

Том 14, № 6
Vol. 14, No. 6
2024

Regulatory research and medicine evaluation

ISSN 3034-3062 (Print)
ISSN 3034-3453 (Online)

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



ГЛАВНАЯ ТЕМА

Риск-ориентированная стратегия в контроле качества
лекарственных средств

www.vedomostincesmp.ru



Услуги ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России осуществляет следующие услуги:

Экспертиза



Экспертная помощь

E-mail:
expert_help@expmed.ru



Ввод в ГО



Ввод в гражданский оборот

E-mail:
osmibp@expmed.ru



Штаммы



Государственная коллекция патогенных микроорганизмов

E-mail:
general@expmed.ru



ФСО



Служба фармакопейных стандартных образцов и фармакопейных исследований

E-mail:
fso@expmed.ru



Трансфер



Центр трансфера медицинских технологий

E-mail:
ctmt@expmed.ru



Обучение



Центр образовательных программ

E-mail:
expert_help@expmed.ru



Приглашаем к сотрудничеству всех заинтересованных представителей фармацевтического сообщества



Уважаемые читатели!

Данный выпуск журнала посвящен актуальным вопросам повышения эффективности контроля качества лекарственных средств, который в настоящее время осуществляется с применением принципов управления рисками. Оценку безопасности действующих и вспомогательных веществ лекарственных средств, а также их примесей, проводят с учетом их терапевтической дозы и путей введения в организм.

В рамках риск-ориентированной стратегии контроля качества лекарственных средств основной акцент делается на замену неселективных методов контроля селективными, а также на повышение селективности и чувствительности применяемых методик. При контроле содержания действующих веществ лекарственных средств природного происхождения применение селективных методов позволяет идентифицировать конкретные действующие вещества, которые ранее определялись в виде групп отдельных биоактивных соединений. Перечень примесей, подлежащих контролю в рамках риск-ориентированной стратегии, определяют на основе результатов предварительного мониторинга их содержания и анализа требований нормативной документации.

В выпуске представлены статьи, которые охватывают широкий спектр тем, начиная от селективных методов анализа до определения оптимальных условий дозирования при длительной терапии биомедицинским клеточным продуктом.

Я уверена, что материалы этого выпуска будут полезны как для исследователей, так и для практикующих специалистов, работающих в сфере контроля качества лекарственных средств, и послужат стимулом для дальнейших научных изысканий в этой критически важной области.

*Искренне ваша,
главный редактор*

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

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 Ольга Федоровна
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц.

**Ответственный редактор
тематического выпуска:**

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук

Научные редакторы:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук
Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Балтина Любовь Александровна

Менеджер по развитию:

Мжельский Александр Анатольевич

Адрес учредителя и редакции:

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

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 1999 году.

Предыдущее название журнала:
Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского при-
менения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных
средств (до мая 2024 г.)

Выходит шесть раз в год.

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и междунаро-
дных реферативных и индексных базах данных:
Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитиро-
вания (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, его архив
включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек
WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия
Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives
Initiative, ResearchBib, ЭБС ЛАНБ, Research4life, Lens.org, Openaire.eu,
Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ — 0,571.

Входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых долж-
ны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой
степени доктора наук (категория К1).

В журнале освещаются передовые достижения в сфере стандартиза-
ции 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 высоко-
технологичные методы доклинических и клинических исследований
лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фар-
макологии, клинической медицины, вопросы рационального приме-
нения лекарственных препаратов на основе принципов персонализиро-
ванной терапии.

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

- Промышленная фармация и технология получения лекарств;
- Фармацевтическая химия, фармакогнозия;
- Организация фармацевтического дела;
- Фармакология, клиническая фармакология.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 (CC BY 4.0)	
Подписано в печать:	12.12.2024
Дата выхода в свет	18.12.2024
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» — 57942
	в каталоге агентства «Урал-Пресс» — 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2024

Редакционная коллегия

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Ответственный секретарь

Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Члены редакционной коллегии

Астапенко Елена Михайловна, канд. техн. наук, Минздрав России (Москва, Россия)

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

Глаголев Сергей Владимирович, Минздрав России (Москва, Россия)

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

Гурина Наталия Сергеевна, д-р биол. наук, проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Республика Беларусь)

Дмитриев Виктор Александрович, канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

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

Егорова Светлана Николаевна, д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

Елизарова Ольга Сергеевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Кайтель Сьюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

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

Кодина Галина Евгеньевна, канд. хим. наук, доцент (Москва, Россия)

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

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

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

Потанина Ольга Георгиевна, д-р фарм. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

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

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, 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.
Исполнитель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	150 экз. Цена свободная

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder and publisher:

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

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.

Guest Editor for the Special Issue:

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

Science Editors:

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

Editor:

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

Translation Editor:

Liubov A. Baltina

Development Manager:

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder and editorial office:

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

www.vedomostincesmp.ru

The journal was founded in 1999.

The journal was titled Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation until May 2024.

The journal was published six times per year.

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

The journal's two-year impact factor is 0.571.

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 (Category K1).

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, and approaches to the evaluation of medicinal products, including assessment of medicine interchangeability. It discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology and clinical medicine, and 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 formulation and manufacturing;
- Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy;
- Pharmaceutical management;
- Pharmacology, clinical pharmacology.

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

Passed for printing:	12.12.2024
Date of publication:	18.12.2024
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2024

Editorial Board

Editor-in-Chief

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

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

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

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

Executive Secretary

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Editorial Board Members

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

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

Natalia S. Gurina, Dr. Sci. (Biol.), Belarusian State Medical University (Minsk, Republic of Belarus)

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 Medical University (Kazan, Russia)

Olga S. Elizarova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Susanne Keitel, Ph.D. (Bonn, Germany)

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

Galina E. Kodina, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof. (Moscow, Russia)

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)

Olga G. Potanina, Dr. Sci. (Pharm.), Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Academician 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)

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

Registration	The journal is registered as a mass medium by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	150 copies. Free price

Содержание

Том 14, №6 2024

ГЛАВНАЯ ТЕМА:		РИСК-ОРИЕНТИРОВАННАЯ СТРАТЕГИЯ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
		КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
Е.Л. Ковалева, О.А. Матвеева, В.В. Шелестова, К.А. Балацкая	620	Фармакопейные требования и требования производителей к качеству твердых желатиновых капсул
А.А. Пономаренко, Л.И. Панова	634	Подходы к оценке качества жирных масел и лекарственных препаратов, представляющих собой масляные растворы
Е.Л. Ковалева, К.С. Архипова, И.М. Алдамова	645	Современные подходы к контролю неродственных технологических примесей в антибиотиках
О.Г. Корнилова, Е.А. Смирязин, В.Л. Багирова, М.А. Сумцов	655	Стандартизация метода определения остаточных органических растворителей (обзор)
Д.Л. Прокушева, Д.С. Круглов, В.В. Величко	663	Оценка возможности использования микроэлементного статуса лекарственного растительного сырья в качестве дополнительного критерия доброкачественности на примере сырья «Ромашки аптечной цветки»
И.Ю. Якупов, С.И. Кулешова, О.Н. Высочанская, Е.П. Симонова	673	Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок малого объема
		ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
Г.И. Горбачевич, Л.С. Зеневич, И.Р. Баталова, С.А. Коваленко, П.М. Бычковский	686	Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов плодовых тел <i>Ganoderma lingzhi</i> и <i>Ganoderma lucidum</i>
Д.С. Круглов	698	Исключение влияния экзогенного загрязнения на микроэлементный состав лекарственных растений
		ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО
Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина	707	Календулы цветки (<i>Calendulae officinalis flos</i>): методы выделения фракций биологически активных веществ
		ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В.О. Небогатиков, Д.И. Салихова, Е.В. Белоусова, Е.В. Броновицкий, Е.А. Орлова, М.А. Лапшина, Д.В. Гольдштейн, А.А. Устюгов	720	Безопасность биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников человека: пилотное исследование на мышах линии C57BL/6J при ретроорбитальном введении

Contents

Volume 14, No. 6 2024

MAIN TOPIC:		RISK-BASED QUALITY CONTROL STRATEGY FOR MEDICINES
		QUALITY CONTROL OF MEDICINES
E.L. Kovaleva, O.A. Matveeva, V.V. Shelestova, K.A. Balatskaya	620	Pharmacopoeias' and Manufacturers' Requirements for the Quality of Hard Gelatin Capsule Shells
A.A. Ponomarenko, L.I. Panova	634	Approaches to Assessing the Quality of Fatty Oils and Medicinal Products Formulated as Oily Solutions
E.L. Kovaleva, K.S. Arhipova, I.M. Aldamova	645	Current Approaches to the Control Of Process-Related Impurities in Antibiotics
O.G. Kornilova, E.A. Smiryagin, V.L. Bagirova, M.A. Sumtsov	655	Standardisation of the Method of Residual Organic Solvent Determination (Review)
D.L. Prokusheva, D.S. Kruglov, V.V. Velichko	663	Assessment of the Possibility of Using the Trace Element Status of a Herbal Drug as an Additional Quality Criterion: Chamomile Flowers as a Case Study
I.Yu. Yakupov, S.I. Kuleshova, O.N. Vysochanskaya, E.P. Simonova	673	Quantitative Determination of Naftifine and Its Degradation Products in Medicines by HPLC with Small-Volume Columns
		HERBAL MEDICINAL PRODUCTS
H.I. Harbatsevich, L.S. Zenevich, I.R. Batalova, S.A. Kovalenko, P.M. Bychkovsky	686	Chemical Composition and Antioxidant Activity of <i>Ganoderma lingzhi</i> and <i>Ganoderma lucidum</i> Fruiting Body Extracts
D.S. Kruglov	698	Elimination of Exogenous Pollution Influence on the Microelement Composition of Medicinal Plants
		PHARMACEUTICAL MANUFACTURING
R.I. Lukashou, N.S. Gurina	707	Calendula Flowers (<i>Calendulae officinalis flos</i>): Methods to Obtain Fractions of Biologically Active Substances
		PRECLINICAL STUDIES
V.O. Nebogatikov, D.I. Salikhova, E.V. Belousova, E.V. Bronovitsky, E.A. Orlova, M.A. Lapshina, D.V. Goldshtein, A.A. Ustyugov	720	Safety of a Medicinal Product Based on Human Glial Progenitor Cells: A Pilot Study of Retrobulbar Administration in C57BL/6J Mice



Е.Л. Ковалева 
О.А. Матвеева 
В.В. Шелестова 
К.А. Балацкая 

Фармакопейные требования и требования производителей к качеству твердых желатиновых капсул

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

✉ Матвеева Оксана Анатольевна; matveeva@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Отсутствие национальных требований, регламентирующих качество твердых желатиновых капсул (ТЖК) без содержимого (до их заполнения лекарственным средством), вызывает трудности не только у разработчиков и производителей капсул, но также и у экспертов, осуществляющих оценку представленных на экспертизу материалов. В связи с этим представляется актуальным проведение сравнительного анализа требований к оценке качества ТЖК в России и за рубежом для подготовки проекта фармакопейной статьи на ТЖК без содержимого.

ЦЕЛЬ. Оценка уровня требований к качеству ТЖК, выбор показателей качества, нормативных требований, методов и методик анализа для подготовки проекта фармакопейной статьи на ТЖК.

ОБСУЖДЕНИЕ. По результатам проведенного исследования показано, что растущий интерес производителей к выпуску лекарственных препаратов в форме «капсулы» объясняется преимуществами данной лекарственной формы. В фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ), Китайской Народной Республики (ФКНР), Индии, Республики Корея и Японии включены монографии на ТЖК без содержимого. Завершено обсуждение соответствующей монографии для Фармакопее США. Отмечено, что перечень фармакопейных требований к ТЖК включает контроль по показателям «Описание», «Подлинность (желатин, титана диоксид, красители, консерванты)», «Запах», «Средняя масса капсул», «Распадаемость», «Потеря в массе при высушивании», «Микробиологическая чистота», а также контроль посторонних примесей (сульфатной золы, тяжелых металлов и мышьяка) и консервантов (парабенов, серы диоксида). Сравнительный анализ фармакопейных требований показал, что наиболее детализирован подход к контролю качества ТЖК в ГФ РБ и ФКНР. На основе анализа материалов регистрационных досье на 65 препаратов в форме «капсулы», установлено, что в России чаще всего используют ТЖК восьми производителей. Стандарты качества ТЖК этих производителей содержат все общие показатели качества, соответствующие фармакопейным требованиям, а также дополнительные показатели «Мышьяк», «Смазывающие вещества».

ВЫВОДЫ. В результате проведенного сравнительного анализа фармакопейных стандартов качества на ТЖК и стандартов производителей обоснован выбор необходимых показателей качества, норм и требований для включения в проект фармакопейной статьи на ТЖК без содержимого.

Ключевые слова: твердые желатиновые капсулы; желатин; вспомогательные вещества; красители; консерванты; методы анализа; фармакопейные требования

Для цитирования: Ковалева Е.Л., Матвеева О.А., Шелестова В.В., Балацкая К.А. Фармакопейные требования и требования производителей к качеству твердых желатиновых капсул. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):620–633. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-620-633>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Е.Л. Ковалева — член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2011 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Elena L. Kovaleva 
Oksana A. Matveeva 
Valentina V. Shelestova 
Ksenia A. Balatskaya 

Pharmacopoeias' and Manufacturers' Requirements for the Quality of Hard Gelatin Capsule Shells

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

✉ Oksana A. Matveeva; matveeva@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The lack of national requirements regulating the quality of empty hard gelatin capsule shells (before filling with medicines) causes difficulties not only for capsule developers and manufacturers but also for experts evaluating regulatory submissions. This necessitates a comparative analysis of Russian and international requirements for the quality of hard gelatin capsule shells in order to draft a pharmacopoeia monograph on empty hard gelatin capsule shells.

AIM. This study aimed to analyse the level of quality requirements for hard gelatin capsule shells, the selection of quality attributes for testing, and the applicable methods and analytical procedures for the preparation of a draft monograph for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

DISCUSSION. The results of this study indicate that the growing interest of manufacturers in producing capsule formulations is due to a number of features and advantages of this dosage form. Monographs on empty hard gelatin capsule shells are available in the State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, the Indian Pharmacopoeia, the Pharmacopoeia of the People's Republic of China, the Korean Pharmacopoeia, and the Japanese Pharmacopoeia. The pharmacopoeial requirements for hard gelatin capsule shells include testing for quality attributes, such as description, identification (gelatin, titanium dioxide, dyes, and preservatives), odour, average capsule mass, disintegration, loss on drying, microbiological quality, impurities (sulfate ash, heavy metals, and arsenic), and preservatives (parabens and sulfur dioxide). Compared with other pharmacopoeias, the pharmacopoeias of Belarus and China provide the most detailed approach to the control of hard gelatin capsule shells. According to the materials of registration dossiers for 65 medicinal products formulated as capsules, the hard gelatin capsule shells that are most frequently used in Russia are produced by eight manufacturers. The specifications of these manufacturers include all the common quality attributes described in the pharmacopoeias and additional tests for arsenic and lubricants.

CONCLUSIONS. The results of this comparative analysis of pharmacopoeial quality standards and manufacturers' specifications for hard gelatin capsule shells justify the selection of the necessary quality attributes, limits, and requirements for inclusion in the draft monograph on empty hard gelatin capsule shells.

Keywords: hard gelatin capsules; gelatin; excipients; dyes; preservatives; methods of analysis; pharmacopoeial requirements

For citation: Kovaleva E.L., Matveeva O.A., Shelestova V.V., Balatskaya K.A. Pharmacopoeias' and manufacturers' requirements for the quality of hard gelatin capsule shells. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):620–633. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-620-633>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Elena L. Kovaleva has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2011. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Твердые желатиновые капсулы (ТЖК) широко используются для производства лекарственных препаратов (ЛП). Капсульное производство в СССР появилось еще во второй половине XX века, но до сих пор в Российской Федерации отсутствуют общие требования к контролю каче-

ства пустых ТЖК (без содержимого). Представляется актуальным проведение сравнительного анализа требований зарубежных фармакопей к качеству ТЖК, который может стать основой для подготовки проекта соответствующей фармакопейной статьи (ФС) для Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ).

Цель работы — оценка уровня требований к качеству твердых желатиновых капсул (ТЖК), выбор показателей качества, нормативных требований, методов и методик анализа для подготовки проекта фармакопейной статьи на ТЖК.

Задачи исследования:

- оценить объемы применения ТЖК для производства зарегистрированных в Российской Федерации препаратов в лекарственной форме «капсулы»;
- провести сравнительный анализ требований зарубежных фармакопей к качеству ТЖК;
- провести сравнительный анализ нормативных документов производителей, регламентирующих качество ТЖК (спецификаций, сертификатов качества, аналитических методик на ТЖК).

В работе использовали методы сравнительного информационно-аналитического исследования и контент-анализа. Проведен сравнительный анализ требований к качеству пустых ТЖК, которые описаны в ФС «Капсулы твердые желатиновые» Государственной фармакопеи Республики Беларусь (ГФ РБ)¹, монографиях «Vacant Gelatin Capsules» Фармакопеи Китайской Народной Республики (ФКНР)², «Hard Gelatin Capsule Shells» Индийской фармакопеи (ИФ)³, «Hard Gelatin Capsule Shells» Японской фармакопеи (ЯФ)⁴, «Capsules» Фармакопеи Республики Корея (ФРК)⁵ и проекте монографии «Hard Gelatin Capsule Shells» для Фармакопеи США (USP)⁶.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Общая характеристика ТЖК и их получение.

Под капсулами подразумевают как готовые дозированные формы, состоящие из полимерной оболочки, наполненные различными веществами, так и незаполненные емкости заданных размеров, предназначенные для капсулирования⁷.

Среди дозированных лекарственных форм ЛП в капсулах занимают приоритетное положение после таблеток и растворов в ампулах [1]. Производство и потребление лекарственных средств в форме капсул в России увеличивается [2]. К преимуществам лекарственной формы «капсулы» можно отнести высокую точность дозирования помещаемых в них лекарственных веществ ($\pm 3\%$), маскировку неприятных органолептических свойств лекарственных средств

(вкуса, запаха), удобство в применении (некоторые капсулы благодаря гладким и скользящим оболочкам легче принимать внутрь), способность оболочки капсулы обеспечивать защиту от разрушающей среды желудочно-кишечного тракта и предупреждать контакт с пищей и другими лекарственными средствами, возможность применять субстанции в неизменном виде, не подвергая их влажной грануляции, тепловому воздействию, давлению (как при производстве таблеток), возможность использовать меньшее количество вспомогательных веществ, чем при производстве таблеток [3]. Снижение качества ТЖК может привести к неэффективной доставке действующего вещества в организм человека [4].

В зависимости от содержания пластификаторов, физических характеристик оболочки и технологии получения различают два типа капсул: мягкие (с цельной оболочкой) и твердые (корпус с крышечкой) [5]. Мягкие желатиновые капсулы (МЖК) получили свое название от того, что в процессе их изготовления наполнитель помещают в еще мягкую, эластичную оболочку, после чего капсулы подвергаются дальнейшим процессам формования, в результате которых первоначальная эластичность оболочки частично, а иногда и полностью теряется [6]. ЛП в форме МЖК представлены на рынке в меньшем количестве по сравнению с препаратами в ТЖК. Доля зарегистрированных препаратов, выпускаемых в ТЖК, на российском рынке составляет 91%, а в МЖК, соответственно, 9% [2]. Твердые капсулы заполняют лекарственным средством только после полного технологического цикла формования, когда готовые оболочки приобретут жесткость [7]. Как правило, пустые ТЖК не производятся самим производителем ЛП, а закупаются в готовом виде. Процесс получения ТЖК не является простым из-за ряда технологических ограничений: большая длительность процесса формования по сравнению с таблетированием из-за медленной сушки капсул, необходимость контроля качества капсул, возможность потенциальных дефектов (протекание, деформация или склеивание капсул), высокая доля отходов (до 30%) в процессе производства капсул, гигроскопичность и возможность контаминации желатиновой оболочки

¹ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

² Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

³ Indian Pharmacopoeia. 9th ed. 2022.

⁴ Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. English version; 2021.

⁵ Korean Pharmacopoeia. 12th ed. 2024.

⁶ <https://www.uspnf.com/pharmacopeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

⁷ ОФС.1.4.1.005 Капсулы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

микроорганизмами, что требует применения консервантов и соблюдения определенных условий хранения [8]. Для производства ТЖК в настоящее время применяют в основном метод погружения, основанный на использовании охлажденных, смазанных маслом специальных «макальных» рам со штифтами в форме капсул. Штифты опускают в нагретую желатиновую массу, которая застывает на них тонкой оболочкой, после чего оболочку снимают и формуют капсулы⁸ [9, 10].

По внешнему виду ТЖК представляют собой цилиндр с полусферическими концами, состоящий из двух частей — корпуса и крышечки, которые входят одна в другую, не образуя зазоров. Для надежного соединения корпуса с крышечкой и предотвращения их раскрытия в процессе транспортировки на капсулах предусмотрены «замки» в виде специальных канавок и выступов [11]. ТЖК имеют восемь стандартных типоразмеров от 5 до 000 вместимостью от 0,13 до 1,37 мл и дополнительный девятый типоразмер № 0el вместимостью 0,78 мл (0 elongated), т.е. размер 0 капсул удлиненной формы⁹. Согласно ГФ РФ XV изд. допускается возможность использования капсул других размеров¹⁰.

Ранее, до 1980-х гг., ТЖК наполняли в основном порошками и гранулами, в настоящее время ТЖК наполняют также капсулами меньших размеров, микрокапсулами, микротаблетками, пеллетами, липофильными вязкими жидкостями, пастами. В зависимости от способа применения различают капсулы для приема внутрь, капсулы ректальные, капсулы для рассасывания, капсулы жевательные, капсулы вагинальные, капсулы с порошком для ингаляций и др.¹¹

Основным компонентом капсульной оболочки является желатин, используют и другие полимерные структурообразователи и вспомогательные вещества: непрозрачные наполнители, поверхностно-активные вещества, антимикробные консерванты, красители, ароматизаторы, разрешенные к медицинскому применению¹².

Желатин — продукт частичного гидролиза коллагена, образующего главную часть соедини-

тельной ткани позвоночных. Наиболее часто используемыми источниками желатина являются свиная кожа (46%), бычьи шкуры (29,4%), кости свиней и крупного рогатого скота (23,1%), кости и хрящи рыб (1,5%) [12]. Используемый метод гидролиза коллагена определяет природу конечного продукта, обозначенного как желатин марки А (кислотный) и марки В (щелочной), которые различаются между собой по ряду физико-химических показателей [11, 13]. В Российской Федерации получают желатин марки В, а за рубежом в производстве капсул используют смеси желатина А и В, получая желатиновую массу с наиболее оптимальными реологическими характеристиками (прочность, вязкость и др.) [14].

Фармакопейные требования к качеству ТЖК.

Оценивают внешний вид капсул, их форму, поверхность и структуру, исходные компоненты, входящие в состав капсул. Капсулы должны иметь гладкую поверхность, не должны содержать воздушных пузырьков и механических повреждений¹³.

Согласно ГФ РБ¹⁴ требуется определение внешнего вида и физических характеристик капсул с указанием количества испытуемых капсул и методик анализа. Соответствие физических характеристик капсул определяют по параметрам «длина закрытой на «замок» капсулы», «толщина стенки капсулы», «масса 100 капсул», указаны допустимые отклонения. По ИФ¹⁵ так же, как и по ГФ РБ, предусмотрена оценка внешнего вида и размеров капсул. В ФКНР приведено описание капсул, но, в отличие от ГФ РБ и ИФ, указание размеров не предусмотрено, однако предусмотрено определение запаха капсул в рамках показателя «Описание» с нормой «Запах отсутствует»¹⁶. В монографии ИФ определение запаха вынесено в отдельный показатель «Запах». Определение по этому показателю проводится на 100 капсулах, предварительно выдержанных в герметично укупоренном сосуде при температуре 30–40 °С в течение суток (норма: «Не должно наблюдаться постороннего запаха»). В соответствующей монографии ФРК описание ограничено одной фразой «Эластичные

⁸ Мягкие лекарственные формы Желатиновые капсулы. Изготовление оболочек капсул способом погружения. В кн.: Быковский СН, Василенко ИА, Демина НБ, ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо; 2015.

⁹ ОФС.1.4.1.005 Капсулы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

¹⁰ Там же.

¹¹ Там же.

¹² Там же.

¹³ Там же.

¹⁴ Капсулы желатиновые. Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

¹⁵ Hard gelatin capsule shells. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. 2022.

¹⁶ Vacant gelatin capsules. Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

и не имеют запаха»¹⁷. Описания внешнего вида капсул в ЯФ не указано¹⁸. В проекте монографии USP определения внешнего вида капсул также не предусмотрено¹⁹.

Согласно ИФ и ГФ РБ требуется определение средней массы капсул. В ГФ РБ по показателю «Масса 100 капсул» нормы не указаны. В монографии ИФ введены значения номинальной массы для капсул пяти размеров (от «0» до «4»), испытанию также подлежат 100 капсул, для которых отклонение средней массы от номинальной должно укладываться в диапазон $\pm 10\%$. В ФКНР, ЯФ и ФРК контроль средней массы капсул не предусмотрен.

Контроль качества капсул включает идентификацию их химического состава. Поскольку основным компонентом ТЖК является желатин, его идентификация является обязательной и осуществляется с использованием качественных реакций. Согласно ФКНР подлинность желатина определяют по реакции с дихроматом калия в растворе соляной кислоты, осаждением белков с таниновой кислотой и в реакции с натронной известью с образованием газа, который окрашивает смоченную красную лакмусовую бумажку в синий цвет (реакция на аминный азот в белках)²⁰.

В ГФ РБ указаны две качественные реакции: с таниновой кислотой и раствором меди(II) сульфата (биуретовая реакция). В монографии ИФ приведены реакции осаждения белков пикриновой и таниновой кислотами. В проекте монографии USP предусмотрено включение двух качественных реакций на желатин: взаимодействие с раствором меди(II) сульфата (биуретовая реакция), в результате которой образуется фиолетовое окрашивание, и идентификация желирующего желатина (нагревание раствора твердых желатиновых капсул до 60 °C в течение 15 мин с последующим выдерживанием до 6 ч при температуре 2–8 °C, в результате при переворачивании пробирки ее содержимое не вытекает)²¹. В ЯФ и ФРК идентификация не предусмотрена. Качественные реакции с раствором меди(II) сульфата, таниновой кислотой и реакция на geleобразование используются в ГФ РФ XIV изд.²²

Для придания более эстетичного вида, обозначения разных дозировок одного и того же ЛП

и удобства при использовании потребителями капсулы при производстве окрашивают. В качестве красителей используют вещества природного происхождения (карминовая кислота, хлорофилл, бета-каротин и др.), малая токсичность которых подтверждена согласно регуляторным требованиям в большинстве стран, неорганические пигменты (красители на основе железа оксида — желтый, красный и черный), а также органические красители, разрешенные к медицинскому применению. Количество красителей в составе одной капсулы, как правило, не превышает 50 мкг.

В ГФ РБ предусмотрена идентификация органических красителей (хинолиновый желтый, апельсиновый желтый, кармузан, понсо 4R, красный очаровательный, индигокармин, бриллиантовый голубой, зеленый S) методом спектрофотометрии в диапазоне от 350 до 650 нм, указаны длины волн, при которых наблюдается максимум поглощения, и удельные показатели поглощения красителей²³. Присутствие в капсулах в качестве красителя железа(III) оксида определяют качественной реакцией зольного остатка с растворами аммония персульфата и аммония роданида с образованием железо-роданидного комплекса, окрашивающего раствор в темно-красный цвет.

Если фармацевтические субстанции являются светочувствительными, используют капсулы с замутнителями — веществами, позволяющими получить непрозрачные капсулы. При добавлении замутнителей в желатиновую массу образуется устойчивая мелкодисперсная суспензия. Чаще всего в качестве замутнителя в состав капсул добавляют титана диоксид, реже — алюминия гидроксид или кальция карбонат. В ГФ РБ предусмотрена идентификация титана диоксида: получают зольный остаток и проводят реакцию с калия сульфатом с последующим добавлением серной кислоты и нескольких капель раствора пероксида водорода, в результате образуется пероксидный комплекс титана(IV), окрашенный в желтый цвет²⁴. В других фармакопеях идентификация красителей и замутнителей не предусмотрена.

В составе желатиновой капсулы вода выполняет функцию пластификатора, при снижении количества воды стенки капсулы теряют эластичность,

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

¹⁸ Hard gelatin capsule shells. Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. English version. 2021.

¹⁹ <https://www.uspnf.com/pharmacopeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

²⁰ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

²¹ <https://www.uspnf.com/pharmacopeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

²² ФС.2.1.0099.18 Желатин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М.; 2018.

²³ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

²⁴ Там же.

становятся хрупкими [15]. Избыточное влажностное содержание приводит к набуханию стенок капсулы. Как повышение, так и понижение влажности капсул может негативно сказываться на свойствах лекарственных средств, которыми заполняют капсулы. Поэтому нормирование содержания влаги по показателю «Потеря в массе при высушивании» является критичным для желатиновых капсул. Согласно требованиям большинства фармакопей испытание проводят из навески массой 1 г при температуре 105 °С. Нормы содержания воды по ГФ РБ, монографиям ФКНР и ИФ укладываются в диапазон 12–17%, в ЯФ указаны более узкие нормы: 13–16%²⁵. Исключение составляют требования USP, согласно которым нижний предел содержания влаги 9,0%²⁶.

Важным показателем качества ТЖК является их распадаемость, которую определяют по скорости разрушения капсул в результате механического воздействия или растворения в воде, либо в кислоте хлористоводородной, либо в искусственном (натуральном) желудочном и (или) кишечном соке. Температура, при которой проводят испытание распадаемости ТЖК, составляет 37±2 °С, если указано, используют диски. В таблице 1 приведено время распадаемости, регламентированное различными фармакопеями.

В монографии ИФ (табл. 1) дополнительно отмечается, что испытание на распадаемость не применяют к капсулам, предназначенным для использования в ингаляционных препаратах. В ЯФ и ФРК контроль распадаемости капсул не предусмотрен. По ФКНР испытания проводят с капсулами, заполненными тальком, что позволяет приблизить полученные результаты к предполагаемым результатам испытания ЛП на распадаемость²⁷. Согласно USP также предусмотрена возможность заполнения капсул вспомогательными веществами: например крахмалом, тальком или лактозой²⁸.

Любая лекарственная форма, включая капсулы, должна оставаться стабильной в течение установленного срока годности, т.е. сохранять свои исходные свойства и соответствовать стандартам качества при соблюдении условий хранения. Чтобы обеспечить стабильность, в состав капсул добавляют консерванты, например метилпарагидроксibenzoат и пропилпарагидроксibenzoат, имеющие разный спектр действия и часто используемые в комбинации (в соотношении 4:1). Реже в качестве консерванта используют сорбиновую кислоту. Согласно требованиям ИФ, ЯФ и ФРК на ТЖК содержание консервантов не оценивают, а в ГФ РБ и ФКНР их контроль предусмотрен, испытание проводят методом

Таблица 1. Требования зарубежных фармакопей по показателю «Распадаемость» для контроля качества твердых желатиновых капсул

Table 1. International pharmacopoeial requirements for the disintegration of hard gelatin capsule shells

Фармакопеи <i>Pharmacopoeias</i>	Нормы <i>Requirements</i>	Интерпретация результатов <i>Result interpretation</i>
Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2012 <i>State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, 2012</i>	Не более 20 мин, диски используют при необходимости. Допускается наличие оболочки на сетке <i>Not more than 20 min; if necessary, add discs. The shell may remain on the basket mesh.</i>	1 этап — 6 капсул. Если 1 или 2 капсулы не распались, испытание повторяют на других 12 капсулах. Не менее 16 из 18 капсул должны распаться <i>Stage 1: 6 capsules. If 1 or 2 capsules fail to disintegrate, repeat the test on 12 additional capsules. The requirements of the test are met if not fewer than 16 of the 18 capsules tested have disintegrated</i>
Фармакопея США, 2024 <i>United States Pharmacopoeia, 2024</i>	Не более 15 мин, с использованием дисков <i>Not more than 15 min; with discs</i>	
Индийская фармакопея, 2022 <i>Indian Pharmacopoeia, 2022</i>	Не более 15 мин, с использованием дисков <i>Not more than 15 min; with discs</i>	
Фармакопея Китайской Народной Республики, 2020 <i>Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020</i>	Заполненные тальком 6 капсул должны распаться в течение 10 мин, если одна из капсул не распалась — проводят повторный тест <i>6 talc-filled capsules disintegrate within 10 min. If 1 capsule fails to disintegrate, repeat the test</i>	1 этап — 6 капсул. Если 1 капсула не распалась, то повторяют испытание на 6 капсулах. Не менее 11 капсул из 12 должны распаться <i>Stage 1: 6 capsules. If 1 capsule fails to disintegrate, repeat the test on 6 additional capsules. The requirements of the test are met if not fewer than 11 of the 12 capsules tested have disintegrated</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

²⁵ Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. English version. 2021.

²⁶ <https://www.uspnf.com/pharmacopoeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

²⁷ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

²⁸ <https://www.uspnf.com/pharmacopoeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание метил- и пропилпарагидроксибензоатов в ГФ РБ нормируется по верхнему пределу — не более 0,4 и 0,1% соответственно²⁹. Согласно ФС ГФ РБ проведение испытания является обязательным, даже если в маркировке не указано наличие консервантов. Отличием требований ФКНР является определение общего содержания парабенов (метил-, этил-, пропил-, и бутилпарагидроксибензоатов), которых в сумме должно быть не более 0,05%³⁰. В монографии ФКНР указано, что испытание не проводят, если парабены не используются в производстве капсул.

Помимо определения содержания парабенов, в ФКНР предусмотрен контроль сульфитов, которые, как правило, в виде натрия сульфита или натрия метабисульфита, также могут использоваться при производстве желатиновых капсул. Сульфиты служат источником диоксида серы, являющегося консервантом, остаточное содержание которого в ТЖК не должно превышать 100 ppm (0,01%)³¹. В то же время допустимое содержание диоксида серы в желатине составляет «не более 50 ppm» и регламентировано во всех монографиях на желатин. Увеличение его допустимого предела в ТЖК не совсем объяснимо.

Оценку содержания примесей в ТЖК проводят путем определения общей золы, сульфатной золы и тяжелых металлов. Содержание общей золы характеризует общее содержание веществ минерального происхождения в ЛП и ТЖК и контролируется только согласно требованиям ГФ РБ. Нормы по показателю «Общая зола» для прозрачных и непрозрачных капсул различаются, что связано с содержанием загустителя, как правило, титана диоксида (прозрачные капсулы — не более 2,0%, прозрачные/непрозрачные — не более 5,0%, непрозрачные — не более 7,0%)³². Взамен показателя «Общая зола» в ФКНР предусмотрено определение «Сульфатной золы» (прозрачные капсулы — не более 2,0%, прозрачные/непрозрачные капсулы — не более 3,0%, непрозрачные капсулы — не более 5,0%)³³.

Испытание на тяжелые металлы, согласно ГФ РБ, проводят из зольного остатка, сравнивают окраску испытуемого и эталонного растворов (норма: «не более 0,005%»)³⁴. По показателю «Тяжелые металлы» в ФКНР установлены более жесткие требования: «не более 40 ppm» (0,004%)³⁵, в других фармакопеях контроль тяжелых металлов не предусмотрен.

Согласно ФКНР для ТЖК необходим контроль по показателю «Хром», для содержания которого установлена норма «не более 2 ppm»³⁶. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Обычно соединения хрома используются для дубления шкур, отходы кожевенного производства являются сырьем для получения желатина. В Китае в 2012 г. в желатиновых капсулах было обнаружено высокое содержание хрома, причиной чего являлось использование для производства капсул технического желатина вместо пищевого³⁷. В соответствии с российскими требованиями содержание хрома в пищевом желатине не должно превышать 10 ppm, согласно ГФ РБ XIV изд. также установлен предел содержания хрома «не более 10 ppm»³⁸.

Желатиновая масса является благоприятной средой для размножения микроорганизмов. В ГФ РБ по показателю «Микробиологическая чистота» не приведены нормы, а указана ссылка на статью 5.1.4. «Микробиологическая чистота нестерильных лекарственных средств и фармацевтических субстанций», согласно которой к ТЖК предъявляют общие требования по содержанию аэробных микроорганизмов — не более 1000 КОЕ/г (10^3 КОЕ/г) и грибов — не более 100 КОЕ/г (10^2 КОЕ/г). Дополнительно предусмотрен контроль специфицированных микроорганизмов: ТЖК должны соответствовать требованиям для субстанций природного происхождения (национальные требования) — отсутствие *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* в 1 г; отсутствие *Salmonella* в 10 г; не более 10^2 КОЕ/г грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, либо не более 10^2 КОЕ/г бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при испытании в соответствии

²⁹ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

³⁰ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

³¹ Там же.

³² Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

³³ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

³⁴ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

³⁵ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

³⁶ Там же.

³⁷ Morrison N. SFDA clamps down on chromium-tainted gel capsules. 2012. <https://www.outsourcing-pharma.com/Article/2012/04/23/SFDA-clamps-down-on-chromium-tainted-gel-capsules>

³⁸ ФС.2.1.0099.18 Желатин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

с альтернативной методикой определения. Согласно ФКНР и ИФ, в отличие от требований ГФ РБ, не проводится определение грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*³⁹ и не контролируется содержание дрожжевых и плесневых грибов⁴⁰. Контроль по показателю «Микробиологическая чистота» предусмотрен в ЯФ и проекте монографии USP. Согласно ЯФ контролируют исключительно количество аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов. В монографии ФРК указания по микробиологической чистоте не приведены (табл. 2).

Единые нормы для пустых ТЖК применять некорректно, так как ЛП в лекарственной форме «капсулы» классифицируют в зависимости от способа применения: капсулы для приема внутрь, капсулы для ингаляций и др. ЛП для ингаляций долж-

ны соответствовать требованиям 2-й категории препаратов по микробиологической чистоте согласно ГФ РФ XIV изд.⁴¹, при этом сама капсула в организм человека не попадает, но попадает ее содержимое. ЛП для приема внутрь относят к 3-й категории по микробиологической чистоте.

Такой же дифференцированный подход предусмотрен в проекте монографии USP, определены 4 категории капсул: для приема внутрь, для ингаляций, для назального применения и вагинальные⁴². Требования к микробиологической чистоте капсул, указанные в проекте монографии USP, представлены в таблице 3.

В монографию ФКНР, в отличие от ГФ РБ, ИФ, АФ, ЯФ и ФРК, дополнительно включены показатели качества «Степень уплотнения», «Хрупкость», «Вязкость», «Этиленхлоргидрин», «Этиленоксид (оксан)»⁴³.

Таблица 2. Сравнительная характеристика требований зарубежных фармакопей по показателю «Микробиологическая чистота» для твердых желатиновых капсул

Table 2. Comparison of international pharmacopoeial requirements for the microbiological quality of hard gelatin capsule shells

Определяемый показатель <i>Parameter</i>	Фармакопейные требования <i>Pharmacopoeial requirements</i>			
	ГФ РБ <i>Ph. Bel.</i>	ФКНР <i>ChP</i>	ИФ <i>IP</i>	ЯФ <i>JP</i>
Общее количество аэробных микроорганизмов <i>Total aerobic microbial count</i>	Не более 1000 КОЕ/г <i>Not more than 1000 CFU/g</i>	Не более 1000 КОЕ/г <i>Not more than 1000 CFU/g</i>	Не более 1000 КОЕ/г <i>Not more than 1000 CFU/g</i>	Не более 1000 КОЕ/г <i>Not more than 1000 CFU/g</i>
Общее количество дрожжевых и плесневых грибов <i>Total yeasts and moulds count</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	–	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>
<i>Escherichia coli</i>	Отсутствие в 1 г <i>Absent in 1 g</i>	Отсутствие в 1 г <i>Absent in 1 g</i>	Отсутствие в 1 г <i>Absent in 1 g</i>	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутствие в 1 г <i>Absent in 1 g</i>	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствие в 1 г <i>Absent in 1 g</i>	–	–	–
Грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи <i>Absence of bile-tolerant gram-negative bacteria</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	–	–	–
Бактерии рода <i>Salmonella</i> <i>Absence of Salmonella</i>	Отсутствие в 10 г <i>Absent in 10 g</i>	Отсутствие в 10 г <i>Absent in 10 g</i>	Отсутствие в 10 г <i>Absent in 10 g</i>	–

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ГФ РБ – Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2012; ФКНР – Фармакопея Китайской Народной Республики, 2020; ИФ – Индийская фармакопея, 2022; ЯФ – Японская фармакопея, 2021; «–» – определение не предусмотрено.

Note. Ph. Bel., State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus (2012); ChP, Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020); IP, Indian Pharmacopoeia (2022); JP, Japanese Pharmacopoeia (2021); –, not provided.

³⁹ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

Indian Pharmacopoeia. 9th ed. 2022.

⁴⁰ Indian Pharmacopoeia. 9th ed. 2022.

⁴¹ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁴² <https://www.uspnf.com/pharmacopoeial-forum/pf-legacy-pdfs-archive-28-44>

⁴³ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

Таблица 3. Требования по показателю «Микробиологическая чистота», указанные в проекте монографии Фармакопеи США на твердые желатиновые капсулы**Table 3.** Microbiological quality requirements set forth in the United States Pharmacopeia monograph on hard gelatin capsule shells

Определяемый показатель <i>Parameter</i>	Требования Фармакопеи США для отдельных категорий капсул <i>United States Pharmacopeia requirements for specific types of capsules</i>			
	Для приема внутрь <i>Oral capsules</i>	Для ингаляционного применения <i>Capsules for inhalation</i>	Для назального применения <i>Capsules for nasal use</i>	Для вагинального применения <i>Vaginal capsules</i>
Общее количество аэробных микроорганизмов <i>Total aerobic microbial count</i>	Не более 1000 КОЕ/г <i>Not more than 1000 CFU/g</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>
Общее количество дрожжевых и плесневых грибов <i>Total yeasts and moulds count</i>	Не более 100 КОЕ/г <i>Not more than 100 CFU/g</i>	Не более 10 КОЕ/г <i>Not more than 10 CFU/g</i>	Не более 10 КОЕ/г <i>Not more than 10 CFU/g</i>	Не более 10 КОЕ/г <i>Not more than 10 CFU/g</i>
<i>Escherichia coli</i>	Отсутствие <i>Absent</i>	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	Отсутствие <i>Absent</i>	Отсутствие <i>Absent</i>	Отсутствие <i>Absent</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	Отсутствие <i>Absent</i>	Отсутствие <i>Absent</i>	Отсутствие <i>Absent</i>
Грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи <i>Absence of bile-tolerant gram-negative bacteria</i>	–	Отсутствие <i>Absent</i>	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	Отсутствие <i>Absent</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – определение не предусмотрено.**Note.** –, not provided.

Показатель качества «Степень уплотнения» служит для проверки герметичности капсул, а показатель «Хрупкость» является способом оценки прочности капсул. По показателю «Вязкость» определяют кинематическую вязкость водного раствора капсул. Эти показатели можно отнести к фармацевтико-технологическим испытаниям, которые, по нашему мнению, следует проводить в рамках процесса производства ТЖК.

Этиленоксид (оксан) широко использовался для стерилизации капсул в 1970–1980 гг., но в настоящее время больше не применяется в странах Европейского союза и США, однако используется в Китае⁴⁴ [16]. Этиленоксид представляет собой бесцветный газ, который обладает раздражающим, сенсibiliзирующим и наркотическим действием⁴⁵. Имеются также данные о его канцерогенных свойствах⁴⁶. В монографии ФКНР отмечено, что содержание этиленоксида определяют в случае, если он используется для стерилизации капсул. Этиленхлоргидрин

вместе с этиленгликолем образуются при разрушении этиленоксида. Необходимость количественного определения этиленхлоргидрина связана с его высокой токсичностью. Для определения этиленоксида и этиленхлоргидрина используют метод газовой хроматографии.

Таким образом, на основании проведенного анализа требований зарубежных фармакопей установлено:

- ФС и монографии на пустые ТЖК включены в ГФ РБ, ФКНР, ИФ, ЯФ, ФРК. Подготовлен проект монографии для USP. В Российской Федерации отсутствуют национальные требования, регламентирующие качество ТЖК;
- наиболее детально требования к качеству ТЖК определены в ГФ РБ и ФКНР;
- общими показателями качества для ТЖК согласно требованиям ГФ РБ, ФКНР, ИФ являются «Описание», «Распадаемость», «Подлинность», «Потеря в массе при высушивании», «Микробиологическая чистота».

⁴⁴ Яковлев Г.А. О нежелательности газовой стерилизации pH-зондов (ZrH-зондов) окисью этилена. Функциональная гастроэнтерология. 2014. <https://www.gastroscan.ru/literature/authors/7499>

⁴⁵ Там же.

⁴⁶ Монахова М. Стерилизация излучением, стерилизация этиленоксидом. <http://sterilize.ru/2019/12/22/стерилизация-излучением-стерилизац/>

По ГФ РБ и ФКНР дополнительно необходим контроль содержания примесей и консервантов в ТЖК. Монографии ЯФ и ФРК не содержат большинства требований, указанных в ГФ РБ, ФКНР, ИФ.

Сравнительный анализ требований производителей ТЖК к их качеству. На основании материалов 65 регистрационных досье на ЛП в лекарственной форме «капсулы» (66% ЛП российского производства) проведен сравнительный анализ требований к качеству пустых ТЖК, указанных в нормативных документах производителей (спецификации, сертификаты анализа, паспорта входного контроля, аналитические методы и методики анализа).

Установлено, что большинство российских производителей ЛП используют готовые ТЖК зарубежного производства. Для анализа было отобрано 8 производителей ТЖК, продукция которых чаще всего используется в производстве ЛП (табл. 4).

В результате проведенных исследований установлено, что в сертификатах анализа производители ТЖК обычно указывают информацию о составе капсул (перечень компонентов, количество каждого из них) и стандарты,

регламентирующие их качество. В состав ТЖК большинства производителей помимо желатина также входят титана диоксид и различные красители (железа оксиды и др.). В сертификатах на ТЖК двух производителей в составе дополнительно указаны вода очищенная и натрия лаурилсульфат.

Показатели качества «Описание» и «Подлинность» включены как в зарубежные фармакопеи, так и в сертификаты анализа производителей ТЖК и спецификации готовых ЛП. Для идентификации желатина в составе ТЖК все производители, за исключением одного, используют качественную реакцию с образованием характерного геля при охлаждении раствора капсул, а также качественные реакции с растворами пикриновой, таниновой кислот и меди(II) сульфата. Только один производитель ТЖК проводит подтверждение подлинности желатина в соответствии с методиками монографии ФКНР.

Для идентификации титана диоксида производители используют качественную реакцию с пероксидом водорода, аналогичную указанной в ГФ РБ⁴⁷. Подлинность красителей в составе ТЖК подтверждают методом тонкослойной хроматографии или качественной реакцией с раствором ферроцианида калия (железа оксиды).

Таблица 4. Производители твердых желатиновых капсул, используемых в России для производства готовых лекарственных препаратов в лекарственной форме «капсулы»

Table 4. Manufacturers of hard gelatin capsule shells used in Russia for the production of finished medicinal products formulated as capsules

Название производителя капсул, страна производства <i>Capsule shell manufacturer, country of manufacturing</i>	Количество лекарственных препаратов, выпускаемых в капсулах указанного производителя <i>Number of medicinal products produced using capsule shells from the manufacturer</i>
Capsugel, Бельгия <i>Capsugel, Belgium</i>	28
ACG Europe d.o.o, Хорватия <i>ACG Europe d.o.o, Croatia</i>	19
Hubei Humanwell Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., Китай <i>Hubei Humanwell Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., China</i>	5
Цзянсу Лэфань Кэпсул Ко., Лтд., Китай <i>Jiangsu Lefan Capsule Co., Ltd, China</i>	4
Shanxi Guansheng Medicinal Capsule Co., Ltd (GS Capsule), Китай <i>Shanxi Guansheng Medicinal Capsule Co., Ltd (GS Capsule), China</i>	3
ООО «Артлайф», Россия <i>ООО Artlife, Russia</i>	3
Uni-Capsule (Jiangsu) Capsule Co., Ltd., Китай <i>Uni-Capsule (Jiangsu) Capsule Co., Ltd., China</i>	2
Erawat Pharma Limited, Индия <i>Erawat Pharma Limited, India</i>	1

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

⁴⁷ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. 2012.

Российский производитель ТЖК для идентификации красителей помимо тонкослойной хроматографии использует метод спектрофотометрии.

Производители ТЖК, кроме одного, проводят определение запаха капсул, тогда как только в ГФ РБ, ИФ и ФРК предусмотрен его контроль. В документации российского производителя, помимо запаха, дополнительно приведена информация об отсутствии вкуса у капсул.

Показатели «Средняя масса» и «Размер капсул» включены во все сертификаты анализа производителей ТЖК. В таблице 5 приведены нормы, установленные производителями, по показателю «Средняя масса» для ТЖК в зависимости от их размера.

При анализе данных таблицы 5 можно сделать вывод, что каждый из производителей самостоятельно определяет допустимые нормы отклонений от средней массы, не всегда при этом учитывая размер капсул.

В стандартах качества на пустые ТЖК у всех рассмотренных производителей предусмотрен показатель качества «Распадаемость». ТЖК большинства производителей должны распадаться в течение 15 мин, что соответствует требованиям монографии ИФ, у одного производителя заявлена более жесткая норма «не более 10 мин» по аналогии с требованиями ФКНР

(табл. 1). У российского производителя капсул норма соответствует требованиям ГФ РБ – «не более 20 мин».

Нормы по показателю «Потеря в массе при высушивании» у всех производителей ТЖК указаны в пределах «от 13 до 16%», что соответствует монографии ЯФ, один из производителей установил норму «от 12,5 до 16,0%» согласно монографии ИФ.

Определение посторонних примесей, таких как сульфатная зола, тяжелые металлы и элементные примеси, указано в сертификатах анализа и спецификациях всех производителей. Большинство из них устанавливают норму сульфатной золы в ТЖК на уровне «не более 7%», один из производителей – «не более 5%», что сопоставимо с требованиями, указанными для непрозрачных капсул в монографии ФКНР. У российского производителя нормативные требования дифференцированы: для прозрачных капсул «не более 2%», прозрачных/непрозрачных «не более 5%» и непрозрачных «не более 7%». Контроль общей золы («не более 5%») предусмотрен только одним производителем пустых ТЖК.

Анализ стандартов качества на ТЖК показал, что не все производители контролируют тяжелые металлы. В сертификатах анализа европейских производителей и индийского

Таблица 5. Требования производителей по показателю «Средняя масса» твердых желатиновых капсул в зависимости от их размера

Table 5. Manufacturers' requirements for the average mass of hard gelatin capsule shells depending on the shell size

Производитель капсул <i>Capsule shell manufacturer</i>	Размер и номинальная масса капсул <i>Capsule shell size and nominal mass</i>	Средняя масса капсул, мг <i>Average capsule shell mass, mg</i>
Uni-Capsule (Jiangsu) Capsule Co., Ltd., Китай <i>Uni-Capsule (Jiangsu) Capsule Co., Ltd., China</i>	0 (96,0 мг) <i>(96.0 mg)</i>	90–102 (±6%)
ООО «Артлайф», Россия <i>ООО Artlife, Russia</i>	0 (96,0 мг) <i>(96.0 mg)</i>	88,3–103,7 (±8%)
Capsugel, Бельгия <i>Capsugel, Belgium</i>	1 (76,0 мг) <i>(76.0 mg)</i>	71–81 (±7%)
Цзянсу Лэфань Кэпсул Ко., Лтд., Китай <i>Jiangsu Lefan Capsule Co., Ltd, China</i>	1 (77,0 мг) <i>(77.0 mg)</i>	71–83 (±8%)
Erawat Pharma Limited, Индия <i>Erawat Pharma Limited, India</i>	1 (76,0 мг) <i>(76.0 mg)</i>	68,4–83,6 (±10%)
ACG Europe d.o.o., Хорватия <i>ACG Europe d.o.o, Croatia</i>	2 (63,0 мг) <i>(63.0 mg)</i>	58,6–67,4 (±7%)
Hubei Humanwell Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., Китай <i>Hubei Humanwell Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., China</i>	2 (63,0 мг) <i>(63.0 mg)</i>	57–65 (±7%)
Shanxi Guansheng Medicinal Capsule Co., Ltd (GS Capsule), Китай <i>Shanxi Guansheng Medicinal Capsule Co., Ltd (GS Capsule), China</i>	3 (48,0 мг) <i>(48.0 mg)</i>	45–51 (±6%)

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

производителя отсутствует данный показатель качества, тогда как часть китайских производителей ТЖК осуществляет контроль и элементных примесей, и тяжелых металлов. Некоторые производители определяют содержание хрома («менее 2 ppm») в соответствии с требованиями монографии ФКНР на пустые ТЖК.

Количественное определение парабенов (метилпарагидроксибензоата) включено только в спецификации на ТЖК отечественного производителя. Европейские производители ТЖК в своих сертификатах анализа заявляют об отсутствии консервантов и контроль по данному показателю не проводят. Производитель ТЖК Бельгии также указывает информацию об отсутствии использования этиленоксида и гамма-излучения при производстве капсул.

Определение серы диоксида, которое включено в монографию ФКНР, проводят почти все производители ТЖК, кроме российского. Практически во всех случаях норма содержания серы диоксида составляет «не более 50 ppm», однако в некоторых более поздних сертификатах бельгийского производителя встречается норма «не более 10 ppm». Таким образом, требование к предельному содержанию серы диоксида в нормативных документах производителей ТЖК жестче, чем указано в монографии ФКНР, согласно которой допускается не более 100 ppm серы диоксида⁴⁸.

Важно отметить, что большинство производителей контролируют в капсулах содержание лубрикантов (растительных или минеральных масел и др.), поскольку их используют в процессе производства ТЖК для смазывания металлических форм (стержней). Согласно стандартам качества ТЖК всех производителей содержание лубриканта не превышает значение «0,5%».

В спецификациях некоторых производителей указано, что при производстве капсул могут быть использованы органические растворители 3-го класса токсичности, предельное содержание которых не должно превышать «0,5%». Органические растворители в производстве ТЖК применяют для удаления масел, которыми смазывают рамы со штифтами, или других загрязнений, образующихся при шлифовке поверхности капсул. Чаще всего для промывки капсул применяют трихлорэтилен или изопропиловый спирт⁴⁹.

По сравнению с требованиями ГФ РБ и других зарубежных фармакопей в сертификаты анализа

производителей ТЖК дополнительно включены показатели «Мышьяк» и «Смазывающие вещества», при этом показатели, указанные в ФКНР «Степень уплотнения», «Вязкость» и «Этиленхлорид», отсутствуют.

Таким образом, стандарты качества производителей ТЖК в основном содержат общие показатели качества, соответствующие минимальным фармакопейным требованиям, и дополнительно – определение мышьяка и лубриканта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Российской Федерации отсутствуют национальные требования, регламентирующие качество пустых твердых желатиновых капсул (ТЖК). Общая фармакопейная статья на лекарственную форму «капсулы», включенная как в российскую, так и в зарубежные фармакопеи, распространяется не на желатиновую капсулу, а на уже готовый лекарственный препарат – наполненную капсулу. При этом в ряде зарубежных фармакопей установлены требования к качеству пустых ТЖК. На основании сравнительного анализа этих требований показано, что общими показателями качества для пустых ТЖК в монографиях Государственной фармакопеи Республики Беларусь (ГФ РБ), Фармакопеи Китайской Народной Республики (ФКНР) и Индийской фармакопеи (ИФ) являются «Описание», «Распадаемость», «Подлинность», «Потеря в массе при высушивании», «Микробиологическая чистота». В монографиях ГФ РБ и ФКНР дополнительно требуется определение содержания примесей и консервантов в ТЖК. Стандарты качества на ТЖК производителей капсул содержат все общие показатели качества, включенные в фармакопеи, определение содержания примесей и консервантов, а также дополнительные показатели качества «Мышьяк», «Смазывающие вещества».

