

# РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN 2305-2066 (Print)  
ISSN 2658-5049 (Online)

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

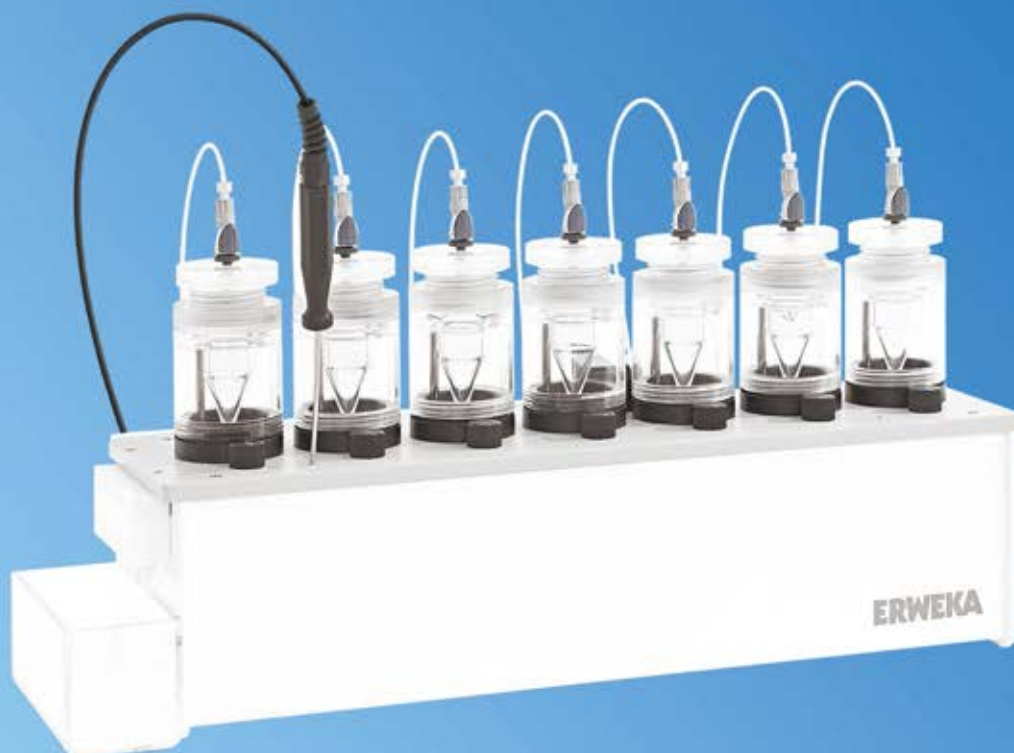
СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



**ERWEKA**  
www.erweka.com

## Тестер растворения «Проточная ячейка» ERWEKA DFZ II



ООО «ЭРВЕКА»

115114, Москва, ул. Летниковская,  
д. 16, офис 103

Тел.: +7 499 110 90 60  
E-mail: sales@erweka.ru



ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2020)

#### Основными видами деятельности центра являются:

- биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы клинических исследований) химико-фармацевтических лекарственных средств, нано-препаратов и препаратов-биоаналогов;
- сравнительный тест кинетики растворения (моделирование высвобождения лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте в условиях *in vitro*);
- статистическая обработка результатов биоаналитических исследований и описание фармакокинетики препаратов;
- разработка, валидация и апробация методик анализа лекарственных средств



#### Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- проведение СТКР (сравнительного теста кинетики растворения)



ООО «ЦФА»  
117246, город Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел.: +7 (499) 281-81-11  
www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), № Сертификата 19.1198.026 от 18 июля 2019 г. Сертификат действителен до 3 августа 2022 г.; ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации), № Сертификата 18.1497.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 18.1498.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г. Область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТКР (сравнительного теста кинетики растворения), определение противоязвенных антител к биологическим лекарственным препаратам.

**НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ**

**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



При поддержке  
ФБУ «ГИЛС и НП»



**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Научно-производственный журнал

**2020. Том 9, № 3**

**RAZRABOTKA I REGISTRACIÂ LEKARSTVENNYH SREDSTV**

**DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION**

Research & production journal

**2020. Volume 9, No. 3**

## Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного одобрения. **Первый** раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств, **второй** – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования – до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов. **Третий** раздел описывает аналитические методики контроля качества; **четвертый** раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований; в **пятом** разделе рассматриваются вопросы валидации методики, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

## Редакционная коллегия

### Главный редактор

Шохин И. Е., д.фарм.н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Москва, Россия

## Редакционная коллегия

Аммур Ю. И., к.биол.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Белоусов М. В., профессор, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Боян Салия, Assist. Professor, PhD, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Белград, Сербия

Василенко И. А., проф., д.х.н., профессор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Ваизова О. Е., доцент, д.м.н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Вартаньянц И. А., проф., к.ф.-м.н., профессор Deutsches Elektronen-Synchrotron, Гамбург, Германия

Гузев К. С., д.ф.н., уполномоченное лицо АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва, Россия

Гусаров Д. А., к.х.н., руководитель группы экспериментального биотехнологического производства Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Демина Н. Б., проф., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Емшанова С. В., д.фарм.н., начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Каленикова Е. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Комаров Т. Н., к.фарм.н., заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2, ООО «ЦФА», Москва, Россия

Кулинич Ю. И., к.фарм.н., эксперт 1 категории ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Макеев О. Г., проф., д.м.н., зав. кафедрой биологии и медицинской генетики УГМУ, Екатеринбург, Россия

Малашенко Е. А., к.фарм.н., ст. преп. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В., к.фарм.н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Мельников Е. С., к.фарм.н., старший научный сотрудник ЦКФ ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Миросниченко И. И., д.м.н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

Мустафин Р. И., к.фарм.н., директор Института фармации ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан

Оборотова Н. А., проф., д.фарм.м, НИМЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Попов В. В., проф., д.м.н., зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия

## Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal «Drug development & registration» (Razrabotka i registraciã lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal «Drug development & registration» (Razrabotka i registraciã lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization. The **first** section is devoted to the research and development of new medicines, the **second** one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development. The **third** section describes analytical quality control methods; the **fourth** section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies. The **fifth** section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

## Editorial board

### Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (ООО Center of Pharmaceutical Analytics/ООО «СРНА»), Moscow, Russia

## Editorial board

Yulia I. Ammour, Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow, Russia

Mikhail V. Belousov, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Boyan R. Calija, as. Prof., PhD (Serbia), University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Ivan A. Vasilenko, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Olga E. Vaizova, as. Prof., Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Ivan A. Vartanians, Prof., Cand. of Sci, Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

Konstantin S. Guzev, Retinoidy Company, Dr. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Dmitriy A. Gusarov, MIREA – Russian Technological University (RTU MIREA), Dr. of Sci. (Chem.), Moscow, Russia

Natalia B. Diomina, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Svetlana V. Emshanova, Dr. of Sci. (Pharm.), RUDN University, Moscow, Russia

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Timofey N. Komarov, Cand. of Sci. (Chem.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Julia I. Kulnich, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Oleg G. Makeev, Prof., Dr. of Sci. (Med.), The Central Research Laboratory of the Ural Medical University, Yekaterinburg, Russia

Evgeniya A. Malashenko, Cand. of Sci. Pharm., Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev, Cand. of Sci. (Pharm.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Igor I. Mirosnichenko, Dr. of Sci., Federal State Budget Scientific Institution «Scientific Center of Mental Health», Moscow, Russia

Rouslan I. Moustafine, Cand. of Sci. (Pharm.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan

Natalia A. Oborotova, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Vladimir V. Popov, Prof., Dr. of Sci. (Med.), Joint Stock Company «Russian Railways», Moscow, Russia

**Русинов В. Л.**, чл. корр. РАН, д.х.н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

**Скорик Ю. А.**, доц., к.х.н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Сливкин А. И.**, проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Смехова И. Е.**, профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

**Станишевский Я. М.**, д.х.н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

**Сукоян Г. В.**, д.б.н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Ивана Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

**Сысуев Б. Б.**, доц., д.фарм.н., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

**Ташлицкий В. Н.**, к.х.н., старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Тринева О. В.**, д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Хуторянский В. В.**, к.х.н., Prof., BSc MSc PhD MRSC, School of Pharmacy, University of Reading, Реддинг, Великобритания

**Чучалин В. С.**, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

**Эпштейн Н. А.**, к.х.н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

#### Учредители печатной версии

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

#### Учредители онлайн версии

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

#### Издатель

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)  
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

#### Директор журнала

Кульджанова Н. В.