Проведенный анализ фармакопейных требований, а также российской и зарубежной нормативной документации, регламентирующей качество ТЖК, свидетельствует о необходимости разработки фармакопейной статьи (ФС) для Государственной фармакопеи Российской Федерации на ТЖК в соответствии с современными требованиями к контролю их качества. При разработке ФС на ТЖК за основу необходимо принимать монографии, приведенные в ФКНР и ГФ РБ. ФС на ТЖК должна включать показатели качества «Описание», «Подлинность

⁴⁸ Chinese Pharmacopoeia. Vol. 4. 2020.

⁴⁹ Грядунова ГП, Козлова ЛМ, Литвинова ТП. Руководство к практическим занятиям по заводской технологии лекарственных форм. М.: Медицина; 1986.

(желатин, красители (в том числе титана диоксид), консерванты)», «Запах», «Средняя масса капсул и однородность по массе», «Размеры капсул», «Распадаемость», «Потеря в массе при высушивании», «Микробиологическая чистота», а также определение посторонних примесей (сульфатной золы, тяжелых металлов и мышьяка / элементных примесей), определение консервантов

и стерилизующего агента (парабенов и серы диоксида).

Наличие ФС позволит отечественным производителям использовать для производства лекарственных препаратов ТЖК, отвечающие современному уровню требований к их качеству. ФС будет использована для контроля качества ТЖК при производстве лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гаммель ИВ, Горбунова СА. Исследование ассортимента лекарственных средств в твердых желатиновых капсулах. *Медицинский альманах*. 2018;(1):121–5. Gammel IV, Gorbunova SA. The study of the range of drugs in hard gelatin capsules. *Medical Almanac*. 2018;(1):121–5 (In Russ.). EDN: [YWNRRNT](#)
2. Гаммель ИВ, Пятигорская НВ, Горбунова СА. Ассортиментный контур сегмента российского фармацевтического рынка лекарственных средств в твердых желатиновых капсулах. *Ремедиум*. 2017;(9):26–30. Gammel IV, Pyatigorskaya NV, Gorbunova SA. The assortment contour of the Russian pharmaceutical market segment – drugs in hard gelatin capsules. *Remedium*. 2017;(9):26–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2017-9-26-30>
3. Степанова ЭФ, Ким МЕ, Мурзагулова КБ, Евсеева СБ. Микрокапсулы: перспективы использования в современной фармацевтической практике. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;(5):767. Stepanova EF, Kim ME, Murzagulova KB, Evseyeva SB. Microcapsules: use prospects in modern pharmaceutical practice. *Modern Problems of Science and Education*. 2014;(5):767 (In Russ.). EDN: [SZVUAZ](#)
4. Jezerska L, Prokes R, Gelnar D, Zegzulka J. Hard gelatine capsules: DEM supported experimental study of particle arrangement effect on properties and vibrational transport behavior. *Powder Technol*. 2022;405:117525. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117525>
5. Демченко ДВ, Пожарская ОН, Шиков АН, Макаров ВГ. История развития производства капсул. *Фармация*. 2015;(8):47–51. Demchenko DV, Pozharitskaya ON, Shikov AN, Makarov VG. History of the development of the manufacture of capsules. *Pharmacy*. 2015;(8):47–51 (In Russ.). EDN: [VBNYBT](#)
6. Романова ЕИ, Молохова ЕИ, Холов АК, Мысов МВ. Разработка состава желатиновой массы для получения мягких желатиновых капсул. *Медицинский альманах*. 2014;(2):135–8. Romanova EI, Molokhova EI, Kholov AK, Mysov MV. The creation of the composition of gelatin mass for producing of soft gelatin capsules. *Medical Almanac*. 2014;(2):135–8 (In Russ.). EDN: [SFNOQE](#)
7. Гумеров РХ, Галиуллина ТН, Тарасова НВ, Егорова СН. Твердые желатиновые капсулы как вместилища для лекарственных средств. *Новая аптека*. 2002;(10):74–6. Gumerov RKH, Galiullina TN, Tarasova NV, Egorova SN. Hard gelatin capsules as a receptacle of medicines. *New Pharmacy*. 2002;(10):74–6 (In Russ.).
8. Кудеева АЮ. Производство твердых желатиновых капсул. *Тенденции развития науки и образования*. 2022;(86-3):148–50. Kudaeva AYU. Production of hard gelatin capsules. *Trends in the Development of Science and Education*. 2022;(86-3):148–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.18411/trnio-06-2022-129>
9. Юрьева ИН. Изучение влияния технологических факторов на показатели качества таблеток и капсул лекарственного препарата «Флуоксетин». *Пермский медицинский журнал*. 2016;33(1):59–65. Yuriyeva IN. Study of influence of technological factors on qualitative indices of fluoxetine tablets and capsules. *Perm Medical Journal*. 2016;33(1):59–65 (In Russ.). EDN: [VOALQR](#)
10. Саенко АЮ, Степанова ЭФ, Петров АЮ, Куль ИЯ. Фармако-технологические исследования желатиновых капсул с циннаризином. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина, фармация*. 2012;(22):150–4. Saenko AYU, Stepanova EF, Petrov AYU, Kool IYa. Pharmaco-technological research of gelatin rectal capsules with cinnarizine. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Series: Medicine, Pharmacy*. 2012;(22):150–4 (In Russ.). EDN: [RDUPWH](#)
11. Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Сравнительный анализ требований к оценке качества желатина, используемого для производства лекарственных средств (Обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(12):49–54. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-12-49-54>
12. Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Comparative analysis of quality assessment requirements for gelatin used in drug production (Review). *Pharm Chem J*. 2017;50:820–5. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1540-4>
13. Шатабаева ЭО, Мун ГА, Шайхутдинов ЕМ, Хуторянский ВВ. Желатин: источники, получение и применение в пищевой промышленности и биомедицине. *Вестник Казахского национального университета. Серия химическая*. 2020;98(3):28–46. Shatabayeva EO, Mun GA, Shaikhutdinov EM, Khutoryanskiy VV. Gelatin: sources, preparation and application in food and biomedicine. *Chemical Bulletin of Kazakh National University*. 2020;98(3):28–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.15328/cb1112>
14. Коель НД, Шах С, Джюка Тенекам И, Хамиякова Т, Саууен Н, Вингерхоетс С, et al. Lipid based formulations in hard gelatin and HPMC capsules: a physical compatibility study. *Pharm Res*. 2021;38(8):1439–54. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03088-8>
15. Молохова ЕИ, Пономарева ЕИ, Сорокина ЮВ, Алексеева ИВ, Рюмина ТЕ, Новикова ВВ и др. Экспериментальное обоснование состава желатиновой массы для получения капсул с эфирными маслами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):63–8. Molokhova EI, Ponomareva EI, Sorokina YuV, Alekseeva IV, Ryumina TE, Novikova VV, et al. Experimental substantiation of the composition of gelatin mass for obtaining

- capsules with essential oils. *Drug Development & Registration*. 2021;10(4):63–8 (In Russ.).
[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-63-68](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-63-68)
15. Асякина ЛК, Просяков АЮ, Ульрих ЕВ, Белова ДД. Исследование деградации пленок и капсул из растительных аналогов фармацевтического желатина. *Фундаментальные исследования*. 2014;(9–11):2369–74.
16. Podczeczek F, Jones BE, eds. *Pharmaceutical capsules*. Pharmaceutical Press; 2004.
- Asyakina LK, Prosekov AYU, Ulrikh EV, Belova DD. Study of degradation of films and capsules plant analogs pharmaceutical gelatine. *Fundamental Research*. 2014;(9–11):2369–74 (In Russ.).
EDN: [SWOJAB](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.Л. Ковалева — идея, разработка концепции исследования, ответственность за все аспекты работы, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; О.А. Матвеева — систематизация и анализ нормативных требований, ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей рукописи; В.В. Шелестова — сбор, анализ и интерпретация данных литературы и нормативных документов, написание отдельных частей текста рукописи; К.А. Балацкая — сбор данных литературы, анализ нормативной документации производителей, написание отдельных частей текста рукописей, подготовка материалов к проекту фармакопейной статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Elena L. Kovaleva* conceived the study idea, conceptualised the study, agreed to be accountable for all aspects of the work and the academic integrity of the article, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication. *Oksana A. Matveeva* collated and analysed regulatory requirements and agreed to be accountable for all aspects of the work and the academic integrity of the article. *Valentina V. Shelestova* collected, analysed, and interpreted literature data and regulatory documents and drafted individual sections of the manuscript. *Ksenia A. Balatskaya* collected literature data, analysed manufacturers' documentation, drafted individual sections of the manuscript, and prepared materials for the draft pharmacopoeial monograph.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук / **Elena L. Kovaleva**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4163-6219>

Матвеева Оксана Анатольевна / **Oksana A. Matveeva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8647-3305>

Шелестова Валентина Васильевна, канд. фарм. наук / **Valentina V. Shelestova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3850-5501>

Балацкая Ксения Александровна / **Ksenia A. Balatskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0949-4276>

Поступила 12.09.2024

После доработки 08.11.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 12 September 2024

Revised 8 November 2024

Accepted 4 December 2024



А.А. Пономаренко ,
Л.И. Панова 

Подходы к оценке качества жирных масел и лекарственных препаратов, представляющих собой масляные растворы

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

✉ Пономаренко Анна Александровна; Kuzovkova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В составе лекарственных препаратов (ЛП), представляющих собой масляные растворы, масла жирные растительные (МЖР) могут составлять 50% и более (в некоторых случаях ЛП может на 100% состоять из МЖР). Качество используемого МЖР и протекающие в нем процессы будут оказывать существенное влияние на качество ЛП. Технологический процесс производства, условия хранения и транспортировки ЛП относятся к факторам, влияющим на образование примесей в МЖР, следовательно, актуальным вопросом является рассмотрение национального и международного подходов к оценке примесей в МЖР и ЛП на их основе. **ЦЕЛЬ.** Анализ фармакопейных требований к контролю примесей в МЖР и их обобщение в виде рекомендаций для производителей лекарственных препаратов, представляющих собой масляные растворы с содержанием МЖР от 50 до 100%. **ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведен сравнительный анализ требований Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) и ведущих зарубежных фармакопей к контролю примесей в МЖР на примере масел, наиболее часто используемых в качестве растворителей в производстве жидких лекарственных форм (кунжутное, оливковое, подсолнечное, соевое, рапсовое, касторовое). Установлено, что профиль примесей на одноименные МЖР в монографиях ведущих зарубежных фармакопей, как правило, различается либо качественно, либо количественно и зависит от типа используемого масла, а также различаются требования к содержанию примесей в МЖР в зависимости от предполагаемой к производству лекарственной формы. В ГФ РФ отсутствуют частные фармакопейные статьи на наиболее часто используемые в процессе производства ЛП МЖР (подсолнечное, оливковое, кунжутное, рапсовое). Оценка качества таких масел осуществляется в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи (ОФС) «Масла жирные растительные» ГФ РФ. Требования же к оценке качества ЛП, представляющих собой масляные растворы, приведены только в ОФС «Растворы» ГФ РФ, согласно которой определяют «Кислотное число» и «Пероксидное число». **ВЫВОДЫ.** При подготовке фармакопейных статей на ЛП, представляющие собой масляные растворы, необходимо стандартизировать подходы к оценке примесей, а именно предусмотреть обязательный контроль по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число», поскольку данные показатели характеризуют качество используемого масла как на момент производства, так и в процессе хранения.

Ключевые слова: масла жирные растительные; фармакопейные требования; кислотное число; пероксидное число; йодное число; окисление; Европейская фармакопея; Фармакопея США; масляные растворы

Для цитирования: Пономаренко А.А., Панова Л.И. Подходы к оценке качества жирных масел и лекарственных препаратов, представляющих собой масляные растворы. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):634–644. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-634-644>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© А.А. Пономаренко, Л.И. Панова, 2024

Anna A. Ponomarenko ,
Lyudmila I. Panova 

Approaches to Assessing the Quality of Fatty Oils and Medicinal Products Formulated as Oily Solutions

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

✉ Anna A. Ponomarenko; Kuzovkova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Vegetable fatty oils can comprise over 50% of a medicinal product formulated as an oily solution (in some cases, 100%). The quality of the vegetable fatty oil used and the processes occurring in this oil have a significant impact on the quality of the medicinal product. The factors that influence the formation of impurities in vegetable fatty oils include the manufacturing process and storage and transportation conditions. Therefore, it is necessary to analyse national and international approaches to the assessment of impurities in vegetable fatty oils and medicinal products based on vegetable fatty oils.

AIM. This study aimed to analyse pharmacopoeial requirements for the control of impurities in vegetable fatty oils and summarise these requirements as recommendations for manufacturers of oily solution formulations containing 50–100% of vegetable fatty oils.

DISCUSSION. This study compared the requirements of national and international pharmacopoeias (State Pharmacopoeia of the Russian Federation, European Pharmacopoeia, and United States Pharmacopoeia) for the control of impurities in vegetable fatty oils. The comparative analysis focused on the vegetable fatty oils most frequently used as solvents for the production of liquid dosage forms (sesame, olive, sunflower, soya-bean, rapeseed, and castor oils) as a case study. According to the results, as a rule, the impurity profiles provided by the monographs of the leading international pharmacopoeias for the same vegetable fatty oils differ, either qualitatively or quantitatively, and depend on the type of oil. Additionally, the pharmacopoeial limits for impurities in vegetable fatty oils vary depending on the intended dosage form. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation lacks individual monographs for some of the vegetable fatty oils most frequently used in the production of medicinal products (sunflower, olive, sesame, and rapeseed oils). The State Pharmacopoeia of the Russian Federation requires that the quality of these oils should be assessed using the general approach described in the general monograph *Vegetable fatty oils*, whereas the requirements for the quality of medicinal products formulated as oily solutions are provided exclusively in the general monograph *Solutions*, which includes the acid value and peroxide value tests.

CONCLUSIONS. To draft pharmacopoeial monographs for oily solution formulations, it is necessary to standardise approaches to assessing impurities, in particular, to provide for mandatory acid value and peroxide value testing, as these attributes characterise the quality of oils during both production and storage.

Keywords: fatty vegetable oils; pharmacopoeial requirements; acid value; peroxide value; iodine value; oxidation; European Pharmacopoeia; United States Pharmacopoeia; oily solutions

For citation: Ponomarenko A.A., Panova L.I. Approaches to assessing the quality of fatty oils and medicinal products formulated as oily solutions. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):634–644. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-634-644>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В лекарственных препаратах (ЛП) масла жирные растительные (МЖР) могут использоваться как в качестве действующих, так и в качестве вспомогательных веществ. Наиболее часто

МЖР используют в качестве вспомогательных веществ при производстве различных лекарственных форм: растворов для парентерального применения, растворов для приема внутрь и для наружного применения, суппозиториях,

капсул, линиментов, мазей и т.д. При этом в качестве вспомогательных веществ, как правило, используют не обладающие выраженной фармакологической активностью МЖР (например, подсолнечное, касторовое масло и др.). Их применяют, если активная фармацевтическая субстанция не растворима в воде (ЛП, содержащие в качестве действующего вещества жирорастворимые витамины) или если необходимо обеспечить пролонгированное действие ЛП.

В качестве растворителей МЖР используют при производстве ЛП, содержащих нейролептики, гестагены, андрогены, эстрогены, поливитамины, слабительные и местнораздражающие средства и др. [1]. Большинство ЛП, относящихся к нейролептикам и гормональным средствам, обычно представляют собой лекарственные формы для парентерального применения.

Масляные растворы поливитаминов выпускают как в виде парентеральных лекарственных форм, так и в виде растворов для приема внутрь, а слабительные средства производят в виде растворов для приема внутрь. Содержание МЖР в таких ЛП составляет 50% и более (в некоторых случаях более 90%), в некоторых случаях ЛП может на 100% состоять из МЖР (касторовое масло). Следовательно, качество используемого МЖР и его стабильность в процессе хранения будут определять качество готового ЛП.

При анализе нормативной документации производителей на ЛП, в составе которых МЖР составляют более 50%, были выявлены различия в подходе к контролю качества этих препаратов. Неблагоприятные условия при производстве ЛП в форме масляных растворов могут приводить к разложению и окислению исходного МЖР и стать причиной увеличения примесей в препарате. Поскольку в настоящее время в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) отсутствуют фармакопейные статьи на ЛП, представляющие собой масляные растворы, возникла необходимость стандартизации фармакопейных требований к оценке примесей в наиболее часто используемых МЖР и ЛП на их основе.

Цель работы — анализ фармакопейных требований к контролю примесей в маслах жирных растительных и их обобщение в виде рекомендаций для производителей лекарственных препаратов, представляющих собой масляные растворы с содержанием МЖР от 50 до 100%.

Задачи исследования:

- провести сравнительный анализ требований ведущих зарубежных фармакопей (Европейская фармакопея¹ (Ph. Eur.), Фармакопея США² (USP)) к оценке примесей в маслах, наиболее часто используемых в качестве растворителей в производстве жидких лекарственных форм (кунжутное, оливковое, подсолнечное, соевое, рапсовое, касторовое);
- проанализировать подходы к оценке примесей в МЖР и ЛП, принятые в ГФ РФ и Фармакопее Евразийского экономического союза (ФЕАЭС);
- обобщить подходы к выбору методов анализа примесей в ЛП, представляющих собой масляные растворы, и сформулировать рекомендации производителям по составлению спецификаций на ЛП.

Исследование было проведено информационно-аналитическим методом.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Согласно требованиям общей фармакопейной статьи (ОФС) «Масла жирные растительные»³ МЖР — это природные смеси, состоящие из триглицеридов (сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот). В зависимости от состава триглицеридов МЖР подразделяют на невымсыхающие, полувымсыхающие, вымсыхающие. Степень ненасыщенности жирных кислот характеризуется значением йодного числа масла, и это значение позволяет оценить способность масел к вымсыханию. Если в составе масла преобладает олеиновая кислота и значение йодного числа составляет менее 100, то такие масла будут относиться к невымсыхающим (оливковое, касторовое и др.). Если в составе масла преобладает линолевая кислота и значение йодного числа составляет 100–140, то масло будет относиться к полувымсыхающим (подсолнечное, соевое, рапсовое и др.). Если же в составе масла преобладает линоленовая кислота, значение йодного числа составляет 140 и более, то масло будет относиться к вымсыхающим (кунжутное, льняное и др.) [2].

При выборе МЖР в качестве вспомогательного вещества необходимо принимать во внимание функциональные характеристики масла, способные оказывать влияние на стабильность, биодоступность или технологический процесс производства ЛП [2].

¹ European Pharmacopoeia. 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

² United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville, MD; 2024.

³ ОФС.1.5.2.0002 Масла жирные растительные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

Для приготовления нестерильных масляных растворов используют как невысыхающие, так и полувывсыхающие масла. В качестве растворителей для стерильных масляных растворов должны использоваться невысыхающие, легкоподвижные и маловязкие жирные масла (ЖМ), которые относительно легко проходят через каналы инъекционных игл (например, оливковое масло) [2].

Примеси, определяемые в МЖР, имеют различное происхождение: образуются в процессе роста и развития растения и извлекаются вместе с маслом (например, белки) или могут оставаться в маслах после проведения экстракции и очистки (например, остаточные органические растворители, вода и мыла). Впоследствии остаточная вода индуцирует гидролиз, в результате которого в процессе хранения и транспортировки масла могут образоваться гидропероксидные соединения.

В процессе получения и хранения МЖР подвергаются самоокислению, а также окислению на свету, что приводит к образованию соединений, ухудшающих вкус и качество масла, и токсичных продуктов окисления⁴. Окисление ненасыщенных жирных кислот с образованием пероксидных и гидропероксидных соединений — одна из основных причин порчи масел [2]. Физико-химическая стабильность МЖР в процессе производства и хранения является важной характеристикой, так как определяет качество масла и срок его годности.

Загрязненность масла гидропероксидами (показатель «Пероксидное число») является характеристикой ранней порчи масла. Позднюю стадию порчи масла характеризует показатель «Анизидиновое число», позволяющий оценить загрязненность масла альдегидами, образующимися при окислении гидропероксидов [3, 4]. «Кислотное число» позволяет оценить количество свободных жирных кислот и других нейтрализуемых щелочью примесей. Свободные жирные кислоты, образующиеся при гидролизе триацилглицеридов, ухудшают органолептические свойства масла. Их присутствие указывает на протекающие в масле процессы окислительного прогоркания [3, 4].

Содержание остаточных органических растворителей определяют, если они были исполь-

зованы в процессе производства масла. Мыла используются в процессе очистки масла и, следовательно, могут остаться в нем. Цианиды и синильную кислоту определяют в маслах, полученных с использованием семян семейства розоцветных (например, миндаля) [3]. Вода, используемая в процессе производства масел при щелочной очистке и оставшаяся после сушки, способствует реакциям ферментативного гидролиза, в результате которых увеличивается количество свободных жирных кислот в масле, поэтому определение содержания воды в масле является важным показателем.

Присутствие белков ускоряет порчу растительных масел, ухудшает их товарный вид, увеличивает потери при рафинировании и хранении. Белки способны вступать в химическое взаимодействие с другими веществами МЖР⁵.

К факторам, влияющим на окисление масел, относят: жирнокислотный состав масел (более ненасыщенные масла окисляются быстрее, чем менее ненасыщенные); используемый технологический процесс производства (стабильность к окислению МЖР, полученного методом экстракции, в некоторых случаях выше, чем полученного прессованием); влияние температуры и света (автоокисление масел и распад гидропероксидов ускоряются с увеличением температуры [5], хранение масел в прозрачных пластиковых бутылках на свету способствует окислению масел, особенно нерафинированных); присутствие кислорода (влияние кислорода на окисление масла возрастает при высокой температуре и на свету [6]); содержание металлов (железо, медь ускоряют автоокисление масла путем разложения гидропероксидов [7]); остаточные компоненты масел (свободные жирные кислоты, моно- и ди-глицериды, металлы, фосфолипиды, пероксиды, хлорофиллы, каротиноиды, фенольные соединения и токоферолы [8] — некоторые из них ускоряют окисление масел, а некоторые действуют в качестве антиоксидантов). Свободные жирные кислоты имеют функциональные группы, более способные к окислению, а также снижающие поверхностное натяжение масел, что увеличивает скорость диффузии кислорода из пространства над маслом в объем, ускоряя этим его окисление⁶.

Сырое растительное масло содержит около 2% веществ, не являющихся глицеридами:

⁴ Бурункова ЮЭ, Успенская МВ, Самуйлова ЕО. Растительные масла: свойства, технологии получения и хранения, окислительная стабильность. Учебное пособие. СПб.: Университет ИТМО; 2020.

⁵ <https://bigenc.ru/c/rastitelnye-masla-29692a>

Бурункова ЮЭ, Успенская МВ, Самуйлова ЕО. Растительные масла: свойства, технологии получения и хранения, окислительная стабильность. Учебное пособие. СПб.: Университет ИТМО; 2020.

⁶ Бурункова ЮЭ, Успенская МВ, Самуйлова ЕО. Растительные масла: свойства, технологии получения и хранения, окислительная стабильность. Учебное пособие. СПб.: Университет ИТМО; 2020.

фосфолипиды, токоферолы, стеролы, смолы, углеводороды, пестициды, белки, металлы, пигменты (госсипол, каротин и хлорофилл), свободные жирные кислоты. Состав триглицеридов и примесей зависит от вида лекарственного растительного сырья и условий его произрастания: климата, типа почвы, сезона созревания, возраста растения, его состояния, микробиологической среды, генетических вариаций [3].

По результатам сравнительного анализа требований ведущих зарубежных фармакопей к МЖР рафинированным⁷, гидрогенизированным⁸ и полученным путем прямого отжима, наиболее часто используемым для приготовления ЛП (табл. 1–3), выявлены различия в профиле примесей.

При анализе требований Ph. Eur.⁹ и USP¹⁰ к допустимому содержанию примесей в рафинированных маслах (кунжутное, соевое, касторовое и оливковое) были выявлены различия установленных норм по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число» в зависимости от предполагаемого использования МЖР (табл. 1). Так, для рафинированного кунжутного, соевого и оливкового масел, предназначенных для производства парентеральных ЛП, согласно Ph. Eur. по показателю «Пероксидное число» установлены требования «не более 5,0», для производства других лекарственных форм — «не более 10,0». При этом для касторового, подсолнечного и рапсового рафинированных масел

Таблица 1. Требования ведущих зарубежных фармакопей к оценке примесей в рафинированных кунжутном, соевом, касторовом, оливковом, подсолнечном и рапсовом маслах

Table 1. Requirements of the European and United States pharmacopoeias for the assessment of impurities in refined sesame, soya-bean, castor, olive, sunflower, and rapeseed oils

Показатели <i>Parameters</i>	Европейская фармакопея ¹¹ <i>European Pharmacopoeia¹¹</i>	Фармакопея США ¹² <i>United States Pharmacopeia¹²</i>
Кунжутное рафинированное масло <i>Refined sesame oil</i>		
Щелочные примеси <i>Alkaline impurities</i>	Не более 0,1 мл 0,01 моль/л соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid</i>	Не более 0,1 мл 0,01 н. соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 N hydrochloric acid</i>
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,5 <i>Maximum 0.5</i>	Не более 2,0 мл 0,020 н. раствора натрия гидроксида для нейтрализации <i>Not more than 2.0 mL of 0.020 N sodium hydroxide is required for neutralisation</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0 Не более 5,0 для парентеральных лекарственных форм <i>Maximum 10.0; Maximum 5.0 if intended for use in the manufacture of parenteral preparations</i>	Не более 10,0 <i>Not more than 10.0</i>
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	Не более 2,0% <i>Maximum 2.0%</i>	Не более 1,5% <i>Not more than 1.5%</i>
Соевое масло рафинированное <i>Refined soya-bean oil</i>		
Щелочные примеси <i>Alkaline impurities</i>	Не более 0,1 мл 0,01 моль/л соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid</i>	Не более 0,1 мл 0,01 н. соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 N hydrochloric acid</i>
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,5 <i>Maximum 0.5</i>	Не более 0,3 <i>Not more than 0.3</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0 Не более 5,0 для парентеральных лекарственных форм <i>Maximum 10.0; Maximum 5.0 if intended for use in the manufacture of parenteral preparations</i>	Не более 10,0 <i>Not more than 10.0</i>
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	Не более 1,5% <i>Maximum 1.5%</i>	Не более 1,5% <i>Not more than 1.5%</i>

⁷ Рафинация — обработка масла щелочью с целью выведения избыточного количества свободных жирных кислот.

⁸ Гидратация — процесс обработки масла водой для осаждения гидрофильных примесей (фосфатидов, фосфопротеидов).

⁹ European Pharmacopoeia. 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁰ United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville, MD; 2024.

¹¹ European Pharmacopoeia. 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹² United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville, MD; 2024.

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Показатели <i>Parameters</i>	Европейская фармакопея <i>European Pharmacopoeia</i>	Фармакопея США <i>United States Pharmacopeia</i>
Касторовое масло рафинированное <i>Refined castor oil</i>		
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,8 <i>Maximum 0.8</i>	Не более 2,0. Не более 0,8 для парентеральных лекарственных форм <i>Not more than 2.0.</i> <i>Not more than 0.8 if intended for use in injectable dosage forms</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 5,0 <i>Maximum 5.0</i>	Не более 10,0. Не более 5,0 для парентеральных лекарственных форм <i>Not more than 10.0.</i> <i>Not more than 5.0 if intended for use in injectable dosage forms</i>
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	Не более 0,8 % <i>Maximum 0.8 %</i>	Не более 0,8% <i>Not more than 0.8%</i>
Оливковое масло рафинированное <i>Refined olive oil</i>		
Щелочные примеси <i>Alkaline impurities</i>	Не более 0,1 мл 0,01 моль/л соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid</i>	Не более 0,1 мл 0,01 н. соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 N hydrochloric acid</i>
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,3 <i>Maximum 0.3</i>	Не более 0,3 <i>Not more than 0.3</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0; не более 5,0 для парентеральных лекарственных форм <i>Maximum 10.0;</i> <i>Maximum 5.0 if intended for use in the manufacture of parenteral preparations</i>	Не более 10,0 <i>Not more than 10.0</i>
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	Не более 1,5% <i>Maximum 1.5%</i>	Не более 1,5% <i>Not more than 1.5%</i>
Подсолнечное масло рафинированное <i>Refined sunflower oil</i>		
Щелочные примеси <i>Alkaline impurities</i>	Не более 0,1 мл 0,01 моль/л соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid</i>	Не более 0,1 мл 0,01 н. соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 N hydrochloric acid</i>
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,5 <i>Maximum 0.5</i>	Не более 2,5 мл 0,020 н. раствора натрия гидроксида для нейтрализации <i>Not more than 2.5 mL of 0.020 N sodium hydroxide is required for neutralisation</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0 <i>Maximum 10.0</i>	–
Содержание пероксидов <i>Limit of peroxide</i>	–	Не более 10,0 мЭкв/кг <i>Not more than 10.0 mEq/kg</i>
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	Не более 1,5% <i>Maximum 1.5%</i>	Не более 1,0% <i>Not more than 1.0%</i>
Рапсовое масло рафинированное <i>Refined rapeseed oil</i>		
Щелочные примеси <i>Alkaline impurities</i>	Не более 0,1 мл 0,01 моль/л соляной кислоты <i>Not more than 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid</i>	Не описано <i>Not described</i>
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 0,5 <i>Maximum 0.5</i>	
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0 <i>Maximum 10.0</i>	
Неомыляемые вещества <i>Unaponifiable matter</i>	–	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – не нормируется.**Note.** –, not standardised.

по показателю «Пероксидное число» установлены единые нормативные требования вне зависимости от варианта дальнейшего использования масла. Требования USP для кунжутного, соевого и оливкового рафинированных масел по показателю «Пероксидное число» едины — «не более 10,0» и применимы для масла, используемого в производстве как ЛП для парентерального применения, так и других лекарственных форм. Однако для рафинированного касторового масла, предназначенного для производства ЛП для парентерального применения, в монографии USP по показателю «Пероксидное число» предусмотрены более жесткие нормативные требования — «не более 5,0» (для применения в производстве других лекарственных форм — «не более 10,0»). Таким образом, требования Ph. Eur. и USP для рафинированного касторового масла, предназначенного для производства инъекционных лекарственных форм, одинаковы — «не более 5,0».

По показателю «Кислотное число» деление нормативных требований Ph. Eur. отсутствует для рафинированных кунжутного, соевого, касторового, подсолнечного и оливкового масел, предназначенных для производства как парентеральных ЛП, так и других лекарственных форм (табл. 1). При этом в USP для рафинированного касторового масла, если оно используется для производства парентеральных ЛП, предусмотрены требования «не более 0,8», в то время как для касторового масла, предназначенного для производства других лекарственных форм, — «не более 2,0». Требования по показателю «Кислотное число» в монографиях Ph. Eur. и USP для рафинированного соевого масла различны (не более 0,5 и не более 0,3 соответственно), тогда как для рафинированного оливкового масла требования обеих фармакопей идентичны: не более 0,3. Требования по показателю «Кислотное число» не зависят от лекарственной формы, для производства которой будет использоваться масло. Нормирование неомыляемых веществ согласно Ph. Eur. и USP различается только для кунжутного рафинированного масла (табл. 1). Для рапсового масла провести сравнение требований невозможно, так как в USP описано только гидрогенизированное рапсовое масло.

При анализе требований Ph. Eur. и USP к качеству гидрогенизированных МЖР (соевое, касторовое и рапсовое) отмечено, что по показателям «Пероксидное число» и «Кислотное число» не предусмотрено отдельных требований к маслу, если оно предназначено для использования

в производстве ЛП для инъекций (табл. 2). Для гидрогенизированного соевого масла требования Ph. Eur. и USP идентичны по всем перечисленным показателям качества.

Для гидрогенизированного касторового масла согласно Ph. Eur. предусмотрен контроль по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число», тогда как требования USP по показателю «Пероксидное число» отсутствуют, а требования для показателя «Кислотное число» в Ph. Eur. и USP различны и составляют «не более 4,0» и «не более 3,1» соответственно.

Монография на гидрогенизированное рапсовое масло Ph. Eur. отсутствует, а требования USP для данного масла значительно отличаются от аналогичных требований к качеству других гидрогенизированных масел. Так, по показателю «Кислотное число» установлена норма «не более 6,0», а для касторового и соевого масел — «не более 3,1» и «не более 0,5» соответственно (табл. 2). При этом по показателю «Пероксидное число» для гидрогенизированного рапсового масла в USP установлены более высокие требования в сравнении с аналогичным соевым маслом.

В таблице 3 представлены требования Ph. Eur. и USP к качеству касторового и оливкового масел, полученных путем холодного отжима (virgin). Согласно USP требования к качеству касторового масла, предназначенного для производства парентеральных лекарственных форм, по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число» более жесткие, чем к маслу для производства других лекарственных форм. При этом согласно Ph. Eur. требования для касторового масла одинаковы независимо от его дальнейшего использования в производстве. Оливковое масло, полученное путем холодного отжима, описано только в Ph. Eur.

Таким образом, исходя из представленных в таблицах 1–3 данных, можно сделать вывод, что к маслам, применяемым для производства ЛП для парентерального применения, в большинстве случаев предъявляются более высокие требования к содержанию примесей, чем если бы это же масло применялось для производства нестерильных лекарственных форм.

В ГФ РФ XIV изд. включена фармакопейная статья «Клещевины обыкновенной семян масло жирное»¹³, другие МЖР, не описанные в ГФ РФ, должны соответствовать требованиям

¹³ ФС.3.4.0011.18 Клещевины обыкновенной семян масло жирное. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Таблица 2. Требования ведущих зарубежных фармакопей к оценке примесей в гидрогенизированном соевом, касторовом и рапсовом маслах

Table 2. Requirements of the European and United States pharmacopoeias for the assessment of impurities in hydrogenated soya-bean, castor, and rapeseed oils

Показатели Parameters	Европейская фармакопея ¹⁴ European Pharmacopoeia ¹⁴	Фармакопея США ¹⁵ United States Pharmacopoeia ¹⁵
Соевое масло гидрогенизированное Hydrogenated soya-bean oil		
Щелочные примеси Alkaline impurities	Не более 0,4 мл 0,01 моль/л соляной кислоты Not more than 0.4 mL of 0.01 M hydrochloric acid	Не более 0,4 мл 0,01 н. соляной кислоты Not more than 0.4 mL of 0.01 N hydrochloric acid
Кислотное число Acid value	Не более 0,5 Maximum 0.5	Не более 0,5 Not more than 0.5
Пероксидное число Peroxide value	Не более 5,0 Maximum 5.0	Не более 5,0 Not more than 5.0
Неомыляемые вещества Unsaponifiable matter	Не более 1,0% Maximum 1.0%	Не более 1,0% Not more than 1.0%
Касторовое масло гидрогенизированное Hydrogenated castor oil		
Щелочные примеси Alkaline impurities	Не более 0,2 мл 0,01 моль/л соляной кислоты Not more than 0.2 mL of 0.01 M hydrochloric acid	Не более 0,2 мл 0,01 н. раствора соляной кислоты Not more than 0.2 mL of 0.01 N hydrochloric acid
Кислотное число Acid value	Не более 4,0 Maximum 4.0	Не более 3,1 Not more than 3.1
Пероксидное число Peroxide value	Не более 5,0 Maximum 5.0	—
Рапсовое масло гидрогенизированное Hydrogenated rapeseed oil		
Щелочные примеси Alkaline impurities	Не описано Not described	Не более 0,4 мл 0,01 н. соляной кислоты Not more than 0.4 mL of 0.01 N hydrochloric acid
Кислотное число Acid value		Не более 6,0 Not more than 6.0
Пероксидное число Peroxide value		Не более 2,0 Not more than 2.0
Неомыляемые вещества Unsaponifiable matter		Не более 1,5% Not more than 1.5%

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «—» — не нормируется.
Note. —, not standardised.

ОФС¹⁶. Для включения в ГФ РФ XV изд. разработаны проекты фармакопейных статей на клещевины обыкновенной семян масло жирное рафинированное, клещевины обыкновенной семян масло жирное гидрогенизированное, подсолнечника однолетнего семян масло жирное рафинированное и рапса семян масло жирное рафинированное.

При оценке качества МЖР согласно ГФ РФ определяют органолептические свойства (цвет, запах, вкус), физико-химические показатели (растворимость, температура плавления и (или)

затвердевания, плотность, показатель преломления, pH, йодное число, гидроксильное число), а также контролируют содержание примесей.

Согласно ОФС «Масла жирные растительные»¹⁷ для оценки примесей предусмотрены показатели «Анизидиновое число», «Кислотное число», «Пероксидное число», «Число омыления», «Неомыляемые вещества», «Посторонние жирные масла», «Летучие вещества», «Цианиды, синильная кислота», «Фосфорсодержащие вещества», «Мыла», «Остаточные органические

¹⁴ European Pharmacopoeia. 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.
¹⁵ United States Pharmacopoeia. USP–NF. Rockville, MD; 2024.
¹⁶ ОФС.1.5.2.0002 Масла жирные растительные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.
¹⁷ Там же.

Таблица 3. Требования ведущих зарубежных фармакопей к оценке примесей в касторовом и оливковом маслах, полученных путем холодного отжима (virgin)

Table 3. Requirements of the European and United States pharmacopoeias for the assessment of impurities in cold-pressed (virgin) castor and olive oils

Показатели <i>Parameters</i>	Европейская фармакопея ¹⁸ <i>European Pharmacopoeia¹⁸</i>	Фармакопея США ¹⁹ <i>United States Pharmacopeia¹⁹</i>
Касторовое масло холодного отжима <i>Virgin castor oil</i>		
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 1,5 <i>Maximum 1.5</i>	Не более 2,0. Не более 0,8 для парентеральных лекарственных форм <i>Not more than 2.0. Not more than 0.8 if intended for use in injectable dosage forms</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 10,0 <i>Maximum 10.0</i>	Не более 10,0. Не более 5,0 для парентеральных лекарственных форм <i>Not more than 10.0. Not more than 5.0 if intended for use in injectable dosage forms</i>
Неомыляемые вещества <i>Unsaponifiable matter</i>	Не более 0,8% <i>Maximum 0.8%</i>	Не более 0,8% <i>Not more than 0.8%</i>
Оливковое масло холодного отжима <i>Virgin olive oil</i>		
Кислотное число <i>Acid value</i>	Не более 2,0 <i>Maximum 2.0</i>	Не описано <i>Not described</i>
Пероксидное число <i>Peroxide value</i>	Не более 20,0 <i>Maximum 20.0</i>	
Неомыляемые вещества <i>Unsaponifiable matter</i>	Не более 1,5% <i>Maximum 1.5%</i>	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors
Примечание. «–» – не нормируется.
Note. –, not standardised.

растворители», «Тяжелые металлы», «Мыла», «Парафин, воск, смоляные и минеральные масла», «Альдегиды», «Белки», «Вода».

Для ЛП в виде масляных растворов согласно требованиям ГФ РФ²⁰ и Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС)²¹ в спецификации должен быть предусмотрен контроль качества по показателю «Кислотное и пероксидное число», что позволит характеризовать органолептические свойства масла, входящего в состав ЛП, степень его окисленности и возможной порчи.

При анализе нормативной документации российских производителей касторового масла для приема внутрь было установлено, что согласно спецификации контроль качества ЛП проводят по показателям «Кислотное число», «Число омыления», «Йодное число», «Гидроксильное число», «Пероксидное число», «Неомыляемые вещества», «Посторонние масла», «Хлорсодержащие

соединения», «Летучие вещества», «Белки», «Мыла» и др. Это представляется избыточным, поскольку данный ЛП на 100% состоит из активной фармацевтической субстанции, для которой контроль качества по перечисленным показателям уже был проведен перед розливом ЛП. В дальнейшем при разработке частных фармакопейных статей на лекарственные формы, которые получают путем розлива активных фармацевтических субстанций, представляющих собой МЖР, для оценки примесей следует ограничиться показателями «Кислотное число» и «Пероксидное число», поскольку они характеризуют раннюю порчу масла. Исключение избыточности контроля окажет положительное влияние на конечную себестоимость ЛП.

В ГФ РФ указано²², что при производстве ЛП, представляющих собой масляные растворы, как правило, предусмотрен процесс нагревания. Поскольку МЖР содержат в своем составе жирные кислоты,

¹⁸ European Pharmacopoeia. 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.
¹⁹ United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville, MD; 2024.
²⁰ ОФС.1.4.1.0011 Растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.
²¹ 2.5.1.25 Растворы. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т.1. Ч. 2. М.; 2023.
²² ОФС.1.4.1.0011 Растворы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

то повышение температуры и длительности термообработки ускоряет цепные реакции образования первичных продуктов окисления (неустойчивые пероксидные соединения различных типов). Большая часть данных продуктов обуславливает посторонние привкус и запах масла [9].

Согласно документации производителей для ЛП, содержащих в составе кунжутное масло, растворение действующего вещества в масле осуществляют при температуре от 30 до 50 °С. Производители для снижения риска порчи таких ЛП стараются исключить стадию нагревания из технологического процесса производства. Было выявлено, что для ряда ЛП, представляющих собой растворы для парентерального применения, в состав которых входит касторовое, кунжутное или оливковое масло, технологический процесс производства не всегда предусматривает процесс нагревания.

Активные фармацевтические субстанции рассмотренных ЛП представляли собой кристаллический порошок, для растворения действующего вещества и его равномерного распределения по всему объему применимы различные технологические приемы, например использование соразтворителей (этанола). Действующее вещество растворяют в этаноле, а затем полученный раствор смешивают с маслом. Такой способ широко используют при производстве парентеральных ЛП, действующими веществами которых являются ципротерон, тестостерон, фулвестрант, а в качестве основного растворителя применяют касторовое масло.

Некоторые производители используют другой способ получения масляных растворов для парентерального применения без нагревания: добавление действующего вещества непосредственно в масло и затем перемешивание полученной суспензии до полного растворения действующего вещества. При этом дополнительно может быть предусмотрено барботирование суспензии азотом или же перемешивание осуществляют в реакторе, воздух в котором замещают азотом. Такую технологию используют при производстве ЛП, содержащих оливковое или кунжутное масла. Перемешивание в атмосфере азота, а также использование барботирования предусмотрено для того, чтобы вытеснить кислород из реакционной массы и свести к минимуму химические процессы, протекающие в масле под действием кислорода.

Технология производства ЛП, представляющих собой нестерильные масляные растворы,

также включает в себя стадию нагревания. Большинство таких растворов содержат в качестве действующего вещества жидкие жирорастворимые витамины, в качестве растворителя используют масло подсолнечное, нагревание осуществляют до 50–70 °С. Для ЛП, в составе которых содержится более 50% масла, предпочтительным является использование технологических приемов, исключающих нагревание, чтобы минимизировать процессы порчи масла и обеспечить длительность хранения ЛП.

Анализ спецификаций, сертификатов качества, паспортов входного контроля на МЖР, используемых при производстве ЛП, показал, что контроль по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число» проводится производителями МЖР в обязательном порядке и гарантирует, что МЖР, используемое в производстве ЛП, соответствует требованиям ГФ РФ²³. Однако при анализе спецификаций ЛП, содержащих МРЖ (растворы для приема внутрь масляные, растворы для парентерального применения масляные), было выявлено, что на срок годности ЛП предусмотрен контроль только по показателю «Кислотное число», при этом контроль по показателю «Пероксидное число» не всегда присутствует в спецификации таких ЛП. Следовательно, контроль гидропероксидов, свидетельствующих о ранней порче масла, отсутствует. Некоторые производители считают, что поскольку контроль по показателю «Пероксидное число» предусмотрен спецификацией на используемое МЖР, то контроль ЛП по данному показателю является избыточным. Однако в технологическом процессе производства ЛП может быть предусмотрена стадия нагревания или длительного перемешивания без замещения воздуха в реакторе азотом, при этом перед фасовкой в тару раствор может некоторое время находиться в реакторе. Совокупность указанных факторов может оказать существенное влияние на качество ЛП в процессе его хранения, и, следовательно, контроль по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число» является обязательным для таких ЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ требований ведущих зарубежных фармакопей к оценке примесей в наиболее часто используемых маслах жирных растительных. Показано, что в зависимости от лекарственной формы, в которой будет использовано то или иное масло, подходы к оценке примесей и нормы по показателям «Кислотное число» и «Пероксидное число» могут быть различны. Если масло предназначено для производства

²³ ОФС.1.5.2.0002 Масла жирные растительные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

лекарственных форм для парентерального применения, то к нему предъявляются более высокие требования.

При анализе нормативной документации на лекарственные препараты (ЛП), полученные путем розлива активной фармацевтической субстанции (т.е. на 100% состоящим из масла), выявлена избыточность перечня контролируемых показателей. Рекомендуется для ЛП, полученных

путем розлива, составлять спецификацию с учетом того, что контроль по основным показателям качества уже был проведен при анализе фармацевтической субстанции и повторный контроль по идентичным показателям не требуется. При подготовке частных фармакопейных статей на ЛП, представляющие собой масляные растворы, в спецификацию следует включать показатели «Кислотное число» и «Пероксидное число», характеризующие раннюю порчу масла.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ali S, Ekbab R, Salar S, Yasheshwar, Ali SA, Jaiswal AK, et al. Quality standards and pharmacological interventions of natural oils: current scenario and future perspectives. *ACS OMEGA*. 2023;8(43):39945–63. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05241>
2. Тринеева ОВ. Особенности оценки качества и перспективы стандартизации жирных растительных масел и масляных экстрактов фармацевтического назначения (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(2):114–34. Trineeva OV. Features quality assessment and prospects standartization fatty oils and oil extracts for pharmaceutical purposes (review). *Drug Development & Registration*. 2016;(2):114–34 (In Russ.). EDN: [WYJZMH](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113236)
3. Калинин АМ, Антонова НП, Прохвятилова СС, Шефер ЕП. Определение примесей в растительных жирных маслах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(4):51–3. Kalinin AM, Antonova NP, Prokhvatilova SS, Shefer EP. Determination of impurities in fixed vegetable oils. *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin*. 2015;(4):51–3 (In Russ.). EDN: [UYSRFP](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114981)
4. Макарова НВ, Воронина МС. Исследование окислительной стабильности нескольких видов растительных масел при различных технологических параметрах. *Инновации и продовольственная безопасность*. 2019;(3):82–90. Makarova NV, Voronina MS. Study of the oxidative stability of several types of vegetable oils with different technological parameters. *Innovations and Food Safety*. 2019;(3):82–90 (In Russ.). <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2019-25-3-82-90>
5. Chen J, Wang Y, Liu W, Zhang F, Li J, Yang H, Bi Y. Effects of free fatty acids and peroxide on thermal loss of sesamol and formation of its transformation products in soybean oil. *LWT – Food Sci Technol*. 2022;159(4617):113236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113236>
6. Bastida S, Sanchez-Muniz FJ. Thermal oxidation of olive oil, sunflower oil and a mix of both oils during forty discontinuous domestic frying of different foods. *Food Sci Technol Int*. 2001;7(1):15–21. <https://doi.org/10.1106/1898-PLW3-6Y6H-8K22>
7. Khabbaz ES, Jaldani S, Farhoosh R. Unusual multiphase peroxidation of sunflower oil: a kinetic study. *LWT – Food Sci Technol*. 2023;184:114981. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114981>
8. King MF, Boyd LC, Sheldon BW. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J Am Oil Chem Soc*. 1992;69:237–42. <https://doi.org/10.1007/BF02635893>
9. Бондаренко ЖВ, Эмелло ГГ, Хаванская ОИ. Влияние термообработки на устойчивость к окислению и жирнокислотный состав смеси растительных масел. *Труды БГТУ*. 2016;(4):162–6. Bondarenko ZhV, Emello GG, Khavanskaya OI. The influence of heat treatment on the oxidation stability and fatty acid composition of a vegetable oil mixture. *Proceedings of BSTU*. 2016;(4):162–6 (In Russ.). EDN: [WHMPOT](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114981)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Пономаренко – написание текста рукописи, анализ технологических особенностей производства и состава лекарственных препаратов, ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей рукописи; Л.И. Панова – разработка концепции исследования, анализ и систематизация нормативных требований, написание и редактирование текста рукописи, формулировка заключения.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Anna A. Ponomarenko drafted the manuscript, analysed the specifics of the production process and composition of the relevant medicinal products, and agreed to be accountable for all aspects of the work and the academic integrity of the article. Lyudmila I. Panova conceptualised the study, analysed and systematised regulatory requirements, drafted and edited the manuscript, and formulated the conclusions.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Пономаренко Анна Александровна / Anna A. Ponomarenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3829-6225>

Панова Людмила Ивановна / Lyudmila I. Panova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2417-8295>

Поступила 12.09.2024

После доработки 08.11.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 12 September 2024

Revised 8 November 2024

Accepted 4 December 2024



Е.Л. Ковалева 
К.С. Архипова 
И.М. Алдамова 

Современные подходы к контролю неродственных технологических примесей в антибиотиках

*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*

✉ Ковалева Елена Леонардовна; Kovaleva@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Отдельным классом органических примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков являются технологические примеси, не относящиеся к родственным соединениям или органическим растворителям, в частности N,N-диметиланилин, 2-этилгексановая кислота и ее производные. Данные вещества используются в процессе производства фармацевтических субстанций антибиотиков в качестве реагентов, и контроль их остаточного содержания предусмотрен отечественной и зарубежными фармакопеями.

ЦЕЛЬ. Обосновать требования к контролю технологических неродственных примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведен анализ фармакопейных статей и монографий Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) и зарубежных фармакопей (Европейской фармакопеи (Ph. Eur.), Фармакопеи США (USP), Международной фармакопеи) на фармацевтические субстанции антибиотиков, а также анализ материалов регистрационных досье на фармацевтические субстанции антибиотиков российского и зарубежного производств, включенных в Государственный реестр лекарственных средств. В работе использовали методы сравнительного информационно-аналитического исследования и контент-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В Ph. Eur. контроль содержания 2-этилгексановой кислоты предусмотрен в фармацевтических субстанциях антибиотиков (полусинтетических и полученных способом ферментации). В USP этот показатель не включен в частные монографии. Определение остаточных количеств N,N-диметиланилина введено как в частные монографии на полусинтетические антибиотики Ph. Eur., так и USP, что, вероятно, обусловлено его высокой токсичностью. Требования ГФ РФ гармонизированы с Ph. Eur. При анализе материалов регистрационных досье было показано, что производители заменяют 2-этилгексановую кислоту и N,N-диметиланилин на менее токсичные реагенты, содержание которых при необходимости контролируют в соответствии с общими требованиями к остаточным органическим растворителям.

ВЫВОДЫ. Современные технологические процессы позволяют производить фармацевтические субстанции антибиотиков без использования 2-этилгексановой кислоты и N,N-диметиланилина. Концепция их контроля должна быть основана на оценке рисков, и соответствующие указания следует включить в фармакопейные статьи, переведя показатели из статуса обязательных в статус контролируемых только при использовании 2-этилгексановой кислоты и N,N-диметиланилина в процессе производства.

Ключевые слова: фармацевтические субстанции; антибиотики; органические примеси; N,N-диметиланилин; контроль качества; 2-этилгексановая кислота; фармакопея; технологические примеси; неродственные примеси

Для цитирования: Ковалева Е.Л., Архипова К.С., Алдамова И.М. Современные подходы к контролю неродственных технологических примесей в антибиотиках. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):645–654. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-645-654>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Е.Л. Ковалева — член редакционной коллегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2011 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Elena L. Kovaleva 
Ksenia S. Arhipova 
Irina M. Aldamova 

Current Approaches to the Control of Process-Related Impurities in Antibiotics

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

✉ Elena L. Kovaleva; Kovaleva@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Antibiotic active substances have a distinct class of organic impurities other than related substances or organic solvents, namely, process-related impurities, such as *N,N*-dimethylaniline and 2-ethylhexanoic acid and its derivatives. These compounds are used as reagents in the production process, and national and international pharmacopoeias require that their residual levels should be controlled.

AIM. This study aimed to justify the requirements for the control of process-related impurities in antibiotic active substances.

MATERIALS AND METHODS. The study analysed general chapters and individual monographs on antibiotic active substances of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and international pharmacopoeias, including the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), the United States Pharmacopoeia (USP), and The International Pharmacopoeia (Ph. Int.). The study also analysed registration dossiers for local and imported antibiotic active substances listed in the Russian State Register of Medicines. The study used comparative and content analysis methods.

RESULTS. The Ph. Eur. requires that 2-ethylhexanoic acid should be controlled in antibiotic active substances, such as semisynthetic and fermentation-derived antibiotics. In contrast, the USP does not include this quality attribute in individual monographs. The Ph. Eur. and USP individual monographs on semisynthetic antibiotics require manufacturers to control residual levels of *N,N*-dimethylaniline. This is probably due to the high toxicity of *N,N*-dimethylaniline. The relevant requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation are harmonised with those of the Ph. Eur. According to the analysis of registration dossiers, manufacturers replace 2-ethylhexanoic acid and *N,N*-dimethylaniline with less toxic reagents and, if necessary, control the residual levels of these alternative reagents in accordance with the general requirements for residual organic solvents.

CONCLUSIONS. Current technological processes can produce antibiotic active substances without the use of 2-ethylhexanoic acid and *N,N*-dimethylaniline. Therefore, the concept of process-related impurity control in active substances should be based on risk assessment. Furthermore, the relevant general chapters should require testing for 2-ethylhexanoic acid and *N,N*-dimethylaniline only if these compounds are used in the production process.

Keywords: active substances; antibiotics; organic impurities; *N,N*-dimethylaniline; quality control; 2-ethylhexanoic acid; pharmacopoeia; process-related impurities; impurities

For citation: Kovaleva E.L., Arhipova K.S., Aldamova I.M. Current approaches to the control of process-related impurities in antibiotics. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):645–654. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-645-654>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. Elena L. Kovaleva has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2011; the other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Общие требования к контролю органических примесей в лекарственных средствах приведены в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) в общих фармакопейных статьях (ОФС)¹, в Фармакопее Евразийского экономического союза (ФЕАЭС)², в монографиях Европейской фармакопеи (Ph. Eur.) и Фармакопеи США (USP)³, руководствах 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)⁴, Решении Коллегии Евразийской экономической комиссии от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей».

Отдельным классом органических примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков являются технологические примеси, не относящиеся к родственным соединениям или к органическим растворителям. Основными представителями данного класса примесей являются N,N-диметиланилин, 2-этилгексановая кислота и ее производные. Данные вещества используются в процессе производства, и их контроль не рассматривается вышеуказанными документами. Нормы и требования к остаточному содержанию N,N-диметиланилина, 2-этилгексановой кислоты включены в частные фармакопейные статьи ГФ РФ и монографии Ph. Eur. на фармацевтические субстанции антибиотиков. В USP нормативные требования приведены только для N,N-диметиланилина в общей монографии «Dimethylaniline»⁵. Методики определения остаточного содержания 2-этилгексановой кислоты и N,N-диметиланилина описаны в общих фармакопейных статьях и монографиях⁶.

Изучение принципов и подходов к оценке примесей имеет научно-практическое значение

в целях гармонизации национальных требований к стандартам качества фармацевтических субстанций с международными требованиями и обеспечения качества фармацевтических субстанций, используемых в составе лекарственных препаратов антибиотиков.

Цель работы – обоснование требований к контролю технологических неродственных примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков.

Задачи исследования:

1. Сравнительный анализ требований ГФ РФ и ведущих зарубежных фармакопей к контролю технологических неродственных примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков.
2. Оценка необходимости контроля технологических неродственных примесей в фармацевтических субстанциях антибиотиков российских и зарубежных производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен сравнительный анализ фармакопейных статей и монографий Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV и XV изд., зарубежных фармакопей (Европейской фармакопеи 11 изд., Фармакопеи США 44 изд., Международной фармакопеи 11 изд. (Ph. Int.)), а также материалов регистрационных досье на фармацевтические субстанции антибиотиков российского и зарубежного производств, включенные в Государственный реестр лекарственных средств⁷. В работе использовали методы сравнительного информационно-аналитического исследования и контент-анализа.