#### Заведующий редакцией

Михайлова Н. С.

**Дата выхода в свет журнала: ноябрь 2012 г.**

**Журнал выходит с периодичностью 4 раза в год**

#### Адрес редакции

Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. Тел.: +7 (499) 281-81-11  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru) e-mail: [info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)

#### Отпечатано в типографии

ООО «МАКС ПРЕСС», Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103

**Журнал зарегистрирован в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ)**

#### Свидетельство о регистрации:

СМИ ЭЛ № ФС77-75437 от 01.04.2019 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

**Префикс DOI:** 10.33380/2305-2066

**Тираж** 999 экземпляров

#### Условия распространения материалов:

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

#### Свободная цена

**Vladimir L. Rusinov**, RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

**Yury A. Skorik**, Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds, Saint-Petersburg, Russia

**Aleksei I. Slivkin**, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Irina E. Smekhova**, Dr. of Sci. (Pharm.), Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

**Yaroslav M. Stanishevskiy**, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

**Galina V. Sukoyan**, Dr. of Sci. (Biol.) (Georgia), International Centre of Introduction of New Biomedical Technology, Tbilisi, Georgia

**Boris B. Sysuev**, as. Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

**Vadim N. Tashlitsky**, Cand. of Sci. (Chem.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Olga V. Trineeva**, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Vitaliy V. Khutoryanskiy**, Prof., Dr. of Sci. (Chem.) (UK), University of Reading, Reading, United Kingdom

**Vladimir S. Chuchalin**, Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

**Naum A. Epshtein**, Cand. of Sci. (Chem.), Irvin-2 Company, Moscow, Russia

#### Print version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
(Sechenov University)

Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Siberian State Medical University

Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

#### Online version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

#### Publisher

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

#### Journal director

Natalia V. Kuldjanova

#### Managing Editor

Nadezhda S. Mikhaylova

**Date of publication of the magazine: November 2012**

**The journal is published at intervals of 4 times a year**

#### Editorial office address

20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia. Tel.: +7 (499) 281-81-11  
[www.pharmjournal.ru](http://www.pharmjournal.ru) e-mail: [info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru)

#### Printing office

LLC «MAX PRESS», 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia

**Journal is registered in Russian index of scientific citation**

#### Registration certificate:

EL Media No. FS77-75437 dated 01.04.2019 issued by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technologies and Mass Communications

**DOI prefix:** 10.33380 / 2305-2066

**Circulation:** 999 copies

#### Content distribution terms:

Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License

#### Free Price

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

## Содержание

## Contents

<b>От редакции</b>	<b>6</b>	<b>Introduction</b>
<b>Практические рекомендации</b>	<b>9</b>	<b>Practical recommendations</b>
<b>Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»</b>		<b>«Research and development of new drug products» part</b>
<i>Е. В. Ферубко</i>	<b>15</b>	<i>Ekaterina V. Ferubko</i>
Многокомпонентные средства для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения		Multicomponent Agents for Prevention and Treatment of Digestive Diseases
<b>Раздел «Фармацевтическая технология»</b>		<b>«Pharmaceutical Technology» part</b>
<i>Б. Лугэнь, М. В. Дмитриева, О. Л. Орлова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл.), Д. О. Боков, О. И. Степанова, А. В. Беляцкая</i>	<b>21</b>	<i>Bu Lugen, Mariya V. Dmitrieva, Ol'ga L. Orlova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (jr.), Dmitrij O. Bokov, Ol'ga I. Stepanova, Anastasiya V. Belyackaya</i>
Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индокарбазола		Development of a Liposomal Dosage Form based on Hydrophobic Derivative of Indolocarbazole
<i>Т. А. Биткина, А. В. Басевич, В. М. Родин</i>	<b>28</b>	<i>Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich, Viktor M. Rodin</i>
Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии		Critical Points for the Production of Polymeric Microspheres Used in X-Ray Surgery
<i>А. В. Ситенкова (Буховец), А. Ю. Ситенков, Р. И. Мустафин</i>	<b>36</b>	<i>Aleksandra V. Bukhovets, Alexander Y. Sitenkov, Rouslan I. Moustafine</i>
Интерполимерные комплексы на основе Eudragit® EPO/Eudragit® S100 как перспективные носители		Interpolymer Complexes Based on Eudragit® EPO/Eudragit® S100 as Carriers for Oral Controlled Drug Delivery Systems
<i>Н. Н. Порфирьева, В. В. Хуторянский, Р. И. Мустафин</i>	<b>45</b>	<i>Natalia N. Porfiryeva, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Rouslan I. Moustafine</i>
Изучение высвобождения галоперидола из поликомплексных наночастиц на основе сополимеров Eudragit®		A Study of Haloperidol Release from Polycomplex Nanoparticles Based on Eudragit® Copolymers
<i>А. Н. Голубев, Т. Ш. Нгуен, В. В. Сорокин, И. Е. Каухова</i>	<b>51</b>	<i>Artyom N. Golubev, Thi S. Nguen, Vladislav V. Sorokin, Irina E. Kauhova</i>
Разработка таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением методов планирования эксперимента и инструментов QbD		Tablets Development Based on Clover Meadow Grass Phytosubstance Using Design of the Experiment Method and QdD Tools
<b>Раздел «Методы анализа лекарственных средств»</b>		<b>«Analytical Methods» part</b>
<i>О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, Е. Ф. Сафонова</i>	<b>59</b>	<i>Olga V. Trineeva, Aleksey I. Slivkin, Elena F. Safonova</i>
Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами		Determination of Nettle Leaves Extracts Antioxidant Activity by Various Methods
<i>О. В. Тринеева</i>	<b>67</b>	<i>Olga V. Trineeva</i>
Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье (обзор)		Methods and Prospects for Determination of Mycotoxins in Medicinal Herbal Raw Materials (Review)
<i>М. Г. Шульженко, И. А. Василенко, Б. И. Уграк, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев, Е. А. Малашенко</i>	<b>111</b>	<i>Marina G. Shulzhenko, Ivan A. Vasilenko, Bagdan I. Ugrak, Igor E. Shohin, Yuri V. Medvedev, Evgeniya A. Malashenko</i>
Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин»		Comparative Analysis of Dalargin Pharmaceutical Substance Identification Methods
<i>М. А. Джавахян, М. Г. Токарева, Ю. Э. Прожогина, Е. И. Каленикова</i>	<b>118</b>	<i>Marina A. Dzhavakhyan, Maria G. Tokareva, Yulia E. Prozhogina, Elena I. Kalenikova</i>
Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов		Pharmaceutical Development of «Sedoflav» Capsules, Standardization and Validation of Flavonoids Assay Methods
<i>Н. А. Эпштейн</i>	<b>129</b>	<i>Naum A. Epshtein</i>
Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор)		Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review)

- С. В. Горяинов, С. Эспарса, В. А. Ивлев, Д. И. Писарев, Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, О. О. Новиков, О. Г. Потанина, С. Лазар, А. В. Хромов, Н. Н. Бойко  
Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L.
- 137 Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Oleg O. Novikov, Olga G. Potanina, Simon Lazar, Arkidiy V. Khromov, Nikolay N. Boyko  
A Technology for Isolation and Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Biologically Active Components from *N. sativa* L. Seeds
- Г. В. Адамов, Е. С. Мельников, И. А. Лупанова, А. И. Радимич, О. Л. Сайбель  
Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.)
- 143 Grigorij V. Adamov, Evgenij S. Melnikov, Irina A. Lupanova, Andrej I. Radimich, Ol'ga L. Saybel  
Investigation of the Chemical Composition and Dopaminergic Activity of the Vitex Agnus-castus Fruits
- А. Е. Суханов, А. Н. Ставрианиди, Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк, О. В. Буюклинская  
Разработка методики количественного определения диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L.
- 150 Anton E. Sukhanov, Andrej N. Stavrianidi, Elena D. Kubasova, Aleksandra S. Panasyuk, Ol'ga V. Buyuklinskaya  
Method Development for Quantitative Determination of Diosgenin from the Seeds of Fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L.
- Раздел «Доклинические и клинические исследования»**
- «Preclinical and clinical study» part
- В. М. Косман, Н. М. Фаустова, И. Н. Уракова, М. Н. Карлина, В. Г. Макаров  
Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebahiensis*) как возможный биомаркер фармакокинетики
- 158 Vera M. Kosman, Natal'ya M. Faustova, Irina N. Urakova, Marina N. Karlina, Valerij G. Makarov  
Dipeptidylpeptidase IV Activity Ingibition after Oral Administration to Rabbits of *Strongylocentrotus Droebahiensis* Gonads Extract as Possible Biomarker of Pharmacokinetics
- О. Е. Клементьева, А. Б. Брускин, А. С. Лунёв, М. Г. Рахимов, К. А. Лунёва, Г. Е. Кодина  
Доклиническая оценка RGD-пептида, меченного <sup>68</sup>Ga, для обнаружения очагов злокачественного ангиогенеза
- 166 Olga E. Klementyeva, Alexander B. Bruskin, Aleksandr S. Lunev, Marat G. Rakhimov, Kristina A. Luneva, Galina E. Codina  
Preclinical Evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled RGD Peptide for Detection of Malignant Angiogenesis
- Раздел «Регуляторные вопросы»**
- «Regulatory Issues» part
- Н. В. Шинева, М. В. Гаврилин, Ю. А. Старчак, С. В. Макаров  
Метрологические требования к измерительному оборудованию (обзор)
- 173 Nadezhda V. Shineva, Mikhail V. Gavrilin, Yuliya A. Starchak, Sergey V. Makarov  
Metrological Requirements to Measuring Equipment (Review)
- Ю. А. Старчак, М. В. Гаврилин, Н. В. Шинева  
Трансфер аналитических методик (обзор)
- 182 Yuliya A. Starchak, Mikhail V. Gavrilin, Nadezhda V. Shineva  
Transfer of Analytical Procedures (Review)
- В. Н. Шестаков, Ю. В. Подпружников  
Анализ нового риск-ориентированного регуляторного подхода к классификации нарушений в сфере GMP (обзор)
- 189 Vladislav N. Shestakov, Yuri V. Podpruzhnikov  
Evaluation of New Risk-based Regulatory Approach to Classification of GMP Deficiencies (Review)
- Материалы конференций** 203 **Conference Proceedings**

## ЦКП (НОЦ) РУДН открыл набор в практико-ориентированную аспирантуру по «Фармацевтической технологии»

**Р. А. Абрамович, д. фарм. н., доцент – директор Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) РУДН, зав. кафедрой технологии получения лекарств и организации фармацевтического дела факультета повышения квалификации мед. работников РУДН; руководитель образовательной программы аспирантуры «Pharmaceutical technology»/ «Фармацевтическая технология» по направлению подготовки 33.06.01 «Фармация».**

[www.ccp.rudn.ru](http://www.ccp.rudn.ru)

**Рассказывает директор Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (ЦКП (НОЦ) РУДН), д. фарм. н., доцент Р. А. Абрамович**



*Римма Александровна, расскажите, что сподвигло Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр) РУДН открыть образовательную программу аспирантуры?*

В 2019 году Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) РУДН отметил свое десятилетие. За это время накопился опыт проведения полного комплекса исследований, связанных с

разработкой лекарственных средств от синтеза субстанций до внедрения в производство современных лекарственных форм, и взял курс на пациент-ориентированную модель развития фармацевтических разработок. ЦКП (НОЦ) РУДН – один из немногих, кому удалось привлечь фармацевтические компании в университеты для проведения исследований и разработок новых лекарственных средств. Фармацевтические компании обращаются в ЦКП (НОЦ) РУДН для проведения систематизированных объективных междисциплинарных исследований (с привлечением фармацевтов, химиков, физиков, врачей) без конкурентного интереса и в соответствии с требованиями норм и документации РФ, гармонизированными с международной практикой. Это дает им возможность значительно минимизировать финансовые затраты на этапах разработки, внедрения и масштабирования производства нового продукта, уменьшить технологические риски, значительно сократить время разработки. В свою очередь ЦКП (НОЦ) накопил информацию о реальных потребностях фармацевтических компаний – о наиболее трудных вопросах, касающихся разработки лекарственных средств (с которыми они обычно обращаются за помощью в наш центр), о том, в каких кадрах они нуждаются.

Компании-лидеры фармацевтического бизнеса нацеливают специалистов на проведение перспективных инновационных разработок в области исследования лекарственных средств на основании планов стратегического развития предприятия. Знание данного вектора развития помогло высшей школе выявить новые направления в организации профессионального образования, а также выявить необходимость комплексного обновления образовательного процесса в соответствии с актуальными трендами производства. ЦКП (НОЦ) уже 10 лет проводит подготовку квалифицированных кадров в рамках дополнительного профессионального образования. Кроме того, на базе центра и под руководством его сотрудников ведутся научные исследования: защищено бо-



более 10 диссертаций на соискание степени кандидата наук, 2 диссертации на соискание степени доктора наук, в том числе моя. База центра действительно уникальная: более 300 единиц современного измерительного, испытательного и технологического оборудования, чистые помещения класса D, учебно-производственный участок, отвечающий требованиям надлежащей производственной практики и имеющий лицензию на осуществление производства лекарственных средств. На участке обрабатывается технология собственно разработанных новых лекарственных форм, а также коммерческих препаратов под ключ. Работая с более чем 250 ведущими фармацевтическими предприятиями, мы увидели их интерес и в «индустриальном» PhD: компания отправляет на обучение своего сотрудника, после окончания сотрудник возвращается и внедряет результаты своего исследования в производство.

Кроме того, ЦКП (НОЦ) проводит совместные исследования в области фармацевтической технологии с Базельским университетом (Швейцария). Кстати говоря, швейцарские коллеги выбрали нас потому, что у нас есть учебно-производственный участок, соответствующий требованиям GMP. На реальном заводе сложно выделить такой участок для учебных целей или малых серий производства. Мы же можем провести обучение на таком участке, а также выпол-

нить и отработать фармацевтическую технологию лекарственного препарата, например, для клинических исследований. Анализируя наш опыт, говоря молодежным сленгом – бэкграунд, мы ощутили готовность к шагу создания своей аспирантуры по фармацевтической технологии.

*Расскажите об открытой образовательной программе аспирантуры «Pharmaceutical technology»/ «Фармацевтическая технология» по направлению подготовки 33.06.01 «Фармация»?*

Образовательная программа «Pharmaceutical technology»/«Фармацевтическая технология» по направлению подготовки 33.06.01 «Фармация» реализуется в ЦКП (НОЦ) РУДН совместно с University of Basel (г. Базель, Швейцария). Срок обучения 3 года. Форма обучения – очная. Обучающимся предоставляется отсрочка от призыва на военную службу.

Нужно иметь в виду, что очное образование в аспирантуре не подразумевает постоянное присутствие обучаемого в аудитории. Большое количество времени аспирант тратит на практическое выполнение собственного научного исследования, которое должно вылиться в диссертацию на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Это исследование может и должно выполняться под задачи потенциального работодателя и, в том числе, на его про-



изводственной площадке. Таким образом, решается ряд задач интересных как обучающемуся, так и фарм. производителю.

Кроме того, мы предполагаем активно использовать инструменты дистанционного обучения, такие как информационные системы быстрого обмена, обучающие вебинары и пр.

Надо отметить, что при обучении в РУДН аспирант имеет дополнительные возможности для собственного роста, например, в языковой сфере.