К технологическим неродственным примесям антибиотиков относятся следующие соединения: N,N-диметиланилин, 2-этилгексановая кислота и ее производные, используемые в процессе производства фармацевтических субстанций в качестве реагентов. С целью обоснования подходов к контролю указанных примесей были выбраны фармацевтические субстанции

¹ ОФС.1.1.0006 Фармацевтические субстанции. ОФС.1.1.0023 Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

² 2.3.18.0. Субстанции для фармацевтического применения. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1, ч. 2. М.; 2023.

³ General monograph 01/2021:2034 Substances for pharmaceutical use. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2021. <476> Control of organic impurities in drug substances and drug products. United States Pharmacopeia. 44th ed.

⁴ CPMP/ICH/2737/99. ICH Topic Q3A (R2) Note for guidance on impurities testing: impurities in new drug substances. EMA; 2006. CPMP/ICH/2738/99. ICH Topic Q3B (R2) Note for guidance on impurities in new drug products. EMA; 2006.

⁵ <223> N,N-Dimethylaniline. United States Pharmacopeia. 44th ed.

⁶ ОФС.1.2.2.0033 2-Этилгексановая кислота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

General monograph 2.4.28 2-Ethylhexanoic acid. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

N,N-диметиланилин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

General monograph 2.4.26 N,N-Dimethylaniline. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

<223> N,N-Dimethylaniline. United States Pharmacopeia. 44th ed.

⁷ <https://grls.minzdrav.gov.ru/>

антибиотиков трех групп (полученные ферментативным способом, полусинтетические, пептидные антибиотики).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контроль содержания 2-этилгексановой кислоты.

Спектр применения 2-этилгексановой кислоты в фармацевтическом производстве достаточно широк: используется для образования амидных связей, снятия аллильной защитной группы, для стереоселективного восстановительного аминирования и т.д. [1, 2]. Важным свойством данного реагента является растворимость в неполярных органических растворителях, что позволяет использовать его для получения солей органических соединений, в том числе антибиотиков. Как правило, 2-этилгексановая кислота, применяется в процессе производства антибиотиков в виде 2-этилгексаноатов натрия или калия в качестве донора ионов натрия или калия соответственно [3].

Ниже приведена схема получения цефотаксима натрия (I). При обработке цефотаксимовой кислоты (1) в метилизобутилкетоне (MIBK) в присутствии этилацетата (EtOAc) раствором 2-этилгексаноата натрия (Na-2-EH) образуется цефотаксим натрия (2). 2-этилгексановая кислота является в данном случае побочным продуктом синтеза (производственной примесью), что обуславливает необходимость контроля ее остаточного содержания в фармацевтических субстанциях [4].

В соответствии с критериями классификации по TRGS 905 (Technische Regeln für Gefahrstoffe, технические правила использования опасных веществ)⁸ 2-этилгексановая кислота отнесена к категории RD3 веществ, токсичных для репродуктивной функции. Контроль содержания 2-этилгексановой кислоты в фармацевтических субстанциях пептидных антибиотиков, а именно блеомицина сульфата, капреомицина сульфата, грамицидина, полимиксина В сульфата, бацитрацина, не предусмотрен ГФ РФ и зарубежными фармакопеями (USP, Ph. Eur., Ph. Int.). Требования

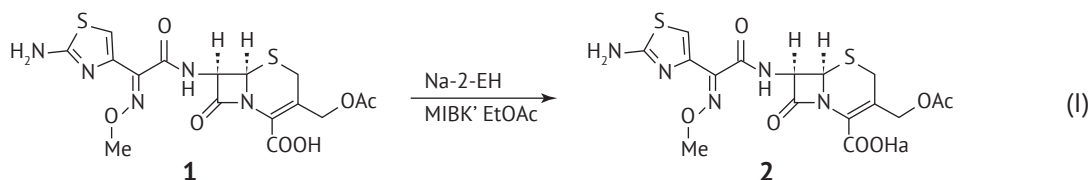
к контролю 2-этилгексановой кислоты в частных фармакопейных статьях и монографиях на фармацевтические субстанции антибиотиков, полученные ферментативным способом и полусинтетические, приведены в таблице 1.

Нормы по допустимому остаточному количеству варьируют от 0,3 до 0,8%. Требования к контролю 2-этилгексановой кислоты в субстанциях антибиотиков ГФ РФ гармонизированы с требованиями Ph. Eur., тем не менее, в отличие от Ph. Eur., которая приводит требование только к натриевой соли бензилпенициллина⁹, ГФ РФ предусматривает контроль 2-этилгексановой кислоты и в субстанции бензилпенициллина калия¹⁰.

USP не включает контроль остаточного содержания 2-этилгексановой кислоты в субстанциях антибиотиков. Однако следует отметить, что в монографиях USP и Ph. Int. на субстанцию калия клавуланат¹¹, структурно родственной пенициллинам, но относящийся к группе ингибиторов бета-лактамаз, введен этот показатель с описанием методики определения.

Для цефтриаксона натрия¹², полусинтетического антибиотика, в Ph. Int. приведено указание, что процесс производства субстанции должен быть валидирован и содержание 2-этилгексановой кислоты не должно превышать 0,8% (в ГФ РФ и Ph. Eur. предусмотрен обязательный контроль ее остаточного содержания).

Контроль содержания N,N-диметиланилина. N,N-диметиланилин является одним из основных соединений, используемых в качестве агента, поглощающего хлороводородную кислоту при производстве ряда антибиотиков [5]. Так, например, N,N-диметиланилин используется при производстве цефтазидима на стадии обработки цефалоридина триметилхлорсиланом, а затем пентахлоридом фосфора и 1,3-бутандиолом (получение промежуточного продукта) (II) [6]. В качестве другого примера можно привести использование N,N-диметиланилина при производстве полусинтетического



⁸ Toxicological evaluation No. 275, 2-Ethylhexanoic acid 06/00, BG Chemie. https://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew275-E.pdf

⁹ Monograph Benzylpenicillin sodium. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

¹⁰ ФС.2.1.0064.18 Бензилпенициллин калия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М.; 2018.

¹¹ Monograph Clavulanate Potassium. United States Pharmacopoeia. 44th ed.

Monograph Clavulanate Potassium. International Pharmacopoeia. 11th ed.

¹² Monograph Ceftriaxone Sodium. International Pharmacopoeia. 11th ed.

Таблица 1. Контроль содержания примеси 2-этилгексановой кислоты в фармацевтических субстанциях антибиотиков (%)

Table 1. Control of the 2-ethylhexanoic acid impurity in antibiotic active substances (%)

Наименование монографии <i>Monograph</i>	Наименование фармакопеи <i>Pharmacopoeia</i>			
	ГФ РФ	Ph. Eur.	USP	Ph. Int.
Антибиотики, полученные методом ферментации <i>Antibiotics produced by fermentation</i>				
Бензилпенициллин калия <i>Benzylpenicillin potassium</i>	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>	–
Бензилпенициллин натрия <i>Benzylpenicillin sodium</i>	≤0,5	≤0,5	Не описан <i>Not described</i>	–
Полусинтетические антибиотики <i>Semisynthetic antibiotics</i>				
Пенициллины <i>Penicillins</i>				
Амоксициллин натрия <i>Amoxicillin sodium</i>	≤0,8	≤0,8	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Амоксициллин тригидрат <i>Amoxicillin trihydrate</i>	–	–	–	–
Ампициллин <i>Ampicillin</i>	–	–	–	–
Ампициллин натрия <i>Ampicillin sodium</i>	≤0,8	≤0,8	–	–
Бакампициллин гидрохлорид <i>Bacampicillin hydrochloride</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Диклоксациллин натрия <i>Dicloxacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,8	–	Не описан <i>Not described</i>
Клоксациллин натрия <i>Cloxacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,8	–	–
Оксациллин натрия моногидрат <i>Oxacillin sodium monohydrate</i>	≤0,8	≤0,8	–	Не описан <i>Not described</i>
Пиперациллин натрия <i>Piperacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	–	Не описан <i>Not described</i>
Пиперациллин моногидрат <i>Piperacillin monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	–	Не описан <i>Not described</i>
Тикарциллин натрия <i>Ticarcillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>
Флуклоксациллин натрия моногидрат <i>Flucloxacillin sodium monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,8	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Флуклоксациллин магния октагидрат <i>Flucloxacillin magnesium octahydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,8	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Цефалоспорины <i>Cephalosporins</i>				
Цефазолин натрия <i>Cefazolin sodium</i>	–	–	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефалексин моногидрат <i>Cefalexin monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефалотин натрия <i>Cefalothin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефамандола нафат <i>Cefamandole nafate</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,3	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Цефапирин натрия <i>Cefapirin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефотаксим натрия <i>Cefotaxime sodium</i>	≤0,5	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Наименование монографии <i>Monograph</i>	Наименование фармакопей <i>Pharmacopoeia</i>			
	ГФ РФ	Ph. Eur.	USP	Ph. Int.
Цефтриаксон натрия <i>Ceftriaxone sodium</i>	≤0,8	≤0,8	–	≤0,8
Цефуроксим натрия <i>Cefuroxime sodium</i>	≤0,5	≤0,5	–	Не описан <i>Not described</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «Не описан» — фармацевтическая субстанция не включена в фармакопею; «–» — контроль не предусмотрен.

ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, Ph. Eur. — Европейская фармакопея, USP — Фармакопея США, Ph. Int. — Международная фармакопея.

Note. 'Not described' stands for the active substances not included in the pharmacopoeia, and '–' specifies the compounds not required to be controlled.

ГФ РФ, State Pharmacopoeia of the Russian Federation; Ph. Eur., European Pharmacopoeia; USP, United States Pharmacopoeia; Ph. Int., The International Pharmacopoeia.

пенициллина — ампициллина. Ампициллин получают из 6-аминопенициллановой кислоты, при этом в качестве органического основания, поглощающего образующуюся хлороводородную кислоту, может использоваться N,N-диметиланилин. Выделяющаяся хлороводородная кислота замедляет процесс синтеза, поэтому необходимо выведение ее из зоны реакции [7].

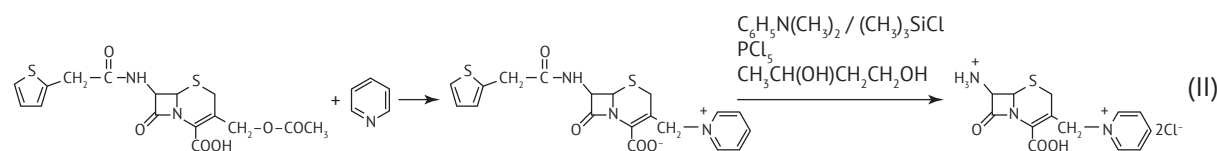
N,N-диметиланилин имеет высокую температуру кипения, вследствие чего его сложно удалить из субстанции [8]. N,N-диметиланилин является токсичным веществом (второй класс опасности), вызывает метгемоглобинообразование, обладает репротоксическим и мутагенным действием, оказывает воздействие на центральную нервную систему, дыхательную и сердечно-сосудистую систему, надпочечники, селезенку, печень и морфологический состав периферической крови¹³. Высокая токсичность N,N-диметиланилина обуславливает необходимость контроля его остаточного содержания в фармацевтических субстанциях.

Контроль содержания N,N-диметиланилина не предусмотрен ГФ РФ, Ph. Eur., USP, Ph. Int. в фармацевтических субстанциях пептидных антибиотиков (блеомицина сульфат, капреомицина сульфат, грамицидин, полимиксина В сульфат, бацитрацин), и антибиотиков, полученных

ферментативным способом (бензилпенициллин калия и бензилпенициллин натрия). Требования к контролю N,N-диметиланилина в монографиях и фармакопейных статьях на фармацевтические субстанции полусинтетических антибиотиков приведены в таблице 2.

В частных и общей фармакопейных статьях ГФ РФ и монографиях ведущих зарубежных фармакопей на фармацевтические субстанции антибиотиков N,N-диметиланилин нормируется на уровне ≤0,002%.

В ГФ РФ и USP для фармацевтической субстанции ампициллина¹⁴ (монография 2021 г.) указано, что определение N,N-диметиланилина необходимо только если его наличие обусловлено технологическим процессом, тогда как для ампициллина натрия¹⁵ (монография пересмотрена в 2020 г.) и других фармацевтических субстанций антибиотиков данное примечание отсутствует. Ph. Eur. подходит к этому вопросу иначе: для ампициллина натрия¹⁶ (монография 2024 г.) приводит рекомендацию проведения производителем оценки риска загрязнения N,N-диметиланилином в ходе производственного процесса (в монографии на ампициллин¹⁷ (пересмотрена в 2017 г.) такое указание отсутствует). Таким образом, Ph. Eur. также переходит



¹³ Федеральный регистр потенциально опасных химических и биологических веществ. Филиал РПОХБВ ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора. <https://rpoxy.ru/online/detail.html?id=44&ysclid=m0lg7g4wib351901776>

¹⁴ ФС.2.1.0372 Ампициллин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023. Monograph Ampicillin. United States Pharmacopoeia. 44th ed.

¹⁵ ФС.2.1.0056 Ампициллин натрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023. Monograph Ampicillin sodium. United States Pharmacopoeia. 44th ed.

¹⁶ Monograph Ampicillin sodium. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

¹⁷ Monograph Ampicillin. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

от обязательного контроля показателя к гарантиям его минимального содержания или отсутствия при валидации процесса производства.

Такие же тенденции отмечаются в отношении субстанций пиперациллина натрия¹⁸ (монография 2022 г.), пиперациллина моногидрата¹⁹ (монография 2021 г.), флуклоксациллина натрия моногидрата²⁰ (монография 2022 г.).

В Ph. Int. для фармацевтических субстанций амоксициллина тригидрата²¹ и цефтриаксона натрия²² указано, что процесс производства субстанции должен быть валидирован и содержание N,N-диметиланилина не должно превышать 0,002%.

Анализ материалов регистрационных досье.

Наряду с проведенным сравнительным анализом требований фармакопей был осуществлен

анализ материалов регистрационных досье фармацевтических субстанций амоксициллина натрия, амоксициллина тригидрата, цефтриаксона натрия (полусинтетические антибиотики) и бензилпенициллина натрия (получен ферментативным способом), включенных в Государственный реестр лекарственных средств, производства Китая, Индии, Испании, России.

Из представленных данных (табл. 3) следует, что применение 2-этилгексановой кислоты в производстве анализируемых фармацевтических субстанций не является обязательным, так как она используется в производстве лишь одной из десяти указанных субстанций. Для ионного обмена в качестве альтернативных субстратов-доноров натрия применяются натрия изооктоат, натрия гидроксид, натрия хлорид,

Таблица 2. Контроль примеси N,N-диметиланилина в фармацевтических субстанциях антибиотиков

Table 2. Control of the N,N-dimethylaniline impurity in antibiotic active substances

Наименование монографии <i>Monograph</i>	Наименование фармакопей <i>Pharmacopoeia</i>			
	ГФ РФ	Ph. Eur.	USP	Ph. Int.
Пенициллины <i>Penicillins</i>				
Амоксициллин натрия <i>Amoxicillin sodium</i>	+	+	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Амоксициллин тригидрат <i>Amoxicillin trihydrate</i>	+	+	+	+
Ампициллин <i>Ampicillin</i>	+	+	+	–
Ампициллин натрия <i>Ampicillin sodium</i>	+	+	+	–
Бакампициллин гидрохлорид <i>Bacampicillin hydrochloride</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Диклоксациллин натрия <i>Dicloxacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	+	Не описан <i>Not described</i>
Клоксациллин натрия <i>Cloxacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	+	–
Оксациллин натрия моногидрат <i>Oxacillin sodium monohydrate</i>	+	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Пиперациллин натрия <i>Piperacillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Пиперациллин моногидрат <i>Pipperacillin monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Тикарциллин натрия <i>Ticarcillin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	+	Не описан <i>Not described</i>
Флуклоксациллин натрия моногидрат <i>Flucloxacillin sodium monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Флуклоксациллин магния октагидрат <i>Flucloxacillin magnesium octahydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>

¹⁸ Monograph Piperacillin sodium. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

¹⁹ Monograph Piperacillin monohydrate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

²⁰ Monograph Fluoxacillin sodium monohydrate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

²¹ Monograph Amoxycillin trihydrate. International Pharmacopoeia. 11th ed.

²² Monograph Ceftriaxone sodium. International Pharmacopoeia. 11th ed.

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Наименование монографии <i>Monograph</i>	Наименование фармакопеи <i>Pharmacopoeia</i>			
	ГФ РФ	Ph. Eur.	USP	Ph. Int.
Цефалоспорины <i>Cephalosporins</i>				
Цефазолин натрия <i>Cefazolin sodium</i>	+	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефалексин моногидрат <i>Cefalexin monohydrate</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	+	Не описан <i>Not described</i>
Цефалотин натрия <i>Cefalothin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефамандола нафат <i>Cefamandole nafate</i>	Не описан <i>Not described</i>	–	Не описан <i>Not described</i>	Не описан <i>Not described</i>
Цефапирин натрия <i>Cefapirin sodium</i>	Не описан <i>Not described</i>	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефотаксим натрия <i>Cefotaxime sodium</i>	+	+	–	Не описан <i>Not described</i>
Цефтриаксон натрия <i>Ceftriaxone sodium</i>	+	+	–	+
Цефуроксим натрия <i>Cefuroxime sodium</i>	+	+	–	Не описан <i>Not described</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «Не описан» – фармацевтическая субстанция не включена в фармакопею;

«–» – контроль N,N-диметиланилина не предусмотрен;

«+» – контроль N,N-диметиланилина предусмотрен на уровне ≤ 0,002%.

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации, Ph. Eur. – Европейская фармакопея, USP – Фармакопея США, Ph. Int. – Международная фармакопея.

Note. 'Not described' stands for the active substances not included in the pharmacopoeia, '–' marks the cases when the control of N,N-dimethylaniline is not required, '+' shows the cases when N,N-dimethylaniline is required to be controlled at ≤ 0,002%.

ГФ РФ, State Pharmacopoeia of the Russian Federation; Ph. Eur., European Pharmacopoeia; USP, United States Pharmacopoeia; Ph. Int., The International Pharmacopoeia.

натрия ацетат. В связи с этим большинство производителей не включают данный показатель в спецификацию либо включают только для формального соблюдения требований, указанных в частной фармакопейной статье.

В настоящее время N,N-диметиланилин также не используется для производства проанализированных фармацевтических субстанций, а заменяется менее токсичными реагентами – триэтиламином (в 6 из 10 указанных субстанций), N,N-диметилацетамидом (в 3 из 10 указанных субстанций).

Необходимость определения остаточного содержания триэтиламина и N,N-диметилацетамида регламентируется ГФ РФ²³, ФЕАЭС²⁴, Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля

содержания примесей». Учитывая, что триэтиламин, согласно данным регистрационных дос-
сые анализируемых субстанций, используется на начальных стадиях производства, его контроль как органического растворителя 3 класса токсичности может отсутствовать. Однако триэтиламин является третичным амином, что увеличивает риск образования в субстанциях нитрозопримесей, и в качестве мер, направленных на обеспечение безопасности лекарственных препаратов, производители должны проводить оценку рисков²⁵ образования примесей нитрозаминов в фармацевтических субстанциях.

Остаточное содержание N,N-диметилацетамида (2 класс токсичности), который также используется на начальных стадиях производства, может не контролироваться, если представлены результаты, полученные на 6 опытно-промышленных или 3 промышленных сериях фармацевтической

²³ ОФС.1.1.0008 Остаточные органические растворители. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

²⁴ 2.3.2.0. Остаточные органические растворители. Фармакопея Евразийского Экономического Союза. Т. 1, ч. 1. М.; 2023.

Таблица 3. Данные по контролю технологических неродственных примесей в субстанциях некоторых антибиотиков
Table 3. Data on the control of process-related impurities in some antibiotic active substances

Производитель <i>Manufacturer</i>	Используется в производстве <i>Used in manufacturing</i>		Включено в спецификацию (предельное содержание) <i>Specification limit</i>
	2-этилгексановая кислота <i>2-ethylhexanoic acid</i>	N,N-диметиланилин <i>N,N-dimethylaniline</i>	
Амоксициллин натрия <i>Amoxicillin sodium</i>			
Производитель 1 <i>Manufacturer 1</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется (замена на триэтиламин, N,N-диметилацетамид) <i>Not used (replaced with triethylamine, N,N-dimethylacetamide)</i>	2-этилгексановая кислота (≤0,8%) <i>2-ethylhexanoic acid (≤0.8%)</i>
Амоксициллина тригидрат <i>Amoxicillin trihydrate</i>			
Производитель 2 <i>Manufacturer 2</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется (замена на триэтиламин) <i>Not used (replaced with triethylamine)</i>	N,N-диметиланилин (≤0,002%) <i>N,N-dimethylaniline (≤0.002%)</i>
Производитель 3 <i>Manufacturer 3</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется (замена на триэтиламин, N,N-диметилацетамид) <i>Not used (replaced with triethylamine, N,N-dimethylacetamide)</i>	–
Производитель 4 <i>Manufacturer 4</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется (замена на триэтиламин, N,N-диметилацетамид) <i>Not used (replaced with triethylamine, N,N-dimethylacetamide)</i>	–
Бензилпенициллин натрия <i>Benzylpenicillin sodium</i>			
Производитель 5 <i>Manufacturer 5</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется <i>Not used</i>	2-этилгексановая кислота (≤0,5%) <i>2-ethylhexanoic acid (≤0.5%)</i>
Производитель 6 <i>Manufacturer 6</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется <i>Not used</i>	2-этилгексановая кислота (≤0,5%) <i>2-ethylhexanoic acid (≤0.5%)</i>
Производитель 7 <i>Manufacturer 7</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется <i>Not used</i>	–
Цефтриаксон натрия <i>Ceftriaxone sodium</i>			
Производитель 8 <i>Manufacturer 8</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется (замена на триэтиламин) <i>Not used (replaced with triethylamine)</i>	–
Производитель 9 <i>Manufacturer 9</i>	Используется <i>Used</i>	Не используется (замена на триэтиламин) <i>Not used (replaced with triethylamine)</i>	2-этилгексановая кислота (≤0,8%) <i>2-ethylhexanoic acid (≤0.8%)</i>
Производитель 10 <i>Manufacturer 10</i>	Не используется <i>Not used</i>	Не используется <i>Not used</i>	–

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – не нормируется.
Note. –, not standardised.

субстанций или промежуточного продукта, показывающие, что его остаточное количество не превышает 10% от предельно допустимого содержания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время сложилась противоречивая ситуация — с одной стороны, современные технологические процессы позволяют производить фармацевтические субстанции без использования токсичных реагентов, таких как 2-этилгексановая кислота и N,N-диметиланилин, с другой стороны, производители вынуждены следовать фармакопейным требованиям, в частности вводить заведомо избыточные показатели качества в спецификацию, создавая балластную лабораторную нагрузку и снижая экономическую эффективность деятельности предприятия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Monguzzi R, Menaspace S, Anzaghi P. Process for the preparation of ceftriaxone. Patent of the United States of America No. US5026843A; 1991.
<https://patents.google.com/patent/US5026843A/en>
2. Iqbal MS, Akmal MA. A simple method for simultaneous determination of some organic liquids in in-process materials and effluents produced in the manufacture of amoxicillin and ampicillin. *Environ Monit Assess*. 2009;151(1–4):397–400.
<https://doi.org/10.1007/s10661-008-0281-y>
3. Кук МА, Уилкинс РБ. Способ получения и/или очистки клавулановой кислоты или ее фармацевтически приемлемых солей или эфиров, соль клавулановой кислоты с аминокислотой. Патент Российской Федерации № RU2105768; 1998. Cook MA, Wilkins RB. Method of preparing and/or purifying clavulanic acid or pharmaceutically acceptable salts or esters thereof clavulanic acid salt with amino acid. Patent of the Russian Federation No. RU2105768; 1998. EDN: [TUWIVQ](https://doi.org/10.1007/s10661-008-0281-y)
4. Raju R, Prasad K. Synthetic applications of 2-ethylhexanoic acid derived reagents. *Tetrahedron*. 2012;68(5):1341–9.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.10.078>
5. Debashish D, Vinod G, Bishwa PR. Method for manufacture of cephalosporin and intermediates thereof. Patent of the United States of America No. US5856502A; 1999.
<https://patents.google.com/patent/US5856502A/en>
6. Vardanyan RS, Hruby VJ. *Synthesis of essential drugs*. Amsterdam: Elsevier; 2006.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52166-8.X5000-6>
7. Choi JK, Park MK. Determination of N,N-dimethylaniline in penicillins by GC-MS. *Arch Pharm Res*. 1981;4(4):85–90.
<https://doi.org/10.1007/BF02855750>
8. Abdo KM, Jokinen MP, Hiles R. Subchronic (13-week) toxicity studies of N,N-dimethylaniline administered to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *J Toxicol Environ Health*. 1990;29(1):77–88.
<https://doi.org/10.1080/15287399009531373>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Е.Л. Ковалева* — идея исследования, ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; *К.С. Архипова* — систематизация и анализ нормативной документации, написание текста рукописи; *И.М. Алдамова* — сбор данных и участие в обсуждении материалов, материалов регистрационного досье, редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Elena L. Kovaleva* conceived the study idea, agreed to be accountable for all aspects of the work and the academic integrity of the article, and approved the final version of the manuscript for publication. *Ksenia S. Arhipova* systematised and analysed regulatory standards and drafted the manuscript. *Irina M. Aldamova* collected data, participated in the discussion of the study materials and registration dossiers, and revised the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук / *Elena L. Kovaleva*, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4163-6219>

Архипова Ксения Сергеевна / *Ksenia S. Arhipova*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7855-8475>

Алдамова Ирина Малхазовна / *Irina M. Aldamova*

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5856-2294>

Поступила 16.09.2024

После доработки 30.10.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 16 September 2024

Revised 30 October 2024

Accepted 4 December 2024

²⁵ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 06.08.2019 № 23 «О Руководстве по оценке и контролю ДНК-реактивных (мутагенных) примесей в лекарственных средствах и установлению границ потенциального канцерогенного риска».



О.Г. Корнилова¹
Е.А. Смирягин^{1,2}
В.Л. Багирова¹
М.А. Сумцов¹

Стандартизация метода определения остаточных органических растворителей (обзор)

¹ 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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»,
ул. Героев Панфиловцев, д. 20, Москва, 125480, Российская Федерация

✉ Смирягин Егор Антонович; smiryaginea@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Одним из показателей качества лекарственных средств (ЛС) и вспомогательных веществ является содержание остаточных органических растворителей (ООР). В ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) отсутствуют методики идентификации, установления предельного содержания и количественного определения ООР, что не позволяет стандартизировать подходы к контролю качества по этому показателю.

ЦЕЛЬ. Анализ мировой фармакопейной практики и методологических подходов к контролю ООР для подготовки проекта общей фармакопейной статьи «Остаточные органические растворители».

ОБСУЖДЕНИЕ. В результате сравнительного анализа требований Европейской фармакопеи, Фармакопеи США, Фармакопеи Евразийского экономического союза и ГФ РФ к контролю ООР отмечено отсутствие описания хроматографических систем в действующей ОФС ГФ РФ и установлена необходимость их включения. Отмечено, что ни в одной из рассмотренных фармакопей требования к валидации соответствующих аналитических методик не устанавливают исчерпывающий перечень характеристик оборудования, необходимый и достаточный для воспроизведения всех условий выполнения анализа.

ВЫВОДЫ. Целесообразно гармонизировать ОФС «Остаточные органические растворители» ГФ РФ в соответствии с мировыми фармакопейными подходами к определению ООР методом газовой хроматографии. Рекомендовано дополнить проект ОФС «Остаточные органические растворители» описанием методик идентификации, установления предельного содержания и количественного определения ООР.

Ключевые слова: остаточные органические растворители; контроль качества; идентификация; предельное содержание; количественное определение; газовая хроматография; парофазные системы ввода

Для цитирования: Корнилова О.Г., Смирягин Е.А., Багирова В.Л., Сумцов М.А. Стандартизация метода определения остаточных органических растворителей (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):655–662. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-655-662>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga G. Kornilova¹ 
Egor A. Smiryagin^{1,2} 
Valeria L. Bagirova¹ 
Mikhail A. Sumtsov¹ 

Standardisation of the Method of Residual Organic Solvent Determination (Review)

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
20 Geroev Panfilovtsev St., Moscow 125480, Russian Federation

 Egor A. Smiryagin; smiryaginea@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. An important quality attribute of medicines and excipients is the content of residual organic solvents (ROS). The general chapter on ROS (1.1.0008) of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Ph. Rus.) does not provide analytical procedures for ROS identification, limit tests, and quantitative determination. This impedes the standardisation of approaches to the control of ROS.

AIM. This study aimed to analyse global pharmacopoeial practices for and methodological approaches to the control of ROS in order to prepare a draft general chapter on ROS.

DISCUSSION. According to the comparative analysis of the requirements for the control of ROS of the European Pharmacopoeia, the United States Pharmacopoeia, the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union, and the Ph. Rus., the current Ph. Rus. general chapter lacks a description of chromatographic systems, and this description should be provided. The validation requirements for the relevant test procedures in neither of the analysed pharmacopoeias include an exhaustive list of equipment characteristics that are necessary and sufficient to satisfy all analytical conditions.

CONCLUSIONS. It is reasonable to harmonise the Ph. Rus. general chapter on ROS (1.1.0008) with global pharmacopoeial approaches to ROS determination by gas chromatography. The authors recommend supplementing the draft general chapter on ROS with analytical procedures for ROS identification, limit tests, and quantitative determination.

Keywords: residual organic solvents; ROS; quality control; identification; limit tests; quantitative determination; gas chromatography; head-space injection systems

For citation: Kornilova O.G., Smiryagin E.A., Bagirova V.L., Sumtsov M.A. Standardisation of the method of residual organic solvent determination (review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):655–662. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-655-662>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Органические растворители применяют при синтезе широкого спектра фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или при производстве лекарственных препаратов. Присутствие растворителей в конечном продукте нежелательно, в основном из-за их токсичности, влияния на терапевтическую активность, запах и (или) вкус лекарственных средств. Для удаления органических растворителей используют различные технологические процессы. Однако даже после проведения таких процессов растворители в небольших количествах остаются в продуктах производства [1, 2].

Все фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и лекарственные препараты, в производстве которых используются или образуются летучие вещества, не полностью удаляющиеся из конечного продукта, подлежат контролю на содержание остаточных органических растворителей (ООР).

Методы контроля примесей делят на две группы: биологические испытания и физико-химические методы. С помощью физико-химических методов определяют органические примеси, неорганические примеси и остаточные растворители. Для оценки фактического и (или) потенциального наличия органических примесей необходимо

проводить объемные работы: изучение процессов синтеза, очистки и хранения; разработку аналитических и экспериментальных методик для определения содержания, токсичности и фармакологического действия. Токсичность неорганических примесей и большинства остаточных растворителей установлена, поэтому возможно использование как фармакопейных, так и нефармакопейных валидированных методик. Таким образом, в соответствии с предписаниями фармакопей производитель обязан разрабатывать и валидировать методики определения ООР.

Лекарственные средства не должны содержать ООР больше, чем это предусмотрено данными по безопасности¹. Традиционно для контроля токсичности лекарственных средств, в том числе обусловленной присутствием ООР, проводят *in vivo* испытание на аномальную токсичность. Количественный *in vitro* контроль примесей современными физико-химическими методами может позволить исключить неспецифические испытания на животных, такие как «Аномальная токсичность». Тренд на исключение показателя «Аномальная токсичность» обусловлен такими недостатками метода, как: высокая вероятность ложноположительных результатов, низкая для рутинного контроля качества лекарственных препаратов эффективность, несоответствие международным требованиям к валидации методик и испытаний, необходимость использования в рутинном контроле большого количества животных [3].

Первым аналитическим методом определения ООР, введенным в фармакопеи, был метод «Потеря в массе при высушивании». Данный метод прост в исполнении и проводится при нормальном давлении, однако имеет ряд недостатков, включая отсутствие специфичности, высокий предел обнаружения (около 0,1%), необходимость в относительно большом количестве образца для проведения анализа (около 1–2 г); изменения атмосферной влажности также могут исказить результаты анализа [4].

На текущий момент основным методом определения ООР является газовая хроматография (ГХ) с использованием насадочных и капиллярных хроматографических колонок. Чаще для контроля ООР применяют капиллярные

колонок благодаря их высокой разделительной способности. Разработку и валидацию новых аналитических методик определения ООР методом ГХ в ряде лекарственных средств продолжают до сих пор² [5–7].

В случае использования в производстве лекарственных средств растворителей только третьего класса токсичности для контроля качества лекарственных средств может быть достаточно провести испытание «Потеря в массе при высушивании» или специфичное определение растворителя. Растворители первого и второго классов токсичности обычно определяют с применением ГХ.

В Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) включена ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители», которая не содержит описания хроматографических методик и нуждается в актуализации с учетом мировой фармакопейной практики.

Цель работы — анализ мировой фармакопейной практики и методологических подходов к контролю остаточных органических растворителей для подготовки проекта общей фармакопейной статьи «Остаточные органические растворители».

Задачи исследования:

- сравнительный анализ требований ведущих зарубежных фармакопей, Фармакопеи ЕАЭС и ГФ РФ к контролю ООР в лекарственных средствах и вспомогательных веществах;
- определение основных направлений разработки проекта ОФС «Остаточные органические растворители»;
- выявление требований к проведению хроматографического анализа содержания ООР, необходимых для включения в нормативные документы.

Исследование было проведено информационно-аналитическим методом. Литературная база источников состоит из научных статей (2003–2024 гг.), доступных для поиска в РИНЦ и Scopus. Ключевые слова поиска: примеси, остаточные органические растворители, газовая хроматография, парофазный анализ, дериватизация, методики контроля качества. Объектной базой исследования послужили фармакопеи: Европейская фармакопея (Ph. Eur.), Фармакопея

¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей».

² Климова Т.В. Разработка методики определения остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях перспективных лекарственных средств из ряда азолоазинов методом газожидкостной хроматографии: выпускная квалификационная работа. Екатеринбург; 2020.

США (USP), Фармакопея Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и ГФ РФ³.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Ph. Eur., USP, Фармакопея ЕАЭС и ГФ РФ содержат информацию о классификации ООР по степени риска, пределах содержания ООР и методах их установления, допустимых суточных дозах и методах их установления. Оценка допустимого содержания ООР основана на максимальной суточной дозе действующего вещества. Также в фармакопеях (за исключением ГФ РФ) описаны методики и хроматографические системы, используемые для проведения идентификации, установления предельного содержания и количественного определения ООР. Монографии Фармакопеи ЕАЭС и Ph. Eur.⁴ гармонизированы между собой, между монографиями Ph. Eur. и USP⁵ существует ряд отличий.

1. Согласно Ph. Eur. оценка пригодности хроматографической системы А или хроматографических систем А и Б всегда проходит на этапе идентификации ООР классов 1 и 2. Для системы А отношение «сигнал/шум» для пика 1,1,1-трихлорэтана должно быть не менее 5, а разрешение между пиками ацетонитрила и дихлорметана не менее 1,0. Для системы Б отношение «сигнал/шум» для пика бензола должно быть не менее 5, а разрешение между пиками ацетонитрила и 1,1,2-трихлорэтилена не менее 1,0. В USP для проведения испытаний на предельное содержание, когда ООР уже идентифицированы, предложены другие критерии пригодности хроматографической системы. Для системы А в случае отсутствия 1,1,1-трихлорэтана отношение «сигнал/шум» для любого другого растворителя должно быть не менее 3. Если используют более одного растворителя, разрешение между интересующим пиком и любым соседним пиком должно быть не менее 1,0. Для системы Б в случае отсутствия бензола отношение «сигнал/шум» для любого другого растворителя должно быть не менее 3. Если используют более одного растворителя, разрешение между

интересующим пиком и любым соседним пиком должно быть не менее 1,0.

2. Стандартный образец (СО) для растворителей класса токсичности 2 в Ph. Eur. отсутствует, поэтому для приготовления стандартного раствора предлагают взять «соответствующие количества растворителей класса 2». На типичной хроматограмме такого стандартного раствора представлены пики 25 ООР. Согласно методике, представленной в монографии USP, используют два СО: смесь А (смесь 17 ООР класса 2 в диметилсульфоксиде (ДМСО))⁶ и смесь В (смесь 8 ООР класса 2 в ДМСО)⁷, получая в итоге две хроматограммы. При этом в соответствии с USP для испытаний на предельное содержание ООР в случае, если заранее известен возможный состав растворителей, при приготовлении стандартных растворов используют только СО этих растворителей.

3. В USP приведены методики количественного определения растворимых и не растворимых в воде ООР, также представлены формулы для вычисления содержания ООР (в ppm). В Ph. Eur. отсутствуют методики количественного определения ООР, но указана возможность использования метода стандартных добавок, если содержание ООР классов токсичности 2 или 3 составляет 0,1% и более.

4. В USP в перечне ООР класса токсичности 2 отсутствуют циклопентилметилловый эфир и трет-бутиловый спирт, а в перечне ООР класса токсичности 3 – 2-метилтетрагидрофуран. Данные растворители были включены в Ph. Eur. изд. 10.7 с целью приведения монографии в соответствие с руководством Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (ICH) Q3C (R8)⁸.

5. Несколько различаются предлагаемые рабочие параметры статического парового анализа. Температура линии подачи газовой пробы для методики пробоподготовки испытуемых образцов, в которых известно или предполагается присутствие N,N-диметилацетамида и (или)

³ European Pharmacopoeia. 11.6. Strasbourg: EDQM; 2024.
United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2024.
Фармакопея Евразийского экономического союза. М.; 2020.
Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

⁴ 2.3.2.0. Остаточные органические растворители. Фармакопея Евразийского экономического союза. М.; 2020.
2.1.4.19. Идентификация и контроль остаточных растворителей. Фармакопея Евразийского экономического союза. М.; 2020.
5.4. Residual solvents. European Pharmacopoeia. 11.6. Strasbourg: EDQM; 2024.

2.4.24. Identification and control of residual solvents. European Pharmacopoeia. 11.6. Strasbourg: EDQM; 2024.

⁵ 5.4. Residual solvents. European Pharmacopoeia. 11.6. Strasbourg: EDQM; 2024.

2.4.24. Identification and control of residual solvents. European Pharmacopoeia. 11.6. Strasbourg: EDQM; 2024.

<467> Residual solvents. United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2024.

⁶ <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1601281-R08520.pdf>

⁷ <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1601292-R08960.pdf>

⁸ ICH Q3C (R8) Impurities guideline for residual solvents. EMA/CHMP/ICH/213867/2020.

N,N-диметилформаида, по Ph. Eur. составляет 105 °C, по USP — 80–90 °C; время пребывания под давлением — по Ph. Eur. 30 с, по USP — не менее 60 с.

В действующей ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» ГФ РФ, в отличие от аналогичных монографий зарубежных фармакопей, отсутствуют методики идентификации, установления предельного содержания и количественного определения ООР. Отсутствие методик не позволяет унифицировать подходы к контролю ООР. Поэтому, ориентируясь на положения монографии Ph. Eur.⁹, в проект ОФС «Остаточные органические растворители» были включены хроматографические методики контроля ООР, в том числе указаны параметры хроматографических систем: температура и время уравнивания, температура линии передачи, время достижения требуемого давления, объем пробы. Для введения пробы предусмотрен метод статической парофазной экстракции (headspace), который имеет ряд преимуществ по сравнению с вводом жидкой пробы [8, 9].

Статический парофазный анализ состоит из нескольких этапов. Исходный образец помещают в виалу, которую термостатируют при определенной температуре. Летучие соединения переходят из образца в газовую фазу над ним в соответствии со значениями коэффициентов распределения в системе «пар — конденсированная фаза» для каждого конкретного соединения. Через некоторое время система переходит в состояние равновесия, при котором концентрация летучего анализа в газовой фазе остается постоянной. Затем аликвота газовой фазы с потоком газа-носителя попадает в хроматографическую колонку, где и происходит разделение. Такой подход позволяет минимизировать влияние матрицы, а также понизить предел обнаружения летучих соединений в составе исследуемого образца [10, 11].

Определяющими условиями проведения статического парофазного анализа являются растворитель испытуемого образца и способ переноса пробы. Растворитель влияет на чувствительность, температуру и время уравнивания. Наиболее часто используемыми растворителями при анализе газохроматографическим методом являются вода, ДМСО и их смесь. Использование

смеси вода–ДМСО позволяет увеличить растворимость многих соединений, а также повышает чувствительность метода за счет концентрирования целевых компонентов [12].

Перенос пробы в колонку может быть осуществлен вручную; с помощью газоплотного шприца; автоматически путем нагнетания давления во флакон с пробой и контролируемого по времени или объему переноса аликвоты в инжектор. Могут быть также использованы твердофазная микроэкстракция или дополнительные адсорбционные ловушки, служащие для очистки летучих анализов от избытка газа-носителя перед прохождением пробы через ГХ-колонку [13].

Упомянутые в тексте статьи хроматографические системы и режимы парофазного анализа будут приведены в проекте ОФС и могут быть использованы:

- 1) для идентификации большинства ООР классов токсичности 1 и 2, если ООР неизвестны;
- 2) для проведения испытания на предельное содержание ООР класса 1 и класса 2;
- 3) для количественного определения ООР класса 2, если их предельные значения превышают 1000 ppm;
- 4) для количественного определения ООР класса 3, если их содержание превышает 0,5%.

В проекте ОФС будут представлены две хроматографические системы с делением потока: система А и система Б. Для каждой системы будут даны подробные характеристики хроматографической колонки и неподвижной фазы, указаны соотношение деления потоков, линейная скорость, газ-носитель, тип используемого детектора, а также температурные режимы колонки, инжектора и детектора соответственно. В конце раздела, посвященного аналитическим методикам, будет представлен алгоритм процедуры определения ООР и оценки соответствия их содержания допустимым пределам.

При валидации методик хроматографии необходимо провести оценку их устойчивости (робастности) — способности аналитической методики быть устойчивой к влиянию небольших задаваемых изменений в условиях проведения испытания, которая указывает на ее надежность при обычном (стандартном) использовании.

⁹ 2.4.24. Identification and control of residual solvents. European Pharmacopoeia. 11.0. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁰ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

2.3.14.0. Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза. М.; 2020.

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

В соответствии с ГФ РФ, Фармакопеей ЕАЭС, руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств и USP¹⁰ типичными параметрами вариации для газовой хроматографии являются различные колонки (разные серии и поставщики); температура; скорость газа-носителя.

Ни в одной из рассмотренных фармакопей не определены четкие критерии критически важных изменений и изменений, не требующих контроля. Например, в разделе «Представление результатов валидации» ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ указано, что протокол валидации должен содержать полное описание методики, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа. В USP¹¹ указано, что типичным параметром вариации в том числе является использование различного оборудования. Такие формулировки не позволяют однозначно определить, какое описание оборудования, используемого в ГХ, будет необходимым и достаточным для воспроизведения и отражения всех условий выполнения анализа. Это может приводить к отказу производителя от исследования робастности на нескольких типах оборудования и обобщению вывода о воспроизводимости методики независимо от использованного оборудования.

Некорректный выбор оборудования, например типа системы ввода, может привести к изменению чувствительности и селективности методики и, как следствие, получению недостоверных результатов [14]. Таким образом, применение в испытательных лабораториях различных систем ввода пробы, отличающихся от тех, которые использовались производителем, может привести к трудностям при воспроизведении методики, основанной на применении метода headspace.

При разработке методик определения ООР, основанных на применении метода headspace, необходимо, по возможности, учитывать свойства определяемых компонентов и использовать способы пробоподготовки, позволяющие их нивелировать. Одним из таких способов, позволяющих улучшить воспроизводимость методик определения ООР методом ГХ, является дериватизация. Можно выделить несколько основных целей использования дериватизации в ГХ:

- снижение температуры кипения вещества. Замена активных (полярных) атомов водорода в анализируемом веществе может приводить к снижению его полярности и увеличению летучести;
- увеличение разрешения. В некоторых случаях дериватизированные аналиты, полученные добавлением специфических соединений к близким по химической природе веществам, могут существенно отличаться друг от друга по свойствам, что позволяет проводить разделение. Также дериватизация может создавать более существенные различия между аналитами и компонентами матрицы. Данный прием часто используют для разделения хиральных молекул [15, 16];
- улучшение формы пика аналита за счет минимизации вторичных взаимодействий хроматографической колонки с частью молекул аналита;
- повышение стабильности соединения путем защиты определенных групп в анализируемом веществе.

Химические реакции, используемые в дериватизации, могут быть классифицированы следующим образом:

- (1) реакции с образованием алкильных или арильных производных;
- (2) реакции силилирования;
- (3) реакции с образованием ацильных производных;
- (4) реакции присоединения к углерод-гетерократным связям;
- (5) реакции с образованием циклических соединений;
- (6) другие реакции, специфичные для определенного анализа.

Следует, однако, отметить, что все дополнительные операции, проводимые с испытуемым образцом или аналитом, в том числе и дериватизация, могут стать источником ошибок.

В фармацевтическом анализе дериватизацию при проведении ГХ обычно используют для повышения летучести анализируемых компонентов, например жирных кислот, однако также ее можно использовать для улучшения воспроизводимости методик определения некоторых ООР методом ГХ. Так, например, определяют муравьиную кислоту в виде этилформиата, получаемого методом предколоночной дериватизации этанолом в присутствии паратолуолсульфокислоты [17].

¹¹ <1225> Validation of compendial procedures. United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2024.

ВЫВОДЫ

1. Установлена необходимость включения в ГФ РФ методик определения ООР методом ГХ.
2. Установлено, что монографии ЕАЭС и Ph. Eur. гармонизированы между собой, а между монографиями Ph. Eur. и USP существует ряд отличий. Предложено для разработки положений ГФ РФ в части методик контроля ООР, в том числе описания хроматографических систем, исходить

из положений соответствующей монографии Фармакопеи ЕАЭС.

3. При разработке методик определения ООР необходимо предусмотреть учет влияния конфигурации системы ввода проб на воспроизводимость. Предложено включение дериватизации пробы в качестве одного из способов улучшения воспроизводимости методик определения некоторых ООР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Матвеева ОА. Контроль остаточных количеств органических растворителей в фармацевтических субстанциях. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(3):241–3.
Matveeva OA. Control of residual organic solvents in active substances. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(3):241–3 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-3-241-243>
2. B'Hymer C. Residual solvent testing: a review of gas-chromatographic and alternative techniques. *Pharm Res*. 2003;20(3):337–44.
<https://doi.org/10.1023/A:1022693516409>
3. Неугодова НП, Степанюк ЕО, Сапожникова ГА, Саканян ЕИ, Рябцева МС. Современные подходы к введению показателя «Аномальная токсичность». *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(2):82–8.
Neugodova NP, Stepanyuk EO, Sapozhnikova GA, Sakanyan EI, Ryabtseva MS. Current approaches to the abnormal toxicity test. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(2):82–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-82-88>
4. Grodowska K, Parczewski A. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products. *Acta Pol Pharm*. 2010;67(1):13–26.
PMID: 20210075.
5. Rao SS, Vijayalakshmi A. Analytical method development and validation of glipizide to determine residual solvents by head space-gas chromatography. *Res J Pharm Technol*. 2021;14(5):2440–4.
<https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00429>
6. Noorbasha K, Shaik AR. Determination of residual solvents in paclitaxel by headspace gas chromatography. *Futur J Pharm Sci*. 2021;7:40.
<https://doi.org/10.1186/s43094-021-00186-7>
7. Zou L, Guo X, McElderry JD. Platform headspace gas chromatography method for high-throughput determination of residual solvents in pharmaceutical materials. *J Pharm Biomed Anal*. 2023;229:115349.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115349>
8. Родинков ОВ, Бугайченко АС, Москвин ЛН. Статический паровый анализ и его современное состояние. *Журнал аналитической химии*. 2020;75(1):3–23.
<https://doi.org/10.31857/S0044450220010132>
Rodinkov OV, Bugaichenko AS, Moskvina LN. Static headspace analysis and its current status. *J Anal Chem*. 2020;75(1):1–17.
<https://doi.org/10.1134/S106193482001013X>
9. Родинков ОВ. Современные тенденции развития парового газохроматографического анализа. *Аналитика*. 2021;11(1):30–9.
Rodinkov OV. Current trends in the development of head-space gas chromatography analysis. *Analytics*. 2021;11(1):30–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.22184/2227-572X.2021.11.1.30.39>
10. Витенберг АГ, Конопелько ЛА. Паровый газохроматографический анализ: метрологические приложения. *Журнал аналитической химии*. 2011;66(5):452–72.
EDN: [NWCPUH](https://doi.org/10.1002/0471914584)
Vitenberg AG, Konopelko LA. Gas-chromatographic headspace analysis: metrological aspects. *J Anal Chem*. 2011;66(5):438–57.
<https://doi.org/10.1134/S106193481103018X>
11. Kolb B, Ettre LS. *Static headspace – gas chromatography: theory and practice*. John Wiley & Sons; 2006.
<https://doi.org/10.1002/0471914584>
12. Sithersingh MJ, Snow NH. Headspace gas chromatography. In: *Gas chromatography*. Elsevier; 2021. P. 251–65.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820675-1.00012-5>
13. Cheng C, Liu S, Mueller BJ, Yan Z. A generic static headspace gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance. *J Chromatography A*. 2010;1217(41):6413–21.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.016>
14. Швець АА, Сумцов МА. Влияние конфигурации системы ввода на результаты испытаний методом парового газовой хроматографии (сравнительное исследование). *Журнал прикладной химии*. 2024;97(4):268–76.
Shvets AA, Sumtsov MA. Influence of the injection system configuration on head-space gas chromatography test results (comparative study). *Journal of Applied Chemistry*. 2024;97(4):268–76 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31857/S0044461824040017>
15. Schurig V. Use of derivatized cyclodextrins as chiral selectors for the separation of enantiomers by gas chromatography. *Ann Pharm Fr*. 2010;68(2):82–98.
<https://doi.org/10.1016/j.pharma.2009.11.004>
16. Betzenbichler G, Huber L, Kräh S, Morkos ML, Siegle A, Trapp O. Chiral stationary phases and applications in gas chromatography. *Chirality*. 2022;34(5):732–59.
<https://doi.org/10.1002/chir.23427>
17. del Barrio MA, Hu J, Zhou P, Cauchon N. Simultaneous determination of formic acid and formaldehyde in pharmaceutical excipients using headspace GC/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(3):738–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.033>

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga G. Kornilova* conceptualised the study and edited the manuscript. *Egor A. Smiryagin* drafted the manuscript, formulated the conclusions, and conducted literature search. *Valeria L. Bagirova* approved the final version of the manuscript for publication. *Mikhail A. Sumtsov* critically revised the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

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

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

Смирязин Егор Антонович / **Egor A. Smiryagin**

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

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

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

Сумцов Михаил Александрович, канд. фарм. наук / **Mikhail A. Sumtsov**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8483-8788>

Поступила 22.10.2024

После доработки 05.11.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 22 October 2024

Revised 5 November 2024

Accepted 4 December 2024



Д.Л. Прокушева 
Д.С. Круглов 
В.В. Величко 

Оценка возможности использования микроэлементного статуса лекарственного растительного сырья в качестве дополнительного критерия доброкачественности на примере сырья «Ромашки аптечной цветки»

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Новосибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Красный пр-т, д. 52, Новосибирск, 630091, Российская Федерация

✉ Прокушева Дарья Леонидовна; mak_dl@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Определение подлинности лекарственного растительного сырья и его отличий от морфологически схожих видов часто оказывается затруднительным, особенно при использовании измельченного сырья. Для анализа сложных смесей растительного происхождения целесообразно использовать дополнительные способы оценки подлинности, в частности метод иерархической кластеризации по содержанию микроэлементов в сырье.

ЦЕЛЬ. Исследовать возможность использования метода иерархической кластеризации содержания микроэлементов в сложной биологической матрице (смеси растений) на примере ромашки аптечной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для ромашки аптечной, широко применяемой в медицинской практике, известен ряд морфологически схожих совместно произрастающих видов других растений. Объектами исследования являлись цветки с цветоносами, заготовленные от растений: *Matricaria recutita* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip., *Leucanthemum vulgare* Lam., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip. и *Matricaria suaveolens* Buchenau и искусственно созданные смеси ромашки и примесных видов, не соответствующие требованиям фармакопейной статьи. Содержание микроэлементов определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10 со встроенными алгоритмами анализа данных многофакторных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Определено содержание 56 микроэлементов в растениях и их смесях, затем с использованием методов кластерного анализа построено иерархическое дерево. Выявлено, что наиболее близкими по микроэлементному статусу являются *M. recutita* и *M. suaveolens*, что коррелирует с их таксономией. Искусственно приготовленные смеси растений занимали промежуточные кластеры между различными видами ромашки. При этом по критерию несходства все примесные виды растений и смеси с содержанием более 10% значительно отличались от кластера микроэлементного состава *M. recutita*.

ВЫВОДЫ. Показана возможность использования метода иерархической кластеризации содержания микроэлементов в биологическом объекте для анализа сложных систем, в том числе смесей растений, и выявления их различий, способных иметь диагностическое значение при контроле качества лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: ромашка аптечная; *Matricaria recutita* L.; кластерный анализ; иерархическое дерево; лекарственное растительное сырье; примеси; качество

Для цитирования: Прокушева Д.Л., Круглов Д.С., Величко В.В. Оценка возможности использования микро-элементного статуса лекарственного растительного сырья в качестве дополнительного критерия добро-качественности на примере сырья «Ромашки аптечной цветки». *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):663–672. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-639>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Darya L. Prokusheva 
Dmitriy S. Kruglov 
Victoria V. Velichko 

Assessment of the Possibility of Using the Trace Element Status of a Herbal Drug as an Additional Quality Criterion: Chamomile Flowers as a Case Study

Novosibirsk State Medical University,
52 Krasny Ave, Novosibirsk 630091, Russian Federation

✉ Darya L. Prokusheva; mak_dl@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Herbal drugs can often be difficult to identify and distinguish from morphologically similar species, especially when fractionated. For the analysis of complex mixtures of herbal origin, it is reasonable to use additional identification methods, including hierarchical clustering of herbal drugs by their trace element content.

AIM. This study aimed to assess the possibility of using hierarchical clustering by trace element content for complex biological matrices (plant mixtures), with official chamomile species as a case study.

MATERIALS AND METHODS. Multiple morphologically similar species grow together with official chamomile species that are widely used in medical practice. The study examined the flowers and peduncles of *Matricaria recutita* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip., *Leucanthemum vulgare* Lam., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip., and *Matricaria suaveolens* Buchenau, as well as artificial mixtures of chamomile with adulterant species (as samples non-compliant with pharmacopoeial specifications). The content of trace elements was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The statistical treatment of the results used Statistica 10 software with a built-in data analysis algorithm for multivariate experiments.

RESULTS. Having determined the content of 56 trace elements, the authors plotted a hierarchical cluster tree using cluster analysis methods. *M. recutita* and *M. suaveolens* were shown to be the closest to each other in terms of their trace element status, which correlated with their taxonomy. Artificial plant mixtures formed intermediate clusters that were observed between different chamomile species. Moreover, according to the criterion of dissimilarity, the trace element cluster of *M. recutita* significantly differed from the trace element clusters of all the adulterant species and mixtures containing more than 10% of the adulterant species.

CONCLUSIONS. This study demonstrated the possibility of using hierarchical clustering based on the content of trace elements in a biological object to analyse complex systems, including plant mixtures, and identify differences that may have discriminative value for the quality control of herbal drugs.

Keywords: chamomile; *Matricaria recutita* L.; cluster analysis; hierarchical cluster tree; herbal drug; impurities; adulterant species; quality

For citation: Prokusheva D.L., Kruglov D.S., Velichko V.V. Assessment of the possibility of using the trace element status of a herbal drug as an additional quality criterion: Chamomile Flowers as a case study. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):663–672. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-639>

Funding. Research was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологическое действие лекарственных растительных препаратов (ЛРП) определяется сочетанием биологически активных соединений в их составе. Одним из условий воспроизводимости фармакологического эффекта при применении ЛРП является изготовление препарата из подлинного и доброкачественного лекарственного растительного сырья (ЛРС). Однако в ряде случаев существует проблема идентификации производящего лекарственного растения, являющегося источником подлинного ЛРС, и его отличия от морфологически схожих видов, часто произрастающих в тех же условиях [1]. Даже подлинное ЛРС может не отвечать критерию доброкачественности вследствие повышенного содержания допустимых примесей близких видов неядовитых растений [2] и поллютантов [3].