*Какие преимущества получает выпускник аспирантуры этой программы?*

Аспирантура по специальности «Фармацевтическая технология» по системе межвузовского обмена позволит стать исследователем в области разработки теоретических основ технологии получения лекарственных средств, дизайна готовых лекарственных форм; расширит базу знаний и карьерные перспективы в фармацевтической и биотехнологической промышленности; научит оценивать, планировать и проводить исследования с применением современных подходов в разработке лекарств – Quality-by-Design, ICH Q-8, ICH Q-10; даст знания от фармацевтического бизнеса – знания по коммерциализации научных идей.

После обучения в аспирантуре при выполнении индивидуального рабочего плана аспиранта выдается диплом государственного образца об окончании аспирантуры, успешно защитившим диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук – диплом кандидата наук.



Преимущества наличия ученой степени для развития карьеры очевидны: это дополнительные возможности совмещать научно-исследовательскую деятельность с карьерой в педагогической и деловой сферах. А также выпускники востребованы в учебных, научно-исследовательских организациях, на фармпредприятиях, в аптечных учреждениях, в сфере обращения лекарственных средств. Опыт взаимодействия с иностранными партнерами повышает конкурентоспособность специалиста на профильном рынке труда.

*Как организован учебный процесс по данной образовательной программе?*

Учебный процесс в аспирантуре включает в себя научно-исследовательскую и педагогическую практики.

Аспирант принимает участие в проведении комплексных исследований для реальных отечественных и зарубежных фармацевтических компаний в области разработки и трансфера в промышленное производство инновационных лекарственных средств.

Часть данного образовательного модуля «Практика» проходит на базе вуза-партнера – Базельского университета в Отделении фармацевтических наук.

*Кто может учиться на данной образовательной программе и как поступить в аспирантуру?*

Абитуриенту необходимо сдать один вступительный экзамен по фармацевтической технологии. Вступительные испытания в 2020 году проводятся в форме компьютерного теста. Обучаться в аспирантуре могут специалисты с высшим образованием.

Приглашаем в аспирантуру ЦКП (НОЦ) РУДН!

**Контактная информация:**

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН).  
Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) (ЦКП (НОЦ) РУДН).

**Адрес:** Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, корп. 2.

**Тел.:** +7 (495) 787-38-03, доб. 2116

**E-mail:** ckp@rudn.ru, abramovich-ra@rudn.ru

**Сайт:** www.ccp.rudn.ru



## Перламутровые пигменты Candurin® от «MERCK» для фармацевтики

Материал предоставлен  
компанией ХИММЕД



Окрашивание таблеток и капсул играет важную роль. Этот процесс не только выделяет товар на фоне конкурентов, но и защищает лекарственные препараты от подделки. Также это помогает пациентам и сотрудникам больниц проще ориентироваться среди большого количества таблеток, позволяя беглым взглядом найти нужную. Одобренные для использования в фармацевтике красители предоставляют ограниченный выбор цветов, однако ООО «ТД «ХИММЕД» предлагает расширить его, выделив препараты перламутровым блеском.

ООО «ТД «ХИММЕД» является официальным дистрибьютором «MERCK» в категории «Performance Materials» и предлагает фирменные перламутровые пигменты компании. Представленные линейками IRIODIN®, COLORSTREAM®, PYRISMA®, XIRALLIC®, MIRAVAL®, TIVIDA®, SECURALIC®, SPECTRAVAL®, THERMAVAL® красители придают блеск автомобильным краскам, губным помадам и люминесцентным покрытиям упаковок. Для фармацевтической промышленности компания «MERCK» разработала линейку пигментов CANDURIN®.

Благодаря этому пигменту лекарственные препараты обретут блеск, сравнимый с натуральным жемчугом. Эффект достигается за счет осаждения диоксида титана, оксида железа или их комбинации на натуральную слюду. Использование различной концентрации этих веществ позволило создать 17 цветов, в которые можно окрашивать таблетки, капсулы и пероральные суспензии. Также CANDURIN® совместим со стандартными фармацевтическими и пищевыми красителями.

На выбор предлагаются традиционные варианты, вроде красного или желтого, или более выделяющиеся,

вроде золотого или серебряного. Независимо от выбранного цвета, таблетки и капсулы будут блестеть, сразу бросаясь в глаза и на полках аптек и в домашних аптечках. Также доступны различные варианты внешнего вида. В зависимости от размера частиц (5–150 микрон), таблетки и капсулы можно сделать матовыми, полуглянцевыми, глянцевыми или придать эффект блесков.

Используемые вещества классифицируются как пищевые добавки, благодаря чему удовлетворяют требованиям фармацевтических организаций. CANDURIN® можно наносить на пленочную оболочку или непосредственно в массу. Пигмент совместим с используемыми для оболочек полимерами, не оказывает негативного влияния на время разложения и высвобождение действующего вещества, а также обладает солнцезащитными свойствами, предотвращая слипание. Также он является единственным перламутровым пигментом, получившим одобрение FDA. Это, в совокупности с производством, соответствующим стандартам GMP, будет полезно для работы на международном уровне.

В некоторых случаях Candurin® позволяет удешевить производство, исключая необходимость создания дополнительного пленочного покрытия для лекарственных препаратов и БАД. Исследования, проведенные с использованием функциональных наполнителей Parteck® ODT и Parteck® SI, показали, что пигмент не влияет на прессование и время растворения.

Заказать или задать вопросы по пигменту CANDURIN® и другим продуктам категории «Performance Materials» производства MERCK вы можете по **e-mail: [develop@chimmed.ru](mailto:develop@chimmed.ru)**.

Перламутровый пигмент Candurin®:

- Выделяет препараты перламутровым блеском.
- Производится из натуральных компонентов.
- На выбор 17 цветов с различным внешним видом покрытия.
- Не оказывает негативного влияния на оболочку, прессование и активные вещества.
- Единственный перламутровый пигмент, одобренный FDA.



## Целостность данных при квалификации аналитических приборов

### Сетевая распределенная ACE (NDA) Agilent CrossLab

Материал предоставлен  
компанией Agilent Technologies, Inc.

#### Обзор технической информации

## ВВЕДЕНИЕ

Программа по обеспечению соответствия нормативным требованиям Agilent CrossLab Compliance предлагает полностью согласованный подход к проведению квалификации, реализуемый специалистами компании Agilent. Функциональность данной программы позволяет использовать ее в рамках целого предприятия. Этот комплекс услуг представляет собой единый протокол квалификации, основанный на полностью автоматизированном ПО (запатентованная в США Agilent Compliance Engine, ACE), которое предоставляет единообразные электронные отчеты, журналы действий и подписи, необходимые для ускорения проверок и минимизации правовых рисков.

CrossLab Compliance уменьшает правовые риски за счет:

- гармонизации различных приборов и всех основных систем сбора и обработки хроматографических данных,
- гибкости в настройке тестовых и типовых регламентов испытаний,
- полной автоматизации для обеспечения соответствия протоколам,
- электронных отчетов и подписей.

ПО ACE полностью соответствует требованиям статьи <1058> Фармакопеи США, приложения 15 GM и FDA по целостности данных и прослеживаемости. С помощью ACE авторизованные специалисты Agilent настроят график проведения испытаний в соответствии с вашим утвержденным планом по квалификации оборудования. Сами испытания выполняются с помощью установленного у вас ПО управления и сбора данных (например, системы хроматографических данных). После этого результаты испытаний собираются в отчете о квалификации оборудования (EQR). На основе критериев, включенных в план по квалификации оборудования, выносится заключение об успешном или неуспешном прохождении квалификации.

ACE может быть развернута в различных конфигурациях в зависимости от потребностей и организационной структуры вашей лаборатории. Простейший вариант – это использование внешнего USB-диска, с которого запускается приложение. Установка на внешний USB-диск не занимает дисковое пространство рабочего компьютера, не влияет на его настройки и предоставляет полностью переносимую рабочую среду с электронным и процедурным управлением и полной прослеживаемостью, необходимой для обеспечения соответствия Части 11.

Для лучшего контроля Agilent может установить ПО непосредственно на компьютер (рабочую станцию или сервер) в вашей локальной сети. Преимущества данного подхода в тесной интеграции с источниками данных и упрощенной рабочей документации. Также в этом случае ПО подчиняется всем правилам, управляющим работой вашей сети.

ACE, развернутая в локальной сети, называется сетевой распределенной ACE (NDA), и ей посвящен данный обзор. После установки ПО ACE может использоваться сервисными работниками Agilent для проведения квалификации и обеспечивает необходимый технический контроль для соответствия методическим рекомендациям по целостности данных.

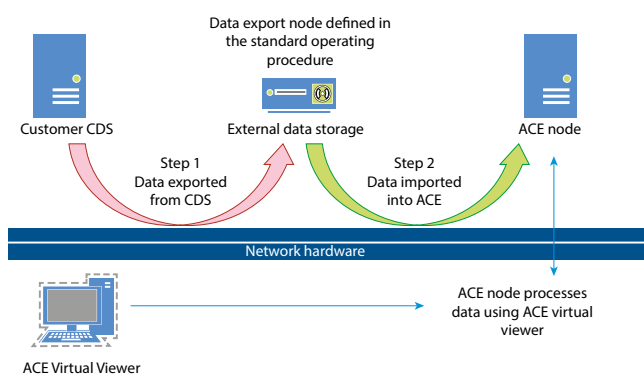
## ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА СЕТЕВОЙ РАСПРЕДЕЛЕННОЙ ACE

Концептуальная диаграмма (рисунок 1) показывает основные работы системы и сетевые ресурсы, которые участвуют в передаче данных и работе системы. Очевидное преимущество NDA в том, что все компоненты, которые участвуют в квалификации, находятся в одной локальной сети и подчиняются общим подходам политики контроля и доступа к данным.

Передача данных контролируется на всем протяжении процесса квалификации. Сервисные инженеры Agilent настроят местоположения хранилищ данных и



**Рисунок 1. Установка сетевой распределенной программы автоматического обеспечения соответствия Agilent**



**Figure 1. Installing Agilent Networked Distributed Automated Compliance Program**

**Таблица 1. Установка на внешний USB-диск и сетевые конфигурации**

**Table 1. External USB Installation and Network Configurations**

Характеристика Characteristic	Внешний USB-диск External USB drive	Прямой NDA (P2P) Direct NDA (P2P)	NDA-RDS/Citrix
Совместимость с Ч. 11 Part 11 compatible	✓	✓	✓
Прослеживаемость данных оборудования Equipment data traceability	✓	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network
Запись исходной информации Recording of initial information	✓ На DVD ✓ On DVD	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network
Хранение протоколов и отчетов Storage of protocols and reports	✓ На DVD ✓ On DVD	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network	✓ Настраивается в сети ✓ Configurable on the network
Подпись протоколов Signing protocols	✓ Внешняя ✓ External	✓ Доступно в редакторе протоколов ✓ Available in the protocol editor	✓ Доступно в редакторе протоколов ✓ Available in the protocol editor
Просмотр журнала сеансов (журнал аудита) Viewing the session log (audit log)	✓ Статичный отчет ✓ Static report	✓ Через средство просмотра журналов ✓ Through the log viewer	✓ Через средство просмотра журналов ✓ Through the log viewer
Резервное копирование Backup	н/д n/a	✓ Часть сетевых правил/процедур ✓ Part of network rules/procedures	✓ Часть сетевых правил/процедур ✓ Part of network rules/procedures
Безопасность доступа Access security	н/д n/a	✓ Основные разрешения ✓ Basic Permissions	✓ Расширенные разрешения ✓ Extended Permissions
Тонкий клиент Thin client	н/д n/a	н/д n/a	

контроль доступа в соответствии с правилами вашей локальной сети и действующими процедурами контроля доступа. Резервное копирование данных может быть запланировано в соответствии с действующими в лаборатории принципами.

Планы и отчеты по квалификации могут сохраняться централизованно для постоянного хранения и передаваться для различных согласований. Авторизованные сотрудники могут подписывать планы квалификации в электронном виде в соответствии с вашими инструкциями по обеспечению качества.

Краткое сравнение основных характеристик установки ACE в сети и на внешний USB-диск приводится в таблице 1.

## КАКАЯ СХЕМА УСТАНОВКИ ACE ВАМ БОЛЬШЕ ПОДХОДИТ?

NDA может устанавливаться в различных конфигурациях в зависимости от потребностей вашей лаборатории, что добавляет услугам, предоставляемым компанией Agilent, удобство и универсальность. NDA может быть установлена в трех вариантах.

- **Установка в одноранговой сети:** ПО ACE устанавливается на один из компьютеров в вашей локальной сети. При этом не создается никаких дополнительных учетных записей и настроек, и работа системы контролируется сетевыми настройками рабочего компьютера. Сетевые порты и доступ к данным системы сбора и обработки хроматографических

данных, которая управляет оборудованием, настраиваются вручную (подробнее см. Контрольный список подготовки к установке NDA).

- **Установка в виде сервиса удаленного рабочего стола Microsoft (RDS):** это облегчает настройку сетевых прав и передачи данных. В этом режиме система управляется с рабочего компьютера, но при этом подчиняется всем настройкам прав доступа и подходам политики управления, действующим в вашей локальной сети.
- **Полностью интегрированная среда с тонкими клиентами (например Citrix):** позволяет использовать самые передовые и мощные средства управления сетевыми приложениями. Вся работа ПО контролируется настройками Citrix и вашей локальной сети.

Во всех перечисленных вариантах установки требуется создание новой учетной записи для того, чтобы сервисный инженер Agilent получил доступ к приложению. Это включает в себя доступ к файлам данных, созданным квалифицируемым оборудованием, а также права на чтение и запись файлов настроек и данных в рабочих каталогах ACE. Местонахождение и права доступа к данным каталогам определяются в ручном режиме (прямой NDA) или глобально, используя среду RDS или Citrix.

После создания данной учетной записи в соответствии с правилами, действующими в вашей локальной сети, она должна сохраняться в домене для того, чтобы обеспечить постоянную возможность проводить квалификацию оборудования.

NDA не требует никакого дополнительного сетевого функционала сверх того, который необходим для нормальной работы распределенной системы хроматографических данных. Поэтому установка NDA не предъявляет никаких дополнительных требований

к уже квалифицированной сети, которая обеспечивает передачу данных и подходит для использования по назначению.

### Поддерживаемые версии

В таблице 2 приведены версии ПО, необходимые для установки NDA в трех возможных конфигурациях. Установка ACE и оперативная самоквалификация ACE – это готовое решение, разработанное в рамках программы Agilent по обеспечению качества в всем протяжении жизненного цикла продукта. Каждая версия ACE валидируется; валидация подтверждается сертификатом.

Каждая установка ACE независимо от ее носителя (USB-диск или узел сети) или серверной конфигурации (прямой NDA, RDS/Citrix) квалифицируется на пригодность для использования по назначению. Модуль оперативной самоквалификации автоматически производит квалификацию по окончании установки программы и записывает результаты в отчет о верификации установки.

Agilent производит квалификацию ACE и предоставляет вам отчет о квалификации. Квалификация ACE включает в себя следующие этапы:

- Тесты верификации ПО (SVT) CrossLab проверяют правильность установки файлов и примененных настроек.
- К краткому отчету о самоквалификации всегда прилагается сводный отчет. Расширенный отчет о самоквалификации доступен по запросу и дает информацию по всем индивидуальным тестам, включенным в самоквалификацию.
- Для всех вариантов установки NDA отчет о верификации установки включает в себя контрольный список установки и тест безопасности, который проверяет правильность настройки прав доступа к приложению.