К лекарственным растениям, для которых известен ряд морфологически схожих видов, относится ромашка аптечная (*Matricaria recutita* L.), широко применяемая как в мировой [4, 5], так и в российской медицинской практике¹ [6]. Цветки ромашки аптечной применяются как антибактериальное, противовоспалительное, спазмолитическое средство при заболеваниях верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта [5, 7].

Цветки ромашки аптечной следует отличать от сходных по строению корзинок других растений семейства сложноцветных (*Asteraceae*), не подлежащих заготовке [4]. Согласно инструкции² по сбору и сушке соцветий ромашки аптечной основными ромашковидными растениями европейской части России являются ромашка душистая (*Matricaria suaveolens* (Pursh) Buchenau), пупавка собачья (*Anthemis cotula* L.), пупавка полевая (*Anthemis arvensis* L.), во флоре Сибири преобладают нивяник обыкновенный (*Leucanthemum vulgare* Lam.), трехреберник непачукий (*Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip.), ромашка душистая [8] и широко культивирующийся в качестве декоративного растения пиретрум девичий (*Pyrethrum parthenium* (L.) J.G.Sm.) [9].

Эти растения обладают различным химическим составом травы, цветков, различается также состав их эфирных масел. Так, основными действующими веществами эфирного масла ромашки аптечной являются хамазулен и бисаболол [10], тогда как в видах-примесях содержатся другие компоненты: эфирное масло *M. suaveolens* содержит β-мирцен, (E)-β-фарнезен,

геранил-3-метилбутаноат, гермакрен D [10–13], *T. inodorum* – матрикариа-эфир, гермакрен D, (E)-β-фарнезен [10, 13], *L. vulgare* – сабинен, мирцен, эвдесмол, (E)-β-фарнезен [10], *P. parthenium* – камфору, (E)-хризантенилацетат [14–16].

Поскольку ЛРС часто заготавливают сборщиками без ботанического и фармакогностического образования, и на следующий этап обращения сырье уже может поступать в измельченном виде, то определение его доброкачественности становится затруднительным. Важно заметить, что сырье, содержащее примеси в недопустимом количестве, по товароведческим показателям и по количественному содержанию эфирного масла и флавоноидов, нормируемых согласно требованиям фармакопейной статьи, может соответствовать принятым нормам. Однако в связи с отличием состава действующих веществ из-за присутствия примесей может измениться фармакологическое действие ЛРП либо могут развиться нежелательные реакции при его приеме.

В фармакопейной статье ФС.2.5.0037.15³ описаны методы определения подлинности и чистоты (наличия примесей) ЛРС по морфологическим признакам, достаточным для измельченного сырья, в котором присутствуют частицы с размерами более 2 мм. Вместе с тем в настоящее время значительная доля ЛРП, изготовленных из ромашки аптечной, выпускается в фильтр-пакетах, в которых частицы размером более 2 мм отсутствуют. Поэтому для определения подлинности данной продукции использование диагностических морфологических признаков существенно затруднено.

В цветках ромашки определяют количественное содержание эфирного масла, суммы флавоноидов в пересчете на рутин и экстрактивных веществ, извлекаемых водой. Однако данные показатели в связи с содержанием суммы подобных веществ во многих видах растений не могут быть использованы в качестве эффективного и достоверного критерия качества ЛРС. Одним из возможных путей видоспецифичной диагностики ЛРС может быть получение хроматограммы эфирного масла, в котором могут быть выявлены нехарактерные компоненты [17, 18]. В этом случае требуется использование нескольких хроматографических методов анализа: высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием для фенольных компонентов ЛРС и газовой хроматографии для компонентов эфирного масла,

¹ Государственный реестр лекарственных средств <https://grls.rosminzdrav.ru>

² Правила сбора и сушки лекарственных растений. Сборник инструкций. М.: Медицина; 1985.

³ ФС.2.5.0037.15 Ромашки аптечной цветки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

что существенно усложняет процесс контроля качества ЛРС.

В наших предыдущих исследованиях [19] было показано, что состав микроэлементов растений определяется в первую очередь видовой принадлежностью растения, что позволяет говорить о гомеостазе микроэлементного статуса растения и использовать его при решении задач хемосистематики [20]. Важным обстоятельством является установленная корреляция между микроэлементным статусом и компонентным составом эфирного масла, получаемого из растения [21].

При использовании иерархической кластеризации микроэлементного статуса в качестве критерия сходства используется Евклидово расстояние в N-мерном пространстве, и если это расстояние превышает изменчивость определяемых параметров по промысловой заросли (~15%), то кластеры считаются разными [22]. Применение такого подхода при анализе ЛРС «Чабреца трава» [20] показало, что сформированный кластер качественного ЛРС «Чабреца трава» значительно отличается от кластера некачественного сырья.

Микроэлементный состав растения определяется не только условиями в месте его произрастания, но и в значительной степени его геномом, поскольку микроэлементы необходимы для синтеза растением видоспецифичных соединений. Растения семейства сложноцветных в качестве запасного вещества накапливают инулин в отличие от характерного для растений других семейств крахмала [7]. Поскольку исследования по связи микроэлементного состава с таксономическим положением были выполнены

для крахмалосодержащих семейств [19–22], представляет интерес определить информативность микроэлементного состава для инулинсодержащих растений.

Цель работы — исследовать возможность использования метода иерархической кластеризации содержания микроэлементов в сложной биологической матрице (смеси растений) на примере ромашки аптечной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве **объектов исследования** были выбраны ромашка аптечная, пиретрум девичий, нивяник обыкновенный, трехреберник непахучий и ромашка душистая, собранные в окрестностях пос. Михайловский Новосибирской области (широта 55°04', долгота 83°27'). В качестве сырья заготавливали цветки с цветоносами длиной не более 3 см по правилам заготовки ЛРС «Ромашки аптечной цветки». После сбора сырье доводили до воздушно-сухого состояния. Из высушенного сырья были приготовлены смеси на основе *M. recutita* с добавлением 10 и 25% по массе сырья примесных видов, заготовленного по тем же правилам (табл. 1). Исходное сырье и полученные смеси измельчали в ротационной мельнице TSM6A (Bosch) и разделяли на фракции с помощью лабораторных сит («Экрос») с размерами ячеек 5,0 мм (верхнее сито) и 0,2 мм (нижнее сито). Фракции крупнее 5,0 мм и меньше 0,2 мм отбрасывали.

Количественное определение элементов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на спектрометре ELAN DRC-II (Perkin Elmer Inc) в соответствии с утвержденной методикой⁴.

Таблица 1. Состав приготовленных растительных смесей

Table 1. Composition of prepared herbal mixtures

Растение <i>Plant</i>	Смесь 1 <i>Mixture 1</i>	Смесь 2 <i>Mixture 2</i>	Смесь 3 <i>Mixture 3</i>	Смесь 4 <i>Mixture 4</i>	Смесь 5 <i>Mixture 5</i>	Смесь 6 <i>Mixture 6</i>	Смесь 7 <i>Mixture 7</i>	Смесь 8 <i>Mixture 8</i>
<i>Matricaria recutita</i> , %	90	75	90	75	90	75	90	75
<i>Leucanthemum vulgare</i> , %	10	25	–	–	–	–	–	–
<i>Tripleurospermum inodorum</i> , %	–	–	10	25	–	–	–	–
<i>Matricaria suaveolens</i> , %	–	–	–	–	10	25	–	–
<i>Pyrethrum parthenium</i> , %	–	–	–	–	–	–	10	25

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» — компонент в смеси отсутствует.

Note. — The mixture does not contain the component.

⁴ НСАМ № 512-МС Определение элементного состава образцов растительного происхождения (травы, листья) атомно-эмиссионным и масс-спектральными методами анализа. М.: ФГБУ ВИС; 2017.

Точную навеску измельченного сырья массой около 0,1–0,2 г помещали во фторопластовый вкладыш лабораторного автоклава. Дальнейший анализ проб проводили, как описано в работе [23]. Для минерализации проб использовали кислоту азотную концентрированную («Ленреактив», кат. № 011584) и кислоту фтористоводородную («Ленреактив», кат. № 200629). Контроль правильности определения проводили методом добавок.

Для построения **калибровочных графиков** использовали многоэлементные стандартные растворы ICP-MS-68-A и ICP-MS-68-B 0,01 г/л (High-Purity Standards), а также одноэлементный стандартный раствор Hg 1 г/л (High-Purity Standards). Стабильность градуировочных характеристик контролировали путем сравнения результатов определения содержания введенного внутреннего стандарта индия (^{115}In , High-Purity Standards, кат. № 100024-2-100) в каждом анализируемом образце.

Для обеспечения стабильного режима работы масс-спектрометра все измерения проводили в термостатированных условиях при $22,0 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Проводили пять параллельных определений для каждого анализируемого образца, за результат принимали среднее значение.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10, имеющего встроенные алгоритмы анализа данных многофакторных экспериментов. В качестве алгоритма анализа был принят метод иерархической кластеризации⁵. Полученные экспериментальные данные были представлены в виде матрицы, столбцы которой соответствовали исследуемым растительным образцам, а в строках были полученные средние значения содержания микроэлементов в растительном объекте. Для исключения влияния на результат величины абсолютных значений количества микроэлементов была произведена нормировка данных с использованием встроенной функции стандартизации по строкам и с приведением всех преобразованных переменных к единому диапазону значений, выраженных в каждой ячейке матрицы как отношение количества микроэлемента в каждом образце к среднему значению его содержания по всем исследуемым образцам.

Построение дендрограммы. Для построения дендрограммы в качестве способа измерения дистанции между кластерами было выбрано Евклидово расстояние между точками в многомерном пространстве, а в качестве алгоритма объединения – метод Варда [24], согласно которому для оценки расстояний между кластерами используются методы дисперсионного анализа. В качестве меры подобия (целевой функции) применяют внутригрупповую сумму квадратов отклонений, которая представляет собой сумму квадратов расстояний между каждой точкой (объектом) и средней по кластеру, содержащему этот объект. На каждом этапе объединяются такие два кластера, которые приводят к минимальному увеличению целевой функции, т.е. внутригрупповой суммы квадратов отклонений. Значимость увеличения целевой функции оценивается по критерию Фишера при уровне доверительной вероятности 0,95. В качестве критериев объединения точек в кластер использовали граничное условие о том, что Евклидово расстояние между точками меньше величины ε [24], критическое значение приемлемости которой было принято как изменение микроэлементного состава по объекту менее 15% и которая в данном случае выполняла роль доверительного интервала для оценки значимости различий между кластерами [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления закономерностей в многофакторных данных, полученных на биологических матрицах, использование статистического аппарата оценки доверительных интервалов параметрическими многофакторными корреляционными методами мало применимо и наиболее эффективно использование методов кластерного анализа. В этом случае вводится понятие виртуального многомерного пространства, базисными ортами которого являются нормированные концентрации микроэлементов. Построенное иерархическое дерево кластеров по результатам, приведенным в *таблице 2*, представлено на *рисунке 1*.

На основании построенного иерархического дерева и принятого критерия несходства статистически значимыми являются только кластеры в виде синглетонов [25] каждого из примесных видов, собственно *M. recutita* (доверительная вероятность $p=0,95$), тогда как для кластеров,

⁵ Буреева Н.Н. Многомерный статистический анализ с использованием ППП «STATISTICA». Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Применение программных средств в научных исследованиях и преподавании математики и механики». Нижний Новгород; 2007.

Таблица 2. Содержание микроэлементов в растительном сырье и смесях**Table 2.** Content of trace elements in individual herbal drugs and herbal drug mixtures

Элемент Element	Содержание элемента в объектах исследования, мкг/г <i>Element content per study object, µg/g</i>												
	<i>M. recutita</i>	<i>M. suaveolens</i>	<i>L. vulgare</i>	<i>T. inodorum</i>	<i>P. parthenium</i>	Смесь 1 <i>Mixture 1</i>	Смесь 2 <i>Mixture 2</i>	Смесь 3 <i>Mixture 3</i>	Смесь 4 <i>Mixture 4</i>	Смесь 5 <i>Mixture 5</i>	Смесь 6 <i>Mixture 6</i>	Смесь 7 <i>Mixture 7</i>	Смесь 8 <i>Mixture 8</i>
Li	0,336	0,173	0,086	0,107	0,68	0,315	0,277	0,317	0,282	0,324	0,299	0,375	0,428
Be	0,001	0,001	0,013	0,04	0,066	0,002	0,004	0,005	0,01	0,001	0,001	0,007	0,016
Na	1545,2	548,0	66,0	268,0	295,0	1350,7	1136,2	1370,3	1185,1	1397,4	1252,8	1372,9	1191,7
Mg	2687,9	3321,0	1956,0	2055,0	2026,0	2386,0	2285,8	2395,1	2308,4	2510,6	2597,3	2392,4	2301,8
Al	485,4	310,0	86,0	156,0	150,0	417,0	360,9	423,5	377,2	438,0	413,4	422,9	375,8
Si	1303,5	1411,0	545,0	1003,0	820,0	1265,4	1148,1	1312,7	1266,3	1354,7	1371,3	1293,8	1219,1
P	7344,8	8921,0	4775,0	4960,0	5415,0	7079,1	6694,1	7097,6	6740,3	7493,2	7729,3	7143,0	6853,8
K	25575,8	28368,0	27260,0	24610,0	27219,0	26254,7	26512,3	25984,5	25836,7	26367,8	26794,9	26250,6	26502,1
Ca	9455,0	6920,0	8550,0	6770,0	6756,0	9250,4	9116,3	9074,6	8676,8	9089,5	8713,9	9073,2	8673,3
Ti	32,4	24,0	6,8	11,0	11,0	26,9	23,5	27,3	24,5	28,5	27,3	27,4	24,5
V	1,33	1,04	0,64	1,17	0,19	1,37	1,25	1,42	1,40	1,41	1,36	1,32	1,13
Cr	2,39	2,61	1,8	1,99	1,96	2,34	2,25	2,36	2,30	2,42	2,45	2,35	2,29
Mn	38,0	50,0	58,0	97,0	177,0	39,0	41,9	42,8	51,4	38,2	40,0	50,6	70,9
Fe	351,9	258,0	130,0	161,0	190,0	353,7	318,0	357,1	326,4	367,5	352,5	360,2	334,2
Co	0,31	0,26	0,29	0,26	0,46	0,28	0,28	0,28	0,27	0,28	0,27	0,29	0,32
Ni	1,34	1,04	4,54	2,45	2,98	1,75	2,26	1,53	1,7	1,38	1,33	1,58	1,84
Cu	8,04	11,56	9,21	11,24	15,92	7,44	7,6	7,63	8,06	7,65	8,14	8,05	9,13
Zn	45,0	65,9	38,3	37,1	37	45,1	44,1	45,0	43,8	47,9	51,1	45,0	43,7
Ga	0,13	0,12	0,057	0,08	0,088	0,12	0,11	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	0,12
As	0,32	0,25	0,23	0,59	0,12	0,29	0,28	0,33	0,37	0,29	0,28	0,28	0,26
Se	0,35	0,43	0,62	0,45	0,001	0,41	0,45	0,39	0,41	0,39	0,4	0,34	0,28
Br	31,54	19,06	60,69	28,92	62,88	34,22	38,56	31,06	30,67	30,09	28,23	34,44	39,11
Rb	10,84	9,19	36,93	26,29	25,96	13,44	17,35	12,38	14,69	10,67	10,42	12,34	14,61
Sr	15,13	9,2	8,7	5,4	20,0	14,73	13,74	14,4	12,92	14,78	13,87	15,84	16,52
Y	0,15	0,099	0,032	0,049	0,055	0,128	0,112	0,130	0,116	0,135	0,127	0,130	0,117
Zr	0,51	0,31	0,103	0,17	0,2	0,5	0,44	0,51	0,46	0,53	0,49	0,51	0,47
Nb	0,064	0,043	0,0097	0,018	0,023	0,058	0,050	0,059	0,052	0,061	0,058	0,059	0,053
Mo	3,55	5,1	0,61	3,35	2,37	3,26	2,82	3,54	3,51	3,71	3,95	3,44	3,26
Ag	0,011	0,0033	0,0065	0,0075	0,015	0,0101	0,0094	0,0102	0,0097	0,0098	0,0087	0,0109	0,0115
Cd	0,034	0,133	0,09	0,13	0,071	0,031	0,026	0,044	0,059	0,045	0,06	0,038	0,044
Sn	3,37	8,52	11,07	4,92	4,64	3,75	4,80	3,20	3,41	3,52	4,22	3,17	3,34
Sb	0,026	0,007	0,01	0,016	0,089	0,025	0,022	0,025	0,024	0,024	0,022	0,033	0,043
Cs	0,037	0,018	0,042	0,13	0,024	0,038	0,039	0,047	0,06	0,035	0,033	0,036	0,034

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Элемент Element	Содержание элемента в объектах исследования, мкг/г Element content per study object, µg/g												
	<i>M. recutita</i>	<i>M. suaveolens</i>	<i>L. vulgare</i>	<i>T. inodorum</i>	<i>P. parthenium</i>	Смесь 1 Mixture 1	Смесь 2 Mixture 2	Смесь 3 Mixture 3	Смесь 4 Mixture 4	Смесь 5 Mixture 5	Смесь 6 Mixture 6	Смесь 7 Mixture 7	Смесь 8 Mixture 8
Ba	5,98	3,53	3,22	2,41	4,58	5,9	5,48	5,82	5,27	5,93	5,56	6,04	5,83
La	0,177	0,112	0,039	0,063	0,054	0,174	0,152	0,177	0,159	0,182	0,172	0,176	0,156
Ce	0,37	0,22	0,072	0,11	0,11	0,35	0,3	0,35	0,32	0,37	0,34	0,35	0,31
Pr	0,041	0,03	0,0089	0,015	0,013	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
Nd	0,17	0,11	0,035	0,049	0,048	0,16	0,14	0,16	0,15	0,17	0,16	0,16	0,14
Sm	0,034	0,028	0,01	0,012	0,013	0,03	0,026	0,03	0,027	0,031	0,03	0,03	0,027
Eu	0,0096	0,0069	0,00052	0,002	0,0019	0,009	0,0076	0,0092	0,008	0,0097	0,0093	0,0092	0,008
Gd	0,041	0,024	0,0058	0,013	0,011	0,035	0,03	0,036	0,032	0,037	0,034	0,036	0,031
Tb	0,0058	0,0034	0,0013	0,002	0,0018	0,0055	0,0048	0,0056	0,005	0,0057	0,0053	0,0055	0,0049
Dy	0,031	0,0202	0,0071	0,0086	0,008	0,026	0,023	0,026	0,023	0,027	0,026	0,026	0,023
Ho	0,0061	0,0043	0,0012	0,0025	0,0021	0,0052	0,0045	0,0054	0,0049	0,0055	0,0053	0,0053	0,0048
Er	0,012	0,0097	0,0017	0,0039	0,0056	0,011	0,009	0,011	0,01	0,011	0,011	0,011	0,01
Tu	0,0028	0,0016	0,00064	0,00117	0,00053	0,0024	0,0021	0,0025	0,0022	0,0025	0,0023	0,0024	0,0021
Yb	0,015	0,01	0,0018	0,003	0,0051	0,015	0,013	0,015	0,013	0,016	0,015	0,016	0,014
Lu	0,0028	0,0013	0,00043	0,00075	0,00068	0,0027	0,0023	0,0027	0,0024	0,0027	0,0025	0,0027	0,0023
Ta	0,0039	0,0028	0,0005	0,0013	0,00085	0,0034	0,003	0,0035	0,0032	0,0037	0,0035	0,0035	0,0030
W	0,0072	0,008	0,0021	0,0024	0,0019	0,007	0,006	0,007	0,006	0,008	0,008	0,007	0,006
Hg	0,0032	0,011	0,012	0,0022	0,0035	0,0038	0,0051	0,0027	0,0022	0,0036	0,0047	0,003	0,003
Tl	0,0024	0,002	0,00073	0,0017	0,0028	0,0024	0,0021	0,0025	0,0024	0,0025	0,0024	0,0026	0,0027
Pb	0,29	0,19	0,076	0,093	0,11	0,275	0,242	0,277	0,246	0,286	0,27	0,278	0,25
Bi	0,0044	0,0032	0,0028	0,011	0,0031	0,004	0,0034	0,0051	0,0061	0,004	0,0034	0,0043	0,0042
Th	0,051	0,027	0,0096	0,017	0,015	0,044	0,038	0,045	0,04	0,046	0,042	0,045	0,04
U	0,012	0,0076	0,0025	0,0036	0,006	0,0105	0,0091	0,0106	0,0094	0,011	0,0104	0,0108	0,01

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. смесь 1 – 90% *Matricaria recutita* + 10% *Leucanthemum vulgare*; смесь 2 – 75% *M. recutita* + 25% *L. vulgare*; смесь 3 – 90% *M. recutita* + 10% *Tripleurospermum inodorum*; смесь 4 – 75% *M. recutita* + 25% *T. inodorum*; смесь 5 – 90% *M. recutita* + 10% *M. suaveolens*; смесь 6 – 75% *M. recutita* + 25% *M. suaveolens*; смесь 7 – 90% *M. recutita* + 10% *Pyrethrum parthenium*; смесь 8 – 75% *M. recutita* + 25% *P. parthenium*.

Note. Mixture 1: 90% *Matricaria recutita* + 10% *Leucanthemum vulgare*; Mixture 2: 75% *M. recutita* + 25% *L. vulgare*; Mixture 3: 90% *M. recutita* + 10% *Tripleurospermum inodorum*; Mixture 4: 75% *M. recutita* + 25% *T. inodorum*; Mixture 5: 90% *M. recutita* + 10% *M. suaveolens*; Mixture 6: 75% *M. recutita* + 25% *M. suaveolens*; Mixture 7: 90% *M. recutita* + 10% *Pyrethrum parthenium*; Mixture 8: 75% *M. recutita* + 25% *P. parthenium*.

объединивших синглетоны 2-4-8 и 1-3-5-6-7, принятый порог статистической значимости не был превышен ($p=0,9^6$).

В полученном распределении кластеров попадание образца 6 в кластер с образцами 1, 3, 5, 7 пока не находит своего объяснения и требует

⁶ В случае, когда синглетон характеризуется достоверной вероятностью $p=0,95$, а критерий несходства в виде индивидуальной изменчивости содержания имеет $p=0,95$, то общая достоверная вероятность их совместного применения будет равна произведению достоверных вероятностей $0,95 \times 0,95 = 0,9025$.

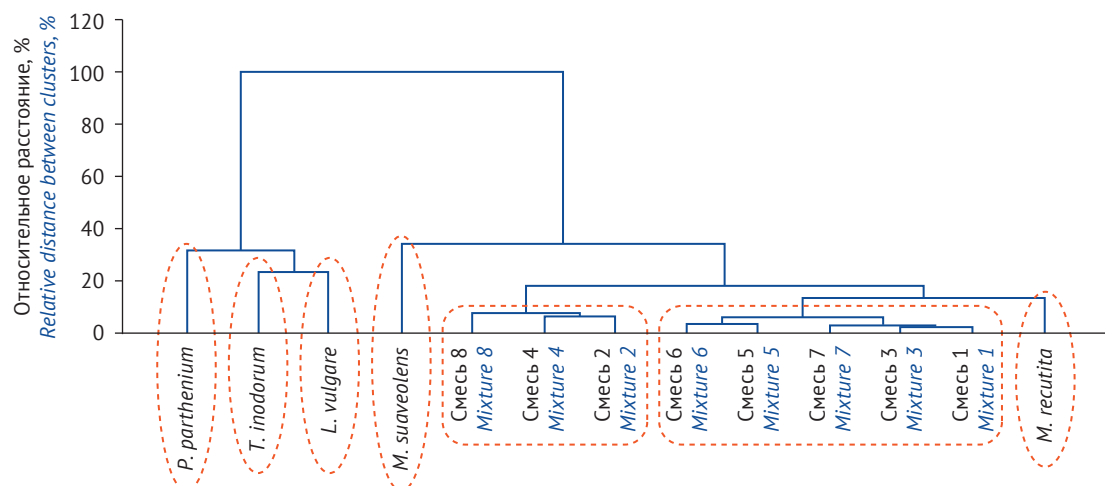


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Иерархическое дерево кластеризации содержания микроэлементов в растениях семейства сложноцветных

Fig. 1. Hierarchical cluster tree for the content of trace elements in Compositae spp.

дальнейшего изучения. В целом анализ иерархического дерева позволил показать, что наиболее близки по микроэлементному статусу ромашка аптечная и пахучая, и это коррелирует с их таксономией. Смеси же, что вполне естественно, занимают промежуточные кластеры между ромашками (преобладающий вклад в их состав вносит ромашка аптечная). Все примесные виды растений и смеси с содержанием 10% и более примесей только по критерию несходства значительно отличаются от кластера микроэлементного состава ромашки аптечной, при этом сама кластерная группа не может рассматриваться как статистически значимый объект по результатам кластерного анализа.

Таким образом, необходима дальнейшая стандартизация метода кластерного анализа микроэлементного состава ЛРС «Ромашки аптечной цветки» для решения вопроса о возможности его использования как потенциального инструмента

для анализа сложных смесей растительного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построенное на примере растений семейства сложноцветных и их смесей иерархическое дерево кластеризации по 56 микроэлементам позволило определить сходство микроэлементного состава близкородственных видов *Matricaria recutita* и *Matricaria suaveolens*. Предложенный метод позволяет выявить присутствие примесных видов растений при их содержании в смеси более 10%.

Показана потенциальная возможность использования метода иерархической кластеризации содержания микроэлементов в биологической матрице для анализа сложных систем, и в том числе смесей растений.

При дальнейшей стандартизации метода данный подход может быть использован в качестве дополнительного критерия комплексной оценки качества лекарственного растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Самылина ИА, Баландина ИА. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация. *Фармация*. 2004;52(2):39–41. Samylina IA, Balandina IA. Ways of the use of medicinal plant raw materials and its standardization. *Pharmacy*. 2004;52(2):39–41 (In Russ.).
- Стоянова ЯВ, Стреляева АВ, Кузнецов РМ, Стреляев НД, Боброва ЕИ. Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья травы пижмы обыкновенной и недопустимой примеси к сырью растений рода лютик. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2023;22(2):215–22. Stoyanova YV, Strelyaeva AV, Kuznetsov RM, Strelyaev ND, Bobrova EI. Pharmacognostic study of herb of *Tanacetum vulgare* L. Medicinal plant raw materials and unacceptable admixture of the genus *Ranunculus* plants raw materials. *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2023;22(2):215–22 (In Russ.). EDN: PWKQWQ
- Sakharkar P. Lead poisoning due to herbal medications. *Indian J Clin Biochem*. 2017;32(4):500–1. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0678-x>
- Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(9):82–95. <https://doi.org/10.4103%2F0973-7847.79103>
- Niu F-J, Li K-W, Wang Y-Y, Wang J, Zhou C-Z, Gao L-N. Chamomile: a review of its traditional uses, chemical

- constituents, pharmacological activities and quality control studies. *Molecules*. 2023;28(1):133. <https://doi.org/10.3390/molecules28010133>
6. Сафонова НВ, Трофимова ЕО. Обзор российского рынка растительных препаратов. *Ремедиум*. 2021;(3):11–22. Safonova NV, Trofimova EO. Overview of the Russian market of herbal products. *Remedium*. 2021;(3):11–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2021-3-11-22>
 7. Saeedi M, Khanavi M, Shahsavari K, Manayi A. *Matricaria chamomilla*: an updated review on biological activities of the plant and constituents. *Res J Pharmacogn*. 2024;11(1):109–36. <https://doi.org/10.22127/RJP.2023.404256.2145>
 8. Красноборов ИМ, ред. *Флора Сибири*. Т. 13: *Asteraceae (Compositae)*. Новосибирск: Наука; 1997. Krasnoborov IM. *Flora of Siberia*. Vol. 13: *Asteraceae (Compositae)*. Novosibirsk: Nauka; 1997 (In Russ.). EDN: VTAFNV
 9. Коновалова ДС. Анатомическое изучение пиретрума девичьего. *Фармация*. 2007;(6):19–20. Konovalova DS. Examining the anatomic structure of *Pyrethrum parthenium*. *Pharmacy*. 2007;(6):19–20 (In Russ.). EDN: KXHIND
 10. Raal A, Kaur H, Orav A, Arak E, Kailas T, Müürisepp M. Content and composition of essential oils in some *Asteraceae* species. *Proc Est Acad Sci*. 2011;60(1):55–63. <https://doi.org/10.3176/proc.2011.1.06>
 11. Lopes D, Kolodziejczyk PP. Essential oil composition of pineapple-weed (*Matricaria discoidea* DC.) grown in Canada. *J Essent Oil-Bear Plants*. 2005;8(2):178–82. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2005.10643440>
 12. Orav A, Sepp J, Kailas T, Müürisepp M, Arak E, Raal A. Composition of essential oil of aerial parts of *Chamomilla suaveolens* from Estonia. *Nat Prod Commun*. 2010;5(1):133–6. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500131>
 13. Ткачев АВ, Прокушева ДЛ, Домрачев ДВ. *Дикорастущие эфирномасличные растения Южной Сибири*. Новосибирск: Офсет-ТМ; 2017. Tkachev AV, Prokusheva DL, Domrachev DV. *Wild growing aromatic plants of the Southern Siberia*. Novosibirsk: Off-set-TM; 2017 (In Russ.). EDN: WSPENJ
 14. Mirjalili M, Salehi P, Sonboli A, Vala M. Essential oil composition of feverfew (*Tanacetum parthenium*) in wild and cultivated populations from Iran. *Chem Nat Compd*. 2007;43:218–20. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0085-2>
 15. Mojab F, Tabatabai SA, Hasanali N-B, Fahima G. Essential oil of the root of *Tanacetum parthenium* (L.) Schulz. Bip. (*Asteraceae*) from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2007;6(4):291–3. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.735>
 16. Mohammadhosseini M, Jeszka-Skowron M. A systematic review on the ethnobotany, essential oils, bioactive compounds, and biological activities of *Tanacetum* species. *Trends Phytochem Res*. 2023;7(1):1–29. <https://doi.org/10.30495/tpr.2023.700612>
 17. Морозов СВ, Ткачева НИ, Ткачев АВ. Проблемы комплексного химического профилирования лекарственных растений. *Химия растительного сырья*. 2018;(4):5–28. Morozov SV, Tkacheva NI, Tkachev AV. Problems of comprehensive chemical profiling of medicinal plants. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(4):5–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018044003>
 18. Ткачев АВ. Проблемы качественного и количественного анализа летучих веществ растений. *Химия растительного сырья*. 2017;(3):5–37. Tkachev AV. Problems of qualitative and quantitative analysis of plant volatiles. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2017;(3):5–37 (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.2017032712>
 19. Круглов ДС. Прогностическая применимость микроэлементного профиля растений для задач систематики. В кн.: *Ботаника в современном мире*. Махачкала: АЛЕФ; 2018. С. 58–60. Kruglov DS. Prognostic applicability of a trace-element profile of plants for goals of taxonomy. In: *Botany in modern world*. Makhachkala: ALEF; 2018. P. 58–60 (In Russ.). EDN: WNFKID
 20. Круглов ДС, Прокушева ДЛ, Величко ВВ. Микроэлементный статус растения в стандартизации лекарственного растительного сырья. *Фармация*. 2023;(6):12–8. Kruglov DS, Prokusheva DL, Velichko VV. Trace element status of plant for standardizing of herb raw material. *Pharmacy*. 2023;(6):12–8 (In Russ.). EDN: KZVXOM
 21. Kruglov DS, Kruglova MY, Olennikov DN. Correlation between the microelement profile and essential oil composition of plants from the *Filipendula* genus. *Russ J Bioorg Chem*. 2020;46:1378–84. <https://doi.org/10.1134/S1068162020070055>
 22. Круглов ДС. Применение метода многофакторной кластеризации для анализа микроэлементного состава растений. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2022;(спец. выпуск):53–7. Kruglov DS. Application of the multifactor clustering method to analyze the microelement composition of plants. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2022;(special issue):53–7 (In Russ.). EDN: UAUPPX
 23. Круглов Д.С. Исключение влияния экзогенного загрязнения на микроэлементный состав лекарственных растений. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):698–707. Kruglov D.S. Elimination of exogenous pollution influence on the microelement composition of medicinal plants. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):698–707 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617>
 24. Hartigan JF. *Clustering algorithms*. New York: John Wiley & Sons; 1975.
 25. Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical clustering method: Which algorithms implement Ward's criterion? *J Classif*. 2014;31:274–95. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.Л. Прокушева — концепция работы, культивирование, сбор и сушка сырья, написание разделов рукописи «Введение» и «Заключение»; Д.С. Круглов — разработка методики пробоподготовки сырья для микроэлементного анализа, анализ данных, написание разделов рукописи «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение»; В.В. Величко —

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Darya L. Prokusheva conceptualised the study; cultivated, collected, and dried herbal drugs; and drafted the Introduction and Conclusion sections. Dmitriy S. Kruglov developed the sample preparation procedure for trace element analysis, analysed data, and drafted the Materials and Methods section and the Discussion section. Victoria V. Velichko edited

редактирование и переработка текста рукописи, написание резюме, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллективу Химико-аналитического центра «Плазма» (г. Томск) и его директору Н.В. Федюниной за помощь в проведении настоящей работы.

and revised the manuscript, drafted the abstract, and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the staff of the Chemical-Analytical Center "Plasma" (Tomsk) and its director N.V. Fedyunina for assistance in carrying out this work.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Прокушева Дарья Леонидовна, канд. фарм. наук, доцент / **Darya L. Prokusheva**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0480-2311>

Круглов Дмитрий Семенович, канд. техн. наук, доцент / **Dmitriy S. Kruglov**, Cand. Sci. (Techn.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1904-7901>

Величко Виктория Владимировна, канд. фарм. наук, доцент / **Victoria V. Velichko**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9224-9350>

Поступила 22.03.2024

После доработки 10.07.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Online first 03.10.2024

Received 22 March 2024

Revised 10 July 2024

Accepted 21 August 2024

Online first 3 October 2024



И.Ю. Якупов ✉ 
С.И. Кулешова 
О.Н. Высочанская 
Е.П. Симонова 

Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок малого объема

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

✉ Якупов Илья Юрьевич; yakupoviy@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Лекарственные препараты на основе нафтифина широко используются в медицинской практике для лечения грибковых инфекций. Одним из основных показателей качества лекарственного препарата является содержание действующего вещества. При разработке методик количественного определения для рутинного анализа лекарственных средств особое внимание уделяется сокращению временных и материальных затрат.

ЦЕЛЬ. Модернизация методики количественного определения нафтифина и его примесей в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием колонок малого объема, позволяющих сократить время анализа и расход реактивов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектами исследования были субстанция и препараты нафтифина в форме 1% спиртового раствора и крема для наружного применения. Хроматографирование растворов проводили на жидкостных хроматографах Agilent 1200 Infinity и Agilent Infinity II 1290, оснащенных диодно-матричными детекторами с использованием нескольких хроматографических колонок: XBridge Phenyl 20×4,6 мм с размерами частиц 2,5 и 3,5 мкм и Acquity BEH Phenyl 75×2,1 мм, 1,7 мкм. Для оценки специфичности методики использовали образцы N-метил-1-нафталинметиламина, коричневого альдегида и растворы нафтифина после химической, термической и фотолитической деструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Подобран оптимальный нетоксичный растворитель проб — 0,1% раствор ортофосфорной кислоты и доказано, что для разных лекарственных форм могут быть применены разные растворители. Выбраны условия анализа: концентрация испытуемых растворов нафтифина — 10 мкг/мл, колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм; 2,5 мкм), градиентный режим элюирования смесью 0,1% раствора хлорной кислоты и ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Показано, что детектирование при длине волны 254 нм обеспечивает наилучшее соотношение сигнала и шума для пика нафтифина. Воспроизводимость разработанной методики количественного определения нафтифина была подтверждена валидацией согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации. Специфичность методики подтверждена хроматографированием растворителя, подвижной фазы и модельных растворов, содержащих основные примеси нафтифина. Линейность методики подтверждена в диапазоне 80–120% нафтифина (коэффициент корреляции составил 0,995). При проверке правильности методики открываемость составила 100,2%. Доказана устойчивость методики при незначительных изменениях хроматографических параметров. Время удерживания пика нафтифина — около 2 мин.

ВЫВОДЫ. Разработана селективная и чувствительная ВЭЖХ-методика количественного определения нафтифина в лекарственных средствах, позволяющая сократить время анализа и свести к минимуму расход используемых реагентов. Результаты валидации методики удовлетворяют критериям приемлемости, подтверждают ее пригодность и воспроизводимость.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; нафтифин; количественное определение; продукты деструкции нафтифина; валидация

Для цитирования: Якупов И.Ю., Кулешова С.И., Высочанская О.Н., Симонова Е.П. Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок малого объема. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):673–685. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-673-685>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya Yu. Yakupov 
Svetlana I. Kuleshova 
Olga N. Vysochanskaya 
Elena P. Simonova 

Quantitative Determination of Naftifine and Its Degradation Products in Medicines by HPLC with Small-Volume Columns

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

✉ Ilya Y. Yakupov; yakupoviy@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Naftifine medicinal products are widely used in medical practice to treat fungal infections. A key quality attribute of a naftifine medicinal product is the content of the active substance. It is essential to develop quantitative analytical procedures for the routine control of medicines with a particular focus on reducing time and costs.

AIM. This study aimed to update the analytical procedures for the quantitative determination of naftifine and its impurities in medicines by high-performance liquid chromatography (HPLC) with small-volume columns providing a reduction in assay time and reagent consumption.

MATERIALS AND METHODS. This study focused on the active substance naftifine and naftifine-based medicinal products, including a 1% naftifine alcohol solution and a 1% naftifine cream for cutaneous use. The solutions were analysed on Agilent 1200 Infinity and Agilent Infinity II 1290 liquid chromatography systems equipped with diode-array detectors and several chromatographic columns: XBridge Phenyl, 20×4.6 mm, 2.5 µm; XBridge Phenyl, 20×4.6 mm, 3.5 µm; and Acquity BEH Phenyl, 75×2.1 mm, 1.7 µm. The specificity of the analytical procedure was evaluated using spiking solutions of *N*-methyl-1-naphthalenemethylamine and cinnamaldehyde as well as naftifine solutions after chemical, thermal, and photolytic decomposition.

RESULTS. The authors identified the optimal non-toxic solvent (0.1% orthophosphoric acid solution) and demonstrated the applicability of different solvents to different dosage forms. Additionally, the selected analytical conditions included the following: 10 µg/mL naftifine solutions were chromatographed on an XBridge Phenyl column (20×4.6 mm; 2.5 µm) using a gradient of 0.1% perchloric acid and acetonitrile at an elution rate of 1 mL/min. The study showed that the selected detection wavelength of 254 nm provided the best signal-to-noise ratio for the naftifine peak. The reproducibility of the developed quantitative determination procedure was confirmed by validation in accordance with the current requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The specificity of the analytical procedure was shown by chromatographic analysis of the solvent, mobile phase, and solutions containing the main naftifine impurities. The validation study confirmed the linearity of the analytical procedure in the range of 80–120% (with a correlation coefficient of 0.995). During the accuracy validation, the recovery rate was 100.2%. The validation study demonstrated the robustness of the analytical procedure to minor changes in the chromatographic parameters. The naftifine retention time amounted to approximately 2 minutes.

CONCLUSIONS. The authors developed a selective and sensitive HPLC-based analytical procedure for the quantitative determination of naftifine in medicines. This analytical procedure provides for a reduction in assay time and reagent consumption, and its compliance with the validation acceptance criteria indicates its suitability and reproducibility.

Keywords: high-performance liquid chromatography; HPLC; naftifine; quantitative determination; naftifine degradation products; validation

For citation: Yakupov I.Yu., Kuleshova S.I., Vysochanskaya O.N., Simonova E.P. Quantitative determination of naftifine and its degradation products in medicines by HPLC with small-volume columns. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):673–685. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-673-685>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Нафтифин в лекарственной форме для наружного применения используется для лечения грибковых инфекций кожи и ногтей [1], относится к классу аллиламинов [2] и обладает фунгицидным и фунгистатическим действием.

Фунгицидное действие *in vitro* нафтифин оказывает против дерматофитных микроорганизмов *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. и *Epidermophyton floccosum* [2, 3]. В исследованиях *in vivo* было показано, что активность нафтифина против *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* аналогична клотримазолу [4]. Также нафтифин проявляет антибактериальную и противовоспалительную активность, что важно при лечении поверхностных дерматозов, сопровождающихся бактериальной инфекцией и воспалением.

Для количественного определения нафтифина в лекарственных средствах используют методы спектрофотометрии в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне спектра [5] и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [6, 7]. Однако при наличии вспомогательных веществ в составе препаратов нафтифина могут быть не выполнены требования специфичности для метода УФ-спектрофотометрии, поэтому наиболее востребованным в контроле качества является метод ВЭЖХ.

В Фармакопее США (USP)¹ для анализа нафтифина гидрохлорида указана методика нормально-фазовой жидкостной хроматографии с использованием в качестве подвижной фазы смеси *n*-гексана, этанола, диметилформамида и муравьиной кислоты. Компоненты подвижной фазы обладают высокой токсичностью и легковоспламеняемы, а их летучесть может приводить со временем к изменению состава подвижной

фазы. Методика достаточно продолжительная, при этом из-за большой скорости потока элюента (2 мл/мин) расходуется большое количество подвижной фазы. Поэтому актуален выбор условий анализа и совершенствование методики определения нафтифина в лекарственных препаратах.

Цель работы – модернизация методики количественного определения нафтифина и его примесей в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием колонок малого объема, позволяющих сократить время анализа и расход реактивов.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- подобрать оптимальные условия хроматографирования нафтифина;
- выбрать условия пробоподготовки для различных лекарственных форм;
- подтвердить пригодность разработанной методики, определив ее валидационные характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Субстанция-порошок нафтифина (Olon S.p.A.), образцы лекарственных препаратов в форме 1% спиртового раствора и 1% крема для наружного применения, зарегистрированные для применения на территории Российской Федерации², фармакопейный стандартный образец нафтифина гидрохлорида (USP).

Реактивы. Фосфорная кислота (85%, Supelco), метанол (99,9%, J.T. Baker), ацетонитрил (99,9%, CARLO ERBA Reagents), спирт этиловый абсолютный (Merck), хлорная кислота (70%, Sigma-Aldrich), хлороводородная кислота (37%,

¹ Naftifine Hydrochloride. USP-NF. Rockville, MD; 2023.

² <https://grls.rosminzdrav.ru>

Merck), натрия гидроксид (99,9%, Labochem), водорода пероксид (30%, Merck).

Растворы стандартного образца. Для оценки величины аналитического сигнала, эффективности хроматографической колонки и выбора альтернативного растворителя для анализа различных лекарственных форм готовили по 5 растворов стандартного образца нафтифина (200 мкг/мл) в каждом из следующих растворителей: 0,1% растворе фосфорной кислоты (P1), метаноле (P2), смеси воды и этанола (50:50 об./об., P3), этаноле (P4), смеси 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила (70:30 об./об., P5). Затем проводили второе разведение каждого раствора в том же растворителе до концентрации около 10 мкг/мл нафтифина. Все растворы после приготовления отфильтровывали через шприцевые мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор не более 0,45 мкм (Agilent Technologies).

Модельные растворы примесей. Для выбора оптимальной длины волны был приготовлен раствор, содержащий 10 мкг/мл нафтифина, 10 мкг/мл коричневого альдегида (Sigma-Aldrich) и 10 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина (Sigma-Aldrich) в 0,1% фосфорной кислоте. Для определения селективности при проведении валидации методики была приготовлена серия модельных растворов. Раствор, содержащий 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина (Sigma-Aldrich), 1000 мкг/мл коричневого альдегида (Sigma-Aldrich) и 10 мкг/мл нафтифина в 0,1% фосфорной кислоте, готовили путем добавления образцов примесей при втором разведении раствора стандартного образца нафтифина. Растворы разложения нафтифина получали при втором разведении раствора стандартного образца путем добавления к нему растворов натрия гидроксида, соляной кислоты (до 0,1 М в конечном растворе) или водорода пероксида (до 10% в конечном растворе). Затем полученные растворы и раствор без добавления разлагающих реагентов термостатировали при 80 °C

в течение 8 ч. Раствор примесей нафтифина, полученных фотолитическим разложением, готовили при облучении УФ-лампой (длина волны 254 нм) раствора, содержащего 10 мкг/мл нафтифина в 0,1% фосфорной кислоте, в течение 8 ч.

Растворы для количественного определения. Для определения содержания нафтифина в лекарственных препаратах нафтифина использовали метод внешнего стандарта. Для этого готовили растворы стандартного образца нафтифина с концентрацией около 10 мкг/мл в 0,1% фосфорной кислоте в двух повторениях (стандартный раствор) и растворы лекарственных препаратов нафтифина с той же теоретической концентрацией, рассчитанной с учетом навесок, плотности и разведения препарата (испытываемый раствор). Все растворы после приготовления отфильтровывали через шприцевые мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор не более 0,45 мкм (Agilent Technologies).

Оборудование. Хроматографирование приготовленных растворов проводили на жидкостных хроматографах Agilent 1200 Infinity и Agilent Infinity II 1290 (Agilent Technologies), оснащенных диодно-матричными детекторами. Хроматографические колонки, которые были использованы при проведении валидации методики и оценке возможности их замены, указаны в таблице 1.

Условия анализа. Объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °C, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А — 0,1% раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б — ацетонитрил, элюирование проводили в градиентном режиме (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По своей структуре нафтифин (I) представляет собой третичный амин с метильным, (1-нафтил) метильным и циннамильным заместителями на атоме азота. Нафтифин не растворим в воде,

Таблица 1. Характеристики использованных для анализа нафтифина хроматографических колонок

Table 1. Main characteristics of the columns used for naftifine determination

Колонка Column	Длина, мм Length, mm	Внутренний диаметр, мм Inner diameter, mm	Размер частиц, мкм Particle size, μm	Степень покрытия (доля углерода), % Carbon load, %	Площадь поверхности, м ² /г Surface area, m ² /g	Свободный объем колонки, мл Empty column volume, mL
XBridge Phenyl	20	4,6	2,5	14,5	185	0,33
XBridge Phenyl	20	4,6	3,5	14,5	185	0,33
Acquity BEH Phenyl	75	2,1	1,7	15	185	0,3

Таблица составлена авторами по данным производителя колонок (Waters Corp.) / The table is prepared by the authors using data of the column manufacturer (Waters Corp.)

Таблица 2. Программа градиентного режима элюирования

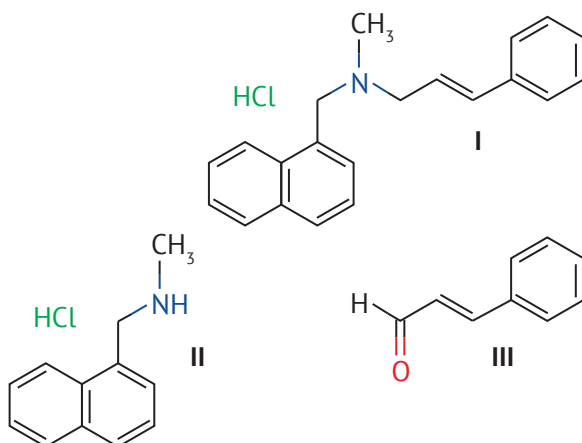
Table 2. Gradient elution programme

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза Б, % Mobile phase B, %
0	70	30
2	65	35
3	20	80
3,5	70	30
5,5	70	30

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

растворим в этаноле, метаноле, диметилсульфоксиде и других органических растворителях, а также в водных растворах кислот.

Возможными примесями нафтифина являются N-метил-1-нафталинметиламин (II), являющийся исходным продуктом при производстве субстанции, и коричный альдегид (III), близкий по структуре к циннамилхлориду – второму компоненту синтеза субстанции.



Основными критериями для выбора условий хроматографирования были максимально возможное сокращение времени анализа и снижение расхода подвижной фазы. Это было достигнуто за счет использования колонок малого объема (свободный объем около 0,3 мл) и выбора состава подвижной фазы, не требующего длительного уравнивания колонки.

Выбор компонентов подвижной фазы был основан на возможной эффективности разделения, сокращении времени уравнивания колонки и данных о токсичности растворителя. Ацетонитрил выбран как обладающий большей элюирующей силой и при этом менее токсичный компонент по сравнению с метанолом и более

удобный в работе, чем обладающий резким запахом тетрагидрофуран. Хлорная кислота в составе подвижной фазы выбрана как компонент, позволяющий обеспечить растворение нафтифина и при этом не требующий длительного уравнивания колонки в отличие от солей алкилсульфоновых кислот.

Применение колонок малого объема (свободный объем около 0,3 мл) при относительно большой скорости потока подвижной фазы (1 мл/мин) позволяет использовать градиентное элюирование с быстрым изменением состава подвижной фазы и значительно сократить время уравнивания колонки перед последующим анализом.

В качестве неподвижной фазы при хроматографировании использовали колонки с фенилгексилсилильным сорбентом (L11 по классификации USP), поскольку при применении такого сорбента основные примеси нафтифина имеют значительно отличающуюся хроматографическую подвижность.

Пригодность хроматографической системы оценивали по разделению пиков нафтифина и его примесей. При хроматографировании раствора, содержащего около 10 мкг/мл каждого из определяемых компонентов, для пиков N-метил-1-нафталинметиламина и коричневого альдегида разрешение составило $4,9 \pm 0,1$, а для пиков коричневого альдегида и нафтифина $6,9 \pm 0,1$ (рис. 1).

Для спектров поглощения нафтифина и его примесей (рис. 2) характерны максимумы 222 и 254 нм (нафтифин), 222 и 282 нм (N-метил-1-нафталинметиламин) и 206, 222, 290 нм (коричневый альдегид).

Основанием для выбора длины волны стала наибольшая чувствительность хроматографической системы, характеризующаяся соотношением сигнала и шума для пика определяемого компонента. Для количественного определения нафтифина выбрали длину волны 254 нм, поскольку для этого максимума поглощения нафтифина наблюдали низкий уровень шумов и дрейфа базовой линии. Для определения примесей выбрали длину волны 222 нм, при которой чувствительность хроматографической системы была выше, чем при 254 нм.

В таблице 3 представлены основные характеристики методики в зависимости от используемого растворителя и количественного содержания нафтифина в растворе стандартного образца (С, мкг/мл): средние площади пиков нафтифина (S, mAU×с), средний отклик, выраженный как отношение средней площади пика к концентрации

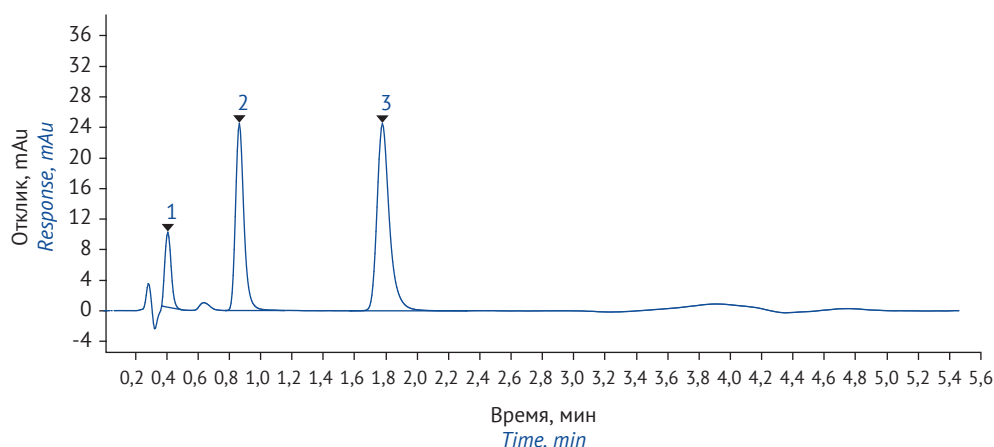


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Хроматограмма модельного раствора, содержащего по 10 мкг/мл нафтифина (3) $RT \approx 1,6$ мин, N-метил-1-нафталинметиламина (1) $RT \approx 0,4$ мин и коричного альдегида (2) $RT \approx 0,8$ мин. Условия анализа: колонка XBridge Phenyl ($20 \times 4,6$ мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

Fig. 1. Chromatogram of a model solution with 10 µg/mL spikes of naftifine (retention time (RT) ≈ 1.6 min) (3), N-methyl-1-naphthalenemethylamine (RT ≈ 0.4 min) (1), and cinnamaldehyde (RT ≈ 0.8 min) (2). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 µm), injection volume of 5 µL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

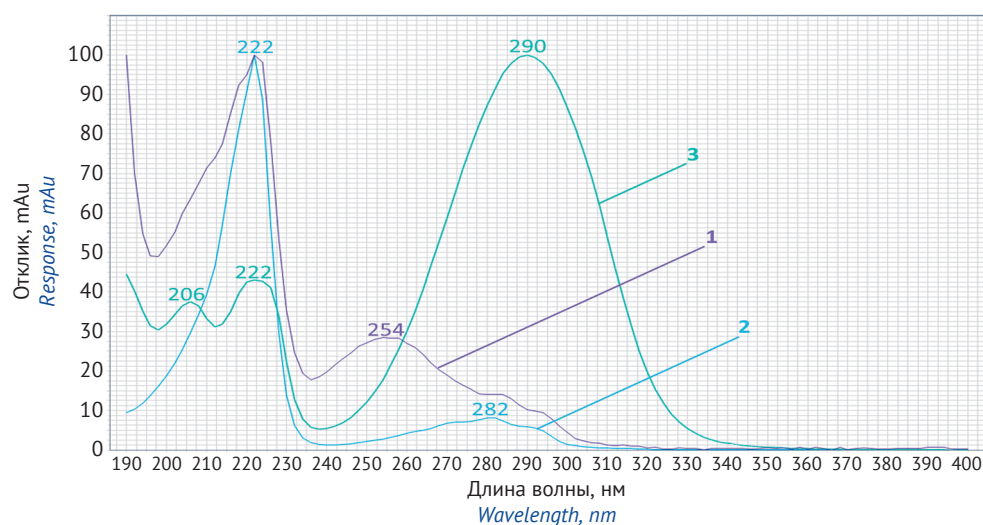


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. УФ-спектры поглощения нафтифина (1), N-метил-1-нафталинметиламина (2) и коричного альдегида (3)

Fig. 2. UV absorption spectra of naftifine (1), N-methyl-1-naphthalenemethylamine (2), and cinnamaldehyde (3)

(S/C, mAU $\times$ смл/мкг), относительное стандартное отклонение (RSD) полученного значения S/C для растворов 10 и 200 мкг/мл нафтифина, а также для всей выборки растворов.

Для проверки отсутствия влияния растворителя на форму пика нафтифина, которое могло бы нарушить точность определения площадей пиков, дополнительно определяли средние значения времени удерживания, асимметрии пика и эффективности, выраженной в количестве теоретических тарелок.