**Таблица 2. Требования к версиям ПО для трех вариантов сети, поддерживаемых NDA**

**Table 2. Requirements for software versions for the three network options supported by NDA**

	NDA (P2P)	RDS	Citrix
Версия ACE ACE version	A.02.80.02 SR1 и выше A.02.80.02 SR1 or higher	A.02.80.02 SR1 и выше	A.02.80.02 SR1 и выше
ОС рабочего компьютера ACE (US English) ACE work computer OS (US English)	Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016 Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2 008R2/2012R2/2016	Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016	Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016
Виртуальное средство просмотра ACE ACE Virtual Viewer	Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016 (Английский/Японский/ Китайский) Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2 / 2012R2 / 2016 (English / Japanese / Chinese)	Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016 Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016	Windows 7/8/10 (32/64 бит) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016 Windows 7/8/10 (32/64 bit) Microsoft Server 2008R2/2012R2/2016
Версия Citrix Citrix version	н/д n/a	н/д n/a	XA65 – Windows Server 2008 R2 XA76+ – Windows Server 2012 R2

## ВЕРСИИ ACE, ОБНОВЛЕНИЯ И ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Сервисные инженеры Agilent используют ACE для предоставления услуги по квалификации аналитических приборов (AIQ). Для нормальной работы ПО не требуются регулярные обновления. При необходимости обновить ПО (например, при добавлении новых типов квалификации приборов или исправлении ухудшающих качество работы ПО ошибок) мы предоставим вам для утверждения документацию контроля изменений, и вся работа будет выполнена в соответствии со стандартами процедуры контроля изменений, такими же как и для остального сетевого лабораторного ПО. Все изменения и обновления ACE квалифицируются сервисным инженером Agilent с помощью вышеописанных встроенных инструментов самоквалификации.

## СОХРАНЕНИЕ ДАННЫХ И РЕЗЕРВНОЕ КОПИРОВАНИЕ

Установка NDA позволяет централизованно хранить и управлять квалификационной документацией, от планов до отчетов о квалификации. Местоположение, разрешения доступа и сроки хранения данных, созданных системой ACE, управляются заданными вами критериями доступа и сроков хранения.

Также Agilent может установить вам систему управления информационными ресурсами OpenLAB ECM, которая предоставляет возможности автоматического хранения отчетов с серверным журналом аудита и возможностью управления версиями.

Вы самостоятельно настраиваете частоту и другие характеристики резервного копирования данных.

## ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ

### **Надо ли заново выполнять квалификацию локальной сети после установки ACE?**

Нет. ACE – это изолированное приложение, которое не оказывает никакого дополнительного влияния на сеть и другие приложения, установленные на других клиентских и сетевых узлах. При установке NDA в одноранговой сети (прямой NDA) некоторые сетевые порты должны быть открыты во время работы ACE. Это может потребовать дополнительной квалификации согласно вашей сетевой политике контроля изменений. Для RDS и Citrix версий установки этого не требуется.

### **Кто отвечает за управление и администрирование ACE после установки?**

ACE используют сервисные инженеры Agilent для предоставления услуги по квалификации аналитических приборов (AIQ). Установка в среде RDS/Citrix имеет определенные требования к учетным записям, правам доступа и развертыванию приложения, которые следует настроить и поддерживать в соот-

ветствии с вашей сетевой политикой. После установки ПО вы отвечаете за то, чтобы учетные записи были доступны вашему представителю Agilent.

### **Кто отвечает за квалификацию ACE (протоколы, отчеты и т. д.)?**

ACE – это готовое решение, разработанное в рамках программы Agilent по обеспечению качества на всем протяжении жизненного цикла продукта. Все установки ACE квалифицируются независимо от того, где они были установлены. ACE квалифицируется с помощью встроенной процедуры самоквалификации, которая включает в себя создание отчета о самоквалификации. Во время самоквалификации создаются следующие документы:

- отчет теста верификации ПО, который проверяет размер установленных файлов и правильность настроек;
- краткий отчет о самоквалификации;
- расширенный отчет о самоквалификации (только по запросу);
- для сетевых вариантов (NDA) всегда прилагается контрольный список установки и базовые тесты безопасности, которые проверяют права доступа к NDA.

### **Как часто надо обновлять ПО?**

### **Как организовано управление обновлением ПО?**

ACE используют сервисные инженеры Agilent для предоставления услуги по квалификации аналитических приборов (AIQ). Для нормальной работы ПО не требуются регулярные обновления. Обновление протоколов также не требуется кроме случаев, когда новое квалифицируемое оборудование (новые модули и т. д.) требует использования новой версии ПО. Платформа ACE требует обновлений только в случае исправления ухудшающих качество работы ПО ошибок. В зависимости от потребностей в квалификации оборудования вы сами решаете, когда обновлять ПО ACE и надо ли его обновлять.

### **Надо ли заново квалифицировать ACE после обновлений?**

Да. ACE всегда квалифицируется с помощью встроенной процедуры самоквалификации, независимо от того, где она установлена. К сетевым вариантам прилагается контрольный список установки, который покрывает особенности NDA.

### **Можно ли использовать ACE с системами хроматографических данных других производителей?**

Да. ACE совместим со всеми основными системами хроматографических данных, и при квалификации аналитическим оборудованием всегда управляет его родная программа, так же, как и во время его обычной эксплуатации.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



## Медиа-партнерство

**Наше издание приглашает к сотрудничеству специалистов и экспертов фармацевтического рынка, задействованных в сфере разработки и производства лекарственных средств, а также производителей сырья, материалов и оборудования, необходимого для оснащения лабораторных комплексов и производственных объектов.**

**В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:**

➤ Публикации в печатном и электронном журнале

- Научные статьи
- Рекламные статьи
- Рекламные модули

➤ Баннерная реклама на сайте

Размещение рекламных баннеров на сайте  
[pharmjournal.ru](http://pharmjournal.ru)

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail маркетинг (в базе 16500 адресов)

➤ Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием

## О журнале



**Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:**

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных ЛС.
- ✓ Аналитические методики контроля качества.
- ✓ Подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.
- ✓ Валидация методик, подготовка регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении.



Включен в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.  
Редакция ведет работу по включению журнала в список цитирования SCOPUS.

**Научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» является партнером ключевых мероприятий фармацевтической отрасли:**



- ✓ Фармацевтический форум стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российский Фармацевтический Форум.
- ✓ GMP-конференция с международным участием.
- ✓ Дженерики и биосимиляры в России и ЕАЭС.
- ✓ IPhEB Russia.
- ✓ И других не менее значимых мероприятий.

По вопросам информационного сотрудничества  
просьба обращаться по электронной почте  
[info@pharmjournal.ru](mailto:info@pharmjournal.ru); [pharmjournalru@gmail.com](mailto:pharmjournalru@gmail.com)  
или по телефону +7 977 781 86 18

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-15-20>  
УДК 615.32; 615.244



Оригинальная статья/Research article

## Многокомпонентные средства для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения

Е. В. Ферубко<sup>1\*</sup>

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

\*Контактное лицо: Ферубко Екатерина Владимировна. E-mail: eferubko@yandex.ru

ORCID: Е. В. Ферубко – <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>.

Статья поступила: 20.07.2020. Статья принята в печать: 25.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** В последние годы во многих странах отмечается неуклонный рост гастроэнтерологических заболеваний, связанный с неблагоприятной экологической обстановкой и нерациональным питанием. Заболевания органов пищеварения имеет не только хронический, но и сочетанный характер, и в терапии широко используются разнообразные синтетические лекарственные средства. Ассортимент официальных многокомпонентных растительных сборов, рекомендуемых в терапии заболеваний пищеварительной системы, ограничен и особенно их недостаток ощущается при лечении хронического гепатита, язвенной болезни желудка, холецистита.

**Цель.** Поиск и создание новых многокомпонентных средств для профилактики и комплексного лечения заболеваний пищеварительной системы.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили разработанные многокомпонентные средства: «Пентафит», «Октафит», «Гексафит». Предложенные составы растительных композиций являются оригинальными, не имеющими аналогов и защищены патентами на изобретение. Для оценки фармакотерапевтического влияния разработанных средств гепатопротективная активность «Пентафита» изучена на экспериментальных моделях тетрахлорметанового и D-галактозаминового гепатитов крыс; гастропротективная активность «Октафита» изучена на моделях острой аспириновой, нейрогенной и хронической бутадииновой язв желудка крыс; желчегонная активность «Гексафита» изучена на моделях экспериментального холецистита и токсических повреждений печени с применением лабораторных животных. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием программы Statistica 10.