RSD отношения S/C для раствора 10 мкг/мл стандартного образца нафтифина в различных растворителях составило 0,486%, что не превышает 2%, требуемых для соблюдения критериев правильности методики. Растворы 200 мкг/мл стандартного образца нафтифина использовали для проверки сходимости результатов. На хроматограммах этих растворов наблюдали увеличение асимметрии пика и уменьшение количества теоретических тарелок, что свидетельствует о слишком большом количестве аналита

Таблица 3. Изменение характеристик пика нафтифина на хроматограммах в зависимости от используемого растворителя проб**Table 3.** Characteristics of the naftifine peak in chromatograms depending on the solvent

Определяемый показатель <i>Measured parameter</i>	Растворитель <i>Solvent</i>									
	10 мкг/мл нафтифина <i>10 µg/mL of naftifine</i>					200 мкг/мл нафтифина <i>200 µg/mL of naftifine</i>				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
S	177,4	207,5	197,5	191,4	180,2	3520,5	4078,6	3914,9	3863,4	3488,0
C	10,15	11,75	11,10	11,00	10,15	202,90	235,00	222,00	220,00	203,00
S/C	17,49	17,57	17,64	17,44	17,62	17,42	17,42	17,56	17,52	17,33
RSD, %	0,486					0,522				
RSD всей выборки, % <i>Total RSD, %</i>	0,566									
Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	2,22	2,20	2,21	2,19	2,21	2,12	2,10	2,10	2,10	2,11
Количество ТТ <i>NTP</i>	2171	2179	2242	1983	2182	1768	1734	1722	1765	1685
Фактор симметрии <i>Symmetry factor</i>	1,15	1,14	1,16	1,12	1,14	1,34	1,38	1,39	1,37	1,37

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. P1 – 0,1% раствор фосфорной кислоты, P2 – метанол, P3 – смесь воды и этанола (50:50 об./об.), P4 – этанол, P5 – смесь 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила (70:30 об./об.), S – площадь пика нафтифина, C – концентрация нафтифина в растворе стандартного образца (мкг/мл), S/C – отношение средней площади пика к концентрации нафтифина в растворе, RSD – относительное стандартное отклонение, ТТ – теоретические тарелки.

Note. P1, 0.1% phosphoric acid; P2, methanol; P3, water-ethanol mixture (50:50 v/v); P4, ethanol; P5, 0.1% perchloric acid-acetonitrile mixture (70:30 v/v); S, naftifine peak area; C, naftifine concentration in the reference standard solution (µg/mL); S/C, naftifine peak-to-mean concentration ratio of the corresponding solution; RSD, relative standard deviation; NTP, number of theoretical plates.

для данной колонки, однако RSD отношения S/C составило 0,522% (0,566% для всей выборки). На хроматограммах, полученных для растворов нафтифина в этаноле, было отмечено уменьшение числа теоретических тарелок на ≈20% и увеличение ширины пика, при этом другие параметры изменились в допустимых пределах.

В качестве растворителя проб выбрали 0,1% раствор ортофосфорной кислоты как наиболее экономичный и сделали вывод о возможности применения любого из рассмотренных растворителей для приготовления растворов стандартного образца и испытуемых растворов препаратов, для которых может потребоваться альтернативный растворитель. Хроматограммы стандартного и испытуемого растворов представлены на рисунке 3.

Валидацию методики проводили согласно фармакопейным требованиям³, оценивали специфичность, аналитическую область, линейность, правильность, внутрилабораторную прецизионность, сходимость и устойчивость (робастность) методики. Для проведения валидации выбрали лекарственный препарат в фор-

ме 1% спиртового раствора нафтифина для наружного применения, поскольку входящие в его состав вспомогательные вещества не влияют на хроматографическое поведение нафтифина и растворение препарата не требуется. Для препаратов в форме крема с различным составом вспомогательных веществ могут требоваться значительные корректировки растворителя при пробоподготовке.

Специфичность. Хроматографировали растворитель (0,1% ортофосфорная кислота), подвижную фазу (смесь 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30) и модельные растворы, содержащие родственные примеси нафтифина, получая не менее трех хроматограмм каждого раствора. В качестве модельных растворов использовали растворы, содержащие N-метил-1-нафталинметиламин и коричневый альдегид, и растворы, подвергшиеся ускоренному разложению.

На хроматограмме модельного раствора, содержащего по 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина и коричневого альдегида и 10 мкг/мл нафтифина, обнаружили

³ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М., 2023.

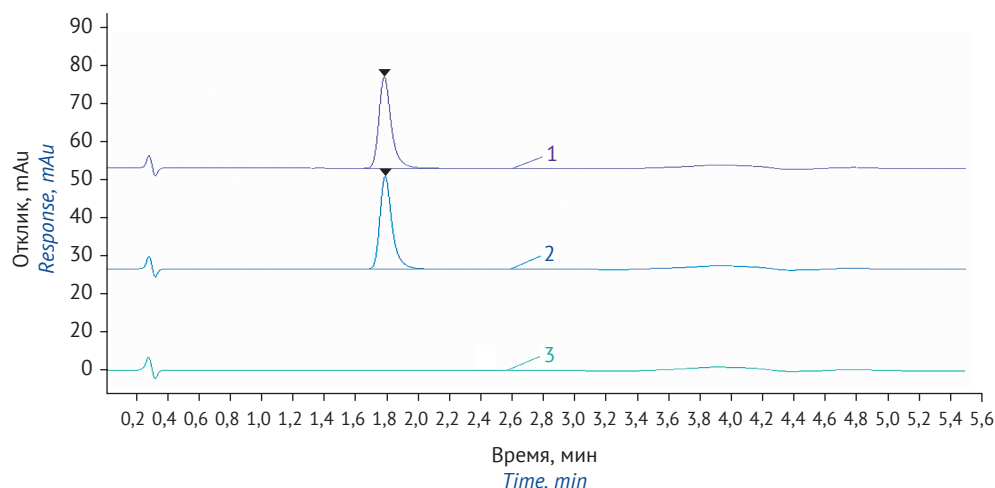


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Хроматограммы стандартного (1) и испытуемого (2) растворов нафтифина. Растворитель проб – 0,1% ортофосфорная кислота (3). Условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

Fig. 3. Chromatograms of standard (1) and test (2) solutions of naftifine. Solvent: 0.1% orthophosphoric acid (3). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 μm), injection volume of 5 μL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

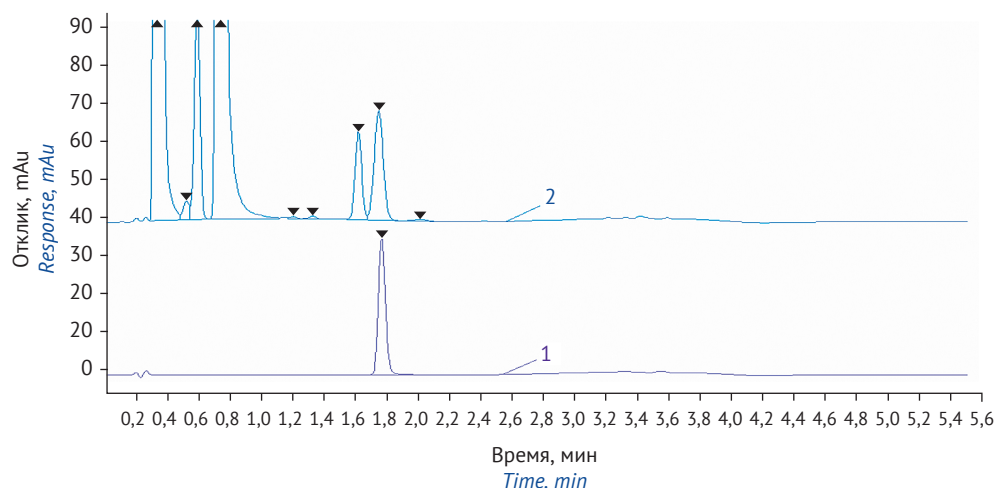


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Хроматограммы стандартного раствора нафтифина 10 мг/мл (1) и модельного раствора (2), содержащего 10 мкг/мл нафтифина, 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина и 1000 мкг/мл коричного альдегида. Условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

Fig. 4. Chromatograms of the 10 mg/mL naftifine reference standard solution (1) and a model solution spiked with 10 μg/mL of naftifine, 1000 μg/mL of N-methyl-1-naphthalenemethylamine, and 1000 μg/mL of cinnamaldehyde (2). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 μm), injection volume of 5 μL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

дополнительный пик примеси коричневого альдегида, элюирующейся вблизи пика нафтифина (рис. 4). Концентрация примесей в модельном растворе в 100 раз больше концентрации нафтифина, при этом площади пика нафтифина на хроматограммах модельного и стандартного растворов различаются менее чем на 10%.

Таким образом, присутствие данных примесей даже в значительных количествах не оказывает существенного влияния на определение содержания нафтифина в препарате.

На хроматограммах растворов, полученных после термического, кислотного и щелочного разложения нафтифина, не обнаружили новых

пиков примесей по сравнению со стандартным раствором, что свидетельствует об устойчивости нафтифина в данных условиях.

После окислительного и фотолитического разложения нафтифина на хроматограммах соответствующих растворов обнаружили новые пики примесей, а площадь пика нафтифина значительно уменьшилась. Пики примесей имеют разрешение с пиком нафтифина не менее 2,0 и не влияют на количественное определение нафтифина в растворе.

Аналитическая область методики. С учетом лекарственных форм, в которых препараты нафтифина представлены на российском фармацевтическом рынке (растворы для наружного применения и кремы для наружного применения), была определена аналитическая область методики. В диапазоне 80–120% от предлагаемой концентрации нафтифина в испытуемом растворе (10 мкг/мл) проводили определение линейности, правильности и прецизионности методики.

Линейность. Для определения зависимости величины сигнала от концентрации определяемого вещества в испытуемом растворе готовили пять растворов, содержащих 8, 9, 10, 11 и 12 мкг/мл стандартного образца нафтифина

в 0,1% фосфорной кислоте, соответствующих уровням концентрации 80, 90, 100, 110 и 120%. Зависимость площади пика нафтифина на хроматограммах полученных растворов от его концентрации описывается линейным уравнением регрессии $y=18,536x-1,4793$. Аппроксимация линейной регрессии считается приемлемой при значениях коэффициента корреляции (R) не менее 0,99, для нафтифина в диапазоне концентраций от 80 до 120% R^2 составил 0,9943, что подтверждает линейность методики.

Правильность. Открываемость результатов при оценке правильности методики должна находиться в диапазоне от 98,0 до 102,0%⁴. Готовили два стандартных раствора нафтифина (10 мкг/мл) для расчета сходимости между ними, а также три испытуемых раствора препарата, содержащих около 8, 10 и 12 мкг/мл нафтифина (табл. 4). Концентрацию нафтифина в испытуемом растворе ($C_{исп}$) определяли методом внешнего стандарта по формуле (1):

$$C_{исп} = S_{исп} \times \bar{O}_{ст} \quad (1)$$

где $S_{исп}$ – площадь пика нафтифина на хроматограмме испытуемого раствора, $\bar{O}_{ст}$ – среднее значение отклика пика нафтифина ($O_{ст}$), рассчитанного по формуле (2) для двух последовательных

Таблица 4. Результаты оценки правильности методики количественного определения нафтифина

Table 4. Accuracy assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine

Уровень содержания, % <i>Content level, %</i>	Навеска препарата, мг <i>Sample weight (medicinal product), mg</i>	Площадь пика, mAu×с <i>Peak area, mAu×с</i>	Найденная концентрация нафтифина в испытуемом растворе, мкг/мл <i>Calculated naftifine concentration (test solution), µg/mL</i>	Найденное содержание нафтифина в препарате, мг/мл <i>Calculated naftifine content (medicinal product), mg/mL</i>	Открываемость, % <i>Recovery, %</i>
80	8209,44	131,58	7,47	9,80	100,09
		131,68	7,47	9,81	100,17
		131,70	7,47	9,81	100,19
100	10665,80	171,03	9,71	9,81	100,17
		171,32	9,72	9,83	100,34
		171,13	9,71	9,81	100,22
120	13014,44	208,56	11,84	9,80	100,05
		208,66	11,84	9,80	100,10
		209,01	11,86	9,82	100,27
Среднее значение <i>Mean</i>				9,81±0,01	100,18±0,06
<i>RSD, %</i>				0,09	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. RSD, relative standard deviation.

⁴ Там же.

хроматограмм стандартного раствора, полученных до и после хроматографирования испытуемого раствора.

$$O_{\text{ст}} = \frac{a_{\text{ст}} \times P_{\text{ст}}}{\bar{S}_{\text{ст}} \times V_{\text{ст}}}, \quad (2)$$

где $a_{\text{ст}}$, $P_{\text{ст}}$, $V_{\text{ст}}$ – навеска, чистота и объем разведения стандартного образца нафтифина соответственно, $\bar{S}_{\text{ст}}$ – средняя площадь пика нафтифина на хроматограммах стандартного раствора. Содержание нафтифина в препарате рассчитывали по формуле (3):

$$X_{\text{исп}} = \frac{C_{\text{исп}} \times V_{\text{исп}}}{a_{\text{исп}} \times \rho_{\text{исп}}}, \quad (3)$$

где $a_{\text{исп}}$, $\rho_{\text{исп}}$, $V_{\text{исп}}$ – навеска, плотность и объем разведения препарата нафтифина соответственно, $C_{\text{исп}}$ – концентрация нафтифина в испытуемом растворе.

Для вычисления открываемости использовали известное значение содержания нафтифина в препарате $9,79 \pm 0,09$ мг/мл, определенное по методике производителя. Открываемость (%) рассчитывали как отношение определенного значения содержания нафтифина в препарате к известному.

Среднее значение открываемости составило $100,18 \pm 0,06\%$ и находилось в границах диапазона приемлемости и диапазона известного значения содержания нафтифина в препарате. Полученные результаты подтверждают правильность разработанной аналитической методики.

Внутрилабораторная прецизионность и сходимость. Анализ отдельных проб испытуемого

образца, отобранных в одной и той же серии, проводили два аналитика в разные дни на разном оборудовании с применением одних и тех же реактивов. Сходимость результатов определения содержания нафтифина для каждого аналитика оценивали по значению *RSD*, которое не должно было превышать 2,0%. Внутрилабораторную прецизионность определяли по значению *RSD* для общей выборки результатов двух аналитиков, также оценивали пересечение доверительных интервалов средних значений содержания нафтифина (табл. 5). Значение *RSD* не должно было превышать 2,0%, а пересечение доверительных интервалов считали приемлемым, если среднее значение содержания нафтифина, полученного каждым из аналитиков, находилось в границах доверительного интервала другого аналитика.

Значение *RSD* найденного содержания нафтифина не превышало 2,0% для каждого аналитика (0,59 и 0,26%). Для общей выборки результатов двух аналитиков *RSD* составило 0,44%, средние значения, полученные каждым аналитиком, находились в границах интервала другого аналитика. Полученные результаты подтверждают внутрилабораторную прецизионность и сходимость методики.

Устойчивость. Для оценки устойчивости методики количественного определения нафтифина при изменении условий проведения анализа хроматографировали стандартный раствор нафтифина концентрацией 10 мкг/мл и регистрировали влияние следующих параметров на результат:

- изменение температуры термостата колонок (от 20 до 60 °C);
- изменение скорости потока ($\pm 20\%$);

Таблица 5. Результаты оценки прецизионности и сходимости методики количественного определения нафтифина

Table 5. Precision and repeatability assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine

Найденное содержание нафтифина, мг/мл <i>Calculated naftifine content, mg/mL</i>		Оценка сходимости <i>Repeatability assessment</i>		Оценка внутрилабораторной прецизионности <i>Interlaboratory precision assessment</i>	
Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	Среднее значение <i>Mean</i>	<i>RSD</i> , %
9,63	9,72	9,72±0,05 <i>RSD</i> =0,59%	9,71±0,02 <i>RSD</i> =0,26%	9,71±0,04	0,44
9,79	9,73				
9,70	9,69				
9,73	9,70				
9,68	9,69				
9,77	9,75				

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *RSD* – относительное стандартное отклонение.

Note. *RSD*, relative standard deviation.

- изменение длины волны детектора (± 2 нм от заданного значения 254 нм);
- использование альтернативных колонок (табл. 1).

Влияние изменений перечисленных параметров на результат анализа считали незначительным при соблюдении следующих характеристик пригодности системы:

- RSD площади пика нафтифина не превышает 2,0%;
- RSD времени удерживания пика нафтифина не превышает 2,0%;

- фактор симметрии пика нафтифина составляет от 0,8 до 1,5;
- число теоретических тарелок по пику нафтифина составляет не менее 2000;
- изменение площади пика нафтифина относительно полученной в стандартных условиях проведения анализа удовлетворяет критериям правильности и находится в диапазоне $\pm 2\%$.

Результаты проведенных тестов, а также их соответствие критериям приемлемости приведены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты оценки устойчивости методики количественного определения нафтифина при изменении условий анализа

Table 6. Robustness assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine (with changes in the analytical conditions)

Параметр системы <i>System parameter</i>	Значение параметра <i>Parameter value</i>	RSD_s , %	RSD_t , %	Симметрия пика <i>Peak symmetry</i>	Количество ТТ <i>NTP</i>	ΔS , %
Температура термостата колонок, °C <i>Column oven temperature, °C</i>	20	0,45	0,06	1,32	6206	-0,28
	25	0,72	0,05	1,13	3186	-0,19
	28	0,65	0,05	1,11	3200	-0,30
	30	0,65	0,05	1,12	3189	–
	32	0,79	0,05	1,28	3196	-0,03
	35	0,81	0,05	1,42	3189	-0,46
	40	0,61	0,09	1,46	3099	-0,49
	50	0,61	0,11	1,41	2922	-0,34
Скорость потока, мл/мин <i>Flow rate, mL/min</i>	60	0,66	0,10	1,37	2784	-0,36
	0,8	0,30	0,26	1,36	2831	-0,60
	0,9	0,24	0,47	1,36	2652	-0,46
	1,0	0,20	0,20	1,38	2525	–
	1,1	0,17	0,18	1,39	2434	-0,09
Длина волны детектора, нм <i>Detection wavelength, nm</i>	1,2	0,30	0,22	1,35	2320	0,35
	252	0,13	0,07	1,21	2660	-1,59
	254	0,19	0,07	1,21	2660	–
Замена колонки <i>Column replacement</i>	256	0,30	0,07	1,21	2660	-0,38
	3,5 мкм* <i>3.5 μm^*</i>	0,11	0,02	1,45	2150	1,58
	2,5 мкм* <i>2.5 μm^*</i>	0,19	0,07	1,21	2660	–
	75×2,1 мм, 1,7 мкм** <i>75×2.1 mm, 1.7 μm^{**}</i>	0,08	0,08	1,30	8567	0,16

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. RSD_s – относительное стандартное отклонение площади пика, RSD_t – относительное стандартное отклонение времени удерживания, ТТ – теоретические тарелки.

* колонка XBridge Phenyl.

** колонка Acquity BEH Phenyl.

Note. RSD_s , relative standard deviation of the peak area; RSD_t , relative standard deviation of the retention time; NTP, number of theoretical plates.

* XBridge Phenyl column.

** Acquity BEH Phenyl column.

При изменении температуры термостатирования хроматографической колонки в диапазоне 25–60 °С не наблюдали значительных изменений характеристик пиков. При температуре 20 °С обнаружили увеличение числа теоретических тарелок для пика нафтифина, что связано с увеличением времени удерживания пика и его элюированием на другой стадии градиентной программы. При таком режиме элюирования есть вероятность наложения пика нафтифина на пики примесей и получения ошибочных результатов анализа. Влияния других параметров системы на характеристики ее пригодности не обнаружили.

При изменении скорости потока учитывали, что особенностью проточного спектрофотометрического детектора является изменение времени нахождения детектируемого вещества в ячейке детектора. Поэтому в расчетах при определении влияния скорости потока на результат значение площади пика нафтифина умножали на соответствующее значение скорости потока подвижной фазы (мл/мин). На основании полученных данных подтвердили, что при учете пересчета площадей система остается устойчивой к изменениям скорости потока элюента. При проведении анализа при измененной, но постоянной в течение анализа скорости потока, значительных влияний на результаты не обнаружили.

Изменение длины волны детектора в диапазоне ± 2 нм от заданного значения не оказало существенного влияния на результат анализа. При замене хроматографической колонки также не обнаружили значительных различий в результатах количественного определения нафтифина. Однако при использовании колонки Acquity BEH Phenyl большей длины и с частицами меньшего размера (75 $\times$ 2,1 мм, 1,7 мкм) обнаружили значительное увеличение эффективности хроматографического разделения, что может улучшить определение примесей нафтифина и послужить основой для более детального анализа. За счет изменения диаметра колонки ее свободный объем отличается незначительно (табл. 1), вследствие чего не происходит изменения времени удерживания пика нафтифина. Недостатком такой замены можно считать дополнительные требования к хроматографической системе, связанные с большим давлением на колонке Acquity BEH Phenyl, что требует использования хроматографа

системы ультраэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ).

Полученные результаты позволили подтвердить, что внесение изменений в условия проведения анализа не приводит к значительным изменениям результатов определения содержания нафтифина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования была разработана эффективная ВЭЖХ-методика количественного определения нафтифина в лекарственных средствах, которая позволяет сократить время анализа (время удерживания нафтифина — около 2 мин) и свести к минимуму расход используемых реагентов с сохранением критериев пригодности хроматографической системы. В ходе исследований определены оптимальные условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20 $\times$ 4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), температура колонки 30 °С, подвижная фаза А — 0,1% раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б — ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме с увеличением доли ацетонитрила от 30 до 80%, скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин, объем ввода пробы 5 мкл, детектирование при 254 нм для количественного определения нафтифина и 222 нм для определения примесей.

Показана возможность использования разных растворителей для приготовления испытуемого раствора для препаратов различных лекарственных форм без значимых изменений хроматографических параметров.

Проведена валидация разработанной методики, подтверждены ее специфичность, аналитическая область (концентрация растворов от 8 до 12 мг/мл), линейность (R^2 составил 0,9943), правильность (RSD составило 0,09%), сходимость (RSD составило 0,59%), внутрилабораторная прецизионность (RSD составило 0,44%) и робастность. Полученные результаты валидации соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации и свидетельствуют о пригодности и воспроизводимости разработанной методики.

Выбраны предварительные условия анализа для определения содержания примесей нафтифина. Установлена возможность их разделения и предварительно определена длина волны детектирования (222 нм).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gupta AK, Ryder JE, Cooper EA. Naftifine: a review. *J Cutan Med Surg.* 2008;12(2):51–8. <https://doi.org/10.2310/7750.2008.06009>
2. Trailokya AA, Shirsat AB, Madhu R, Shah B. Naftifine: a topical allylamine for superficial dermatophytosis. *J Assoc Physicians India.* 2023;71(5):11–2. <https://doi.org/10.5005/japi-11001-0241>
3. Mühlbacher JM. Naftifine: a topical allylamine antifungal agent. *Clin Dermatol.* 1991;9(4):479–85. [https://doi.org/10.1016/0738-081x\(91\)90076-w](https://doi.org/10.1016/0738-081x(91)90076-w)
4. Šveikauskaitė I, Briedis V. Potential of naftifine application for transungual delivery. *Molecules.* 2020;25(13):3043. <https://doi.org/10.3390/molecules25133043>
5. Косенкова СИ, Краснюк ИИ, Краснюк (мл.) ИИ, Беязцкая АВ, Степанова ОИ, Нарышкин СР. Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(1):35–8.
6. Kosenkova SI, Krasnyuk II, Krasnyuk (Jr.) II, Belyatskaya AV, Stepanova OI, Naryshkin SR. Evaluation of the possibility of using the method of UV spectrophotometry for the development of quantitative determination of naftifine hydrochloride in its solution with a combination of PEG for the treatment of fungal infections. *Drug Development & Registration.* 2020;9(1):35–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-35-38>
7. de Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, de Moraes MO, Bezerra FA, de Moraes ME, de Nucci G. Terbinafine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *Ther Drug Monit.* 2001;23(6):709–16. <https://doi.org/10.1097/00007691-200112000-00019>
8. Gurule S, Khuroo A, Monif T, Goswami D, Saha A. Rational design for variability minimization in bioanalytical method validation: illustration with LC-MS/MS assay method for terbinafine estimation in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2010;24(11):1168–78. <https://doi.org/10.1002/bmc.1423>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.Ю. Якупов — идея, написание и графическое оформление текста рукописи, разработка хромотографических условий и проведение испытаний, выполнение валидации методики, интерпретация полученных результатов; С.И. Кулешова — разработка концепции исследования, критический пересмотр текста рукописи, анализ результатов; О.Н. Высочанская — проведение валидации, написание и графическое оформление текста рукописи; Е.П. Симонова — разработка условий проведения испытания, выполнение валидации методики.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya Yu. Yakupov conceived the study idea, drafted the manuscript, designed the graphical material, developed the chromatographic conditions, conducted testing, validated the analytical procedure, and interpreted the results obtained. Svetlana I. Kuleshova conceptualised the study, critically revised the manuscript, and analysed the study results. Olga N. Vysochanskaya conducted validation, drafted the manuscript, and designed the graphical material. Elena P. Simonova developed the testing conditions and validated the analytical procedure.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Якупов Илья Юрьевич / Ilya Yu. Yakupov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук / Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Высочанская Ольга Николаевна / Olga N. Vysochanskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Симонова Елена Павловна / Elena P. Simonova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>

Поступила 29.08.2024

После доработки 29.10.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 29 August 2024

Revised 29 October 2024

Accepted 4 December 2024



Г.И. Горбачевич¹ ,
Л.С. Зеневич²,
И.Р. Баталова²,
С.А. Коваленко³ ,
П.М. Бычковский² 

Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов плодовых тел *Ganoderma lingzhi* и *Ganoderma lucidum*

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр. Дзержинского, д. 83, г. Минск, 220116, Республика Беларусь

² Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром БГУ»,
ул. Академика Курчатова, д. 1, г. Минск, 220045, Республика Беларусь

³ Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»,
ул. Пролетарская, д. 71, г. Гомель, 246001, Республика Беларусь

✉ Горбачевич Глеб Иванович; hleb.harbatsevich@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Грибы рода *Ganoderma* spp., используемые в восточной медицине и в качестве биологически активных добавок к пище, представляют интерес как источники эффективных антиоксидантов. В Российской Федерации и Республике Беларусь не разработана нормативная документация по контролю качества этого вида сырья и его биологически активных веществ, поэтому исследование химического состава и спектра фармакологической активности экстрактов *G. lingzhi* и *G. lucidum* является актуальной задачей.

ЦЕЛЬ. Установление химического состава и антиоксидантной активности экстрактов плодовых тел *G. lingzhi* и *G. lucidum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объектами исследования явились чистые культуры *G. lingzhi* и *G. lucidum* из коллекции штаммов грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси». Для культивирования биомассы использовали два субстрата на основе опилок ольхи (степень измельчения 1–3 мм) и стружки дуба (степень измельчения 5–10 мм). Экстрагирование биомассы проводили 70% этанолом по методу ремацерации. Для определения антирадикальной активности экстрактов грибов использовали реакцию со стабильным свободным радикалом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и катион-радикалом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты). Химический состав экстрактов исследовали методом хроматомасс-спектрометрии. Определение количества фенольных, стероидных и тритерпеновых соединений проводили спектрофотометрически.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что наибольшую антирадикальную активность проявляет экстракт штамма 334 *G. lucidum*, выращенный на субстрате ольхи (концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) по реакции с DPPH=3,1±0,2 мкг/мл, IC_{50} (ABTS)=3,7±0,2 мкг/мл) и характеризующийся максимальным содержанием фенольных (326,2±16,5 мкмоль/г) и тритерпеновых соединений (2,00±0,11 ммоль/г). Антиоксидантная активность полученных экстрактов может быть обусловлена содержанием ганодеровой кислоты D, люциденовой кислоты D и нарингенина и других фенольных соединений.

ВЫВОДЫ. Высокий выход экстракта со значительным уровнем антиоксидантной активности позволяет рассматривать искусственно выращенные грибы *G. lingzhi* и *G. lucidum* в качестве перспективных источников природных антиоксидантов.

Ключевые слова: *Ganoderma lingzhi*; *Ganoderma lucidum*; антиоксидантная активность; антирадикальная активность; ганодеровые кислоты; люциденовые кислоты; нарингенин; фенольные соединения; тритерпены

Для цитирования: Горбачевич Г.И., Зеневич Л.С., Баталова И.Р., Коваленко С.А., Бычковский П.М. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов плодовых тел *Ganoderma lingzhi* и *Ganoderma lucidum*. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2024;14(6):686–697. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Hleb I. Harbatsevich¹ 
Liliana S. Zenevich²,
Irina R. Batalova²,
Snezhana A. Kovalenko³ 
Pavel M. Bychkovsky² 

Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Ganoderma lingzhi* and *Ganoderma lucidum* Fruiting Body Extracts

¹ Belarusian State Medical University,
83 Dzerzhinsky Ave, Minsk 220116, Republic of Belarus

² Unitechprom BSU,
1 Academician Kurchatov St., Minsk 220045, Republic of Belarus

³ Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus,
71 Proletarskaya St., Gomel 246050, Republic of Belarus

✉ Hleb I. Harbatsevich; hleb.harbatsevich@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. *Ganoderma* spp. have been used as a traditional oriental medicine and a bioactive dietary supplement. These fungi are a promising source of effective antioxidants. Currently, there is no regulatory framework to control the quality of this herbal drug and its bioactive components in the Russian Federation and the Republic of Belarus. Therefore, it is essential to study the chemical composition and pharmacological activity spectrum of *G. lingzhi* and *G. lucidum* extracts.

AIM. The aim of this study was to determine the chemical composition and antioxidant activity of *G. lingzhi* and *G. lucidum* fruiting body extracts.

MATERIALS AND METHODS. The study focused on pure cultures of *G. lingzhi* and *G. lucidum* obtained from the fungal species collection of the Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus. Fungal biomass was grown using two substrates, including alder sawdust (1–3 mm fraction) and oak shavings (5–10 mm fraction). The fungal biomass was extracted using repeated maceration with 70% ethanol. The study tested the free radical-scavenging activity of the extracts in reactions with the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the radical cation derived from 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). The chemical composition was analysed by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS). The assays for phenols, steroids, and triterpenes used spectrophotometry.

RESULTS. The extract of *G. lucidum* strain 334 cultivated on the alder substrate demonstrated the highest free radical-scavenging activity ($IC_{50}=3.1\pm0.2$ µg/mL (DPPH), $IC_{50}=3.7\pm0.2$ µg/mL (ABTS)), the highest phenolic content (326.2 ± 16.5 µmol/g), and the highest triterpene content (2.00 ± 0.11 mmol/g) of all the studied extracts. The antioxidant activity of the extracts of *G. lingzhi* and *G. lucidum* may be attributed to the content of ganoderic acid D, lucidenic acid D, naringenin, and other phenolic compounds.

CONCLUSION. The high yield of extracts with a significant radical-scavenging activity makes artificially cultivated *G. lingzhi* and *G. lucidum* mushrooms a promising source of natural antioxidants.

Keywords: *Ganoderma lingzhi*; *Ganoderma lucidum*; antioxidant activity; free radical-scavenging activity; ganoderic acids; lucidenic acids; naringenin; phenolic compounds; triterpenes

For citation: Harbatsevich H.I., Zenevich L.S., Batalova I.R., Kovalenko S.A., Bychkovsky P.M. Chemical composition and antioxidant activity of *Ganoderma lingzhi* and *Ganoderma lucidum* fruiting body extracts. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):686–697. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы описано около 220 видов грибов рода *Ganoderma*, более 400 таксонов, из которых 167 относится к лакированным видам [1]. Молекулярно-генетический анализ таксонов, обозначенных как *G. lucidum*, включая штаммы, коммерчески культивируемые для производства лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище, позволил выявить, что это название охватывает множество различных видов и ранее часто применялось неправильно [2]. Ошибки таксономической идентификации штаммов ганодермы препятствуют комплексным стратегиям поиска новых лекарственных средств. Используемые в медицинских, химических, геномных исследованиях изоляты *G. lingzhi* (син. *G. sichuanense*), а также коммерчески культивируемые штаммы до сих пор объединяют под общим названием *G. lucidum*, хотя около 20 лет назад было показано, что образцы *G. lucidum* из Европы и Восточной Азии в большинстве своем не являются конспецифическими [3], а вид *G. lingzhi* отличается от близкородственного вида *G. lucidum* [4].

Экстракты плодовых тел, мицелия, культуральная жидкость, споры *G. lucidum* и *G. lingzhi* обладают широким спектром фармакологических свойств и используются в качестве источника биологически активных веществ (БАВ) [5], оказывающих иммуномодулирующее, противоопухолевое [6, 7], противовирусное [8], антимикробное [9], гиполипидемическое, гипогликемическое [10], гепатопротекторное [11] и противовоспалительное действия [12]. Стоимость препаратов, получаемых из грибов рода *Ganoderma*, в настоящее время ежегодно оценивается почти в два млрд \$ [4]. Плодовые тела *Ganoderma* spp. имеют уникальный химический состав: содержат микроэлементы (железо, цинк, медь, марганец, селен) [13], полисахариды [14, 15], белки [16], лектины [17], витамины (B_1 , B_2 , B_6 , PP, D_2), тритерпеновые соединения преимущественно ланостанового ряда [18].

Биологическая активность *Ganoderma* spp. в значительной степени может быть обусловлена антиоксидантным действием содержащихся в плодовых телах соединений. Избыточное образование свободных радикалов является причиной повреждения клеточных структур

и составляющих их биомолекул (мембранные липиды, нуклеиновые кислоты, белки и ферменты), что может приводить к развитию хронических заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания печени, язвенный колит, воспаление и рак) [19]. Снизить риски или предотвратить прогрессирование этих патологических состояний возможно путем усиления естественной антиоксидантной защиты организма или с помощью экзогенных антиоксидантов. В связи с этим изучение природных антиоксидантов и поиск содержащего их сырья являются весьма актуальными задачами современных исследований в области химии, биологии и фармации [20].

Дополнительной задачей при использовании нового природного сырья для фармацевтических целей является его стандартизация. Химический состав растительного сырья зависит от вида производящего растения, условий выращивания, фазы вегетации и времени сбора, способа подготовки сырья, режима экстракции и других факторов. Если источником сырья являются грибы, то на качественный и количественный состав продукта влияют характеристики не только исходного штамма гриба, но и используемого для его выращивания субстрата. Представляется актуальным изучение влияния этих факторов на биологическую активность целевого продукта с дальнейшей стандартизацией грибного сырья и оптимизацией условий выделения БАВ. Необходимым этапом исследования является установление взаимосвязи между химическим составом сырья и биологической активностью полученных экстрактов.

В настоящее время на территории Российской Федерации и Республики Беларусь отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства, содержащие компоненты грибов рода *Ganoderma*. В обращении находится лишь биологически активная добавка «Рейши, трутовик лакированный, сырье растительное 25 г». Отсутствует также нормативная документация по контролю качества этого вида сырья и его биологически активных веществ.

Цель работы — установление химического состава и антиоксидантной активности экстрактов плодовых тел *G. lingzhi* и *G. lucidum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по получению плодовых тел *G. lucidum* и *G. lingzhi* проведены в лабораторных условиях сектора пищевых и лекарственных ресурсов леса Государственного научного учреждения «Институт леса Национальной академии наук Беларуси». В качестве объектов

исследований использовали чистые культуры из коллекции штаммов грибов (FIB) ГНУ «Институт леса НАН Беларуси». *G. lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai (син. *G. sichuanense* J.D. Zhao & X.Q. Zhang): штаммы 244, 266, 303, 304, 331, 333, 357, 362; *G. lucidum* (Curtis) P. Karst.: штаммы 171, 334, 335, 358 (табл. 1) и коммерческий доступный

Таблица 1. Происхождение коллекционных штаммов *Ganoderma* spp.

Table 1. Origins of collection strains of *Ganoderma* spp.

№ образца Sample No.	Вид, субстрат Species, substrate	№ штамма, год Strain No., year	Источник поступления в коллекцию Source for the collection	Растворитель, использованный для экстракции Solvent used for extraction
1	<i>G. lingzhi</i> , дуб <i>G. lingzhi</i> , oak	244, 2006	Гомельский р-н, п. Кореневка, выделен из плодового тела <i>Gomel region, Korenevka village, isolated from a fruiting body</i>	Этанол : вода (70:30 об./об.) <i>Ethanol : water (70:30 v/v)</i>
2	<i>G. lingzhi</i> , ольха <i>G. lingzhi</i> , alder			
3	<i>G. lingzhi</i> , дуб <i>G. lingzhi</i> , oak	303, 2011	Брестская обл., Березовский р-н, г. Белоозерск, грибоводческое хозяйство «Виола», выделен из посевного мицелия <i>Brest region, Byaroza district, Byelaazyorsk, Viola mushroom farm, isolated from seed mycelium</i>	
4	<i>G. lingzhi</i> , ольха <i>G. lingzhi</i> , alder			
5	<i>G. lingzhi</i> , дуб <i>G. lingzhi</i> , oak	304, 2011	Брестская обл., Березовский р-н, г. Белоозерск, грибоводческое хозяйство «Виола», выделен из посевного мицелия <i>Brest region, Byaroza district, Byelaazyorsk, Viola mushroom farm, isolated from seed mycelium</i>	
6	<i>G. lingzhi</i> , ольха <i>G. lingzhi</i> , alder			
7	<i>G. lingzhi</i> , дуб <i>G. lingzhi</i> , oak	333, 2004	г. Киев, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, чистая культура штамма IBK-1787 <i>Kyiv, M.G. Kholodny Institute of Botany, pure culture of strain IBK-1787</i>	
8	<i>G. lingzhi</i> , ольха <i>G. lingzhi</i> , alder			
9	<i>G. lucidum</i> , ольха <i>G. lucidum</i> , alder	334, 2004	г. Киев, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, чистая культура штамма IBK-1788 <i>Kyiv, M.G. Kholodny Institute of Botany, pure culture of strain IBK-1788</i>	
10	<i>G. lucidum</i> , дуб <i>G. lucidum</i> , oak	335, 2004	г. Киев, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, чистая культура штамма IBK-1683 (Германия, Weser-Champignon). Депонирован в БИМ F-373 Д <i>Kyiv, M.G. Kholodny Institute of Botany, pure culture of strain IBK-1683 (Germany, Weser-Champignon). Deposited in the Belarusian Collection of Non-pathogenic Microorganisms (BIM F-373 D)</i>	
11	<i>G. lucidum</i> , ольха <i>G. lucidum</i> , alder			
12	<i>G. lingzhi</i>	—*	Китай, Bozhou Swanf Commercial and Trade Co., Ltd <i>China, Bozhou Swanf Commercial and Trade Co., Ltd</i>	Петролейный эфир 40–70** <i>Petroleum ether 40–70**</i>
13	<i>G. lingzhi</i>	—*		Хлороформ** <i>Trichloromethane**</i>
14	<i>G. lingzhi</i>	—*		
15	<i>G. lingzhi</i>	—*		Этилацетат** <i>Ethyl acetate**</i>
16	<i>G. lingzhi</i>	—*		Этанол 96% (об.) ** <i>Ethanol 96% (v/v)**</i>

Таблица составлена авторами по данным работы [21] / The table is prepared by the authors using [21]

Примечание. * Штамм не внесен в коллекцию ГНУ «Институт леса НАН Беларуси».

** Последовательная дробная экстракция растворителями растущей полярности.

Note. *Not part of the collection of the Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus.

**Consecutive fractional extraction with solvents in order of increasing polarity.

продукт из Китая (Bozhou Swanf Commercial and Trade Co., Ltd; серия 09-2022) в качестве образца сравнения.

До молекулярно-генетической идентификации, проведенной в 2015 г. в лаборатории геномных исследований и биоинформатики ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», считалось, что все штаммы относятся к *G. lucidum*. Видовая идентификация проводилась с использованием генетических методов анализа: полимеразная цепная реакция, секвенирование по Сэнгеру. В качестве маркерного региона для видового определения использовался фрагмент рибосомной ДНК «18S рДНК-ITS1-5,8S рДНК-ITS2-28S рДНК», который является «золотым стандартом» при идентификации грибов на протяжении нескольких десятилетий и до настоящего времени¹ [22].

В эксперименте использовали два опилочных субстрата: на основе опилок ольхи *Alnus glutinosa* (степень измельчения 1–3 мм) и стружки дуба *Quercus robur* (степень измельчения 5–10 мм), обогащенных ржаными отрубями (ОАО «Молодечненский КХП», ТУ ВУ 500022448.002-2019) в весовом соотношении 4:1, с добавлением по 1% мела и гипса (ОАО «Фелуценовое подворье», кормовой), повторность опыта шестикратная. Субстрат стерилизовали при давлении 0,12 МПа (температура 122 °С) в течение 2 ч. Блоки массой по 1 кг инокулировали зерновым посевным мицелием в количестве 5% от массы субстрата; pH субстрата из ольховых опилок после автоклавирования составляла 5,9, дубовой стружки – 4,7. Влажность ольховых блоков составляла 65%, дубовых – 66%. Субстратные блоки созревали при температуре 22–24 °С. В период плодоношения в культивационном помещении поддерживали относительную влажность воздуха на уровне 70–80%, температуру 20–22 °С, уровень освещения не ниже 200 люкс. Плодовые тела отделяли от субстрата и высушивали воздушно-теневым способом (потеря в массе при высушивании сырья составляла 7,0–9,9%).

Для приготовления экстрактов грибов применяли метод ремацерации. Для экстракции использовали 10,0 г высушенного сырья, а в качестве экстрагента – 70% (об./об.) раствор этанола в воде. Экстракцию проводили в течение двух недель при комнатной температуре. Каждые 48 ч экстракт отделяли, а к сырью добавляли свежую порцию экстрагента. По завершении экстракты объединяли и фильтровали. Объединенные экстракты упаривали в вакууме

(40–50 °С) на ротормном испарителе RV 05 (Ika Werke GmbH) досуха.

Для получения фракционированных экстрактов использовали последовательную экстракцию растворителями растущей полярности: петролейный эфир (40–70, х.ч., ЭКОС-1), хлороформ (х.ч., ЭКОС-1), этилацетат (х.ч., ЭКОС-1) и этанол (ректифицированный, ОАО «Белхим»). Такой подход позволяет провести предварительное разделение БАВ по полярности. Измельчение проводили после высушивания сырья на дробилке молотковой (МОЛОТ 200). Для экстракции использовали измельченное сырье массой 20,0 г (размер частиц – не более 1000 мкм). Экстракцию проводили в течение 48 ч для каждого извлечения в аппарате Сокслета. Полученные экстракты упаривали в вакууме (30–50 °С) на ротормном испарителе.

Каждый экстракт готовили в трех параллельных извлечениях. Готовые продукты хранили в герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4±2 °С. Выход экстракта выражали как отношение массы сухого экстракта к взятой навеске сухого сырья. Потерю в массе при высушивании определяли гравиметрически после высушивания навески сырья до постоянной массы при температуре 105±2 °С.

Для определения общего содержания фенольных соединений (ОСФ) с реактивом Фолина–Чокальтеу (Merck, кат. № 109001) использовали растворы 1% экстрактов в этаноле 70% (об.). Для построения калибровочного графика готовили серию растворов галловой кислоты (ГК) в диапазоне концентраций 15,625–500 мкг/мл. В пробирки отбирали по 20 мкл растворов экстрактов, добавляли 100 мкл раствора Фолина–Чокальтеу, 400 мкл 10% раствора Na₂CO₃ (ч.д.а., ЗАО «Пять океанов»), 1500 мкл воды очищенной (получена на аквадистилляторе ДЭ-10М) и оставляли растворы на 1 ч при комнатной температуре в темном месте [23]. ОСФ в экстрактах определяли спектрофотометрически. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре HALO VIS-20 (Dynamica Scientific Ltd.) в кварцевой кювете (длина оптического пути 1 см) при длине волны 725 нм. Содержание фенольных соединений выражали в микромолях галловой кислоты на грамм сухого экстракта (мкмоль/г).

Определение количества стероидных и тритерпеновых соединений (ОСТС) в образцах экстрактов проводили спектрофотометрическим

¹ The National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

методом [24]. К 0,5 мл 0,1% спиртового раствора экстракта добавляли 0,5 мл 10% спиртового раствора ванилина (Merck, кат. № 8187180100) и 2,5 мл 70% раствора серной кислоты (х.ч., Экос-1), перемешивали, смесь выдерживали при температуре 60 °С на водяной бане WB-4 (ОДО «БЕЛАКВИЛОН») в течение 10 мин, после чего растворы охлаждали и проводили измерение их оптической плотности при длине волны 548 нм. В качестве раствора сравнения использовали реакционную смесь, не содержащую экстракта, а калибровочный график строили с использованием серии этанольных растворов холестерина 0,1–10,0 мг/мл (Merck, кат. № C8667-5G).

Для определения антирадикальной активности (как одного из составляющих антиоксидантной активности) экстрактов грибов использовали реакцию со стабильным свободным радикалом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и катион-радикалом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислоты) [25]. К 20 мкл растворов экстрактов (область концентраций 0,01–1%) добавляли по 2,0 мл раствора DPPH (Merck, кат. № 300267) или ABTS (Merck, кат. № A1888), перемешивали раствор и выдерживали в течение 40 мин. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 517 (DPPH) или 734 нм (ABTS) относительно раствора сравнения (20 мкл растворов проб и 2 мл 96% этанола). В качестве контроля использовали раствор, состоящий из 20 мкл этанола и 2 мл раствора DPPH (ABTS). Степень ингибирования (*I*) свободных радикалов рассчитывали по формуле:

$$I = \frac{A_{\text{контр}} - (A_{\text{осн}} - A_{\text{сравн}})}{A_{\text{контр}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где $A_{\text{контр}}$ — оптическая плотность, полученная в контрольном опыте (без добавления исследуемого экстракта); $A_{\text{осн}}$ — оптическая плотность, полученная в основном опыте; $A_{\text{сравн}}$ — оптическая

плотность раствора сравнения (для учета поглощения света компонентами экстракта). Антирадикальную активность экстрактов выражали в единицах концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}).

Качественный и полуколичественный состав экстрактов образцов грибов изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Готовили 0,1% раствор сухого экстракта в метаноле (квалификация для ВЭЖХ, CARLO ERBA Reagents GmbH). Анализ проводили на хроматографе Thermo Scientific Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive™ Focus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Для разделения компонентов использовали колонку с обращенной фазой C18 Kinetex 150 мм × 2,1 мм × 2,6 мкм (Phenomenex). Элюирование проводили в градиентном режиме (табл. 2), объем ввода пробы — 15 мкл, скорость потока — 0,4 мл/мин. Температура колонки поддерживалась на уровне 25 °С. Ионизация проводилась при напряжении распылительного капилляра 4 кВ в диапазоне сканирования m/z 120–1000. Скрининг молекулярных ионов проводили в режиме Full-MS (отрицательно заряженные ионы), а для идентификации отдельных компонентов дополнительно изучали продукты фрагментации целевых ионов, полученных в режиме MS/MS (энергия соударения 35 эВ). Для обработки хроматограмм использовали программные продукты Thermo Scientific Xcalibur и Chromeleon v.7.2.6.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MS Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор 70% этанола в качестве экстрагента связан с его высокой извлекающей способностью в отношении широкого спектра БАВ, относительно высокой летучестью и химической стабильностью. Метод ремацерации при комнатной

Таблица 2. Соотношение растворителей для градиентного элюирования

Table 2. Solvent ratios for gradient elution

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, 0,5% водный раствор уксусной кислоты, % Mobile phase A (0.5% acetic acid in water), %	Подвижная фаза В, ацетонитрил, % Mobile phase B (acetonitrile), %
0	80	20
1	70	30
20	70	30
60	2	98
70	2	98
75	80	20

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

температуре, несмотря на свою длительность и высокий расход растворителя, позволяет максимально сохранить содержащиеся в сырье БАВ в нативном состоянии, что крайне важно в исследовании химического состава новых природных объектов. В таблице 3 приведен выход экстрактов, полученных из образцов грибов различных штаммов. Сопоставление этих результатов с уровнем антиоксидантной активности позволяет заключить, что высокий выход экстрактивных веществ из плодовых тел отдельных штаммов *Ganoderma* spp. (образцы 1, 4, 6, 10–12) при относительно невысоком ОСФ и антирадикальной активности могут свидетельствовать об интенсивной созкстракции балластных веществ (прежде всего полисахаридов). Напротив, экстракты образцов с максимальной активностью характеризуются сравнительно невысоким выходом (табл. 3).

Антиоксидантную активность оценивали по трем параметрам: ОСФ и ингибированию DPPH и ABTS радикалов (табл. 3). Методики являются общепринятыми при оценке антиоксидантной активности природных соединений [26]. Отметим, что определение ОСФ основано на восстановлении соединений Mo(VI) до молибденовой сини. В эту реакцию могут вступать фенольные соединения: флавоноиды (нарингенин), производные гидрохинона (лингжины); а также органические соединения других классов с низким значением электрохимического потенциала (углеводы, стероиды, тритерпены, витамины и др.) [23].

Наибольшая антиоксидантная активность была отмечена для экстракта штамма 334 *G. lucidum* (образец 9), выращенного на субстрате ольхи: его ОСФ составляет $326,2 \pm 16,5$ мкмоль/г, IC_{50} (DPPH) = $3,1 \pm 0,2$ мкг/мл,

Таблица 3. Выходы экстрактов, общее содержание фенольных (в пересчете на галловую кислоту), тритерпеновых и стероидных (в пересчете на холестерин) соединений экстрактов *Ganoderma* spp. и их антирадикальная активность

Table 3. Yield, total phenolic content (expressed as gallic acid), triterpene and steroid content (expressed as cholesterol), and free radical-scavenging activity of the *Ganoderma* spp. extracts

Образец, из которого получен экстракт Extracted sample	Выход экстракта, % Extract yield, %	ОСФ, мкмоль/г TPC, $\mu\text{mol/g}$	ОСТС, ммоль/г TSTC, mmol/g	IC_{50} (DPPH), мкг/мл IC_{50} (DPPH), $\mu\text{g/mL}$	IC_{50} (ABTS), мкг/мл IC_{50} (ABTS), $\mu\text{g/mL}$
1	11,3±0,6	15,6±0,8	1,04±0,05	69,5±3,5	31,4±1,6
2	7,9±0,4	10,2±0,5	0,62±0,03	76,7±3,8	46,4±2,3
3	3,8±0,2	39,3±1,9	1,69±0,08	63,3±3,2	9,0±0,5
4	10,4±0,5	2,1±0,1	0,53±0,03	127,6±6,4	77,1±3,9
5	6,4±0,3	42,0±2,1	1,78±0,09	63,8±3,2	34,5±1,7
6	14,4±0,7	7,5±0,4	0,35±0,02	149,9±7,5	75,5±3,8
7	6,3±0,3	23,8±1,2	0,50±0,03	92,3±4,6	44,7±2,2
8	6,7±0,3	19,0±0,9	1,04±0,05	53,3±2,7	39,7±2,0
9	1,3±0,1	326,2±16,5	2,00±0,11	3,1±0,2	3,7±0,2
10	9,6±0,5	22,5±1,1	0,97±0,05	56,3±2,8	6,3±0,3
11	10,2±0,5	22,5±1,1	0,72±0,04	67,4±3,4	49,8±2,5
12	10,3±0,5	21,7±1,1	0,88±0,04	60,9±3,0	40,7±2,0
13	1,3±0,1	20,4±1,5	0,76±0,06	>200	>200
14	6,1±0,3	120,5±9,4	1,84±0,09	58,7±2,9	31,1±1,6
15	1,0±0,1	142,8±10,6	1,96±0,10	55,2±2,8	8,0±0,4
16	8,1±0,4	155,2±8,8	0,36±0,02	90,7±4,5	35,1±1,8

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ОСФ — общее содержание фенольных соединений в сухом экстракте в пересчете на галловую кислоту; ОСТС — общее содержание тритерпеновых и стероидных соединений в сухом экстракте в пересчете на холестерин; IC_{50} (DPPH) и IC_{50} (ABTS) — концентрации полумаксимального ингибирования по реакции со свободным радикалом (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и катион-радикалом (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) соответственно.

Note. TPC, total phenolic content in dry extract, expressed as gallic acid; TSTC, total steroid and triterpene content in dry extract, expressed as cholesterol; IC_{50} (DPPH), half maximal inhibitory concentration in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl stable free radical assay; IC_{50} (ABTS), half maximal inhibitory concentration in 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation assay.

а IC_{50} (ABTS)=3,7±0,2 мкг/мл, что на порядок превосходит активность других образцов, в том числе коммерчески доступного продукта (образец 12). Для образца 9 также характерно высокое значение ОСТС (2,00±0,11 ммоль/г), и следует отметить, что стероидные и тритерпеновые соединения наряду с фенолами могут вносить дополнительный вклад в антиоксидантную активность *G. lucidum*. В представленной выборке наблюдается корреляция величин IC_{50} (DPPH) и IC_{50} (ABTS).