**Результаты и обсуждение.** На основании полученных данных выявлены общие закономерности в молекулярно-биологическом действии изучаемых многокомпонентных средств, заключающиеся в способности их ингибировать свободнорадикальное окисление липидов и стабилизировать биологические мембраны клеток желудка и органов гепатобилиарной системы. Среди изучаемых многокомпонентных средств в экспериментах на животных выгодно отличается «Пентафит» своим многосторонним характером влияния на функциональное состояние и структуру печени. «Октафит» обеспечивает ускоренное заживление и восстановление поврежденных структур функциональных систем желудка крыс. «Гексафит» выделяется поливалентным спектром действия при повреждениях гепатобилиарной системы лабораторных животных.

**Заключение.** Разработанные многокомпонентные препараты расширяют реестр лекарственных средств растительного происхождения отечественного производства для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения.

**Ключевые слова:** многокомпонентные растительные экстракты, доклинические исследования, токсические модели повреждений печени и желчного пузыря, экспериментальные язвы желудка, лабораторные животные, перекисное окисление липидов, болезни пищеварительной системы.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Автор проводил экспериментальные исследования, статистическую обработку и анализ полученных результатов. Автор написал текст статьи.

**Для цитирования:** Ферубко Е. В. Многокомпонентные средства для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-15-20>

## Multicomponent Agents for Prevention and Treatment of Digestive Diseases

Ekaterina V. Ferubko<sup>1\*</sup>

1 – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, 7/1, Green str., Moscow, 117216, Russia

\*Corresponding author: Ekaterina V. Ferubko. E-mail: eferubko@yandex.ru

ORCID: Ekaterina V. Ferubko – <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>.

Received: 20.07.2020. Revised: 25.08.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** In recent years, there has been a steady increase in gastroenterological diseases in many countries due to adverse environmental conditions and unsustainable nutrition. Diseases of digestive organs are not only chronic, but also combined, and varieties of synthetic drugs are widely used in therapy. The range of official multicomponent plant collections recommended in the therapy of diseases of the digestive system is limited, and their disadvantage is especially felt in the treatment of chronic hepatitis, gastric ulcer, cholecystitis.

**Aim.** Search and creation of new multicomponent agents for prevention and complex treatment of digestive system diseases.

**Materials and methods.** The objects of the study were developed multi-component means: «Pentafit», «Octafit», «Hexafit». To assess the pharmacotherapeutic effect of the developed agents «Pentafit» hepatoprotective activity studied in experimental models tetrachloromethane and D-galactosamine hepatitis, «Octafit» gastroprotective activity studied in models of acute aspirin, neurogenic and chronic butadione ulcer, choleric activity of «Hexafit» as studied in models of experimental cholecystitis and toxic liver damage using laboratory animals. The results of the studies processed statistically using the Statistica 10 program.

© Ферубко Е. В., 2020

© Ferubko E. V., 2020

**Results and discussion.** Based on the obtained data, the general patterns in molecular biological action of the studied multicomponent agents revealed, which consist in their ability to inhibit the free radical oxidation of lipids and stabilize the biological membranes of gastric cells and organs of the hepatobiliary system. «Pentafit» profitably distinguished by its multilateral nature of influence on the functional state and structure of the organs of the liver. «Octafit» provides accelerated healing and restoration of damaged structures of functional systems of the stomach. «Hexafit» secreted by the polyvalent spectrum of action in case of damage to the hepatobiliary system

**Conclusion.** Developed multicomponent drugs will expand the register of medicines of plant origin of domestic production for the prevention and treatment of digestive diseases.

**Keywords:** multicomponent plant extracts, preclinical studies, toxic models of liver and gallbladder damage, experimental gastric ulcers, laboratory animals, lipid peroxidation, digestive system diseases.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** The author conducted experimental studies, statistical processing and analysis of the results. The author wrote the text of the article.

**For citation:** Ferubko E. V. Multicomponent agents for prevention and treatment of digestive diseases. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-15-20>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной задачей медицины является расширение исследований по изысканию источников для получения новых эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения, в том числе применяемых в гастроэнтерологической практике.

Одним из путей расширения номенклатуры препаратов растительного происхождения является всестороннее изучение действия уже известных фармакопейных лекарственных растений, часто используемых по ограниченному числу показаний, а также составление рациональных многокомпонентных растительных композиций (сборов), которые являются наиболее популярными, доступными для населения и содержат биологически активные вещества с разносторонним фармакологическим действием для коррекции многих, связанных между собой систем организма [1].

В последние годы во многих странах отмечается неуклонный рост гастроэнтерологических заболеваний, связанный с неблагоприятной экологической обстановкой и нерациональным питанием. В России заболеваниями данной группы страдает каждый десятый житель. К числу наиболее распространенных относится хронический панкреатит (8–35%), язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки (8–10%), заболевания гепатобилиарной системы, в том числе гепатит (8–22%) [2].

Заболевания органов пищеварения имеет не только хронический, но и сочетанный характер, и в терапии широко используются разнообразные синтетические лекарственные средства. Однако при их выраженном терапевтическом эффекте они не лишены побочного действия, имеют противопоказания и ограничения к применению, не всегда предотвращают развитие рецидива заболевания после их отмены [3].

Это определяет необходимость разработки комплексных подходов к их лечению, в том числе с применением лекарственных растительных средств, которые имеют широкий спектр лечебного и профилактического действия, обладают низкой токсичностью, мягкостью действия, способны быстро устранять симптомы обострения, предупреждать рецидивы и способствовать восстановлению нарушенных функций желудочно-кишечного тракта. Возможность рационального сочетания лекарственных растений между собой и с синтетическими препаратами позволяет расширить их терапевтические возможности и снизить частоту побочных явлений медикаментозной терапии.

Ассортимент официальных многокомпонентных растительных сборов, рекомендуемых в терапии заболеваний пищеварительной системы, ограничен и особенно их недостаток ощущается при лечении хронического гепатита, язвенной болезни желудка, холецистита [4].

Все это требует более глубокого изучения принципов комбинирования лекарственного растительного сырья в сборах для обеспечения необходимого фармакологического эффекта.

С целью профилактики сезонных обострений заболеваний пищеварительной системы лекарственные растения целесообразно применять в виде многокомпонентных лекарственных средств, преимуществом которых является взаимное дополнение полезных фармакологических свойств каждого входящего компонента, соответствие поливалентности патогенеза заболеваний, воздействие в целом на организм больного как корригирующей системы.

В этой связи целью исследований является поиск и создание новых многокомпонентных средств для профилактики и комплексного лечения заболеваний пищеварительной системы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание лекарственных средств включает в себя несколько этапов исследования: патентный поиск, изучение сырьевой базы, фитохимическое исследование, разработка современных прогрессивных лекарственных форм и доклиническое экспериментальное изучение. В нашем случае в рамках поставленных задач исследована специфическая фармакологическая активность трех экстрактов, обладающих гепатопротективной, гастропротективной и желчегонной активностью на различных моделях в эксперименте на животных.

Предложен методологический подход к разработке новых лекарственных растительных средств, основанный на теоретическом обосновании вклада каждого компонента растительной композиции, с последующим экспериментальным подтверждением оптимального состава сборов, предназначенных для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения [5].

Объектами исследования служили многокомпонентные средства: «Пентафит», «Октафит», «Гексафит».

«Пентафит» – 5-компонентный сухой экстракт, полученный из корней и корневищ девясила высокого (*Inula helenium* L.) – 250 г, травы золотысячника обыкновенного (*Centaureum erythraea* Rafn.) – 150 г, цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) – 100 г, плодов шиповника (*Rosa* sp.) – 275 г, плодов боярышника (*Crataegus* sp.) – 225 г. Экстракт под условным названием «Пентафит» получен при совместном экстрагировании компонентов 50 % этиловым спиртом. Стандартизация «Пентафита» осуществлена по сумме флавоноидов в пересчет на лютеолин-стандарт, содержание суммы флавоноидов регламентируется не менее 1 %.

«Октафит» представляет собой 8-компонентный сухой экстракт, полученный из листьев подорожника большого (*Plantago major* L.) – 187,5 г, травы сушеницы топяной (*Gnaphalium uliginosum* L.) – 187,5 г, корневищ и корней девясила высокого (*Inula helenium* L.) – 187,5 г, цветков ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.) – 125 г, корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) – 125 г, травы горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.) – 62,5 г, листьев крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) – 62,5 г, плодов рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.) – 62,5 г. Экстракт получен путем экстрагирования отдельных компонентов 70 % спиртом этиловым с последующим объединением полученных экстрактов. Стандартизация экстракта осуществлена по сумме флавоноидов в пересчете на рутин. Содержание суммы флавоноидов регламентируется не менее 1,6 %.