Результаты исследования химического состава полученных экстрактов методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием представлены на рисунке 1 «Общие хроматограммы (масс-детектор, режим полного сканирования отрицательных ионов в области m/z 120–1000) образцов»², рисунке 2 «Хроматограммы экстракта образца *G. lucidum* (штамм 335, выращенный

на дубовом субстрате) по выбранным молекулярным ионам»³ (опубликованы на сайте журнала) и в таблицах 4 «Идентифицированные компоненты экстрактов *Ganoderma spp.*» и 5 «Качественный и полуколичественный состав экстрактивных извлечений *Ganoderma spp.*»⁴ (опубликована на сайте журнала). Условия разделения и ионизации подбирали эмпирически. Идентификация соединений проводилась путем анализа продуктов фрагментации молекулярных ионов целевых веществ (табл. 4 «Идентифицированные компоненты экстрактов *Ganoderma spp.*», рис. 3 «Схема фрагментации люциденовой кислоты N . M_r ([$M-H$]) = 459,28», рис. 4 «Масс-спектры идентифицированных веществ» (опубликован на сайте журнала)⁵. В экстрактах были обнаружены тритерпеновые соединения: люциденовые и ганодеровые кислоты и их производные; флавоноид нарингенин,

Таблица 4. Идентифицированные компоненты экстрактов *Ganoderma spp.*

Table 4. Identified components of *Ganoderma spp.* extracts

Соединение Compound	m/z основных осколочных фрагментов, Да m/z of main fragment ions, Da
Люциденовая кислота N <i>Lucidenic acid N</i>	459,27 [$M-H$] ⁻ ; 441,26 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 361,20 [$M-H-C_6H_{10}O$ (цикл A)] ⁻ ; 317,21 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2$] ⁻ ; 303,20 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (цикл D)] ⁻ ; 299,16 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 289,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻ ; 459,27 [$M-H$] ⁻ ; 441,26 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 361,20 [$M-H-C_6H_{10}O$ (cycle A)] ⁻ ; 317,21 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2$] ⁻ ; 303,20 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (cycle D)] ⁻ ; 299,16 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 289,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻
Люциденовая кислота A <i>Lucidenic acid A</i>	457,26 [$M-H$] ⁻ ; 439,25 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 431,27 [$M-H$] ⁻ ; 359,19 [$M-H-C_6H_{10}O$ (цикл A)] ⁻ ; 313,18 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (цикл D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 287,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (циклы C и D)] ⁻ ; 233,12 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (циклы C и D)- CH_2] ⁻ ; 457,26 [$M-H$] ⁻ ; 439,25 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 431,27 [$M-H$] ⁻ ; 359,19 [$M-H-C_6H_{10}O$ (cycle A)] ⁻ ; 313,18 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (cycle D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 287,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (cycles C and D)] ⁻ ; 233,12 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (cycles C and D)- CH_2] ⁻
Ганодеровая кислота A <i>Ganoderic acid A</i>	515,30 [$M-H$] ⁻ ; 497,29 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 479,28 [$M-H-2H_2O$] ⁻ ; 453,30 [$M-H-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 435,29 [$M-H-2H_2O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (цикл D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (циклы C и D)] ⁻ ; 233,12 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3-CH_2$] ⁻ ; 417,23 [$M-H-C_6H_{10}O$ (цикл A)] ⁻ ; 355,23 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2-H_2O$] ⁻ ; 515,30 [$M-H$] ⁻ ; 497,29 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 479,28 [$M-H-2H_2O$] ⁻ ; 453,30 [$M-H-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 435,29 [$M-H-2H_2O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (cycle D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 285,15 [$M-H-C_8H_{12}O_3-CH_2-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (cycles C and D)] ⁻ ; 233,12 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3-CH_2$] ⁻ ; 417,23 [$M-H-C_6H_{10}O$ (cycle A)] ⁻ ; 355,23 [$M-H-C_6H_{10}O-CO_2-H_2O$] ⁻
Ганодеровая кислота H <i>Ganoderic acid H</i>	571,29 [$M-H$] ⁻ ; 527,27 [$M-H-CH_3CO-H_2$] ⁻ ; 511,31 [$M-H-H_2O+H_2$] ⁻ ; 451,31 [$M-H-H_2O+H_2-CH_3COOH$] ⁻
Ганодеровая кислота D <i>Ganoderic acid D</i>	513,29 [$M-H$] ⁻ ; 495,28 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 451,29 [$M-H-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (циклы C и D)- H_2O-CO_2] ⁻ ; 149,06 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3-C_6H_{10}O$ (цикл B)- H_2O-CO_2] ⁻ ; 417,23 [$M-H-C_6H_{10}O$ (цикл A)] ⁻ ; 355,23 [$M-H-C_6H_{10}O-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (цикл D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (циклы C и D)] ⁻ ; 513,29 [$M-H$] ⁻ ; 495,28 [$M-H-H_2O$] ⁻ ; 451,29 [$M-H-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (cycles C and D)- H_2O-CO_2] ⁻ ; 149,06 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3-C_6H_{10}O$ (cycle B)- H_2O-CO_2] ⁻ ; 417,23 [$M-H-C_6H_{10}O$ (cycle A)] ⁻ ; 355,23 [$M-H-C_6H_{10}O-H_2O-CO_2$] ⁻ ; 301,18 [$M-H-C_8H_{12}O_3$ (cycle D)] ⁻ ; 299,17 [$M-H-C_8H_{12}O_3-2H_2$] ⁻ ; 247,13 [$M-H-C_{12}H_{18}O_3$ (cycles C and D)] ⁻

² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig1>

³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig2>

⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-table5>

⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig4>

Продолжение таблицы 4

Table 4 (continued)

Соединение <i>Compound</i>	<i>m/z</i> основных осколочных фрагментов, Да <i>m/z of main fragment ions, Da</i>
Люциденовая кислота D <i>Lucidenic acid D</i>	513,25 [M-H] ⁻ ; 495,32 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 471,27 [M-H-CH ₃ CO] ⁻ ; 453,18 [M-H-CH ₃ COOH] ⁻
Ганодеровая кислота XL5 <i>Ganoderic acid XL5</i>	547,33 [M-H] ⁻ ; 499,311 [M-H-CH ₃ OH] ⁻ ; 481,30 [M-H-H ₂ O-CH ₃ OH] ⁻ ; 455,30 [M-H-CH ₃ OH-CO ₂] ⁻ ; 437,31 [M-H-H ₂ O-CH ₃ OH-CO ₂] ⁻ ; 303,20 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ (цикл D)] ⁻ ; 301,18 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ -2H ₂] ⁻ ; 287,17 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ -CH ₃ -H ₂] ⁻ ; 249,15 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ (циклы C и D)] ⁻ ; 235,13 [M-H-C ₁₂ H ₁₈ O ₃ -CH ₃] ⁻ ; 431,24 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₂ (цикл A)] ⁻ ; 355,23 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₂ -CO ₂ -CH ₃ OH] ⁻ ; 547,33 [M-H] ⁻ ; 499,311 [M-H-CH ₃ OH] ⁻ ; 481,30 [M-H-H ₂ O-CH ₃ OH] ⁻ ; 455,30 [M-H-CH ₃ OH-CO ₂] ⁻ ; 437,31 [M-H-H ₂ O-CH ₃ OH-CO ₂] ⁻ ; 303,20 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ (cycle D)] ⁻ ; 301,18 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ -2H ₂] ⁻ ; 287,17 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ -CH ₃ -H ₂] ⁻ ; 249,15 [M-H-C ₈ H ₁₂ O ₃ (cycles C and D)] ⁻ ; 235,13 [M-H-C ₁₂ H ₁₈ O ₃ -CH ₃] ⁻ ; 431,24 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₂ (cycle A)] ⁻ ; 355,23 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₂ -CO ₂ -CH ₃ OH] ⁻
3,7-Оксо-12-гидрокси-ганодериновая кислота DM <i>3,7-Oxo-12-hydroxy-ganoderic acid DM</i>	483,31 [M-H] ⁻ ; 465,30 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 385,24 [M-H-C ₆ H ₁₀ O (цикл A)] ⁻ ; 301,18 [M-H-C ₁₁ H ₁₈ O ₂ (цикл D)] ⁻ ; 247,13 [M-H-C ₁₅ H ₂₄ O ₂ (циклы C и D)] ⁻ ; 483,31 [M-H] ⁻ ; 465,30 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 385,24 [M-H-C ₆ H ₁₀ O (cycle A)] ⁻ ; 301,18 [M-H-C ₁₁ H ₁₈ O ₂ (cycle D)] ⁻ ; 247,13 [M-H-C ₁₅ H ₂₄ O ₂ (cycles C and D)] ⁻
Нарингенин <i>Naringenin</i>	271,06 [M-H] ⁻ ; 243,07 [M-H-CO] ⁻ ; 203,07 [M-H-C ₃ O ₂ (цикл A)] ⁻ ; 151,00 [M-H-C ₈ H ₈ O (цикл B и C)] ⁻ ; 271,06 [M-H] ⁻ ; 243,07 [M-H-CO] ⁻ ; 203,07 [M-H-C ₃ O ₂ (cycle A)] ⁻ ; 151,00 [M-H-C ₈ H ₈ O (cycle B and C)] ⁻
Линолевая кислота <i>Linoleic acid</i>	279,22 [M-H] ⁻
Стеариновая кислота <i>Stearic acid</i>	283,26 [M-H] ⁻
12-Гидроксиганодериновая кислота C2 <i>12-Hydroxy-ganoderic acid C2</i>	533,31 [M-H] ⁻ ; 515,30 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 497,29 [M-H-2H ₂ O] ⁻ ; 471,31 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 453,30 [M-H-2H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 433,22 [M-H-C ₆ H ₁₂ O (цикл A)] ⁻ ; 533,31 [M-H] ⁻ ; 515,30 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 497,29 [M-H-2H ₂ O] ⁻ ; 471,31 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 453,30 [M-H-2H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 433,22 [M-H-C ₆ H ₁₂ O (cycle A)] ⁻
Лингжин D <i>Lingzhine D</i>	269,08 [M-H] ⁻
Ганодеровая кислота G <i>Ganoderic acid G</i>	531,30 [M-H] ⁻ ; 495,41 [M-H-2H ₂ O] ⁻ ; 469,36 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻
Ганодеровая кислота C2 <i>Ganoderic acid C2</i>	517,32 [M-H] ⁻ ; 499,33 [M-H-H ₂ O] ⁻ ; 481,34 [M-H-2H ₂ O] ⁻ ; 455,51 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 437,47 [M-H-2H ₂ O-CO ₂] ⁻
(±)-Лингжин B <i>(±)-Lingzhine B</i>	257,20 [M-H] ⁻
α-Линоленовая кислота <i>α-Linolenic acid</i>	277,21 [M-H] ⁻
Олеиновая кислота <i>Oleic acid</i>	281,25 [M-H] ⁻ ; 267,20 [M-H-CH ₂] ⁻

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

лингжины, а также входящие в состав липидов жирные кислоты: линолевая, стеариновая, α-линоленовая, олеиновая (табл. 4).

Данные таблицы 3 свидетельствуют о взаимосвязи величин ОСФ и антирадикальной активности экстрактов в отношении DPPH и ABTS. В подтверждение этому отмечена низкая радикал-ингибирующая активность экстракта в петролейном эфире (образец 13, табл. 3), содержащего малое количество фенолов (20,4±1,5 мкмоль/г), в то время как для хлороформной (образец 14), этанольной (образец 16)

и в особенности этилацетатной (образец 15) фракций характерен достаточно высокий уровень активности (табл. 3). Данные таблицы 5⁶ могут указывать на вклад флавоноида нарингенина и лингжинов в радикал-ингибирующую активность экстрактов [26, 27]. Кроме того, высокой радикал-ингибирующей активности экстрактов могут способствовать тритерпеновые кислоты (ганодеровая кислота D и люциденовая кислота D). При этом для хлороформного и этилацетатного экстрактов (табл. 3), содержащих большое количество тритерпеновых соединений (1,84±0,09 и 1,96±0,10 ммоль/г соответственно),

⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-table5>

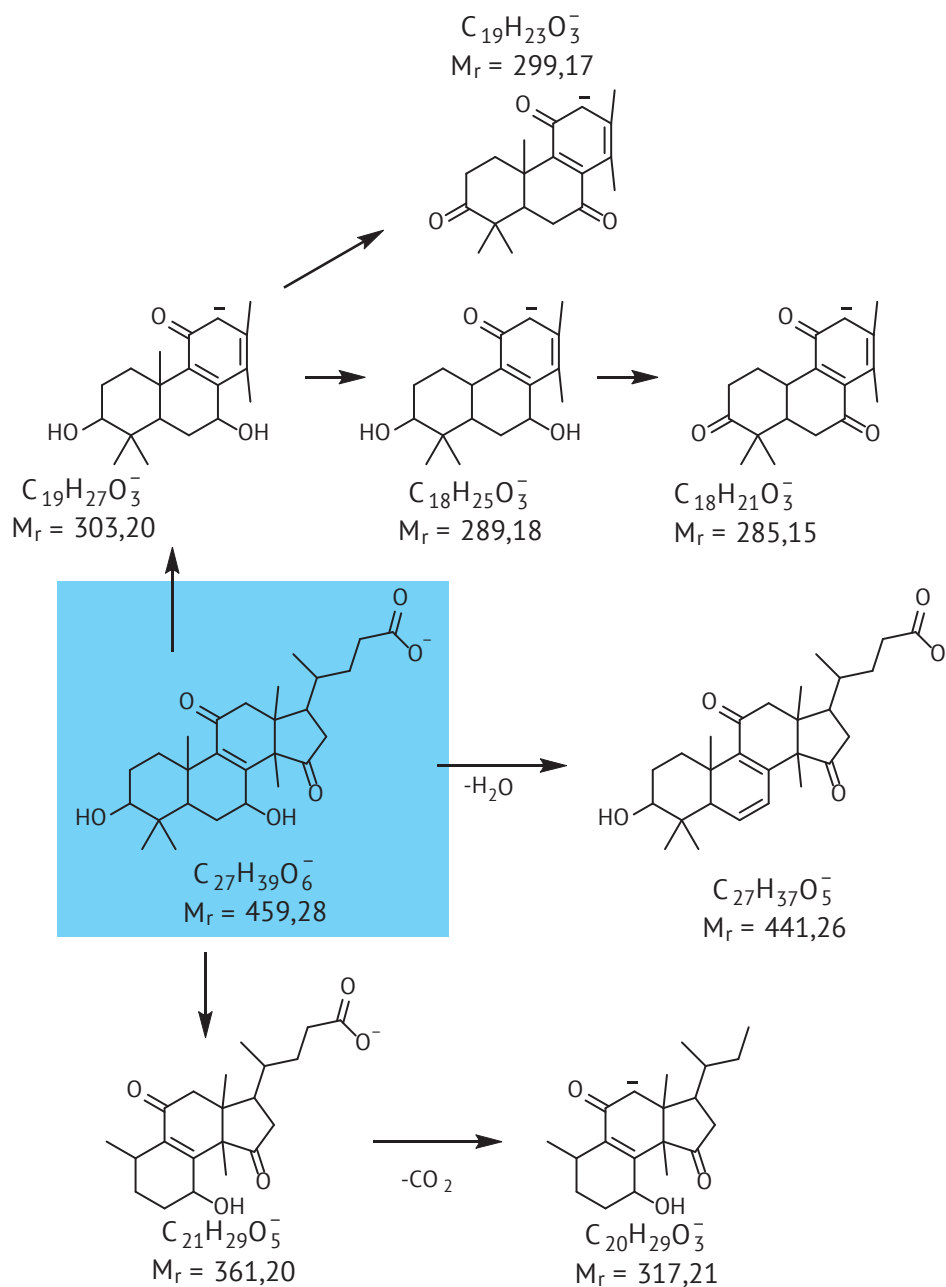


Рис. 3. Схема фрагментации люциденовой кислоты N. M_r ($[M-H]^-$) = 459,28

Fig. 3. Fragmentation scheme for lucidenic acid N. M_r ($[M-H]^-$) = 459,28

также отмечена высокая радикал-ингибирующая активность, но для этанольного экстракта, несмотря на более высокое содержание фенольных соединений, отмечен более низкий уровень активности (образец 16, табл. 3). Ганодеровая кислота D как тетрациклический тритерпеноид является эффективным активатором CaM/CaMKII/NRF2 сигнального пути и вследствие этого обладает способностью предотвращать развитие оксидативного стресса, а наличие 11-оксо- Δ^8 -фрагмента в структурах исследуемых соединений позволяет им образовывать стабильные радикалы [28].

Достоинством полученных экстрактов как потенциальных антиоксидантных средств является наличие БАВ с различной липофильностью: тритерпеновые соединения обладают высокой растворимостью в липидах и защищают их от перекисного окисления при оксидативном стрессе, в то время как флавоноиды действуют в межклеточном пространстве и цитоплазме [29]. Полученные в работе данные согласуются с результатами исследований *in vivo*, проведенными другими научными коллективами: показано, что этанольные экстракты, проявляя антиоксидантную активность, оказывали

цитопротекторное действие на клетки печени, поджелудочной железы и почек у крыс [30]; водные экстракты демонстрировали противодиабетическое действие на стрептозоциновой модели у крыс [31]; терпеноидная фракция *G. lucidum* оказывала гепатопротекторное действие при инвазиях *Plasmodium berghei* за счет снижения оксидативного стресса [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам сравнительных исследований экстрактов штаммов грибов *G. lucidum* и *G. lingzhi*, выращенных на субстратах ольхи и дуба, было установлено, что наибольшую антиоксидантную активность проявляет экстракт FIB-334 *G. lucidum*, выращенный на субстрате ольхи: высокая радикал-ингибирующая активность в отношении DPPH

($IC_{50}=3,1\pm0,2$ мкг/мл) и ABTS ($IC_{50}=3,7\pm0,2$ мкг/мл) согласуется с общим содержанием фенольных соединений ($326,2\pm16,5$ мкмоль/г) и общим содержанием тритерпеновых и стероидных соединений ($2,00\pm0,11$ ммоль/г) в этом экстракте. Высокая антиоксидантная активность изученных штаммов грибов *G. lucidum* и *G. lingzhi* может быть обусловлена наличием фенольных соединений (флавоноидом нарингенином, производными гидрохинона лингжинами В и D), а также тритерпеноидами (ганодеровой кислотой D и люцидеиновой кислотой D).

Полученные результаты позволяют рассматривать искусственно выращенные штаммы *Ganoderma* spp. в качестве перспективного источника антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Cabarro-Hernández M, Villalobos-Arámbula AR, Torres-Torres MG, Decock C, Guzmán-Dávalos L. The *Ganoderma weberianum-resinaceum* lineage: multilocus phylogenetic analysis and morphology confirm *G. mexicanum* and *G. parvulum* in the Neotropics. *Mycologia* 2019;59:95–131. <https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.59.33182>
- Moncalvo J-M. Molecular systematics of *Ganoderma*: what is Reishi? *Int J Med Mushrooms*. 2005;353–4. <https://doi.org/10.1615/INTJMEDMUSHROOMS.V7.I3.160>
- Baby S, Johnson AJ, Govindan B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*. 2015;114:66–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. *Fungal Divers*. 2012;56:49–62. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0178-5>
- Galappaththi MCA, Patabendige NM, Premaratne BM, Hapuarachchi KK, Tibpromma S, Dai DQ. A review of *Ganoderma* triterpenoids and their bioactivities. *Biomol*. 2022;13:24–35. <https://doi.org/10.3390/biom13010024>
- Chan WK, Cheung CCH, Law HKW, Lau YL, Chan GCF. *Ganoderma lucidum* polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immunostimulatory function. *J Hematol Oncol*. 2008;1:9. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-1-9>
- Kladar N V., Gavarić NS, Božin BN. *Ganoderma*: insights into anticancer effects. *Eur J Cancer Prev*. 2016;25:462–71. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000204>
- Paydary K, Khaghani P, Emamzadeh-Fard S, Alinaghi SAS, Baesi K. The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3:515–24. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60106-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60106-9)
- Kamra A, Bhatt AB. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic. *Int J Pharm Sci*. 2012;2:359–62.
- Jia J, Zhang X, Hu YS, Wu Y, Wang QZ, Li NN, et al. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chem*. 2009;115:32–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.043>
- Lin JM, Lin CC, Chen MF, Ujiie T, Takada A. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J Ethnopharmacol*. 1995;47:33–41. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01251-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01251-8)
- Lee JM, Kwon H, Jeong H, Lee JW, Lee SY, Baek SJ, et al. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res*. 2001;15:245–9. <https://doi.org/10.1002/ptr.830>
- Chen DH, Shiou WY, Wang KC, Huang SY, Shie YT, Tsai CM, et al. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *J Chinese Chem Soc*. 1999;46:47–51. <https://doi.org/10.1002/jccs.199900006>
- Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K. *Ganoderma*-ceae: natural products and their related pharmacological functions. *Am J Chin Med*. 2007;35:559–74. <https://doi.org/10.1142/S0192415X07005065>
- Mau JL, Lin HC, Chen CC. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int*. 2001;34:521–6. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00067-9)
- Van der Hem LG, Van der Vliet JA, Bocken CF, Kino K, Hoitsma AJ, Tax WJ. Ling Zhi-8. Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*. 1995;60(5):438–43. PMID: 7676490
- Thakur A, Rana M, Lakhnani TN, Ahmad A, Khan MI. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:1404–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.05.009>
- Li DW, Liu M, Leng YQ, Hu JF, Deng S, Leng AJ, et al. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects against FAAH. *Phytochemistry*. 2022;203:113339. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113339>
- Raj Kapoor B, Burkan ZE, Senthilkumar R. Oxidants and human diseases: role of antioxidant medicinal plants — a review. *Pharmacologyonline*. 2010;1:1117–31.
- Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*. 2008;41:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.001>
- Коваленко СА, Назарова ОМ, Лубянова ВМ. Штаммовое разнообразие *Ganoderma lingzhi* и *G. lucidum* в коллекционном фонде Института леса НАН Беларуси. *Проблемы лесоведения и лесоводства*: сб. науч. тр. ИЛ НАН Беларуси. Вып. 82. Гомель: Институт леса НАН Беларуси; 2022. С. 215–27.
- Kovalenko SA, Nazarova OM, Lubyanova VM. Diversity of *Ganoderma lingzhi* and *G. lucidum* strains in the collection fund of the Forest Institute of the National Academy of

- Sciences of Belarus. *Problems of Forest Science and Forestry*. 2022. Vol. 82. P. 215–27 (In Russ.).
22. White TJ. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Geland DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press Inc; 1990. P. 315–22.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
 23. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152–78.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
 24. Hiai S, Oura H, Nakajima T. Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med*. 1976;29:116–22.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1097639>
 25. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199–200.
<http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
 26. Dong Q, He D, Ni X, Zhou H, Yang H. Comparative study on phenolic compounds, triterpenoids, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* affected by different drying methods. *J Food Meas Charact*. 2019;13:3198–205.
<https://doi.org/10.1007/s11694-019-00242-0>
 27. Rashmi R, Magesh SB, Ramkumar KM, Suryanarayanan S, SubbaRao MV. Antioxidant potential of naringenin helps to protect liver tissue from streptozotocin-induced damage. *Reports Biochem Mol Biol*. 2018;7:76.
PMID: 30324121
 28. Yuan H, Xu Y, Luo Y, Zhang JR, Zhu XX, Xiao JH. Ganoderic acid D prevents oxidative stress-induced senescence by targeting 14-3-3ε to activate CaM/CaMKII/NRF2 signaling pathway in mesenchymal stem cells. *Aging Cell*. 2022;21:e13686.
<https://doi.org/10.1111/ACEL.13686>
 29. Lagouri V. Lipophilic antioxidants. *Lipids Ski Heal*. 2015;301–10.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-09943-9_20
 30. Olorunnisola O.S. Biochemical and histological investigation on the protective effect of poly-herbal extract in high salt diet-fed male Wistar rats. *Phytomedicine Plus*. 2021;1(4):100116.
<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100116>
 31. Jia J. Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chem*. 2009;115(1):32.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.043>
 32. Oluba OM, Akpor OB, Adebisi FD, Josiah SJ, Alabi OO, Shoyombo AO, Olusola AO. Effects of co-administration of *Ganoderma* terpenoid extract with chloroquine on inflammatory markers and antioxidant status in *Plasmodium berghei*-infected mice. *J Integr Med*. 2020;18(6):522–9.
<https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.08.002>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены рисунки 1, 2, 4 и таблица 5.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-table5>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Г.И. Горбачевич — руководство исследованием, подготовка сырья, получение экстрактов, проведение хромато-масс-спектрометрического исследования, подготовка публикации; Л.С. Зеневич, И.Р. Баталова — определение антиоксидантной активности с использованием спектрофотометрических методов, подготовка образцов; С.А. Коваленко — выращивание штаммов грибов, их идентификация, формирование коллекции; П.М. Бычковский — методическое руководство и консультация в вопросах хроматографического анализа.

Additional information. Figures 1, 2, 4 and Table 5 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-fig4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-609-table5>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Hleb I. Harbatsevich managed the research, prepared and extracted the herbal drugs, conducted the experiments by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, and drafted the manuscript. Liliana S. Zenevich, Irina R. Batalova tested the free radical-scavenging activity of extracts by spectrophotometry and carried out sample preparation. Snezhana A. Kovalenko cultivated and identified fungal strains, curated the fungal collection. Pavel M. Bychkovsky provided methodological guidance and advice on chromatographic analysis.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Горбачевич Глеб Иванович, канд. хим. наук, доцент / **Hleb I. Harbatsevich**, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-0226-8636>

Зеневич Лилиана Сергеевна / **Liliana S. Zenevich**

Баталова Ирина Ростиславовна / **Irina R. Batalova**

Коваленко Снежана Александровна, канд. сел.-хоз. наук / **Snezhana A. Kovalenko**, Cand. Sci. (Agr.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4632-9912>

Бычковский Павел Михайлович, канд. хим. наук, доцент / **Pavel M. Bychkovsky**, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5318-6599>

Поступила 29.12.2023

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Online first 21.08.2024

Received 29 December 2023

Revised 1 April 2024

Accepted 10 April 2024

Online first 21 August 2024



Д.С. Круглов ✉ 

Исключение влияния экзогенного загрязнения на микроэлементный состав лекарственных растений

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Новосибирский государственный медицинский университет»,
Красный пр-т, д. 52, Новосибирск, 630091, Российская Федерация

✉ Круглов Дмитрий Семенович; kruglov_ds@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Фармакопейная методика определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье не позволяет различить элементные примеси эндогенного и экзогенного происхождения. При этом более точные данные о микроэлементном составе растения, в том числе информация об эндо- и экзогенных примесях, могли бы быть использованы в задачах хемосистематики и для контроля подлинности сырья.

ЦЕЛЬ. Модификация методики определения содержания макро- и микроэлементов в растительном сырье для исключения влияния экзогенного загрязнения на результаты анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объектов исследования были выбраны растения семейства бурачниковых: генеративные побеги медуницы мягкой — *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Hornem и листья бурачника лекарственного — *Borago officinalis* L. В часть сырья вносили фиксированное количество элементов-поллютантов. Все сырье измельчали и разделяли на фракции. Количественное определение проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В 9 фракциях сырья с различными размерами частиц было определено содержание 30 элементов. Кластерный анализ показал, что фракция сырья с размерами частиц менее 0,2 мм и нефракционированное сырье образуют отдельные кластеры, что свидетельствует об их значимо разном элементном составе. Статистический анализ с использованием критерия Граббса позволил подтвердить, что эти выборки значимо отличались от остальных. Содержание элементов-поллютантов, введенных в фиксированном количестве в сырье, оказалось максимально во фракции частиц менее 0,2 мм — более 90% от введенного количества. Высокое содержание элементов в нефракционированном сырье являлось следствием присутствия частей растения, которые при измельчении и фракционировании попадают во фракцию с размером частиц менее 0,2 мм.

ВЫВОДЫ. Использование нефракционированного сырья при определении содержания элементов вносит систематическую погрешность в результаты измерений и затрудняет их использование для контроля подлинности сырья. Для получения достоверных результатов определения микроэлементного статуса растений предложено при пробоподготовке проводить дополнительное фракционирование сырья и не использовать для анализа фракцию с размерами частиц менее 0,2 мм.

Ключевые слова: микроэлементный состав; кластерный анализ; критерий Граббса; экзогенное загрязнение; поллютанты; растительное сырье; фракционирование сырья; масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Для цитирования: Круглов Д.С. Исключение влияния экзогенного загрязнения на микроэлементный состав лекарственных растений. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):698–706. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Dmitriy S. Kruglov ✉ 

Elimination of Exogenous Pollution Influence on the Microelement Composition of Medicinal Plants

Novosibirsk State Medical University,
52 Krasny Ave, Novosibirsk 630091, Russian Federation

✉ **Dmitriy S. Kruglov**; kruglov_ds@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The compendial analytical procedure for determining the content of heavy metals and arsenic impurities in herbal drugs does not differentiate between endogenous and exogenous elemental impurities. Higher-precision data on the microelement composition of plants, particularly data on endogenous and exogenous impurities, could be instrumental in chemosystematics and in the identification of raw materials.

AIM. This study aimed to modify the analytical procedure for quantifying macro- and microelements in herbal drugs with the intention to eliminate the influence of exogenous pollutants on test results.

MATERIALS AND METHODS. The study focused on herbal drugs from the *Boraginaceae* family, including reproductive shoots of lungwort (*Pulmonaria mollis* Wulf. ex Hornem) and leaves of common borage (*Borago officinalis* L.). A portion was spiked with elemental pollutants. All herbal drugs were ground and fractionated by sieving. Quantitative determination was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry. Statistical analysis of the results used Microsoft Excel and Statistica 8 software.

RESULTS. A total of 30 elements were quantified in 9 fractions of herbal drugs with different particle sizes. Cluster analysis showed that unfractionated herbal drugs and the fraction comprising particles smaller than 0.2 mm formed separate clusters, indicating significant differences in elemental compositions. Grubbs' test confirmed that these two samples were significantly different from the others. The fraction of particles smaller than 0.2 mm had the maximum content of the spiked elements; more than 90% of the spiked amounts were recovered from this fraction. The high content of elements observed in unfractionated herbal drugs was due to the plant parts that would have passed the 0.2 mm sieve had they been ground and fractionated.

CONCLUSIONS. The use of unfractionated herbal drugs leads to a systematic error in the results of elemental content determination, which significantly hinders the applicability of such results for the identification of herbal drugs. To ensure reliable results in the determination of the microelement status of plants, the authors suggest performing additional fractionation of herbal drugs and discarding the fraction under 0.2 mm.

Keywords: microelement composition; cluster analysis; Grubbs' test; exogenous pollution; pollutants; herbal drugs; fractionation of raw materials; inductively coupled plasma mass spectrometry

For citation: Kruglov D.S. Elimination of exogenous pollution influence on the microelement composition of medicinal plants. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):698–706. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The author declares no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Макро- и микроэлементы, входящие в состав биологически активных веществ (ферментов, гормонов и витаминов), необходимы для нормального функционирования организма человека, участвуют в метаболизме белков, липидов, полисахаридов и тем самым регулируют анаболические процессы, теплообмен, кроветворение, иммунный ответ и др. [1]. Примером дисэлементоза является железодефицитная анемия, связанная с недостатком микроэлементов кроветворного комплекса (Fe, Mn, Cu, Cr)¹ [2]. Эссенциальные элементы для животного и растительного организма во многом одинаковы², поэтому растения можно рассматривать как источник получения препаратов, эффективных для лечения анемии³ и для профилактики латентного железодефицита. Микроэлементный состав каждого растения является видоспецифичным, что может быть использовано в задачах хемосистематики [3], а также для контроля примесей при анализе сырья на доброкачественность [4].

Наряду с эндогенными элементами, содержание которых определяется геномом растения, растительное сырье может быть загрязнено элементами, поступающими экзогенным путем. Как правило, растения имеют опушение из простых и железистых трихом, которые задерживают различные поллютанты, в том числе элементные примеси из окружающей среды, и способствуют их накоплению [5].

Для количественного определения элементов в растительном сырье используют один из трех методов: атомно-абсорбционную спектрометрию, атомно-эмиссионную спектрометрию, масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой⁴. Следует отметить, что любой из этих методов определения содержания элементов инвариантен по отношению к путям поступления элементов в растительный объект и не позволяет различить эндо- и экзогенные элементы.

Устранить экзогенное загрязнение наиболее эффективно можно на стадии пробоподготовки. В настоящий момент согласно

требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации⁵ пробоподготовка сырья для количественного определения микроэлементов ограничивается стадией измельчения сырья до частиц размером менее 1–3 мм. Используемая фармакопейная методика позволяет выявить недопустимое загрязнение сырья микроэлементами-токсикантами, что необходимо для оценки безопасности лекарственных растительных препаратов [4]. Но для корректного использования микроэлементного статуса растения в задачах определения его подлинности (видовой принадлежности) или доброкачественности растительного сырья необходимо минимизировать влияние присутствия экзогенных микроэлементов-поллютантов на результат анализа. Одним из способов минимизации экзогенного загрязнения является соблюдение правил сбора растительного сырья и исключение сбора сырья в экологически неблагополучных местах произрастания⁶ [5, 6]. Однако даже соблюдение этих правил не гарантирует отсутствия экзогенного загрязнения элементами из почвы или осадков в экологически чистых местах произрастания.

Цель работы — модификация методики определения содержания макро- и микроэлементов в растительном сырье для исключения влияния экзогенного загрязнения на результаты анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны растения семейства бурачниковых, для которых характерно обильное опушение всех надземных органов, что существенно увеличивает возможность экзогенного загрязнения. Первый объект — генеративные побеги медуницы мягкой — *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Hornem. (было установлено антианемическое действие извлечений из этого вида растительного сырья [7]), собранные в фазу цветения в сосновом бору в Колыванском районе Новосибирской области (55°12' с.ш. и 82°42' в.д.). Сырье, доведенное до воздушно-сухого состояния, измельчали в ротационной мельнице TSM6A (Bosch) и разделяли на фракции с помощью лабораторных сит («Экрос») с размерами ячеек 7,0; 5,0; 3,0; 2,0; 1,0 0,5; 0,2 мм (табл. 1).

¹ Битюцкий НП. Необходимые микроэлементы растений. Учебник. СПб.: ДЕАН; 2005.

² Там же.

³ Громова ОА, Торшин ИЮ, Хаджидис АК. Клинические и молекулярные аспекты эффективного и безопасного лечения анемии. М.; 2010.

⁴ ОФС.1.5.3.0009 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

⁵ Там же.

⁶ Гравель ИВ, Шойхет ЯН, Яковлев ГП, Самылина ИА. Экоотоксиканты в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.

Таблица 1. Исследуемые фракции побегов медуницы мягкой (*Pulmonaria mollis*)**Table 1.** Investigated fractions of soft lungwort (*Pulmonaria mollis*) shoots

Фракция <i>Fraction</i>	Диаметр отверстия, мм <i>Hole diameter, mm</i>	
	нижнее сито <i>lower sieve</i>	верхнее сито <i>upper sieve</i>
1	–*	0,2
2	0,2	0,5
3	0,5	1,0
4	1,0	2,0
5	2,0	3,0
6	3,0	5,0
7	5,0	7,0
8	–**	7,0
9	0,2	7,0

Таблица составлена автором / The table is prepared by the author

Примечание. * – просев; ** – отсев.**Note.** * passing; ** retained.

Вторым объектом являлись листья бурачника лекарственного – *Borago officinalis* L., выращенного на садовом участке в Советском районе г. Новосибирска (54°91' с.ш. и 83°08' в.д.). После сбора листья в естественных условиях доводили до воздушно-сухого состояния. Высушенные листья бурачника лекарственного разделяли на две равные части. Одну часть листьев оставляли в качестве контрольной (сырье без добавки), вторую часть раскладывали на чистой поверхности и наносили на эти листья методом опрыскивания смесь растворимых солей, содержащую 5,0 мг магния, 1,3 мг железа, 0,25 мг алюминия, 0,132 мг цинка, 0,018 мг меди и 0,0017 мг свинца (сырье с добавками-поллютантами). Для внесения заданного количества загрязняющих элементов использовали реактивы: магния сульфат 7-водный (Acros Organics, кат. № 213115000); свинца(II) нитрат (Panreac, кат. № 131473.1210); железа(II) сульфат 7-водный (Panreac, кат. № 141362.1211); цинк сернокислый 7-водный (Panreac, кат. № 141787.1211); алюминий хлорид 6-водный (Merck, кат. № 1.01084.) и медь(II) сернокислая 5-водная («Ленреактив», кат. № 120194).

После нанесения поллютантов сырье снова доводили до воздушно-сухого состояния при комнатных условиях. Оба вида сырья бурачника лекарственного (с добавкой и без добавки) измельчали в ротационной мельнице и формировали из них группу объектов 1–4 (табл. 2).

Таблица 2. Объекты исследования листьев бурачника лекарственного (*Borago officinalis*)**Table 2.** Study objects of common borage (*Borago officinalis*) leaves

Объект <i>Object</i>	Добавка элементов-поллютантов <i>Elemental pollutant spike</i>	Диаметр отверстия, мм <i>Hole diameter, mm</i>	
		нижнее сито <i>lower sieve</i>	верхнее сито <i>upper sieve</i>
1	с добавкой <i>added</i>	–	0,2
2	с добавкой <i>added</i>	0,2	7,0
3	без добавки <i>not added</i>	–	0,2
4	без добавки <i>not added</i>	0,2	7,0

Таблица составлена автором / The table is prepared by the author

Примечание. «–» – просев.**Note.** –, passing.

Количественное определение элементов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ELAN DRC-II (Perkin Elmer Inc.). 0,1–0,2 г измельченного сырья (точная навеска) помещали во фторопластовый вкладыш автоклава и добавляли 5 мл концентрированной азотной кислоты («Ленреактив», кат. № 011584), а для определения кремния использовали смесь 5 мл концентрированной азотной кислоты с 0,5 мл кислоты фтористоводородной («Ленреактив», кат. № 200629). Автоклав герметично закрывали и помещали в микроволновую печь. Разложение пробы проводили при ступенчатом подъеме температуры до 160, 180 и 200 °С с выдерживанием автоклава на каждой температурной ступени в течение 1 ч. После охлаждения автоклавы открывали в вытяжном шкафу и полученные растворы количественно переносили в предварительно взвешенные полиэтиленовые бюксы. В каждый бюкс добавляли по 0,1 мл раствора соли индия с концентрацией 1,0 мг/л (внутренний стандарт) и воды очищенной до общего объема раствора 7–8 мл. Затем доводили массу растворов в бюксах до 10 г. Для контрольного опыта в реакционных емкостях проводили описанные выше процедуры без анализируемого образца. Для контроля правильности определения использовали метод добавок.

Для построения калибровочных графиков использовали многоэлементные стандартные растворы ICP-MS-68-A и ICP-MS-68-B 0,01 г/л, а также одноэлементный стандартный раствор Hg 1 г/л (все – High-Purity Standards). Стабильность градуировочных характеристик

контролировали путем сравнения результатов определения содержания введенного внутреннего стандарта индия (^{115}In) в каждом анализируемом образце.

Параметры работы масс-спектрометра: мощность генератора 1500 Вт; распылитель — поперечно-поточный, материал РЕЕК, сапфировые наконечники; распылительная камера — неохлаждаемая двухходовая, тип Скотта, материал — ритон. Расход плазмообразующего потока аргона (аргон газообразный высшего сорта по ГОСТ 10157-2016) — 15 л/мин; расход анализируемого образца — 1,5 мл/мин. Для обеспечения стабильного режима работы масс-спектрометра все измерения проводили в термостатированных условиях при температуре $22,0 \pm 1,5^\circ\text{C}$.

Проводили пять параллельных определений для каждого анализируемого образца, за результат принимали среднее значение. Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно методическим рекомендациям⁷. Для проверки нормальности выборки использовали критерий Граббса (G), рассчитываемый как отношение максимальной разницы между средним и экстремальным значением к величине среднеквадратичного отклонения. Если рассчитанные значения превышали табличное критическое значение критерия Граббса (G_c), то результат считали принадлежащим другой совокупности данных. При анализе принимали в расчет критерии, соответствующие уровню доверительной вероятности $P=95\%$. Расчет выполняли средствами программы Microsoft Excel. Кластерный анализ выполняли с помощью программы Statistica 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения содержания макро- и микроэлементов в зависимости от фракционного состава сырья медуницы мягкой приведены в таблице 3 «Содержание макро- и микроэлементов в побегах медуницы мягкой (*Pulmonaria mollis*)», опубликована на сайте журнала⁸. Следует обратить внимание на существенно меньшее содержание калия во фракции с размером частиц менее 0,2 мм и значительно более высокое содержание в ней кальция и кремния. Поскольку калий преобладает в живых клетках

мезофилла⁹ и регулирует транспирацию, вполне логично, что на покровных тканях его меньше; в свою очередь, кремний и кальций формируют трихомы защитного опушения, весьма обильного у растений семейства *Boraginaceae*, которые измельчаются более эффективно и проходят через нижнее сито с размером ячеек менее 0,2 мм. Следует отметить, что экспериментальные данные о селективном содержании анализируемых элементов в *P. mollis* могут быть в дальнейшем использованы при изучении видовой специфичности данного растения.

Для выявления закономерностей в многофакторных данных (в таблице 3¹⁰ представлено 9 столбцов по 30 результатов в каждом) наиболее эффективно использование методов кластерного анализа [8]. В этом случае вводится понятие виртуального многомерного пространства, базисными осями которого являются нормированные концентрации микроэлементов. Критерием объединения точек в кластер является условие, что евклидово расстояние между точками меньше некоей задаваемой величины ε . За величину ε можно принять значение индивидуальной изменчивости содержания микроэлементов, определенное в размере 15% от среднего значения¹¹ [8]. Построенное иерархическое дерево кластеров по результатам, приведенным в таблице 3¹², представлено на рисунке 1. Анализ иерархического дерева показал, что фракция сырья медуницы мягкой, проходящая сквозь сита с диаметром отверстий 0,2 мм (фракция 1), образует отдельный кластер, равно как и нефракционированное сырье (фракция 8).

Для подтверждения полученных результатов была выдвинута статистическая гипотеза о том, что микроэлементный состав во всех фракциях подчиняется одному закону распределения и может быть объединен в одну репрезентативную выборку. В противном случае выпадающие фракции подчиняются иному закону распределения и их нужно рассматривать отдельно. Для проверки данной гипотезы были сформированы новые выборки (табл. 4), в которых экспериментальными точками выступали суммы элементов X_i . В таблице 5 приведены результаты расчетов статистических параметров выборок, указанных в таблице 4.

⁷ Никитин В.И. Первичная статистическая обработка экспериментальных данных. Самара: Самарский государственный технический университет; 2017.

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617-table3>

⁹ Медведев С.С. Физиология растений. Учебник. СПб.: БХВ-Петербург; 2012.

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617-table3>

¹¹ Никитин В.И. Первичная статистическая обработка экспериментальных данных. Самара: Самарский государственный технический университет; 2017.

¹² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617-table3>

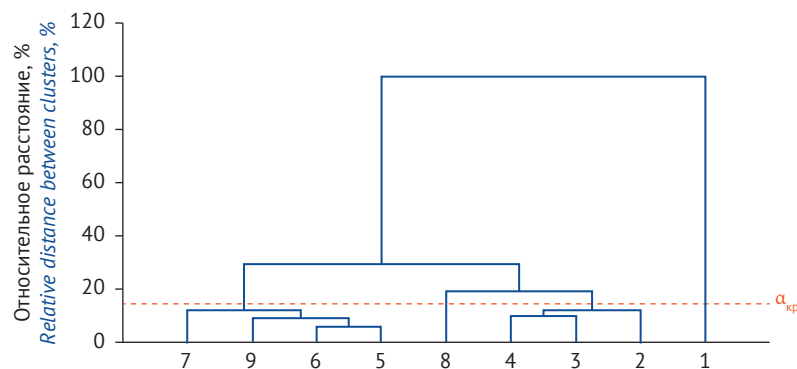


Рисунок подготовлен автором по собственным данным / The figure is prepared by the author using their own data.

Рис. 1. Иерархическое дерево распределения содержания микроэлементов по кластерам исследуемых фракций побегов медуницы мягкой (*Pulmonaria mollis*). $\alpha_{kp}=15,0\%$ – критический уровень, выше которого кластеры считаются отдельными

Fig. 1. Hierarchical tree for microelement content distribution by clusters of studied soft lungwort (*Pulmonaria mollis*) shoot fractions. The critical level above which clusters were considered separate (α_{kp}) was set to 15.0%

Проверка выборки на принадлежность одному распределению по критерию Граббса показала, что значение суммарного содержания микроэлементов во фракции 1 (X_1) значительно отличается от остальных и данная величина должна быть исключена. Оставшиеся суммы элементов (X_2-X_9 – суммарные содержания микроэлементов во фракциях 2–9) были объединены в выборку № 2, и снова был рассчитан критерий Граббса, уже по выборке № 2. В результате было установлено, что в данной выборке должна быть исключена фракция 8 – нефракционированное сырье и сформирована выборка № 3 из семи фракций (сумма микроэлементов в 6-ти фракциях – фракции 2–7 и 9). Новая проверка по критерию Граббса показала, что в выборке № 3 нет значимо выделяющихся значений и объединенные в выборку данные подчиняются нормальному закону распределения.

Таким образом, содержание микроэлементов во всех фракциях с размером частиц более

0,2 мм и во фракционированном сырье (в котором удалена фракция менее 0,2 мм) воспроизводимо и значимо не отличается друг от друга. В то же время результаты измерения, полученные для нефракционированного сырья, следует считать ошибочными за счет погрешности, вносимой присутствием частей растения, загрязненных неорганическими примесями, которые при измельчении и фракционировании сырья попадают во фракцию с размером частиц менее 0,2 мм. Следует также заметить, что эта погрешность является невозпроизводимой и учесть ее в расчетах не представляется возможным.

Вероятнее всего, растительное сырье с неорганическим загрязнением характеризуется более высокой хрупкостью, чем чистое растительное сырье, и измельчается эффективнее. Поэтому в просеве (частицы менее 0,2 мм) концентрация экзогенно загрязненных частей растения и соответственно микроэлементов во много раз больше.

Таблица 4. Схема составления расчетных выборок

Table 4. Design of estimation samples

Наименование выборки Sample name	Суммы элементов в исследуемых фракциях (X_i), мкг/г Sum of elements in studied fractions (X_i), $\mu\text{g/g}$								
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9
Выборка 1 Sample 1	15734,2	7628,4	7462,1	8185,6	7283,1	6890,1	7885,0	10363,3	8607,3
Выборка 2 Sample 2	–	7628,4	7462,1	8185,6	7283,1	6890,1	7885,0	10363,3	8607,3
Выборка 3 Sample 3	–	7628,4	7462,1	8185,6	7283,1	6890,1	7885,0	–	8607,3

Таблица составлена автором по собственным данным / The table is prepared by the author using his own data

Примечание. «–» – фракция, которую не включили в выборку; i – порядковый номер фракции.

Note. –, fraction not included in the sample; i , sequential number of the fraction.

Таблица 5. Статистические параметры расчетных выборок

Table 5. Statistical parameters of estimation samples

Параметр Parameter	Выборка 1 Sample 1	Выборка 2 Sample 2	Выборка 3 Sample 3
Объем выборки, n Sample size, n	9	8	7
$\bar{x}$, мкг/г	8893,3	8038,1	7705,0
σ	2757,1	1079,9	575,1
Δ	2078,8	880,5	468,9
$G_{\max}$	2,48	2,15	1,42
$G_{\min}$	0,73	1,06	1,57
G_t	2,22	2,12	1,88

Таблица составлена автором по собственным данным / The table is prepared by the author using his own data

Примечание. $\bar{x}$ – среднее значение суммы микроэлементов; σ – среднеквадратичное отклонение; Δ – доверительный интервал; $G_{\max}$ – значение критерия Граббса для максимального значения; $G_{\min}$ – значение критерия Граббса для минимального значения; G_t – граничное значение критерия Граббса при доверительной вероятности 95%.
Note. $\bar{x}$, mean value of the sum of microelements; σ , standard deviation; Δ , confidence interval; $G_{\max}$, Grubbs' test value for the maximum value; $G_{\min}$, Grubbs' test value for the minimum value; G_t , critical value for Grubbs' test at 95% confidence.

Таблица 6. Содержание микроэлементов в листьях *Borago officinalis*

Table 6. Content of microelements in *Borago officinalis* leaves

Элемент <i>Element</i>	Содержание микроэлементов, мкг/г <i>Microelement content, µg/g</i>						
	в сырье без добавки <i>unspiked herbal drug</i>		в сырье с добавкой <i>spiked herbal drug</i>		β ₁	β ₂	γ
	просев* <i>passing fraction*</i> C _{1a}	фракция без просева <i>retained fractions</i> C _{2a}	просев* <i>passing fraction*</i> C _{1b}	фракция без просева <i>retained fractions</i> C _{2b}			
Mg	2174,0	1976,8	4521,0	2026,1	1,025	2,08	0,94
Al	104,4	87,4	221,0	90,5	1,035	2,12	0,93
Fe	180,2	135,0	778,4	142,0	1,052	4,32	0,92
Cu	12,2	11,2	20,5	11,4	1,019	1,68	0,92
Zn	22,0	36,6	83,0	38,7	1,057	3,77	0,92
Pb	0,1	0,1	0,89	0,1	1,064	8,92	0,93

Таблица составлена автором по собственным данным / The table is prepared by the author using his own data

Примечание. C_{1a} и C_{1b} – содержание микроэлементов в просеве сырья без добавки и сырья с добавкой соответственно, мкг/г; C_{2a} и C_{2b} – содержание микроэлементов в суммарной фракции после удаления просева для сырья без добавки и сырья с добавкой соответственно, мкг/г; β_1 и β_2 – коэффициенты влияния введенного количества микроэлементов на результаты их определения в нефракционированном сырье и в просеве соответственно; γ – доля перешедшей в просев добавки.
* – фракция с размером частиц менее 0,2 мм.
Note. C_{1a} , microelement content in the passing fraction of the unspiked sample ($\mu\text{g/g}$); C_{1b} , microelement content in the passing fraction of the spiked sample ($\mu\text{g/g}$); C_{2a} , microelement content in the retained fractions of the unspiked sample ($\mu\text{g/g}$); C_{2b} , microelement content in the retained fractions of the spiked sample ($\mu\text{g/g}$); β_1 , microelement spike recovery from unfractionated herbal drug; β_2 , microelement spike recovery from the passing fraction; γ , spike portion in the passing fraction.
* fraction with particles smaller than 0.2 mm.

Для подтверждения данной гипотезы рассмотрим результаты определения элементного состава в эксперименте с образцами листьев бурачника лекарственного, в которые вводились точные количества элементов-поллютантов экзогенным способом (табл. 6).

Для удобства можно ввести несколько расчетных коэффициентов, показывающих влияние введенного количества микроэлементов на результаты их определения в нефракционированном сырье (β_1) и в просеве (β_2) соответственно.

$$\beta_1 = C_{2b} / C_{2a} \text{ и } \beta_2 = C_{1b} / C_{1a}, \quad (1)$$

где C_{1a} и C_{1b} – содержание микроэлементов в просеве сырья без добавки и сырья с добавкой соответственно, мкг/г; C_{2a} и C_{2b} – содержание микроэлементов в суммарной фракции после удаления просева для сырья без добавки и сырья с добавкой соответственно, мкг/г.

Максимальное содержание введенных микроэлементов наблюдается в просеве (табл. 6). Можно рассчитать долю перешедшей в просев добавки (γ), зная массу добавленного элемента ($m_{доб}$) и массу просева (m_c):

$$\gamma = \frac{(C_{1b} - C_{1a}) \times m_c}{m_{доб}}. \quad (2)$$

Содержание элементов-поллютантов максимально во фракции с размером частиц менее 0,2 мм – более 90% от введенного количества. Это подтверждает гипотезу, что экзогенные элементы-поллютанты при фракционировании сырья переходят в подавляющем количестве во фракцию, содержащую частицы размером менее 0,2 мм. При этом максимальный размер частиц лимитируется особенностями используемых методик определения

содержания микроэлементов и составляет 0,5–1,0 мм в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации¹³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам сравнительного анализа содержания макро- и микроэлементов в побегах медуницы мягкой и листьях бурачника лекарственного, предварительно разделенных на 9 фракций по размеру частиц, установлено, что использование нефракционированного сырья при определении микроэлементного статуса растений может существенно затруднить его использование для контроля подлинности сырья и видовой принадлежности растений. Для получения достоверных результатов определения содержания микроэлементов в растительном сырье методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой наряду с рекомендованными Государственной фармакопеей Российской Федерации этапами методики необходимо включить в пробоподготовку стадию предварительного фракционирования сырья и использовать для анализа фракцию с максимальным размером частиц 1,0 мм и минимальным 0,2 мм.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кудрин АВ, Скальный АВ, Жаворонков АА, Скальная МГ, Громова ОА. Иммунофармакология микроэлементов. М.: Медицина; 2000.
Kudrin AV, Skalny AV, Zhavoronkov AA, Skalnaya MG, Gro-mova OA. *Immunopharmacology of microelements*. Moscow: Meditsina; 2000 (In Russ.).
EDN: [QBOLEX](#)
2. Будко ЕВ, Ямпольский ЛМ, Яцюк ВЯ, Черникова ДА. Роль элементного комплекса в процессе гемостаза. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018;(4):53–7.
Budko EV, Yampolskiy LM, Yatsyuk VYa, Chernikova DA. The role of the element complex in the process of hemostasis. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2018;(4):53–7 (In Russ.).
EDN: [XPBWUH](#)
3. Круглов ДС. Прогностическая применимость микроэлементного профиля растений для задач систематики. В кн.: *Ботаника в современном мире. Труды Русского ботанического общества. Т. 1. Систематика высших растений. Флористика и география растений. Охрана растительного мира. Палеоботаника. Ботаническое образование*. Махачкала: АЛЕФ; 2018. С. 58–60.
Kruglov DS. Predictive applicability of plant microelement profiles for taxonomy problems. In: *Botany in the modern world. Proceedings of the Russian Botanical Society. Vol. 1. Systematics of higher plants. Floristry and geography of plants. Protection of flora. Paleobotany. Botanical education*. Makhachkala: ALEF; 2018. P. 58–60 (In Russ.).
4. Круглов ДС, Прокушева ДЛ, Величко ВВ. Микроэлемент-
ный статус растения в стандартизации лекарственного растительного сырья. *Фармация*. 2023;72(6):12–8.
Kruglov DS, Prokusheva DL, Velichko VV. Trace element status of plant for standardizing of herb raw material. *Pharmacy*. 2023;72(6):12–8 (In Russ.).
EDN: [KZYXOM](#)
5. Стрекалова АС, Латышевская НИ. Экологические проблемы заготовки лекарственного растительного сырья в рекреационной зоне промышленного центра. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2006;(5):117–20.
Strekalova AS, Latyshevskaya NI. Environmental problems of collection of herbal drugs in the recreational area of an industrial center. *Vestnik of the Orenburg State University*. 2006;(5):117–20 (In Russ.).
EDN: [NFGOSJ](#)
6. Дьякова НА, Самылина ИА, Сливкин АИ, Гапонов СП. Экологическая оценка сырьевых ресурсов лекарственных растений в условиях нарастающей антропогенной нагрузки центрального Черноземья. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2014;(3):106–10.
Dyakova NA, Samylina IA, Slivkin AI, Gaponov SP. Ecological assessment of raw material resources of herbs in the conditions of accruing anthropogenous loading of the Central Chernozem region. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2014;(3):106–10 (In Russ.).
EDN: [TCCOMX](#)
7. Буданцев АЛ, ред. *Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компо-*

¹³ ОФС.1.5.3.0009 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

ненный состав и биологическая активность. Т. 4. Семейства Caprifoliaceae– Lobeliaceae. СПб – М.: КМК; 2011.

Budantsev AL, ed. *Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity.*

Vol. 4. *Families Caprifoliaceae–Lobeliaceae.* St Petersburg – Moscow: KMK; 2011 (In Russ.).

EDN: [SHBOTZ](#)

8. Hartigan JF. *Clustering algorithms.* N.Y.: John Wiley & Sons; 1975.

Дополнительная информация. Таблица 3 размещена на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств».

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617-table3>

Вклад автора. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Благодарности. Автор выражает благодарность коллективу Химико-аналитического центра «Плазма» (Томск) и его директору Н.В. Федюниной за помощь в проведении настоящей работы.

Additional information. Table 3 is published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation.*

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-617-table3>

Author' contributions. The author confirms that he meets the ICMJE criteria for authorship.

Acknowledgements. The author expresses gratitude to the staff of the Chemical Analytical Center «Plasma» (Tomsk) and its director N.V. Fedyunina for assistance in carrying out the present work.

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Круглов Дмитрий Семенович, канд. техн. наук, доцент / **Dmitriy S. Kruglov**, Cand. Sci. (Tech.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1904-7901>

Поступила 29.01.2024

После доработки 05.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Online first 01.08.2024

Received 29 January 2024

Revised 5 April 2024

Accepted 10 April 2024

Online first 1 August 2024



Р.И. Лукашов 
Н.С. Гурина 

Календулы цветки (*Calendulae officinalis flos*): методы выделения фракций биологически активных веществ

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
пр-т Дзержинского, 83, Минск, 220083, Республика Беларусь

✉ Лукашов Роман Игоревич; r_lukashov@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Актуальной задачей фармацевтической отрасли является разработка ресурсосберегающих технологий производства лекарственных средств (ЛРС). Один из способов эффективного использования лекарственного растительного сырья — технологии, позволяющие получать продукты с различным фармакологическим действием в одном технологическом цикле. В настоящее время отсутствует регламентированный способ обработки данного вида сырья, который бы позволил разрабатывать лекарственные препараты на основе календулы цветков с заданным фармакологическим действием. В странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) для переработки сырья календулы используются методы экстракции, направленные на получение в одном технологическом цикле только одной фракции БАВ (только флавоноидов или только каротиноидов).

ЦЕЛЬ. Оценка возможности получения фракций биологически активных веществ разной полярности (каротиноиды, флавоноиды и полисахариды) из календулы цветков путем использования поэтапной обработки лекарственного растительного сырья в одном технологическом цикле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Экстракцию каротиноидов календулы цветков проводили гексаном. Дополнительно для предварительной обработки сырья использовали термическое воздействие. Количественное определение каротиноидов и флавоноидов выполняли спектрофотометрическим методом, полисахаридных фракций — гравиметрическим. После отгонки гексана был получен твердый маслянистый остаток, который растворяли при механическом перемешивании в масле для получения масляного экстракта. Выполняли трехэтапную обработку: экстракция гексаном (экстракция слабополярным органическим растворителем каротиноидов), экстракция смесью вода/ацетон в отношении 30/70 по объему (выделение флавоноидов) и экстракция водой (осаждение полисахаридов).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Максимальное количество каротиноидов (~4%) содержится в липофильных вытяжках, полученных при однократной экстракции гексаном и ее комбинации с термообработкой, при водно-органической экстракции их содержание меньше в десять раз. Масляные экстракты были получены из твердого маслянистого остатка после отгонки гексана при температуре его кипения, содержание биологически активных веществ в них сопоставимо с исходным. Предварительная экстракция гексаном увеличивает выход флавоноидов на 68,5% при водно-органической экстракции и снижает его в 1,7 раза при водной экстракции по сравнению с нативным сырьем, что сопровождается уменьшением их содержания во фракции водорастворимых полисахаридов практически в 10 раз. С введением новых этапов обработки суммарное содержание и содержание отдельных полисахаридных фракций снижается с повышением степени их чистоты. Соотношение полисахаридных фракций не изменяется при использовании всех примененных способов обработки.

ВЫВОДЫ. Поэтапная обработка сырья календулы цветков позволяет в одном технологическом цикле выделить три фракции, содержащие повышенное количество каротиноидов (в 3,3 раза), флавоноидов (на 44,8%) и полисахаридов (на 41,3%)

соответственно в сравнении с нативным сырьем. Полученный продукт характеризуется более высокой степенью чистоты, чем продукт, полученный при предобработке с применением двукратной экстракции гексаном, или из нативного сырья. Метод рекомендовано использовать для получения лекарственных средств, обогащенных конкретной группой БАВ, или с меньшим содержанием примесей.

Ключевые слова: поэтапная обработка; календулы цветки; каротиноиды; флавоноиды; полисахариды; обезжиривание; удаление флавоноидов; гексан; экстракция; комплексная переработка; лекарственное растительное сырье

Для цитирования: Лукашов Р.И., Гурина Н.С. Календулы цветки (*Calendulae officinalis flos*): методы выделения фракций биологически активных веществ. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):707–719. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-634>

Финансирование. Работа выполнена в рамках задания 2.2.3 «Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ» в рамках государственной программы научных исследований 2 «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия» подпрограммы 2.2 «Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)».

Потенциальный конфликт интересов. Авторами подана заявка на патент Республики Беларусь на изобретение «Способ предварительной обработки лекарственного растительного средства», планируется к подаче заявка на изобретение «Способ получения сухого экстракта из предварительно обработанного лекарственного растительного сырья». Н.С. Гурина является членом редколлегии журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2024 г.

Raman I. Lukashou ,
Natalia S. Gurina 

Calendula Flowers (*Calendulae officinalis flos*): Methods to Obtain Fractions of Biologically Active Substances

Belarusian State Medical University,
83 Dzerzhinsky Ave, Minsk 220083, Republic of Belarus

✉ **Raman I. Lukashou;** r_lukashov@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The pharmaceutical industry aims at developing sustainable resource-saving technologies for manufacturing medicines. Approaches to the effective use of herbal drugs include applying technologies yielding compounds with various pharmacological effects in one production cycle. To date, no standardised herbal drug processing technology has been designed to produce calendula flower-based medicinal products with various pharmacological effects. The Member States of the Eurasian Economic Union (EAEU) process calendula flowers by extraction methods yielding one fraction of biologically active substances per cycle (either only flavonoids or only carotenoids).

AIM. This article aimed to investigate the possibility of stepwise processing of calendula flowers to obtain biologically active substances with different polarities (carotenoids, flavonoids, and polysaccharides) per cycle.

MATERIALS AND METHODS. The authors extracted carotenoids using hexane. The study included additional thermal pretreatment of the herbal drug. Carotenoids and flavonoids were quantified by spectrophotometry, and polysaccharides were quantified by gravimetric analysis. After hexane removal, the dry oily residue was dissolved in oil with mechanical stirring to obtain the oil extract. The study included a three-step processing method that comprised hexane extraction (extraction of carotenoids with a low-polarity organic solvent), extraction with a water–organic solvent system (extraction of flavonoids), and aqueous extraction (precipitation of polysaccharides).

RESULTS. The lipophilic extracts obtained by single hexane extraction or by single hexane extraction and heat treatment had the maximum carotenoid content (~4%), which was 10 times the carotenoid content in the extracts obtained using a water–organic solvent system. Oil extracts were prepared from the dry residue left after removing hexane by distillation at its boiling point. The content of biologically active substances in the oil extracts was comparable to that in the intact herbal drug. Water–organic solvent extraction yielded 68.5% more flavonoids from the herbal

drug extracted with hexane than from the intact herbal drug. In contrast, aqueous extraction applied to the intact herbal drug yielded 1.7 times the amount of flavonoids obtained by aqueous extraction preceded by hexane extraction. The water-soluble polysaccharide fraction extracted from the intact herbal drug had 10 times the flavonoid content observed in the fraction extracted from the processed herbal drug. Each subsequent processing step decreased the total polysaccharide content and the content of individual polysaccharide fractions and increased their purity. The ratio of polysaccharide fractions remained unchanged across all processing methods tested.

CONCLUSIONS. Stepwise processing of calendula flowers ensured that one processing cycle provided three fractions containing increased amounts of carotenoids, flavonoids, and polysaccharides. Relative to the intact herbal drug, there was a 3.3-fold increase in the yield of carotenoids, and the yields of flavonoids and polysaccharides increased by 44.8 and 41.3%, respectively. The resulting product had a higher degree of purity than the products obtained by pretreatment and double hexane extraction or by using the intact herbal drug. The stepwise processing method is advisable for the production of medicines that are enriched with a specific group of biologically active substances or contain smaller amounts of impurities.

Keywords: step-by-step processing; calendula flowers; carotenoids; flavonoids; polysaccharides; defatting; removal of flavonoids; hexane; extraction; complex processing; herbal drugs

For citation: Lukashou R.I., Gurina N.S. Calendula flowers (*Calendulae officinalis flos*): Methods to obtain fractions of biologically active substances. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):707–719. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-634>

Funding. The work was carried out as part of Assignment No. 2.2.3 Production and Standardisation of Extracts with an Increased Content of Biologically Active Substances within the framework of State Research Programme No. 2 Chemical Processes, Reagents and Technologies, Bioregulators and Bioorganic Chemistry and Sub-programme No. 2.2 Synthesis and Targeted Modification of Bioprocess Regulators (Bioregulators).

Disclosure. The authors have applied for an invention patent of the Republic of Belarus for their method of processing for herbal medicines and are going to apply for an invention patent for their method of production of dry extracts from pretreated herbal drugs. Natalia S. Gurina has been a member of the Editorial Board of *Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2024.

ВВЕДЕНИЕ

Комплексная переработка лекарственного растительного сырья (ЛРС) является одной из перспективных технологий, применяемых в промышленной фармации стран СНГ. Целью такой технологии является максимально полное использование растительного сырья, в том числе всех частей растения; шрота после экстракции целевых биологически активных веществ (БАВ); одного вида ЛРС для получения разных продуктов в одном технологическом процессе; вторичного сырья пищевых производств и извлечение разных групп БАВ из одного и того же ЛРС [1, 2].

Значимость внедрения комплексной переработки календулы обусловлена широким применением лекарственных средств на ее основе. На фармацевтическом рынке Республики Беларусь представлены следующие лекарственные препараты на основе календулы цветков¹.

Календулы настойка 1:10 (содержит не менее 65% этанола) относится к коду по АТХ «R02AA — препараты для лечения заболеваний горла.

Антисептики». В форме полосканий после добавления к теплой воде применяют для комплексной терапии воспалительных заболеваний рта (стоматит, гингивит, пародонтит) и горла (тонзиллит), легких воспалительных процессов кожи и небольших поверхностных ран.

Ноготков (календулы) цветки — сырье растительное в картонных пачках и фильтр-пакетах. Применяют в форме водных извлечений по тем же показаниям, что и настойку.

Мазь для наружного применения «Календула» относится к коду АТХ «D03AX — прочие ЛС, способствующие заживлению ран». Оказывает местное противовоспалительное и антисептическое действие. Применяют в терапии ожогов первой степени, небольших поверхностных ран.

На основе календулы цветков получают также жидкие экстракты в составе комбинированных лекарственных средств противовоспалительного, ранозаживляющего, репаративного и антимикробного действия. Календула входит в состав биологически активных добавок к пище (сырье растительное, таблетки), косметических

¹ Государственный реестр лекарственных средств. https://rceth.by/Refbank/reestr_lekarstvennih_sredstv

средств (гель, крем, бальзам), зубных паст, ополаскивателей и др.

В технологию комплексной переработки календулы лекарственной могут быть включены следующие процессы: заготовка надземной части [3]², экстракция из шрота после извлечения 70% этиловым спиртом органических кислот, полисахаридов, флавоноидов, аминокислот, дубильных веществ, тритерпеновых сапонинов, аскорбиновой кислоты³ [4]. В работе И.В. Бурцевой шрот календулы, оставшийся после получения настойки, был использован для получения масляного экстракта, содержащего каротиноиды, и водного экстракта, в котором были определены флавоноиды и полисахариды⁴. В той же работе установлена противоязвенная активность масляного экстракта и иммунокорректирующая — водного. Противоязвенная активность связана с обогащением экстрактов каротиноидами и флавоноидами [5–7], а иммунокорректирующая — полисахаридами⁵ [8]. Как элемент комплексной переработки календулы может быть предложено получение липофильных фракций с использованием сжиженных газов. Полученный липофильный экстракт содержит жирные кислоты, летучие вещества эфирных масел, фитостерины, витамины⁶.

В рамках концепции ресурсосбережения и максимально эффективного использования ЛРС актуальной является разработка такой технологии поэтапной обработки, при которой на каждом последующем этапе повышается выход БАВ или чистота полученного продукта. В рамках такого подхода разные по полярности фракции БАВ могут быть получены в три этапа: извлечение липофильных веществ из ЛРС путем экстракции слабополярным растворителем, извлечение фракций фенольных соединений из обезжиренного сырья путем водно-органической экстракции и выделение из полученного шрота полисахаридных фракций путем водной экстракции. При такой обработке могут быть получены продукты, обогащенные конкретной группой БАВ, что позволит разработать

лекарственные препараты с заданным фармакологическим действием.

Существующие в настоящее время в странах ЕАЭС технологии переработки сырья календулы заключаются в использовании методов экстракции, направленных на получение в одном технологическом цикле только одной фракции БАВ, хотя фармакологическим действием обладает весь комплекс БАВ. Это создает предпосылки для разработки новых методик получения в одном технологическом процессе ряда фракций, обогащенных конкретной группой БАВ, для которой выражен тот или иной фармакологический эффект.

Цель работы — оценка возможности получения фракций биологически активных веществ разной полярности (каротиноиды, флавоноиды и полисахариды) из календулы цветков путем использования поэтапной обработки лекарственного растительного сырья в одном технологическом цикле.

Задачи исследования:

- 1) определить содержание липофильных веществ (каротиноидов) в сырье при экстракции гексаном, твердом маслянистом остатке и масляных экстрактах, водно-органических вытяжках;
- 2) выявить влияние предварительной экстракции гексаном на содержание каротиноидов, флавоноидов, полисахаридов при водно-органической и водной экстракции;
- 3) установить зависимость содержания отдельных полисахаридных фракций и их суммы от используемых этапов обработки;
- 4) предложить методику поэтапной обработки календулы с получением фракций каротиноидов, флавоноидов и полисахаридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись промышленные серии ЛРС календулы цветков производства ООО «НПК Биотест» (Республика Беларусь).

Этапы обработки сырья. Первым этапом обработки являлась экстракция гексаном (х.ч., ОДО «ХимХром») (обезжиривание) календулы цветков в условиях, подобранных ранее⁷.

² Кашенко НИ. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Улан-Удэ; 2014.

³ Дзаурова ММ. Получение и исследование водного экстракта в условиях малоотходной технологии переработки цветков ноготков и его лекарственных форм: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Курск; 2007.

⁴ Бурцева ИВ. Фармакогностическое изучение шрота цветков ноготков после получения настойки: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пермь; 2004.

⁵ WHO monographs on selected medicinal plants. V. 2. Malta; 2002.

⁶ Дёмин МС. Разработка технологии получения и изучение состава липофильных метаболитов плодов *Calendula officinalis* (L.) и *Echinacea purpurea* (L.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2010.

⁷ Assessment report for the development of community herbal monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the community list. https://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_HMPC_assessment_report/2009/12/12/WC500018122.pdf

В полученных после экстракции гексаном извлечениях определяли содержание суммы каротиноидов. Для оценки возможности использования этих извлечений как источников указанной группы БАВ провели удаление гексана путем отгонки при температуре его кипения (69 °С) в ротном испарителе RV 3 есо с баней НВ есо (IKA) и повторное определение каротиноидов, также установили их содержание в твердом маслянистом остатке (экстракте) — плотной массе желто-оранжевого цвета с каплями жирного масла.

Для оценки возможности получения из данного остатка масляных экстрактов использовали в качестве растворителя масло подсолнечное в объеме, эквивалентном первоначальному объему вытяжки, и контролировали полноту растворения визуально и путем определения содержания каротиноидов. Процесс растворения проводили при комнатной температуре в течение 1 ч при механическом перемешивании на орбитальном шейкере KS 130 basic Package (IKA) при 240 об./мин.

Дополнительно до и после отгонки гексана проводили определение каротиноидов ЛРС после различной предобработки: а) обезжиривание с последующей термообработкой; б) термообработка с последующим обезжириванием; в) только термообработка. Термическую обработку проводили при помощи стерилизатора воздушного «Витязь ГП 10-3» (ОАО «Витязь», Республика Беларусь) при следующих условиях: температура в алюминиевой упаковке — 140 °С; продолжительность обработки — 1,5 ч; толщина слоя обрабатываемого порошка сырья — до 1 см. Определяли содержание каротиноидов при повторной (двукратной) экстракции для оценки полноты их извлечения.

Вторым этапом обработки являлась водно-органическая экстракция (смесь вода/ацетон в соотношении 30/70 по объему) флавоноидов из обезжиренного гексаном сырья при подбанных ранее условиях экстракции [9, 10] (далее — этап «удаление флавоноидов»). Условия экстракции: температура экстракции — 60 °С; продолжительность экстракции — 1,5 ч; соотношение сырья и экстрагента — 1:5 (г:мл); кратность экстракции — однократная; степень измельчения сырья — 500 мкм. Сырье оставляли для естественного улетучивания экстрагента до 5 сут под вытяжной системой при комнатной температуре. Высохшее сырье использовали для последующей водной экстракции.

На третьем этапе выполняли водную экстракцию в режиме отвара⁸.

Определение БАВ. В водно-органическом извлечении из ЛРС без предварительной обработки и предварительно обезжиренного (экстракция гексаном) определяли содержание флавоноидов и каротиноидов. В водном извлечении определяли содержание водорастворимых полисахаридов (ВПС), флавоноидов и каротиноидов. В шроте, оставшемся после определения ВПС, устанавливали содержание других полисахаридных фракций (пектиновые вещества (ПВ) и гемицеллюлозы (ГЦ) А и Б) для предварительно необработанного ЛРС, для ЛРС после удаления флавоноидов и после предварительной экстракции гексаном с последующим удалением флавоноидов.

Определение содержания суммы каротиноидов выполняли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 442 нм [11] на спектрофотометре Solar PB2201 (ЗАО «Солар», Республика Беларусь). Исследуемый образец разбавляли гексаном или экстрагентом до значений оптической плотности 0,2–0,8 (испытываемый раствор), в качестве компенсационного раствора использовали гексан или экстрагент без добавок.

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин рассчитывали по формуле (1):

$$\omega_{\text{каротиноиды}} = \frac{A_{\text{проба}} \times V_{\text{извлечение}}}{V_{\text{аликвота}} \times 250 \times m} \times 100\%, \quad (1)$$

где $\omega_{\text{каротиноиды}}$ — массовая доля каротиноидов, %; $A_{\text{проба}}$ — оптическая плотность испытуемого раствора; $V_{\text{извлечение}}$ — объем полученного извлечения, мл; $V_{\text{аликвота}}$ — объем аликвоты, взятой для разведения; 250 — удельный показатель поглощения β-каротина; m — масса навески испытуемого сырья, г.

Определение содержания флавоноидов проводили по схеме: к 5,0 мл извлечения добавляли 8,0 мл раствора 50 г/л алюминия хлорида в 70% этиловом спирте, выдерживали на водяной бане в течение 4 мин, быстро (в течение 30 с) в сосуде со льдом охлаждали до комнатной температуры, добавляли 5,0 мл буферного раствора и доводили 70% этиловым спиртом до объема 25 мл. Получали таким образом испытуемый раствор. Измерение оптической плотности испытуемого раствора производили при 409 нм с использованием компенсационного раствора соответственно.

⁸ Фармакопейная статья 01/2013:РБ0002. Настои, отвары и чаи. Государственная фармакопея Республики Беларусь. 2-е изд. Т. 1. 2012.

Для приготовления буферного раствора к 10 мл 1 М раствора натрия гидроксида прибавляли 25 мл раствора 60 г/л кислоты уксусной ледяной и доводили водой до объема 100 мл.

Компенсационный раствор готовили без добавления алюминия хлорида: 5,0 мл извлечения выдерживали на водяной бане в течение 4 мин, быстро (в течение 30 с) охлаждали в сосуде со льдом до комнатной температуры, добавляли 5,0 мл буферного раствора и доводили 70% этиловым спиртом до объема 25 мл.

Пересчет суммарного содержания флавоноидов проводили методом одного стандарта на рутин (Sigma-Aldrich, кат. № 1606503). Готовили стандартный раствор: к 5,0 мл раствора 2 г/л рутина добавляли 8,0 мл раствора 50 г/л алюминия хлорида в 70% этиловом спирте, выдерживали на водяной бане в течение 4 мин, быстро (в течение 30 с) охлаждали в сосуде со льдом до комнатной температуры, добавляли 5,0 мл буферного раствора и доводили 70% этиловым спиртом до объема 25 мл.

Компенсационный раствор готовили без добавления алюминия хлорида: 5,0 мл раствора 2 г/л рутина выдерживали на водяной бане в течение 4 мин, быстро (в течение 30 с) охлаждали в сосуде со льдом до комнатной температуры, добавляли 5,0 мл буферного раствора и доводили 70% этиловым спиртом до объема 25 мл.

Идентификацию флавоноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, условия хроматографирования приведены в [12], времена удержания и форму спектров поглощения сравнивали с данными, полученными на стандартных образцах Sigma-Aldrich: тифанеозид (кат. № 0002045); мангаслин (кат. № 0003918); рутин (кат. № 1606503); изокверцитрин (кат. № 0105405); нарциссин (кат. № 5481663); изорамнетина 3-глюкозид (кат. № 0016733).

Определение содержания полисахаридных фракций проводили гравиметрически [13–15]. Для определения ВПС из каждого водного извлечения отбирали по три пробы объемом по 25 мл в центрифужные пробирки, прибавляли трехкратный объем 96% этилового спирта и подогревали на водяной бане при 60 °С 5 мин. Через 30 мин центрифугировали при 5000 об./мин в течение 30 мин на центрифуге Sigma 3-16L (Sigma-Aldrich). Надосадочную жидкость фильтровали через предварительно высушенный до постоянной массы при температуре 100–105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм, затем

в отфильтрованной жидкости проводили количественное определение флавоноидов и каротиноидов (при их обнаружении в водном извлечении).

Осадок количественно переносили на предварительно взвешенное часовое стекло, промывали последовательно смесью 96% этилового спирта и воды (3:1, по объему), ацетоном и этилацетатом, высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100–105 °С до постоянной массы и рассчитывали содержание определяемых веществ (ω) (ВПС, ПВ, сумма ГЦ А и В) по формуле (2).

$$\omega = \frac{(m_{\text{часовое стекло} + \text{ПС}} - m_{\text{часовое стекло}}) \times V_{\text{извлечение}}}{V_{\text{аликвота}} \times m} \times 100\%, \quad (2)$$

где $m_{\text{часовое стекло} + \text{ПС}}$ — масса часового стекла с высохшей на нем ПС фракцией, г; $m_{\text{часовое стекло}}$ — масса часового стекла, г; $V_{\text{извлечение}}$ — объем извлечения, полученного в ходе водной экстракции, мл; $V_{\text{аликвота}}$ — объем аликвоты, из которой проводилось осаждение ПС фракции, мл; m — масса навески испытуемого сырья, г.

Конечная масса ВПС определена путем вычитания из массы ВПС, рассчитанной по формуле (2), массы флавоноидов, содержащихся в растворе ВПС, который получали из осадков ВПС после их растворения в 25 мл воды.

Для определения содержания пектиновых веществ к полученному после извлечения ВПС шроту (высушивание в вытяжной системе в течение 3 сут) добавляли смесь растворов 5 г/л аммония оксалата и 5 г/л кислоты щавелевой (1:1, по объему) при соотношении сырья по массе и экстрагента по объему 1:20 (г:мл). Помещали на водяную баню WB-4 («Белаквилон», Республика Беларусь) при температуре 85 °С на 2 ч. После остывания до комнатной температуры пробы фильтровали через ватный тампон, сырье и фильтр отжимали. Фильтр с остатками ЛРС прибавляли к оставшемуся шроту и использовали для дальнейшего извлечения суммы ГЦ А и Б после высушивания в вытяжной системе в течение 3 сут. Осаждение и расчет массовой доли ПВ проводили аналогично ВПС по формуле (2).

При определении содержания суммы гемицеллюлоз А и Б к полученному после извлечения ПВ шроту добавляли раствор 100 г/л натрия гидроксида при соотношении сырья по массе и экстрагента по объему 1:10 (г:мл). Экстракцию проводили в течение 12 ч при комнатной температуре, после чего фильтровали через ватный тампон, сырье и фильтр отжимали.

Из профильтрованных извлечений отбирали по три пробы объемом 10 мл в центрифужные пробирки, к каждой пробе добавляли 10 мл кислоты уксусной ледяной и осаждали полисахаридную фракцию трехкратным объемом 96% этилового спирта [16, 17]. Центрифугировали при 5000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через стеклянный фильтр, к полученному осадку прибавляли 20 мл воды, 1,0 мл кислоты уксусной ледяной и 60 мл 96% этилового спирта. Повторно центрифугировали и фильтровали надосадочную жидкость. С осадком поступали аналогично тому, как описано в случае ВПС. Массовую долю суммы ГЦ А и Б определяли по формуле (2).

Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016 (пакет «Анализ данных»). Каждое испытание проводили три раза ($n = 3$). Результаты представляли в виде $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{X}}$, где $\bar{X}$ – среднее значение выборки; $\Delta_{\bar{X}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины. Значения статистически значимо различались при p -значении (p) < 0,05. Сравнение величин с сырьем, не подвергавшемся предварительной обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены результаты определения содержания каротиноидов, флавоноидов и полисахаридных фракций календулы цветков на различных этапах предобработки. Содержание флавоноидов больше для ЛРС, прошедшего предварительную обработку путем экстракции гексаном, на 44,8% (отн.) ($p = 0,0084$) по сравнению с нативным ЛРС (табл. 1), что подтверждается спектрами поглощения, записанными в УФ- и видимой областях (рис. 1). Флавоноиды присутствовали во всех водных

извлечениях, полученных как из нативного, так и предварительно обработанного сырья (рис. 2а).

Наиболее богато флавоноидами водное извлечение, полученное из нативного сырья; после предварительного удаления флавоноидов водно-органической экстракцией и ее сочетании с экстракцией гексаном содержание этих соединений снижалось на 68,5% (отн.) ($p = 0,0053$) и в два раза соответственно. Также флавоноиды присутствовали в надосадочной жидкости, которая получена после осаждения ВПС 96% этиловым спиртом и их отделении центрифугированием (рис. 2б).

Максимум поглощения при длине волны 409 нм, характерный для продукта химической реакции флавоноидов календулы с алюминия хлоридом, отсутствовал только в надосадочной жидкости после предварительного обезжиривания и удаления флавоноидов (рис. 2б). Содержание флавоноидов в надосадочной жидкости снижалось в ряду «сырье без предварительной обработки» → «после удаления флавоноидов» → «после предварительной экстракции гексаном с последующим удалением флавоноидов», при этом содержание в двух последних случаях уменьшалось в 2 и 9 раз соответственно по сравнению с нативным сырьем.

Осадки ВПС также содержали флавоноиды, что подтверждено их обнаружением в растворах ВПС (рис. 2с).

Больше всего флавоноидов обнаружено в растворе ВПС из ЛРС без предварительной обработки, что в 10 и 13 раз больше в сравнении с раствором «после удаления флавоноидов» и раствором, полученном при сочетании этого метода предобработки с экстракцией гексаном

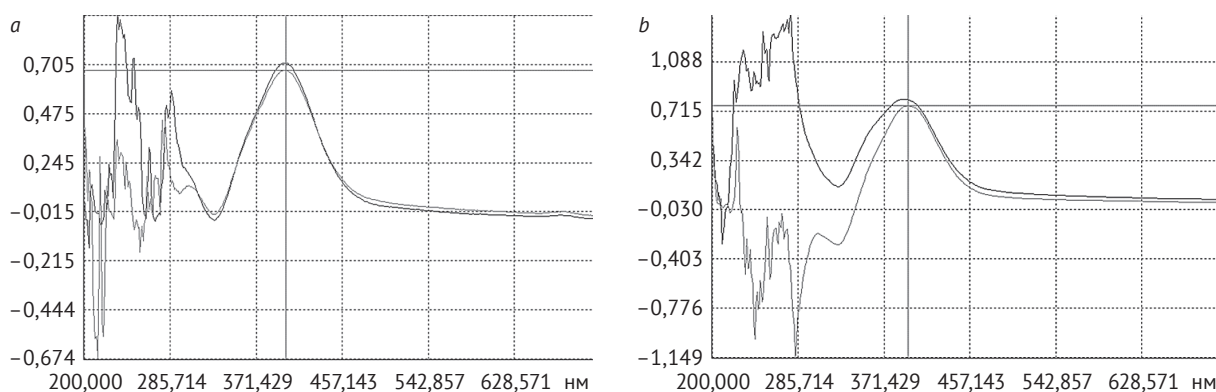


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Спектры поглощения, записанные при количественном определении флавоноидов в водно-органическом извлечении из календулы цветков. а – нативное сырье; б – сырье после предварительной экстракции гексаном

Fig. 1. Absorption spectra recorded during the quantification of flavonoids in extract of calendula flowers obtained using a water-organic solvent system: a, intact herbal drug; b, herbal after pre-extraction with hexane

Таблица 1. Содержание каротиноидов, флавоноидов и полисахаридных фракций календулы цветков при поэтапной предварительной обработке

Table 1. Content of carotenoids, flavonoids, and polysaccharide fractions in calendula flowers observed during stepwise pretreatment

Исследуемый объект <i>Study object</i>	Каротиноиды, % <i>Carotenoids, %</i>	Флавоноиды, % <i>Flavonoids, %</i>	Водорастворимые полисахариды, % <i>Water-soluble polysaccharides (WSPs), %</i>	Пектиновые вещества, % <i>Pectic substances, %</i>	Сумма гемицеллюлоз А и Б, % <i>Sum of hemicelluloses A and B, %</i>
Нативное лекарственное растительное сырье <i>Intact herbal drug</i>					
Водное извлечение <i>Aqueous extract</i>	не обнаружено <i>not detected</i>	3,59±0,12	14,10±0,13	17,36±0,18	12,37±0,20
Надосадочная жидкость <i>Supernatant fluid</i>	–	1,86±0,53	–	–	–
Раствор водорастворимых полисахаридов <i>WSP solution</i>	–	1,47±0,17	–	–	–
Лекарственное растительное сырье после удаления флавоноидов <i>Herbal drug after removal of flavonoids</i>					
Водно-органическое извлечение <i>Extract obtained using a water–organic solvent system</i>	0,40±0,015	4,42±0,62	–	–	–
Водное извлечение <i>Aqueous extract</i>	не обнаружено <i>not detected</i>	2,13±0,10	12,49±0,12	14,91±0,11	10,25±0,083
Надосадочная жидкость <i>Supernatant fluid</i>	–	0,85±0,090	–	–	–
Раствор водорастворимых полисахаридов <i>WSP solution</i>	–	0,15±0,0070	–	–	–
Лекарственное растительное сырье после предварительной экстракции гексаном и удаления флавоноидов <i>Herbal drug after pre-extraction with hexane and removal of flavonoids</i>					
Водно-органическое извлечение <i>Extract obtained using a water–organic solvent system</i>	0,20±0,028	6,39±0,31	–	–	–
Водное извлечение <i>Aqueous extract</i>	не обнаружено <i>not detected</i>	0,92±0,013	9,83±0,80	14,17±0,17	6,81±0,21
Надосадочная жидкость <i>Supernatant fluid</i>	–	0,20±0,028	–	–	–
Раствор водорастворимых полисахаридов <i>WSP solution</i>	–	0,11±0,01	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – количественное определение для этих проб не проводили.
Note. –, no quantitative determination was performed for these samples.

соответственно. Длина волны максимума поглощения раствора ВПС (325 нм) отличается от длины волны максимума поглощения рутина (365 нм) (рис. 3), что свидетельствует об удалении флавоноидов из осадка ВПС во время предварительной обработки сырья – экстракции гексаном и путем водно-органической экстракции, однако не исключает абсорбцию ВПС других веществ, поглощающих в УФ-области спектра (белки, простые фенолы и др.).

При проведении дополнительных процедур предварительной обработки содержание флавоноидов увеличивалось при водно-органической экстракции и снижалось при водной экстракции в надосадочной жидкости и растворе ВПС, что указывало на повышение степени чистоты выделяемых ВПС. Это подтверждается тем, что при введении каждого дополнительного этапа предобработки ЛРС масса ВПС снижалась по сравнению с массой ВПС, полученных

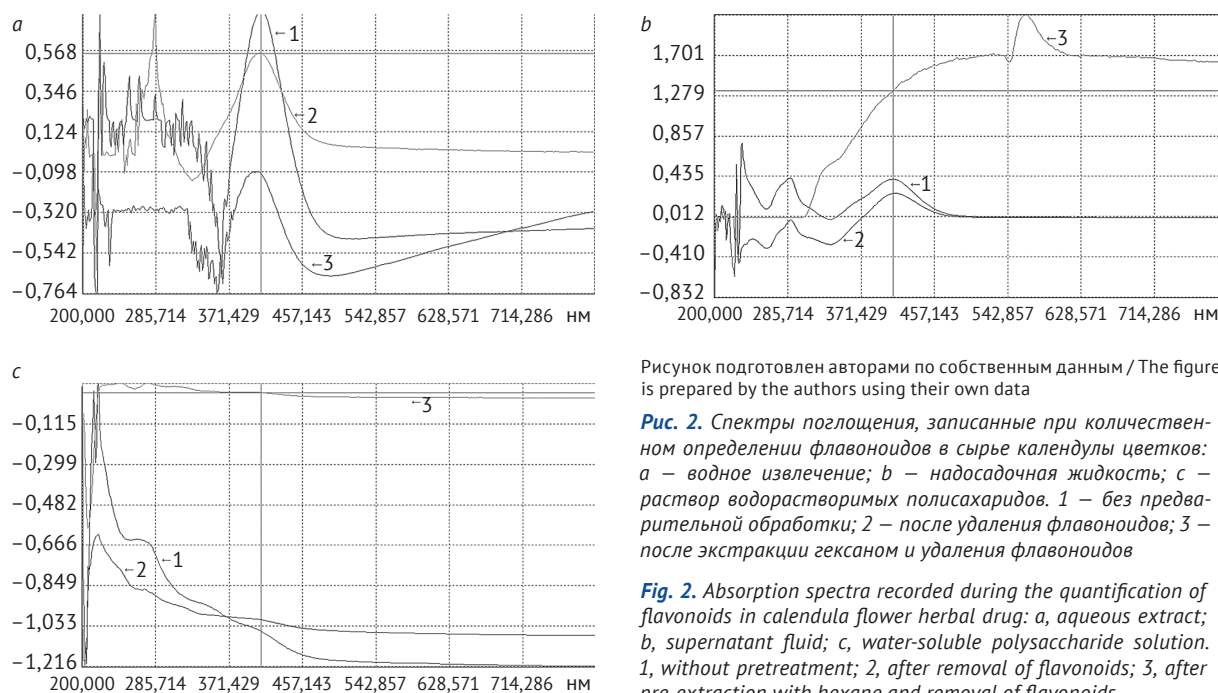


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Спектры поглощения, записанные при количественном определении флавоноидов в сырье календулы цветков: а – водное извлечение; б – надосадочная жидкость; с – раствор водорастворимых полисахаридов. 1 – без предварительной обработки; 2 – после удаления флавоноидов; 3 – после экстракции гексаном и удаления флавоноидов

Fig. 2. Absorption spectra recorded during the quantification of flavonoids in calendula flower herbal drug: a, aqueous extract; b, supernatant fluid; c, water-soluble polysaccharide solution. 1, without pretreatment; 2, after removal of flavonoids; 3, after pre-extraction with hexane and removal of flavonoids

из нативного сырья, на 12,9% (отн.) ($p = 0,083$) и 43,4% (отн.) ($p = 0,0072$) при удалении флавоноидов и сочетании этого метода предобработки с экстракцией гексаном соответственно, то есть снижение массы ВПС происходило за счет удаления флавоноидов при предобработке и уменьшении их массы в осадке ВПС на 15,4% (отн.) ($p = 0,065$) и 49,6% (отн.) ($p = 0,027$) соответственно.

Согласно данным В.И. Дейнеки и соавт. [18], основными каротиноидами календулы являются лютео-, флаво- и рубиксантин (максимумы поглощения при 399, 422 и 448 нм), лютеин

(446 и 474 нм), изомеры ликопина (463–472 нм), β -каротина (458–462 нм). Аналогичные максимумы поглощения отмечены на спектрах липофильных извлечений, полученных при экстракции гексаном (рис. 4). Спектры, приведенные на рисунке 4, совпадают со спектрами, полученными для гексановых вытяжек из календулы⁹ [19, 20].

Каротиноиды определены только в липофильных вытяжках и водно-органических извлечениях (рис. 4) и не обнаружены в водных извлечениях вне зависимости от типа предварительной обработки. Предварительная экстракция гексаном

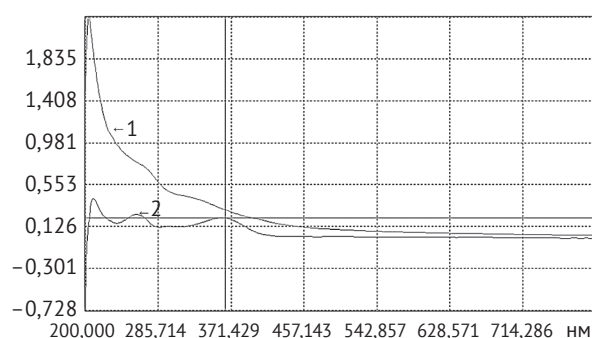


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Спектры поглощения: 1 – раствор водорастворимых полисахаридов из сырья после экстракции гексаном и удаления флавоноидов; 2 – раствор рутина

Fig. 3. Absorption spectra: 1, solutions of water-soluble polysaccharides from calendula flowers after extraction with hexane and removal of flavonoids; 2, rutin solution

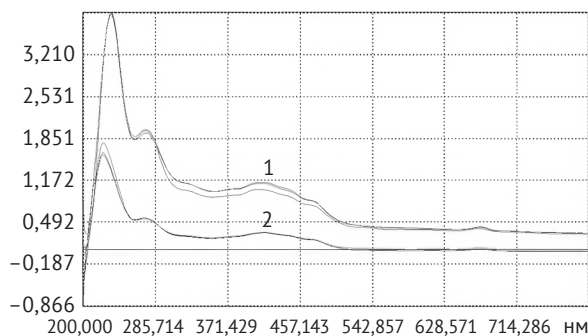


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Спектры поглощения липофильных извлечений из календулы цветков после экстракции гексаном: 1 – однократной; 2 – двукратной

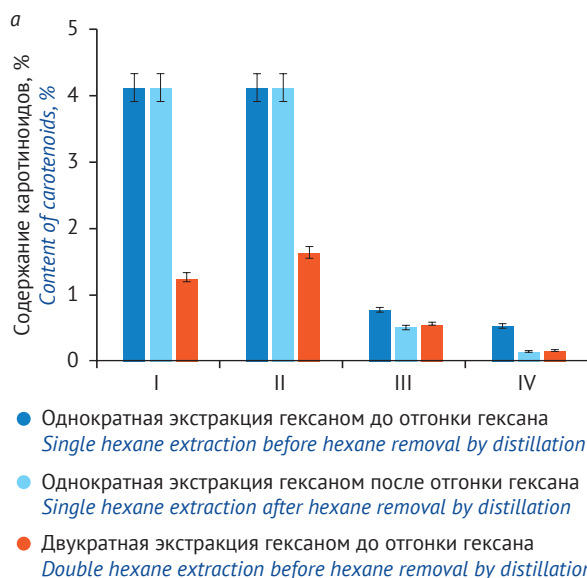
Fig. 4. Absorption spectra of lipophilic extracts from calendula flowers: 1, after single hexane extraction; 2, after double hexane extraction

⁹ Афанасьева П.В. Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Самара; 2017.

снижала содержание каротиноидов при последующей водно-органической экстракции в два раза.

Из образцов, предварительно обработанных гексаном с/без последующей термической обработкой, удалялось в 5–7 раз больше каротиноидов, чем из образцов, обработанных термически с/без последующей экстракцией гексаном. Удаление гексана (отгонка) не влияло на содержание каротиноидов в образце, полученном при экстракции гексаном с/без последующей термической обработкой ($p = 0,29$), при термической обработке с/без экстракцией гексаном содержание каротиноидов снижалось ($p = 0,037$), что, предположительно, связано с двойным воздействием температуры: на этапах предобработки и отгонки гексана. Двукратная экстракция гексаном при всех примененных вариантах предобработки приводит к меньшему извлечению каротиноидов на 37,5–250% (отн.) (рис. 5а), чем однократная.

Наибольшее содержание каротиноидов в твердом маслянистом остатке и масляном экстракте отмечено в случае образца, полученного при экстракции гексаном с/без последующей термической обработкой ($p = 0,28$ и $0,30$ соответственно). Значимое на 41,2–250% снижение отмечено при термической обработке и ее комбинации с экстракцией гексаном (рис. 5б) по сравнению с образцами, полученными только с использованием экстракции гексаном.



Полисахариды календулы относятся к трем группам: водорастворимые полисахариды (31,25%), пектиновые вещества (9,67%), сумма гомоцеллюлоз А и Б (5,92% от массы ЛРС). В составе ВПС 31,25% сахаров восстанавливающего типа и 25,77% кислых сахаров. Моносахаридная фракция содержит глюкозу, арабинозу, галактозу, рамнозу, ксилозу и галактуроновую кислоту [21–23].

Для ВПС, полученных из нативного ЛРС, характерно темно-оранжевое окрашивание, более светлые оттенки характерны для ВПС после удаления флавоноидов с/без экстракцией гексаном (рис. 6а). Содержание ВПС снижалось при удалении флавоноидов и его комбинировании с экстракцией гексаном на 12,9% ($p = 0,067$) и 43,4% ($p = 0,0048$) по сравнению с нативным сырьем.

Окрашивание пектиновых веществ (светло-оранжевое) не зависело от способа предобработки (рис. 6б). В спектре поглощения растворов ПВ отмечены два максимума при длинах волн 285 и 325 нм (рис. 7), аналогичные максимумы отмечены в спектрах поглощения растворов ВПС (рис. 3). При предобработке содержание ПВ снижалось по сравнению с нативным сырьем на 16,4% ($p = 0,047$) в образцах после удаления флавоноидов и на 22,5% ($p = 0,044$) при дополнительной экстракции гексаном.

Окрашивание образцов, содержащих гемицеллюлозу, было оранжевым независимо от способа

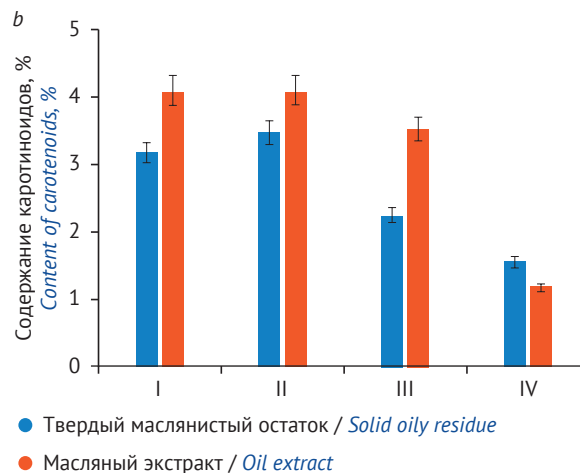


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Содержание каротиноидов в: а – гексановом извлечении, б – твердых маслянистых остатках и масляных экстрактах. Предварительная обработка сырья: I – экстракция гексаном; II – экстракция гексаном, затем термическая обработка; III – термическая обработка, затем экстракция гексаном; IV – термическая обработка

Fig. 5. Content of carotenoids: a, in hexane extracts; b, in solid oily residues and oil extracts. Herbal drug pretreatment: I, hexane extraction; II, hexane extraction followed by heating; III, heating followed by hexane extraction; IV, heating

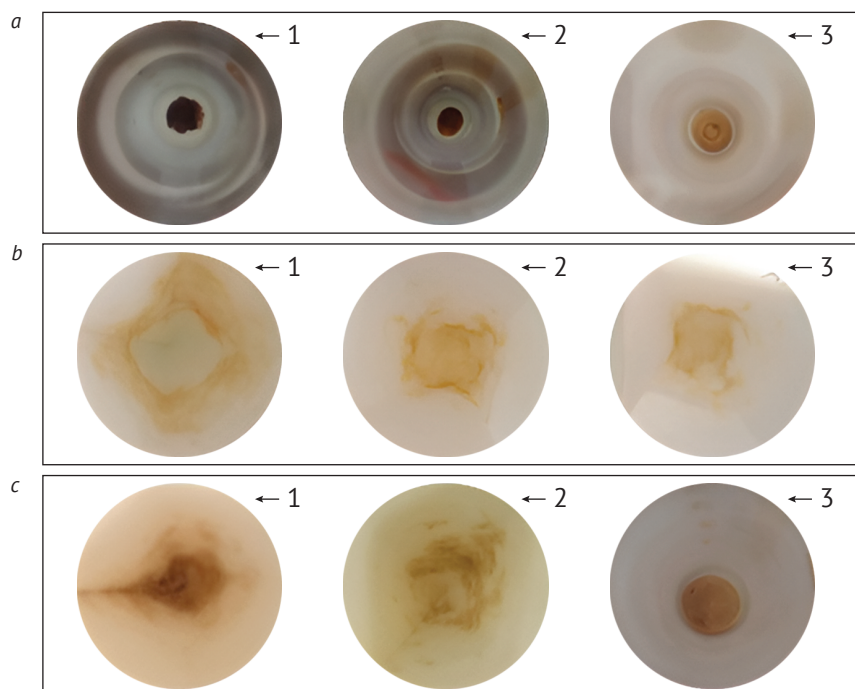


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Внешний вид образцов из сырья календулы цветков на часовом стекле: а – водорастворимые полисахариды; б – пектиновые вещества; с – гemicеллюлозы А и Б. 1 – без предварительной обработки; 2 – после удаления флавоноидов; 3 – после экстракции гексаном и удаления флавоноидов

Fig. 6. Appearance of samples obtained from calendula flowers: a, water-soluble polysaccharides; b, pectic substances; c, hemicelluloses A and B. 1, without pretreatment; 2, after removal of flavonoids; 3, after pre-extraction with hexane and removal of flavonoids

предобработки (рис. 6с). Содержание суммы ГЦ А и Б ПВ снижалось по сравнению с нативным сырьем на 20,7% ($p = 0,045$) при введении этапа удаления флавоноидов и на 81,6% ($p = 0,0031$) при его комбинировании с экстракцией гексаном. При этом снижение содержания ГЦ А и Б происходило более резко, чем в случае ВПС.

Соотношение полисахаридных фракций по массе (ВПС:ПВ:сумма ГЦ А и Б) следующее:

- нативное ЛРС – 1,00:1,30:0,90 (суммарное содержание ПС фракций – $43,40 \pm 0,53\%$);
- ЛРС после удаления флавоноидов – 1,00:1,21:0,83 (суммарное содержание ПС фракций – $37,50 \pm 0,33\%$);
- ЛРС после предварительной экстракции гексаном с последующим удалением флавоноидов – 1,00:1,46:0,70 (суммарное содержание ПС фракций – $30,70 \pm 1,18\%$).

Соотношение ПС фракций имеет схожий профиль при разных способах предварительной обработки ($p = 0,16$), наименьшее количество при любом способе характерно для фракции ГЦ, наибольшее – для фракции ПВ. В меньшей степени снижалось содержание ПВ при увеличении циклов предобработки.

Суммарное содержание полисахаридных фракций снижалось при удалении флавоноидов с/без экстракцией гексаном на 15,7% ($p = 0,046$) и 41,3%

($p = 0,024$) соответственно по сравнению с нативным сырьем. Снижение массы ВПС, ПВ и ГЦ А и Б при увеличении циклов предобработки ЛРС может свидетельствовать о повышении степени чистоты выделяемых полисахаридных фракций за счет удаления флавоноидов, которые могут адсорбироваться на осадках полисахаридов.

Качественный состав флавоноидов при использовании всех рассматриваемых способов предобработки не изменялся (рис. 8. «Хроматограммы

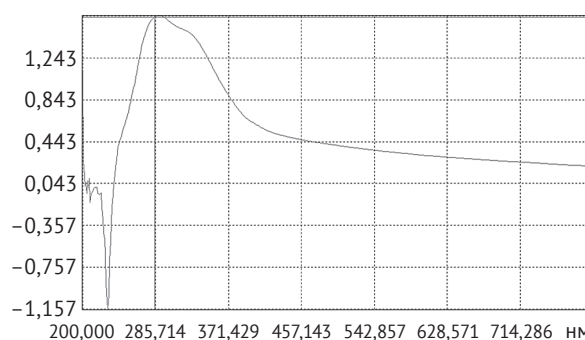


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Спектр поглощения пектиновых веществ из календулы цветков после экстракции гексаном и удаления флавоноидов

Fig. 7. Absorption spectrum of pectic substances from calendula flowers after pre-extraction with hexane and removal of flavonoids

водно-органического извлечения из нативных (а), проэкстрагированных гексаном (b), термообработанных (с), проэкстрагированных гексаном, затем термообработанных (d) и термообработанных, затем проэкстрагированных гексаном (е) календулы цветков», опубликован на сайте журнала¹⁰).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан способ поэтапной обработки ЛРС «календулы цветки», позволяющий получить продукты, обогащенные конкретной группой БАВ. Предварительная экстракция (обезжиривание) слабополярным агентом (гексаном) позволяет по сравнению с нативным сырьем повысить выход флавоноидов на 68,5% при водно-органической экстракции, снижает их содержание при водной экстракции в надосадочной жидкости в два раза и растворе водорастворимых полисахаридов практически в десять раз, повышает чистоту выделенных полисахаридных фракций: водорастворимых полисахаридов на 43,4%,

пектиновых веществ на 22,5% и гемицеллюлозы на 81,6%. Липофильные вытяжки могут быть использованы для получения сухих и масляных экстрактов, в которых содержание каротиноидов сопоставимо с их содержанием в самом сырье. Соотношение полисахаридных фракций не меняется при всех примененных способах обработки.

Таким образом, для повышения эффективности использования ЛРС и получения нескольких продуктов с разными фармакологическими свойствами можно предложить следующий способ поэтапной обработки календулы цветков: экстракция сырья гексаном с получением липофильных вытяжек, обогащенных каротиноидами; водно-органическая экстракция с получением извлечений, обогащенных флавоноидами, и водная экстракция, дающая возможность получить полисахариды высокой степени чистоты, что выгодно отличает предложенный способ от существующих в странах ЕАЭС одноэтапных способов получения фракций биологически активных веществ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сайбель ОЛ. Принцип комплексного использования растительного сырья как инструмент ресурсосберегающих технологий получения лечебных и профилактических средств. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(12):3–10. Saibel OL. The principle of integrated use of plant raw materials as a tool for resource-saving technologies for obtaining therapeutic and prophylactic agents. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2021;24(12):3–10 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-12-01>
2. Куркин ВА, Запесочная ГГ, Авдеева ЕВ, Правдивцева ОЕ, Браславский ВВ, Куркина АВ и др. Создание ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2010;12(1–3):737–40. Kurkin VA, Zapesochnaya GG, Avdeeva EV, Pravdivtseva OE, Braslavsky VB, Kurkina AV, et al. Creation of resource-saving technologies of processing the medicinal plant raw materials. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2010;12(1–3):737–40 (In Russ.). EDN: [NDXVAJ](#)
3. Афанасьева ПВ, Куркина АВ. Перспективы комплексного использования сырья календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014;16(5):980–2. Afanasyeva PV, Kurkina AV. Perspectives of complex use the raw materials of calendula medicinal (*Calendula officinalis* L.). *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2014;16(5):980–2 (In Russ.). EDN: [RPEGPO](#)
4. Бурцева ИВ, Левинова ВФ, Саладовникова ВН. Органические кислоты шрота цветков ноготков. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2007;(2):220–3. Burtseva IV, Levinova VF, Saladovnikova VN. Organic acids of marigold flower meal. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2007;(2):220–3 (In Russ.).
5. Palmieri B, Vadalà M, Laurino C. New vaginal gel for female genital wellness and disease prevention: rationale of a multi-herbal derived treatment on a high-tech pharmaceutical perspective. *AJPCT*. 2016;4(1):1–18.
6. Chandra P, Kishore K, Ghosh AK. Evaluation of antacid capacity and antiulcer activity of *Calendula officinalis* L. in experimental rats. *Orient Pharm Exp Med*. 2015;15:277–85. <https://doi.org/10.1007/s13596-015-0195-5>
7. Воскресенская МЛ, Плеханов АН, Мондодоев АГ, Цыремпилов СВ. Фармакотерапевтическая эффективность календулы лекарственной. *Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация*. 2017;(1):73–8. Voskresenskaya ML, Plekhanov AN, Mondodoev AG, Tsyrempilov SV. Pharmacotherapeutic effectiveness of *Calendula officinalis*. *BSU Bulletin. Medicine and Pharmacy*. 2017;(1):73–8 (In Russ.). EDN: [VKTTXY](#)
8. Лукашов РИ. Обезжиривание календулы цветков как способ повышения экстракции флавоноидов. *Вестник фармации*. 2022;(1):48–56. Lukashou RI. Calendula flowers defatting as a way to increase flavonoids extraction. *Vestnik Farmacii*. 2022;(1):48–56 (In Russ.). EDN: [LVPKJW](#)
9. Лукашов РИ. Влияние природы и концентрации органических экстрагентов на извлечение флавоноидов из календулы цветков. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2018;17(5):109–23. Lukashou RI. The influence of nature and concentration of organic extractants on flavonoids extraction from calendula flowers. *Vitebsk Medical Journal*. 2018;17(5):109–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2018.5.109>
10. Лукашов РИ, Гурина НС. Уточнение объемной доли органических растворителей, используемых для экстракции флавоноидов из календулы цветков. В кн.: *Инновационные технологии в фармации*. Иркутск; 2022. С. 86–90 (In Russ.). Lukashou RI, Gurina NS. Refinement of the volume proportion of organic solvents used for the extraction of flavonoids from calendula flowers. In: *Innovative technologies in pharmacy*. Irkutsk; 2022. P. 86–90 (In Russ.). EDN: [RPMFWT](#)

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-634-fig8>

11. Тринева ОВ, Сливкин АИ, Сафонова ЕФ. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.). *Химия растительного сырья*. 2015;(3):105–10. Trineeva OV, Slivkin AI, Safonova EF. Determination of hydroxycinnamic acids, carotenoids and chlorophyll in leaves of stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Chemistry of Plant Raw Material*. 2015;(3):105–10 (In Russ.). EDN: [VEJOGX](#)
12. Моисеев ДВ, Шелюто ВЛ, Бузук ГН. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(1):35–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2011-45-1-35-38> Moiseev DV, Shelyuto VL, Buzuk GN. Identification of flavonoids in plants by HPLC. *Pharm Chem J*. 2011;45(1):47–50. <https://doi.org/10.1007/s11094-011-0558-2>
13. Бубенчиков РА. Фенольные соединения и полисахариды фиалки собачьей. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2004;(1):156–9. Bubenchikov RA. Phenolic compounds and polysaccharides of *Viola canina*. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2004;(1):156–9 (In Russ.). EDN: [OITHVF](#)
14. Bueno da Silva DP, Ferreira Florentino I, da Silva Moreira L, Ferreira Brito A, Vale Carvalho V, Ferreira Rodrigues M. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). *J Ethnopharmacol*. 2018;213:395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.021>
15. Makio M. Polysaccharides of soybean seeds: Part I. Polysaccharide constituents of “hot-water-extract” fraction of soybean seeds and an arabinogalactan as its major component. *Agric Biol Chem*. 1965;29(6):564–73. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858424>
16. Ананьина НА, Андреева ОА, Оганисян ЭТ. Полисахариды клубней георгины простой (*Dahlia single* L.). *Химия растительного сырья*. 2008;(2):135–6. Ananyina NA, Andreeva OA, Oganisyan ET. Polysaccharides from the roots of *Dahlia single* L. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2008;(2):135–6 (In Russ.). EDN: [JSIRCP](#)
17. Bian J, Peng F, Peng P, Xu F, Sun R-C. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. *Carbohydr Res*. 2010;345(6):802–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.01.014>
18. Дейнека ВИ, Гостищев ИА, Третьяков МЮ, Индина ИВ. Каротиноиды лепестков цветков календулы. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки*. 2011;(15–2):277–85. Deineka VI, Gostishchev IA, Tretyakov MYu, Indina IV. Carotenoids of calendula flower petals. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural Sciences*. 2011;(15–2):277–85 (In Russ.). EDN: [RYLTDP](#)
19. Афанасьева ПВ, Куркин ВА, Куркина АВ. Оптимизация подходов к стандартизации фитопрепаратов на основе календулы лекарственной. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2015;17(5–3):930–4. Afanasyeva PV, Kurkin VA, Kurkina AV. Optimization of the approaches to the standardization of phytopreparations based on *Calendula officinalis*. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2015;17(5–3):930–4 (In Russ.). EDN: [WFCBEF](#)
20. Смирнова АН, Швыдкий ВО, Шишкина ЛН. Физико-химические свойства и состав липидов цветков календулы и плодов облепихи. *Химическая физика*. 2021;40(7):43–8. <https://doi.org/10.31857/S0207401X21070104> Smirnova AN, Shvydkiy VO, Shishkina LN. Physicochemical properties and lipid composition of calendula flowers and sea buckthorn fruits. *Rus J Phys Chem B*. 2021;15(4):710–5. <https://doi.org/10.1134/S1990793121040102>
21. Корж АП, Гурьев АМ, Белоусов МВ, Юсубов МС, Белянин МЛ. Состав водорастворимых полисахаридов из цветков *Calendula officinalis* L. 2012;12(4):23–5. EDN: [TMRBEF](#) Korzh AP, Gur'ev AM, Belousov MV, Yusubov MS, Belyanin ML. Composition of water-soluble polysaccharides from *Calendula officinalis* L. flowers. *Pharm Chem J*. 2012;46(4):219–21. <https://doi.org/10.1007/s11094-012-0765-5>
22. Сычев ИА, Кокина ДГ, Ванина ДС. Влияние полисахарида календулы на изменение состава белой крови крыс и структуру лимфоидных органов в норме и при анемии. *Достижения науки и образования*. 2024;(1):10–6. Sychev IA, Kokina DG, Vanina DS. The influence of calendula polysaccharide on changes in the composition of white blood in rats and the structure of lymphoid organs in normal conditions and in anemia. *Advances in Science and Education*. 2024;(1):10–6 (In Russ.). EDN: [ZTENCX](#)
23. Сироткина ДС, Сычев ИА, Черданцева ТМ, Колосова ТЮ. Действие полисахарида цветков календулы на кровь и кроветворение. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*. 2022;(3):212–7. Sirotkina DS, Sychev IA, Cherdantseva TM, Kolosova TYu. Effect of polysaccharide of calendula flowers on blood and hemorolous. *Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sciences*. 2022;(3):212–7 (In Russ.). EDN: [RDVSKS](#)

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещен рисунок 8. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-634-fig8>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Р.И. Лукашов — выполнение экспериментальных работ, оформление результатов, написание текста рукописи; Н.С. Гурина — постановка цели работы, методическое руководство выполнением экспериментальной работы, обсуждение результатов.

Additional information. Figure 8 is available on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-634-fig8>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Raman I. Lukashou conducted experiments, presented the results, and drafted the manuscript. Natalia S. Gurina set the aim for the work, provided methodological guidance for the experiments, and participated in discussions of the results.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Лукашов Роман Игоревич, канд. фарм. наук, доцент / **Raman I. Lukashou**, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9547-5372>

Гурина Наталия Сергеевна, д-р биол. наук, профессор / **Natalia S. Gurina**, Dr. Sci. (Biol.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>

Поступила 05.03.2024

После доработки 10.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Online first 09.10.2024

Received 5 March 2024

Revised 10 April 2024

Accepted 10 April 2024

Online first 9 October 2024



В.О. Небогатилов¹ 
Д.И. Салихова^{2,3} 
Е.В. Белоусова^{2,3} 
Е.В. Броницкий⁴ 
Е.А. Орлова¹ 
М.А. Лапшина¹ 
Д.В. Гольдштейн² 
А.А. Устюгов¹ 

Безопасность биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников человека: пилотное исследование на мышах линии C57BL/6J при ретроорбитальном введении

¹ Институт физиологически активных веществ
федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр проблем химической физики
и медицинской химии» Российской академии наук,
Северный пр-д, д. 1, Черноголовка, Московская область, 142432,
Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,
ул. Москворечье, д. 1, Москва, 115522, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины
Медицинского института Российского университета дружбы народов,
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, 117198, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Государственный университет просвещения»,
ул. Радио, д. 10а, стр. 2, Москва, вн. тер. г. муниципальный округ
Басманный, 105005, Российская Федерация

✉ Небогатилов Владимир Олегович; vnebogatikov@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Терапия стволовыми клетками представляет собой перспективный метод лечения различных заболеваний и травм, однако безопасность этого метода изучена недостаточно. Исследование безопасности ретроорбитального введения ксеногенного биомедицинского клеточного продукта необходимо для разработки протоколов дальнейших исследований потенциальных препаратов при терапии неврологических заболеваний.

ЦЕЛЬ. Выбор дозы биомедицинского клеточного продукта, полученного на основе глиальных клеток-предшественников, и оценка его безопасности при ретроорбитальном введении мышам линии C57BL/6J.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Глиальные клетки-предшественники (ГКП), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека путем их поэтапной дифференцировки, культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением эпидермального фактора роста и цилиарного нейротрофического фактора, в качестве подложки использовали матригель. Введение клеток мышам осуществляли ретроорбитально под изофлурановым наркозом один раз в неделю на протяжении двух месяцев. Исследование проводили на самцах мышей линии C57BL/6J. Оценивали биохимические показатели крови животных, изменения в поведении, количество активированных астроцитов и клеток микроглии методом иммуногистохимического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь, выбранной на основании данных литературы, в плазме крови животных было отмечено увеличение концентрации аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, что могло свидетельствовать о повреждении клеток и развитии воспалительных реакций. При уменьшении дозы вводимых клеток в 3 раза и более биохимические

показатели крови не отличались от результатов в группе контроля. При оценке маркеров нейровоспаления в экспериментах с разными дозами ГКП значимых различий выявлено не было, однако у животных, получавших препарат в дозе 150×10^3 кл./мышь, наблюдали увеличение числа астроцитов, что может свидетельствовать о развивающихся воспалительных процессах в головном мозге. При введении ГКП в дозах 50×10^3 и 15×10^3 кл./мышь в ретроорбитальный венозный синус патологических изменений в головном мозге и в плазме крови животных не наблюдалось.

ВЫВОДЫ. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной безопасности длительной терапии ГКП на мышах при соблюдении оптимальных условий дозирования. Установленные оптимальные дозы и способ введения ГКП предложено использовать для дальнейших исследований безопасности внутривенной доставки клеточных продуктов, предназначенных для терапии неврологических заболеваний.

Ключевые слова: стволовые клетки; глиальные клетки-предшественники; ретроорбитальное введение; мыши C57BL/6J; выбор дозы

Для цитирования: Небогатилов В.О., Салихова Д.И., Белоусова Е.В., Броновицкий Е.В., Орлова Е.А., Лапшина М.А., Гольдштейн Д.В., Устюгов А.А. Безопасность биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников человека: пилотное исследование на мышах линии C57BL/6J при ретроорбитальном введении. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):720–732. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-15-00362 «Изучение механизмов терапевтического действия внеклеточных везикул, полученных из глиальных клеток-предшественников человека на модели болезни Альцгеймера».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vladimir O. Nebogatikov¹ 
Diana I. Salikhova^{2,3} 
Ekaterina V. Belousova^{2,3} 
Evgeny V. Bronovitsky⁴ 
Ekaterina A. Orlova¹ 
Mariya A. Lapshina¹ 
Dmitry V. Goldshtein² 
Aleksey A. Ustyugov¹ 

Safety of a Medicinal Product Based on Human Glial Progenitor Cells: A Pilot Study of Retrobulbar Administration in C57BL/6J Mice

¹ Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences,
1 Severny Dr., Chernogolovka, Moscow Region 142432, Russian Federation

² Research Centre for Medical Genetics,
1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russian Federation

³ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the Medical Institute of the Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba,
6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russian Federation

⁴ Federal State University of Education,
10A/2 Radio St., Moscow 105005, Russian Federation

✉ Vladimir O. Nebogatikov; vnebogatikov@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. Stem cell therapy is a promising treatment method for various diseases and injuries, but its safety has yet to be determined. Therefore, studying the safety of administering a xenogeneic cell-based medicinal product (CBMP) into the retro-orbital venous sinus is essential for developing protocols for further studies of potential medicinal products for neurological conditions.

AIM. The aim of the study was to determine the optimal dose of a CBMP derived from glial progenitor cells (GPCs) and to evaluate its safety during retrobulbar administration in C57BL/6J mice.

MATERIALS AND METHODS. GPCs were derived from human induced pluripotent stem cells by stepwise differentiation and cultured in DMEM/F12 supplemented

with epidermal growth factor and ciliary neurotrophic factor. Matrigel was used as a substrate. GPCs were injected into the retro-orbital venous sinus of male C57BL/6J mice under isoflurane anaesthesia once a week for two months. The study analysed changes in biochemical blood parameters and behaviour. The quantities of activated astrocytes and glial cells were determined by postmortem immunohistochemical staining.

RESULTS. The administration of GPCs at a dose of 500×10^3 cells/mouse, which was selected using literature data, induced an increase in the plasma levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. This could indicate cell damage and the development of inflammatory reactions. At doses reduced to one-third the initial GPC concentration or lower, the biochemical blood parameters of the treatment groups did not differ significantly from those of the control group. There were no significant differences in neuroinflammatory markers between the groups receiving GPCs at different doses, except for an increase in astrocyte activation at a dose of 150×10^3 cells/mouse, which could potentially indicate inflammatory processes in the brain. The study detected no pathological changes in the brain or cell damage markers in the blood of mice after retrobulbar GPC injections of 15×10^3 or 50×10^3 cells/mouse.

CONCLUSIONS. The study results indicate that long-term therapy with GPCs is potentially safe for mice if the dose is optimal. The authors suggest using the optimal doses and the administration route established in this study for further research into the safety of intravenous administration of CBMPs for neurological conditions.

Keywords: stem cells; glial progenitor cells; retrobulbar administration; C57BL/6J mice; dose selection

For citation: Nebogatikov V.O., Salikhova D.I., Belousova E.V., Bronovitsky E.V., Orlova E.A., Lapshina M.A., Goldshtein D.V., Ustyugov A.A. Safety of a medicinal product based on human glial progenitor cells: A pilot study of retrobulbar administration in C57BL/6J mice. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):720–732. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650>

Funding. The study reported in this publication was conducted with the financial support of the Russian Science Foundation under Grant 23-15-00362 “Study of the mechanisms of therapeutic action of extracellular vesicles obtained from human glial progenitor cells in a model of Alzheimer’s disease”.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Быстрый прогресс, связанный с изучением биологии стволовых клеток, привел в последние годы к разработке новых методов лечения ряда нейродегенеративных заболеваний [1]. Использование стволовых клеток предполагает особенно привлекательную альтернативу терапии небольшими молекулами с одной мишенью, обеспечивая многогранный эффект лечения. Помимо прямой замены ткани, стволовые клетки могут образовывать синапсы, регулировать воспаление и обеспечивать устойчивое обогащение микроокружения посредством секреции паракринных факторов [2, 3]. В настоящее время инъекционные препараты стволовых клеток центральной нервной системы проходят клинические испытания с целью лечения инсульта и болезни Паркинсона [4, 5]. Доклинические исследования по трансплантации стволовых клеток в модели болезни Альцгеймера у мышей показали краткосрочный положительный эффект, который часто связан с доставкой нейротрофических факторов [6, 7]. Этот эффект подтвержден результатами ряда

текущих клинических исследований препаратов различных типов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при их внутривенном и внутрижелудочковом введении [8] пациентам с болезнью Альцгеймера.

К наиболее перспективным примерам экспериментальных исследований в области ксеногенной клеточной трансплантации можно отнести трансплантацию инсулин-продуцирующих клеток человека при моделировании диабета у мышей низкими дозами стрептозотоцина [9], нейральных стволовых клеток (НСК) человека при моделировании болезней Паркинсона [10], Хантингтона [11] и эпилепсии [12]. При этом во всех приведенных работах показана эффективность ксеногенной клеточной трансплантации. Таким образом, использование ксеногенного клеточного продукта — глиальных клеток-предшественников (ГКП), полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, может представлять собой новый терапевтический подход к лечению целого ряда неврологических заболеваний.

При всех преимуществах клеточной терапии, включающих возможность лечения ряда неврологических заболеваний, необходимо также учитывать риски, связанные с безопасностью этого подхода [13, 14]. Так, неконтролируемое размножение трансплантированных клеток может приводить к образованию опухолей [15, 16]. Этот риск особенно высок при использовании стволовых/прогениторных клеток, которые способны к бесконтрольному делению.

Ограничения к применению клеточной терапии могут быть связаны с вероятностью иммунного отторжения используемого препарата. При трансплантации ксеногенных клеток запускается иммунный ответ с активацией Т-лимфоцитов и продукцией антител, что приводит к элиминации трансплантата [17]. Использование клеток или клеточных продуктов в высоких концентрациях может вызывать воспалительные реакции, связанные как с непосредственным воздействием клеток на организм, так и с ответом на секретируемые этими клетками вещества.

Одним из потенциальных осложнений при клеточной терапии является эмболия [18] в результате внутриартериальной/внутривенной инъекции, что вызывает серьезные осложнения после лечения, в том числе инфаркт или инсульт [19]. Минимизировать риски, ассоциированные с эмболией сосудов, можно путем правильного подбора концентрации трансплантата.

Предположительно действие ГКП основано на секреции паракринных факторов, способных влиять на функциональное состояние головного мозга животных. Также сделано предположение, что при определенной концентрации исследуемый биомедицинский клеточный продукт будет безопасен при ретроорбитальном введении, но при этом будет оказывать модулирующие эффекты на клетки-мишени головного мозга.

Ретроорбитальное введение является более безопасным и эффективным, чем введение в хвостовую вену у мышей, особенно при многократном введении [20]. Поскольку основной эксперимент должен быть продолжительным, было выбрано именно ретроорбитальное введение.

Использование ГКП является одной из стратегий в клеточной терапии различных заболеваний, в том числе нейродегенеративных [21]. Однако из-за специфики получения ГКП и отсутствия экспериментальных данных необходимо подбирать безопасные концентрации клеток и дозы для последующей оценки их эффективности.

Целью данной работы является выбор дозы биомедицинского клеточного продукта, полученного на основе глиальных клеток-предшественников, и оценка его безопасности при ретроорбитальном введении мышам линии C57BL/6J.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение глиальных клеток-предшественников. Культура ГКП была получена ранее из ИПСК человека [22]. Для репрограммирования дермальных фибробластов и получения ИПСК использовали набор CTS CytoTune-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen). Для дифференцировки в нейральном направлении ИПСК культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением малых молекул SB431542 (Stemcell Technologies), 2 мкМ дорсоморфина (Stemcell Technologies), 200 нМ LDN193189 (Sigma-Aldrich). Полученную культуру нейральных стволовых клеток культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10 нг/мл фактора роста фибробластов (FGF-2) (ProSpec), 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (ProSpec) и 20 нг/мл цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) (PeproTech) до формирования клеток веретенообразной морфологии, соответствующей ГКП. В качестве подложки использовали матригель (Corning). Пересев культуры осуществляли каждые два-три дня, используя 0,05% раствор трипсина (Capricorn Scientific).

ГКП культивировали в среде следующего состава: DMEM/F12 («ПанЭко»), NEPEs 15 мМ («ПанЭко»), 1мМ глутамин («ПанЭко»), 1% смесь незаменимых аминокислот («ПанЭко»), 100 мг/л пенициллин-стрептомицин («ПанЭко»), 1% N2 добавка («ПанЭко»), 1% фетальная бычья сыворотка (Gibco), 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл CNTF. В качестве подложки использовали матригель (Corning). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторах при постоянной температуре 37 °C и 5% CO₂. При достижении конфлюентности 85–95% клетки снимали раствором 0,05% трипсин-ЭДТА (Capricorn Scientific), центрифугировали 5 мин при 1400 об./мин, осадок разводили культуральной средой в соотношении 1:2 и переносили в новые культуральные флаконы T175 (SPL Life Sciences). Перед введением в ретроорбитальный венозный синус мыши клеточный осадок разводили с использованием фосфатно-солевого буфера (phosphate-buffered saline, PBS) («ПанЭко») до получения растворов, содержащих в одной дозе (150 мл) 500×10³, 150×10³, 50×10³ и 15×10³ клеток.

Лабораторные животные. Мыши были предоставлены из биоресурсной коллекции Центра

коллективного пользования Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН). В двух экспериментах было использовано 40 животных из имеющегося стока, не вошедших в размножение половозрелых самцов линии C57BL/6J в возрасте 6 мес. и массой 30–33 г. Способ введения клеток в ретроорбитальный венозный синус животных был выбран как менее травматичный, чем интракраниальная трансплантация, и допускающий многократные инъекции.

Животные были рандомизированы на основании их массы согласно стандартной операционной процедуре ИФАВ РАН таким образом, чтобы средняя масса животных в группах не отличалась более чем на 10%. При этом учитывалась возможность содержания в клетках, поскольку половозрелых самцов из разных клеток не допускается саживать в одну, также исключалось одиночное содержание.

Все эксперименты с животными были проведены на базе Центра доклинических испытаний ИФАВ РАН в оборудованном виварии с двухкоридорной системой и разделением потоков. Световой цикл состоял из 12 ч дня и 12 ч ночи. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (температура 19–25 °C, относительная влажность 30–70%). Использовали беспылевой подстил и корм торговой марки «Чара» с предварительным автоклавированием при 120 °C, позволяющим обеспечить отсутствие видоспецифичных патогенных микроорганизмов. Животных поили фильтрованной водопроводной водой, прошедшей обработку ультрафиолетовым излучением. Работы с животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215-2014¹ и ГОСТ 33216-2014². Каждую неделю перед введением ГКП проводили клинический осмотр и взвешивание животных.

Проведение исследований было одобрено на заседании локального биоэтического комитета ИФАВ РАН (протоколы заседаний № 80 от 28.07.2023; № 81 от 30.08.2023).

Протокол ретроорбитального введения глиальных клеток-предшественников мышам линии C57BL/6J. Для оценки безопасности введения ГКП мышам и подбора дозы для хронического эксперимента было проведено два пилотных эксперимента.

В первом эксперименте животным контрольной группы вводили ретроорбитально по 150 мкл

DPBS (фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко) (количество животных в группе $n=9$), а животным экспериментальной группы ($n=9$) — по 150 мкл ГКП, содержащего 500×10^3 клеток в одной дозе (кл./мышь). Инъекции проводили один раз в неделю в течение 2 мес. под общим изофлурановым наркозом.

Во втором эксперименте животные были разделены на четыре группы. В группе контроля ($n=5$) животным вводили ретроорбитально по 150 мкл DPBS. В трех экспериментальных группах ($n=5$ в каждой) животным вводили по 150 мкл ГКП, содержащего 150×10^3 , 50×10^3 , 15×10^3 кл./мышь соответственно. Инъекции проводили один раз в неделю в течение 1 мес. под общим изофлурановым наркозом.

Протокол проведения теста «Открытое поле». В первом эксперименте после двухмесячного введения клеток был проведен тест «Открытое поле» для оценки активности животных. Животных помещали в отдельную комнату для акклиматизации за 1 ч до начала теста. Установка «Квадратное открытое поле» представляет собой усеченный куб с размером сторон 40 см, в котором выделен центральный квадрат с размером сторон 20 см. Время теста для одного животного составляло 5 мин при ярком освещении (250 лк).

Забор биологического материала у животных. По окончании эксперимента у 5 животных из каждой группы прижизненно была взята кровь из подъязычной вены в объеме 150–200 мкл. Из массива данных для статистической обработки были исключены пробы крови с гемолизом.

Головной мозг животного после эвтаназии и некропсии был последовательно зафиксирован в 10% растворе формалина (Labiko) (24 ч), 30% растворе сахарозы (АО «ЛенРеактив») (24 ч), растворе (1:1) сахарозы с Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) (24 ч) и хранился при +4 °C для последующего проведения иммуногистохимического исследования.

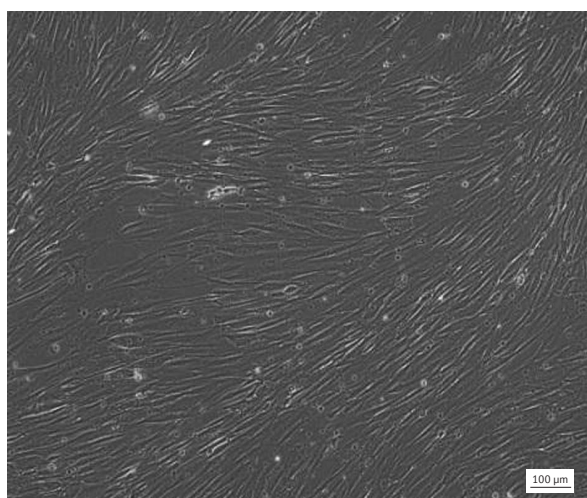
Иммуногистохимическое исследование коры головного мозга мышей. Образцы головного мозга мышей покрывали реагентом Tissue-Tek O.C.T. Compound. Подготовку сагиттальных срезов толщиной 7 мкм выполняли на криотоме Leica CM1950 (Leica Biosystems). Готовые срезы переносили на предметные стекла Superfrost Plus

¹ ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.

² ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

(Thermo Fisher Scientific) и хранили при +4 °C. Демаскировку образцов проводили в 10-кратном цитратном буфере (Sigma-Aldrich, кат. № C9999) на водяной бане. Подготовленные образцы инкубировали в PBS с добавлением 1% раствора бычьего сывороточного альбумина («ПанЭко»), 0,05% Triton X-100 («ПанЭко») в течение 1 ч, а затем обрабатывали первичными антителами к маркеру астроцитов — глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) — 1:200 ab72606 (Abcam) и к микроглие — адаптеру 1, связывающему ионизированный кальций (IBA1) — 1:200 ab178847 (Abcam) и инкубировали ночь при +4 °C. Затем стекла отмывали от первичных антител и инкубировали с перекрестно-адсорбированными вторичными антителами. Для окраски образцов в первом эксперименте использовали вторичные антитела в разведении 1:1000 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific); во втором эксперименте с разными дозами ГКП использовали вторичные антитела в разведении 1:600 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488 (A-11008, Thermo Fisher Scientific) и 1:600 Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor™ 555 (A-21422, Thermo Fisher Scientific). Окраску проводили в течение 2 ч в темноте. Затем стекла повторно отмывали, срезы инкубировали с раствором DAPI (Sigma-Aldrich, кат. № D9542) в PBS (разведение 1:1000) для контрастирования ядер. Заключение срезов под покровные стекла проводили с помощью среды Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

Изображения были получены на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica Microsystems),



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Морфология глиальных клеток-предшественников. Световая микроскопия

Fig. 1. Morphology of glial progenitor cells. Light microscopy

для их обработки использовали программу ImageJ. Было подсчитано общее количество иммунопозитивных клеток в случайно выбранных полях зрения в пределах среза мозга площадью 1 мм² для каждого образца.

Статистический анализ данных был проведен в программах SigmaPlot 15.0 и GraphPad Prism 7. Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро–Уилка. В первом эксперименте в случае, когда распределение данных отличалось от нормального в тесте «Открытое поле», при оценке результатов биохимического и иммуногистохимического анализа был применен критерий Манна–Уитни, при прохождении теста на нормальность распределения использовали *t*-критерий Стьюдента.

Во втором эксперименте в случае отличия распределения данных биохимического анализа крови и иммуногистохимического исследования от нормального был применен ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks) с последующей обработкой тестом Данна, при нормальном распределении — однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика глиальных клеток-предшественников. ГКП были получены ранее из ИПСК человека путем их поэтапной дифференцировки и имели веретенообразную морфологию (рис. 1), согласно методике, указанной в X. Wei и соавт. [23].

Тест «Открытое поле». В эксперименте с высокой дозой клеток — 500×10³ кл./мышь, проводили тест «Открытое поле» для оценки активности животных. В тесте оценивали общее пройденное животным расстояние, среднюю скорость движения, время, проведенное в периферической и центральной зонах. В течение 5 мин теста фиксировали поведенческие паттерны: вертикальные подъемы тела с опорой и без опоры, частоту аутогруминга, частоту дефекации. Между контрольной и экспериментальной группами значимых различий выявлено не было (рис. 2, 3). Введение ГКП не повлияло на активность и поведение животных.

Поскольку в первом эксперименте даже при введении ГКП в высокой дозе клеток различий в поведении животных в тесте «Открытое поле» не обнаружено, во втором эксперименте этот тест не проводили.

Оценка уровня биохимических маркеров воспаления в крови мышей. По окончании обоих экспериментов проводили биохимический анализ венозной крови животных в каждой группе (*n*=5) и оценивали маркеры повреждения клеток.

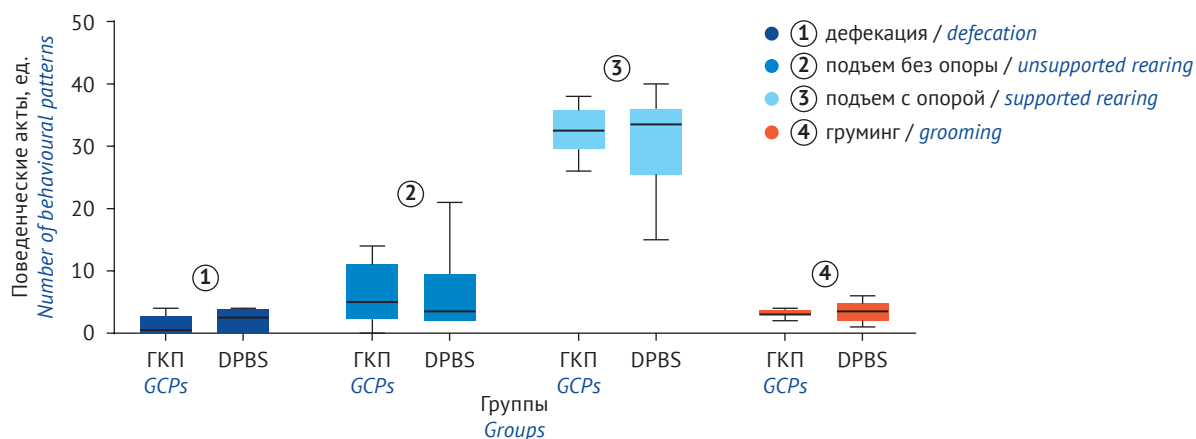


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Количество поведенческих паттернов животных при введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь. ГКП – глиальные клетки-предшественники, DPBS – фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко. Данные проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы и 25–75-го квартилей

Fig. 2. Behavioural patterns of animals injected with GCPs at a concentration of 500×10^3 cells/mouse. GCPs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline. The data were analysed using the Mann-Whitney test and presented as the median and 25–75 quartiles

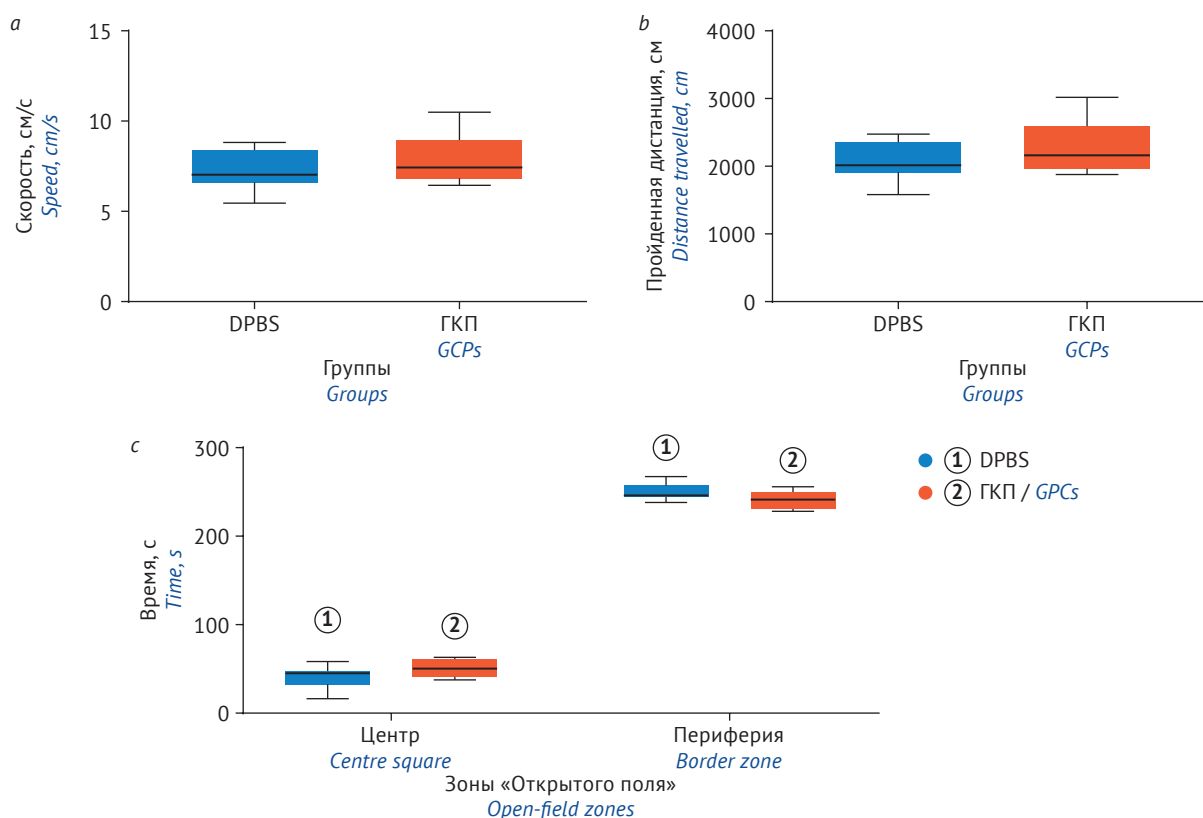


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Параметры активности животных при введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь: а – скорость движения, б – пройденная дистанция, с – время активности. ГКП – глиальные клетки-предшественники, DPBS – фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко. Данные проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы и 25–75-го квартилей

Fig. 3. Parameters of animal activity after administration of GPCs at a concentration of 500×10^3 cells/mouse: a, speed of movement; b, distance traveled; c, time of activity. GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline. The data were analysed using the Mann-Whitney test and presented as the median and 25–75 quartiles

Для анализа были выбраны следующие показатели: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), общий билирубин.

При ретроорбитальном введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь наблюдали статистически значимое увеличение концентрации АСТ, АСТ/АЛТ, ЛДГ и общего билирубина. Повышение уровней данных ферментов в крови свидетельствует о различных состояниях, связанных с повреждением клеток и тканей органов животных, что может указывать на их иммунные реакции при ксенотрансплантации, вызванные инфильтрацией клеток в печень или другие паренхиматозные органы (табл. 1).

Введение животным ГКП в более низких дозах 15×10^3 , 50×10^3 и 150×10^3 кл./мышь не приводило к повышению в крови концентрации маркеров повреждения клеток, что свидетельствует

о возможном использовании ГКП в данных дозах для терапии заболеваний при введении в ретроорбитальный синус животных (табл. 2).

Иммуногистохимическое исследование коры головного мозга. Для оценки нейровоспаления у животных после введения ГКП проводили количественную оценку активированных астроцитов и микроглии в головном мозге. При введении ГКП в дозе 500×10^3 кл./мышь медианное значение количества GFAP-позитивных клеток в коре головного мозга мышей (М) составило 276 кл./мм² ($n=9$) и было достоверно выше, чем в группе контроля ($M=226$ кл./мм², $n=16$) при сравнении групп критерием Манна-Уитни ($p=0,0235$). Количество GFAP-позитивных астроцитов коры головного мозга мышей после иммуногистохимического окрашивания представлено на рисунке 4, опубликованном на сайте журнала³.

Во втором эксперименте при оценке нейровоспаления у животных после введения ГКП

Таблица 1. Биохимические показатели крови мышей после введения высоких доз глиальных клеток-предшественников

Table 1. Biochemical blood parameters of mice after glial progenitor cells administration at high doses

Название группы Group	Номер животного Animal	Результаты анализа крови Blood test findings					
		АЛТ, Ед/л ALT, U/L	АСТ, Ед/л AST, U/L	ЛДГ, Ед/л LDH, U/L	ГГТ, Ед/л GGT, U/L	Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, μmol/L	АСТ/АЛТ AST/ALT
ГКП 500×10^3 клеток GPCs, 500×10^3 cells	1	55	164	1306	<1	6,2	3
	2	56	159	2865	<1	10,8	2,8
	3	38	91	979	<1	5	2,4
	4	30	89	891	<1	5,3	3
	5	88	363	1561	<1	10,5	4,1
	среднее mean	53,4	173,2**	1520,4**	<1	7,56*	3,06*
Контроль (DPBS) Control (DPBS)	1	47	53	289	<1	2,8	1,1
	2	24	39	213	<1	3	1,6
	3	28	39	201	<1	3,1	1,4
	4	28	77	215	<1	2,7	2,8
	5	22	41	186	<1	2,7	1,9
	среднее mean	29,8	49,8	220,8	<1	2,86	1,76

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ГКП – глиальные клетки-предшественники, DPBS – фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко, АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза.

* Уровень значимости – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).

** Уровень значимости – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни).

Note. GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

* The significance of differences from the control group was $p < 0.05$ (Student t-test).

** The significance of differences from the control group was $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4>

Таблица 2. Биохимические показатели крови мышей после введения низких доз глиальных клеток-предшественников
Table 2. Biochemical blood parameters of mice after glial progenitor cells administration at low doses

Название группы <i>Group</i>	Номер животного <i>Animal</i>	Результаты анализа крови <i>Blood test findings</i>					
		АЛТ, Ед/л <i>ALT, U/L</i>	АСТ, Ед/л <i>AST, U/L</i>	ЛДГ, Ед/л <i>LDH, U/L</i>	ГГТ, Ед/л <i>GGT, U/L</i>	Билирубин общий, мкмоль/л <i>Total bilirubin, μmol/L</i>	АСТ/АЛТ <i>AST/ALT</i>
ГКП 150×10 ³ клеток <i>GPCs, 150×10³ cells</i>	1	26	83	767	0	4,8	3,2
	2	20	43	296	0	3,2	2,1
	3	26	119	883	0	4,9	4,6
	4	26	120	542	0	3,1	4,6
	5	26	85	279	0	2,5	3,3
	среднее <i>mean</i>	24,8	90	553,4	0	3,7	3,56
ГКП 50×10 ³ клеток <i>GPCs, 50×10³ cells</i>	1	26	95	399	0	2,8	3,7
	2	23	91	542	0	2,6	3,9
	3	52	67	351	0	2,8	1,3
	4	34	96	740	0	4,2	2,8
	5	23	59	314	0	3,1	2,5
	среднее <i>mean</i>	31,6	81,6	469,2	0	3,1	2,84
ГКП 15×10 ³ клеток <i>GPCs, 15×10³ cells</i>	1	29	49	375	0	3,1	1,7
	2	31	86	718	0	3,4	2,7
	3	42	64	528	0	3,1	1,5
	5	86	131	673	0	2,6	1,5
	среднее <i>mean</i>	47	82,5	573,5	0	3,05	1,85
Контроль (DPBS) <i>Control (DPBS)</i>	1	31	72	565	0	3,9	2,4
	2	28	103	1045	0	4,5	3,6
	3	26	85	530	0	2,9	3,3
	среднее <i>mean</i>	28,3	86,67	713,3	0	3,77	3,1

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ГКП – глиальные клетки-предшественники, DPBS – фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко, АЛТ – аланин-аминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза.
Note. GPCs, glial progenitor cells; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

в низких дозах было отмечено, что среднее число GFAP-позитивных клеток в коре головного мозга мышей, получавших ГКП в дозе 150×10³ кл./мышь, было достоверно выше, чем в группе контроля, при уровне значимости (*p*) равном 0,046 (рис. 5). У животных, получавших ГКП в дозе 15×10³ и 50×10³ кл./мышь, не наблюдали статистически значимых различий с группой контроля. Количество GFAP-позитивных астроцитов коры головного мозга мышей после

иммуногистохимического окрашивания представлено на рисунке 6, опубликованном на сайте журнала⁴.

Количество IBA1-позитивных клеток в коре головного мозга мышей в группе животных, получавших ГКП в дозах 150×10³ и 50×10³ кл./мышь, было в среднем выше, чем у животных, которым вводили препарат в дозе 15×10³ кл./мышь, однако различий с группой контроля (введение DPBS) не отмечено (рис. 7). Количество

⁴ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6>

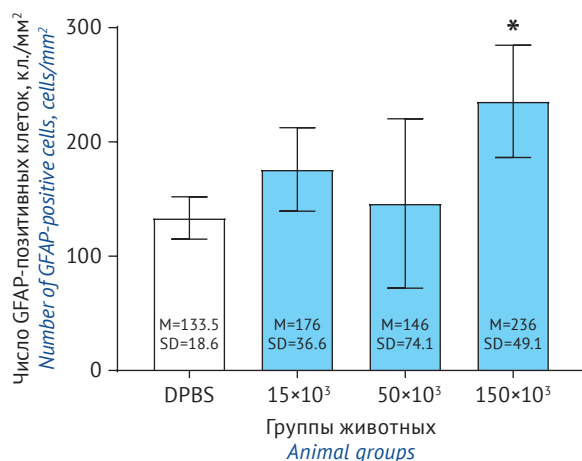


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным /
The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Результаты однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений числа GFAP-позитивных клеток коры головного мозга мышей в группах животных, получавших 150×10³, 50×10³, 15×10³ глиальных клеток-предшественников или фосфатно-солевой буфер в среде Дульбекко (DPBS). M – среднее число GFAP-позитивных клеток, SD – стандартное отклонение, GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок. * Уровень значимости p<0.05

Fig. 5. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for the number of GFAP-positive cells in the cerebral cortex of mice after administration of glial progenitor cells at doses of 150×10³, 50×10³, or 15×10³ cells/mouse or Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). M, mean number of GFAP-positive cells; SD, standard deviation; GFAP, glial fibrillary acidic protein. * The significance level was p<0.05

IBA1-позитивной микроглии коры головного мозга мышей после иммуногистохимического окрашивания представлено на рисунке 8, опубликованном на сайте журнала⁵.

Наиболее изученными клеточными трансплантатами для терапии различных неврологических заболеваний являются препараты на основе МСК и НСК человека [22, 24]. Показано, что МСК обладают иммуносупрессорными свойствами и как при ксенотрансплантации, так и аллотрансплантации не вызывают значимых иммунологических реакций. Однако их длительное введение в организм все еще недостаточно изучено [25]. Внутривенное введение аллогенных МСК (10×10⁶ кл./кг) крысам не приводило к значимым изменениям биохимических показателей через 2 недели после введения, однако вызывало воспаление легких [26]. В другом исследовании изучали безопасность двукратного внутривенного введения МСК, полученных из пуповины человека, крысам в дозах с различным количеством клеток (от 3,0×10⁵ до 1,5×10⁷ кл./кг, что примерно соответствует 9×10³–4×10⁶ кл./мышь), при этом не было показано ни острой, ни дол-

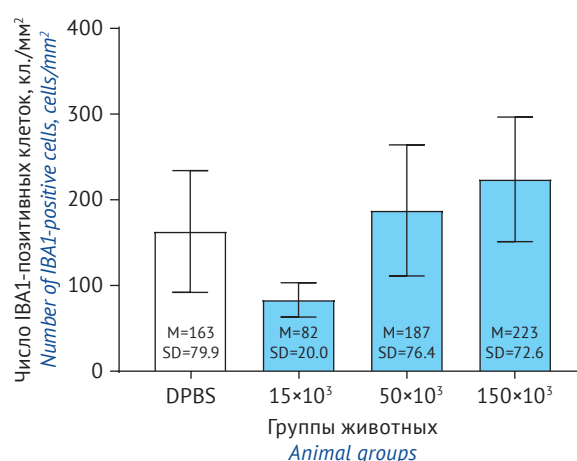


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным /
The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Результаты однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений числа IBA1-клеток коры головного мозга мышей в группах животных, получавших 150×10³, 50×10³, 15×10³ глиальных клеток-предшественников или фосфатно-солевой буфер (DPBS). M – среднее число IBA1-позитивных клеток, SD – стандартное отклонение, IBA1 – адаптер 1, связывающий ионизированный кальций

Fig. 7. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test for the number of IBA1-positive cells in the cerebral cortex of mice after administration of glial progenitor cells at doses of 150×10³, 50×10³, or 15×10³ cells/mouse or Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). M, mean number of IBA1-positive cells; SD, standard deviation; IBA1, ionised calcium-binding adaptor molecule 1

госрочной токсичности клеток [27]. Длительное (11 мес.) введение НСК человека крысам не приводило к снижению жизнеспособности животных или к видимым негативным последствиям, однако детальное изучение безопасности авторы не проводили [28]. Кроме того, было показано, что интраназальное введение аллогенных НСК детям с церебральным параличом в течение 3 мес. не вызывало значительных побочных эффектов такой терапии и в целом оказалось безопасным для пациентов [29].

Данные по изучению влияния долгосрочного введения ГКП при аллогенной или ксенотрансплантации в литературе отсутствуют. Однако известны примеры исследований, направленных на изучение терапевтических свойств ГКП при различных неврологических заболеваниях и свидетельствующих об отсутствии значимых побочных эффектов по крайней мере при однократном применении глиальных клеток [30].

В нашем исследовании введение сниженных доз (50×10³ и 15×10³ кл./мышь) ксенотрансплантатов не влияло на изменение биохимических

⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8>

показателей крови животных в отличие от более высоких доз. Влияния ГКП на поведение животных выявлено не было, однако такое влияние вполне может быть незаметно при малой использованной выборке. При этом было обнаружено, что введение ГКП в дозе 150×10^3 кл./мышь оказывало влияние на активацию глии головного мозга животных, что может быть связано с особенностями метаболизма введенных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование по выбору дозы биомедицинского клеточного продукта на основе глиальных клеток-предшественников (ГКП), полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при многократном внутривенном введении в ретроорбитальный венозный синус мышей. Полученные результаты могут быть использованы при инъекциях стволовых/прогениторных клеток для минимизации осложнений у животных в доклинических исследованиях и создания основы для безопасного применения клеточной терапии в клинической практике.

Изучен профиль безопасности длительного (30 и 60 сут) ретроорбитального введения ГКП как потенциального препарата для терапии неврологических заболеваний. Показано, что продолжительное многократное введение клеток в синус мышей в концентрации 500×10^3 кл./мышь приводило к повышению уровня ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ и общего билирубина в крови животных, что может быть связано с развитием воспалительной реакции из-за накопления чужеродных клеток в таких васкуляризованных органах, как печень и легкие. При этом в головном мозге не наблюдали изменения количества астроцитарных клеток (GFAP+). Введение сниженных доз ГКП (50×10^3 и 15×10^3 кл./мышь) не вызывало изменения уровней маркеров,

ассоциированных с повреждением клеток (АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ), а также общего билирубина по сравнению с аналогичными параметрами в группе контроля. При изучении воспалительных процессов в головном мозге было обнаружено увеличение числа активированных астроцитов (GFAP+) после введения ГКП в дозе 150×10^3 кл./мышь, в то время как количество активированной микроглии (IBA1+) не отличалось от контрольного значения во всех группах.

Настоящее исследование является пилотным, поскольку данные о безопасности длительного ретроорбитального введения ГКП получены впервые. На основании приведенных в этой работе результатов можно сделать вывод, что применение стволовых клеток в дозах, не превышающих 50×10^3 кл./мышь, при выбранном способе введения не вызывает воспалительных реакций в головном мозге животных (низкие уровни GFAP и IBA1) и не изменяет биохимических показателей крови (АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ, общего билирубина), что подтверждает безопасность их введения в течение продолжительного времени. Введение клеток в дозах 150×10^3 кл./мышь не вызывает изменения показателей крови животных, но влияет на состояние астроцитов и глии головного мозга. Возможно, в этом и заключается их воздействие на организм.

Полученные результаты свидетельствуют о важности подбора оптимальной дозы ГКП для проведения клеточной терапии, а также о потенциальной безопасности длительной терапии ГКП при соблюдении оптимальных условий дозирования. Необходимы дополнительные доклинические исследования с целью определения терапевтической эффективности установленных доз препарата, а также для разработки оптимального протокола клеточной терапии с использованием ГКП перед клиническими испытаниями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Czerska-Heryć E, Pękała M, Serwin N, Glizniewicz M, Grygorowicz B, Michalczyk A, et al. The use of stem cells as a potential treatment method for selected neurodegenerative diseases: review. *Cell Mol Neurobiol*. 2023;43(6):2643–73. <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01344-6>
2. Cherkashova EA, Burunova VV, Bukharova TB, Namestnikova DD, Gubskii IL, Salikhova DI, et al. Comparative analysis of the effects of intravenous administration of placental mesenchymal stromal cells and neural progenitor cells derived from induced pluripotent cells on the course of acute ischemic stroke in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2019;166(4):558–66. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04392-5>
3. Наместникова ДД, Губский ИЛ, Салихова ДИ, Леонов ГЕ, Сухинич КК, Мельников ПА и др. Терапевтическая эффективность внутриартериального введения нейральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019;21(1):153–64.
4. Namestnikova DD, Gubskiy IL, Salikhova DI, Leonov GE, Sukhinich KK, Melnikov PA, et al. Therapeutic efficacy of intra-arterial administration of induced pluripotent stem cells-derived neural progenitor cells in acute experimental ischemic stroke in rats. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2019;21(1):153–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-153-164>
4. Kalladka D, Sinden J, Pollock K, Haig C, McLean J, Smith W, et al. Human neural stem cells in patients with chronic

- ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study. *Lancet*. 2016;388(10046):787–96.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30513-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30513-x)
5. Garitaonandia I, Gonzalez R, Christiansen-Weber T, Abramihina T, Poustovoitov M, Noskov A, et al. Neural stem cell tumorigenicity and biodistribution assessment for phase I clinical trial in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2016;6:34478.
<https://doi.org/10.1038/srep34478>
 6. Neves AF, Camargo C, Premer C, Hare JM, Baumel BS, Pinto M. Intravenous administration of mesenchymal stem cells reduces Tau phosphorylation and inflammation in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2021;341:113706.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113706>
 7. Wang Z, Peng W, Zhang C, Sheng C, Huang W, Wang Y, Fan R. Effects of stem cell transplantation on cognitive decline in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:12134.
<https://doi.org/10.1038/srep12134>
 8. Zhang Y, Ren Z, Zou C, Wang S, Luo B, Li F, et al. Insulin-producing cells from human pancreatic islet-derived progenitor cells following transplantation in mice. *Cell Biol Int*. 2011;35(5):483–90.
<https://doi.org/10.1042/cbi20100152>
 9. Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, et al. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2006;26(48):12497–511.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3719-06.2006>
 10. Ryu JK, Kim J, Cho SJ, Hatori K, Nagai A, Choi HB, et al. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):68–77.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.016>
 11. Lee H, Yun S, Kim IS, Lee IS, Shin JE, Park SC, et al. Human fetal brain-derived neural stem/progenitor cells grafted into the adult epileptic brain restrain seizures in rat models of temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2014;9(8):e104092.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104092>
 12. Karvelas N, Bennett S, Politis G, Kouris N-I, Kole C. Advances in stem cell therapy in Alzheimer's disease: a comprehensive clinical trial review. *Stem Cell Investig*. 2022;9:2.
<https://doi.org/10.21037/sci-2021-063>
 13. Tiwari S, Khan S, Kumar SV, Rajak R, Sultana A, Abjal Pasha S, et al. Efficacy and safety of neural stem cell therapy for spinal cord injury: a systematic literature review. *Therapie*. 2021;76(3):201–10.
<https://doi.org/10.1016/j.therap.2020.06.011>
 14. Wang Y, Yi H, Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):545.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02609-x>
 15. Wuputra K, Ku C-C, Wu D-C, Lin Y-C, Saito S, Yokoyama KK. Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):100.
<https://doi.org/10.1186/s13046-020-01584-0>
 16. Chapelin F, Khurana A, Moneeb M, Gray Hazard FK, Ray Chan CF, Nejadnik H, et al. Tumor formation of adult stem cell transplants in rodent arthritic joints. *Mol Imaging Biol*. 2019;21(1):95–104.
<https://doi.org/10.1007/s11307-018-1218-7>
 17. Zhou Q, Li T, Wang K, Zhang Q, Geng Z, Deng S, et al. Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing xenograft rejection. *Front Immunol*. 2022;13:928173.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.928173>
 18. Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, Bieback K, Ringden O, Volk H-D, et al. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol Med*. 2019;25(2):149–63.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.006>
 19. Boltze J, Jolkonen J. Safety evaluation of intra-arterial cell delivery in stroke patients – a framework for future trials. *Ann Transl Med*. 2019;7(Suppl 8):S271.
<https://doi.org/10.21037/atm.2019.12.07>
 20. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*. 2011;40(5):155–60.
<https://doi.org/10.1038%2FLaban0511-155>
 21. Белоусова ЕВ, Салихова ДИ, Небогатииков ВО, Устюгов АА, Гольдштейн ДВ. Терапия болезни Альцгеймера на основе стволовых клеток. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2024;(1):52–60.
Belousova EV, Salikhova DI, Nebogatikov VO, Ustyugov AA, Goldshtein DV. Stem cell-based therapy for Alzheimer's disease. *Laboratory Animals for Science*. 2024;(1):52–60 (In Russ.).
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-01-06>
 22. Salikhova D, Bukharova T, Cherkashova E, Namestnikova D, Leonov G, Nikitina M, et al. Therapeutic effects of hiPSC-derived glial and neuronal progenitor cells-conditioned medium in experimental ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4694.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094694>
 23. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):747–54.
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
 24. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(5):1525–45.
<https://doi.org/10.1007/s12015-022-10369-1>
 25. Podestà MA, Remuzzi G, Casiraghi F. Mesenchymal stromal cells for transplant tolerance. *Front Immunol*. 2019;10:1287.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01287>
 26. Chin S-P, Saffery NS, Then K-Y, Cheong S-K. Preclinical assessments of safety and tumorigenicity of very high doses of allogeneic human umbilical cord mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2024;60(3):307–19.
<https://doi.org/10.1007/s11626-024-00852-z>
 27. Xu J, Liu G, Wang X, Hu Y, Luo H, Ye L, et al. hUC-MSCs: evaluation of acute and long-term routine toxicity testing in mice and rats. *Cytotechnology*. 2022;74(1):17–29.
<https://doi.org/10.1007/s10616-021-00502-2>
 28. Kyung J, Kim D, Shin K, Park D, Hong S-C, Kim TM, et al. Repeated intravenous administration of human neural stem cells producing choline acetyltransferase exerts anti-aging effects in male F344 rats. *Cells*. 2023;12(23):2711.
<https://doi.org/10.3390/cells12232711>
 29. Lv Z, Li Y, Wang Y, Cong F, Li X, Cui W, et al. Safety and efficacy outcomes after intranasal administration of neural stem cells in cerebral palsy: a randomized phase 1/2 controlled trial. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):23.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-03234-y>
 30. Rogujski P, Lukomska B, Janowski M, Stanaszek L. Glial-restricted progenitor cells: a cure for diseased brain? *Biol Res*. 2024;57(1):8.
<https://doi.org/10.1186/s40659-024-00486-1>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены рисунки 4, 6 и 8.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: В.О. Небогатиков — планирование исследования, выполнение эксперимента, проведение сравнительного анализа полученных результатов; сбор данных литературы; Д.И. Салихова — выполнение эксперимента, анализ полученных данных, систематизация и оформление результатов исследования, редактирование текста рукописи, сбор данных литературы; Е.В. Белоусова — работа с клеточными линиями, проведение вычислений, выполнение сравнительного анализа полученных результатов, работа с графическим материалом; Е.В. Брновицкий — работа с животными, статистическая обработка данных, редактирование текста рукописи; Е.А. Орлова — работа с лабораторными животными, редактирование текста рукописи; М.А. Лапшина — работа с клеточными линиями, редактирование текста рукописи; Д.В. Гольдштейн, А.А. Устюгов — основная идея исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования было одобрено на заседании локального биоэтического комитета ИФАВ РАН (протоколы заседаний № 80 от 28.07.2023; № 81 от 30.08.2023).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ИФАВ РАН за возможность использовать животных из биоресурсной коллекции с привлечением аппаратной базы Центра (Госзадание № FFSG-2024-0020).

Additional information. Figures 4, 6, and 8 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig6>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-650-fig8>

Authors' contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Vladimir O. Nebogatikov designed the study, conducted the experiments and the comparative analysis of the results obtained, and collected literature data. Diana I. Salikhova conducted the experiments, analysed the data obtained, collated and presented the study results, edited the manuscript, and collected literature data. Ekaterina V. Belousova worked with cell lines, performed calculations, conducted the comparative analysis of the results obtained, and worked with the graphical material. Evgeny V. Bronovitsky worked with animals, performed statistical processing of data, and edited the manuscript. Ekaterina A. Orlova worked with animals and edited the manuscript. Mariya A. Lapshina worked with cell lines and edited the manuscript. Dmitry V. Goldshtein and Aleksey A. Ustyugov conceived the main idea of the study, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the Local Bioethics Committee of the Institute of Physiologically Active Compounds (IPAC) of the Russian Academy of Sciences (RAS) (minutes of meetings No. 80 of 28.07.2023 and No. 81 of 30.08.2023).

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Centre for Collective Use (IPAC, RAS) for the opportunity to use animals from the Bioresource Collection using the equipment of the Centre (State Assignment No. FFSG-2024-0020).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Небогатиков Владимир Олегович, канд. биол. наук / Vladimir O. Nebogatikov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2454-9255>

Салихова Диана Ирековна, канд. биол. наук / Diana I. Salikhova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7842-7635>

Белоусова Екатерина Владимировна / Ekaterina V. Belousova

Брновицкий Евгений Вадимович / Evgeny V. Bronovitsky

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8321-0729>

Орлова Екатерина Андреевна / Ekaterina A. Orlova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5415-1523>

Лапшина Мария Александровна, канд. биол. наук / Mariya A. Lapshina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5111-5241>

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д-р биол. наук, профессор / Dmitry V. Goldshtein, Dr. Sci. (Biol.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>

Устюгов Алексей Анатольевич, д-р биол. наук / Aleksey A. Ustyugov, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1977-4797>

Поступила 16.04.2024

После доработки 23.07.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Online first 25.10.2024

Received 16 April 2024

Revised 23 July 2024

Accepted 21 August 2024

Online first 25 October 2024

БЛАГОДАРНОСТИ РЕЦЕНЗЕНТАМ
THANK YOU TO ALL OUR REVIEWERS

Выражаем искреннюю признательность рецензентам, которые оказали неоценимую помощь при подготовке выпусков журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». В 2024 г. объективную оценку и рекомендации авторам поступивших в редакцию рукописей дали:

Агацарская Я.В. (Санкт-Петербург)	Макаревич П.И. (Москва)
Акулин И.М. (Санкт-Петербург)	Макаров В.А. (Москва)
Аладышева Ж.И. (Москва)	Мелихов О.Г. (Москва)
Алпатова Н.А. (Москва)	Мельникова Е.В. (Москва)
Ампилогова И.Н. (Санкт-Петербург)	Мизина П.Г. (Москва)
Антонова Н.П. (Москва)	Мирович В.М. (Иркутск)
Асецкая И.Л. (Москва)	Михайлова Н.И. (Витебск, Беларусь)
Бакулин И.Г. (Санкт-Петербург)	Молодова Т.А. (Москва)
Басевич А.В. (Санкт-Петербург)	Новокрещенова И.Г. (Саратов)
Безбородова О.А. (Москва)	Овод А.И. (Курск)
Белоус С.С. (Москва)	Пахомова Д.К. (Караганда, Казахстан)
Беспалов А.В. (Краснодар)	Попов В.С. (Москва)
Бондарева И.Б. (Москва)	Потанина О.Г. (Москва)
Васильева А.В. (Санкт-Петербург)	Прокофьева Т.В. (Москва)
Величко В.В. (Новосибирск)	Прунтова О.В. (Владимир)
Вербицкая Е.В. (Санкт-Петербург)	Пятигорская Н.В. (Москва)
Веселовский А.В. (Москва)	Рабцевич Е.С. (Томск)
Гаврилин М.В. (Санкт-Петербург)	Раменская Г.В. (Москва)
Гиба И.С. (Сочи)	Ремезова И.П. (Пятигорск)
Гончаров А.Е. (Минск, Беларусь)	Решетько О.В. (Саратов)
Горностаи Т.Г. (Иркутск)	Родионова Г.М. (Москва)
Горяинов С.В. (Москва)	Рождественский Д.А. (Москва)
Гравель И.В. (Москва)	Романов Б.К. (Москва)
Гудкова А.А. (Воронеж)	Рязанова Т.К. (Самара)
Гурина Н.С. (Минск, Беларусь)	Савинова Т.А. (Москва)
Джупарова И.А. (Новосибирск)	Сайбель О.Л. (Москва)
Дул В.Н. (Москва)	Саканян Е.И. (Москва)
Дурнев А.Д. (Москва)	Самылина И.А. (Москва)
Дьякова Н.А. (Воронеж)	Сизиков А.Э. (Новосибирск)
Евдокимова О.В. (Москва)	Смехова И.Е. (Санкт-Петербург)
Егорова С.Н. (Казань)	Смирнова Л.А. (Волгоград)
Елизарова Т.Е. (Москва)	Смышляев А.В. (Москва)
Еремина Н.В. (Москва)	Ставрианиди А.Н. (Москва)
Жохова Е.В. (Санкт-Петербург)	Сульдин А.С. (Пермь)
Журавлева М.В. (Москва)	Сысоева М.А. (Казань)
Зайцева Е.Н. (Самара)	Сычев Д.А. (Москва)
Зольникова О.Ю. (Москва)	Сюбаев Р.Д. (Москва)
Ивкин Д.Ю. (Санкт-Петербург)	Титова А.В. (Москва)
Калитин К.Ю. (Волгоград)	Тихонова Т.В. (Москва)
Канатьева А.Ю. (Москва)	Торопова Я.Г. (Санкт-Петербург)
Карабинцева Н.О. (Новосибирск)	Тринеева О.В. (Воронеж)
Караваева Т.А. (Санкт-Петербург)	Фатхудинов Т.Х. (Москва)
Карпенко Ю.Н. (Пермь)	Ходько С.В. (Санкт-Петербург)
Ковальская Г.Н. (Иркутск)	Шаленкова Е.В. (Нижний Новгород)
Косман В.М. (Санкт-Петербург)	Шевченко А.М. (Пятигорск)
Кречетов А.О. (Вольгинский, Владимирская обл.)	Шейченко О.П. (Москва)
Криштанова Н.А. (Санкт-Петербург)	Шефер Е.П. (Москва)
Крышень К.Л. (Санкт-Петербург)	Шнайдер Н.А. (Санкт-Петербург)
Кузьмина Н.Е. (Москва)	Шубникова Е.В. (Москва)
Кулешова С.И. (Москва)	Шугуров М.В. (Саратов)
Левашова О.В. (Курск)	Щербинин М.Б. (Санкт-Петербург)
Лилеева Е.Г. (Ярославль)	Юрочкин Д.С. (Санкт-Петербург)
Людуп А.В. (Москва)	Ягудина Р.И. (Москва)

**Регуляторные исследования
и экспертиза лекарственных средств**