«Гексафит» представляет собой шестикомпонентный сухой экстракт, полученный из цветков бесмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) – 300 г, цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) – 100 г, плодов шиповника (*Rosa* sp.) – 100 г, листьев крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) – 100 г, листьев мяты

перечной (*Mentha piperita* L.) – 50 г, корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) – 50 г. Экстракт получен при совместном экстрагировании компонентов горячей водой 75–85 °С. лютеолин-стандарт и изосалипурпозид – стандарт. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-стандарт не менее 4 %. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид – стандарт не менее 15 %.

Предложенные составы растительных композиций являются оригинальными, не имеющими аналогов и защищены патентами на изобретение № 2689379 «Способ получения средства, обладающего антигепатотоксической активностью», № 2711048 «Противоязвенный сбор лекарственных растений» и № 2700681 «Средство, обладающее желчегонной активностью, и способ его получения».

Эксперименты выполнены на 450 нелинейных крысах-самцах с исходной массой 180–200 г и на 40 морских свинок обоего пола с исходной массой 400–500 г, полученных из «Научного центра биомедицинских технологий» ФМБА России и содержащихся в условиях вивария со свободным доступом к корму и воде. Фармакологические исследования проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Дизайн исследования одобрен комиссией по биоэтике ВИЛАР.

В соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» гепатопротективная активность экстракта, полученного из пятикомпонентного сбора, изучена на моделях тетрахлорметанового и D-галактозаминового гепатитов; гастропротективная активность растительного экстракта, полученного из восьмикомпонентного сбора, изучена на моделях острой аспириновой, нейрогенной и хронической бутадионовой язв; желчегонная активность растительного экстракта, полученного из шестикомпонентного сбора, изучена на моделях экспериментального холецистита и токсических повреждений печени [6].

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием программы Statistica 10. Вычисляли среднюю арифметическую (M), ошибку средней арифметической (m). Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента. Различия между сравниваемыми значениями считали значимыми при  $p < 0,05$  [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При фармакотерапии экспериментального гепатита тетрахлорметанового гепатита у крыс средством назначения «Пентафита» в экспериментально-терапевтической дозе 300 мг/кг наблюдали значительное снижение хемиллюминометрических показателей липидов (таблицу 1).

**Таблица 1.** Динамика изменений показателей хемилюминесценции липидов (имп./сек) под влиянием «Пентафита» при экспериментальном тетрахлорметановом гепатите у крыс

**Table 1.** Dynamics of changes in lipid chemiluminescence indices (imp/sec) under the influence of «Pentafit» in experimental carbon tetrachloride hepatitis in rats

Сроки исследования Study timing	Интактная (H <sub>2</sub> O), n = 10 Intact (H <sub>2</sub> O), n = 10	Контрольная (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O), n = 10 Control (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O), n = 10	Опытная 1 (CCl <sub>4</sub> + «Пентафит» 300 мг/кг), n = 10 Experimental 1 (CCl <sub>4</sub> + «Pentafit» 300 mg/kg), n = 10
3 суток 3 days	38,0 ± 3,8	254,0 ± 11,6	187,0 ± 6,5*
7 суток 7 days	34,0 ± 4,0	143,3 ± 10,8	117,0 ± 4,7*
14 суток 14 days	40,0 ± 3,9	134,6 ± 16,0	83,0 ± 8,5*
21 суток 21 days	37,0 ± 5,0	72,2 ± 8,8	61,0 ± 8,3
28 суток 28 days	38,3 ± 3,0	68,3 ± 10,5	44,0 ± 8,5

**Примечание:** здесь и далее: \* – различия статистически значимы между данными контрольной и опытной групп при p < 0,05.

**Note:** hereinafter: \* – the differences are statistically significant between the data of the control and experimental groups at p < 0.05.

В результате проведенных исследований выявлены отличительные особенности «Пентафита», заключающиеся в уменьшении признаков синдрома цитолиза при экспериментальном D – галактозаминовом гепатите у животных (таблицу 2).

Причем эффекты указанного действия «Пентафита» проявлялись в изменениях соответствующих показателей, начиная с ранних сроков развития токсических гепатитов, характеризовались активацией восстановительных процессов в печени, нормализацией обмена веществ и уменьшением деструкции органа [8].

Помимо «Пентафита» в соответствии с поставленными задачами проведены исследования по изучению гастропротективной активности «Октафита» при курсовом введении крысам в экспериментально-терапевтической дозе 150 мг/кг в условиях моделей экспериментальных язв желудка.

Анализ результатов исследований по действию изучаемого средства на ИП (индекса Паулса) и ПД (противоязвенное действие) показал, что курсовое введение животным «Октафита» характеризуется закономерным снижением ИП и повышением индекса ПД: основных критериев оценки гастропротектив-

**Таблица 2.** Динамика изменения основных биохимических показателей в сыворотке крови под влиянием «Пентафита» при D-галактозаминовом гепатите у крыс

**Table 2.** Dynamics of change in major serum biochemical parameters under the influence of «Pentafit» in D-galactosamine hepatitis in rats

Основные биохимические показатели Basic biochemical parameters	Интактная (H <sub>2</sub> O), n = 10 Intact (H <sub>2</sub> O), n = 10	Контрольная (D – галактозамин + H <sub>2</sub> O), n = 10 Control (D – galactosamine + H <sub>2</sub> O), n = 10	Опытная 1 (D – галактозамин + «Пентафит» 300 мг/кг), n = 10 Experienced 1 (D – galactosamine + «Pentafit» 300 mg/kg), n = 10	Опытная 2 (D – галактозамин + карсил 50 мг/кг), n = 10 Experienced 2 (D – galactosamine + carsil 50 mg/kg), n = 10
<i>7 сутки 7 days</i>				
АЛТ, мкмоль/л ALT, μmol/l	0,68 ± 0,11	3,80 ± 0,18	3,29 ± 0,14	3,50 ± 0,15
АСТ, мкмоль/л AST, μmol/l	0,41 ± 0,05	1,58 ± 0,05	0,87 ± 0,06*	1,10 ± 0,06*
Тимоловая проба, ед. Thymol test, units	1,36 ± 0,19	2,50 ± 0,29	1,82 ± 0,02*	1,98 ± 0,25*
В-липопротеиды, ед. B-lipoproteins, units	9,0 ± 0,25	18,8 ± 1,41	12,5 ± 1,49*	15,0 ± 1,54
Общий белок, г/л Total protein, g/l	74,5 ± 1,1	66,5 ± 2,9	76,0 ± 1,6*	77,0 ± 2,1*
Холестерин мг% Cholesterol mg%	51,0 ± 2,02	95,0 ± 1,01	58,0 ± 1,30*	77,0 ± 1,20*
Общий билирубин мг% Total bilirubin mg%	0,69 ± 0,03	6,18 ± 0,29	4,22 ± 0,28*	5,00 ± 0,31
<i>14 сутки 14 days</i>				
АЛТ, мкмоль/л ALT, μmol/l	0,68 ± 0,11	2,73 ± 0,05	1,27 ± 0,08*	1,39 ± 0,09*
АСТ, мкмоль/л AST, μmol/l	0,41 ± 0,05	0,90 ± 0,05	0,70 ± 0,06*	0,75 ± 0,07*
Тимоловая проба, ед. Thymol test, units	1,36 ± 0,19	2,40 ± 0,12	1,87 ± 0,03*	2,00 ± 0,09*
В-липопротеиды, ед. B-lipoproteins, units	9,0 ± 0,25	11,9 ± 0,54	10,1 ± 0,40	10,5 ± 0,60
Общий белок, г/л Total protein, g/l	74,5 ± 1,1	76,7 ± 1,9	80,7 ± 2,5	82,0 ± 2,2
Холестерин мг% Cholesterol mg%	51,0 ± 2,02	68,0 ± 2,00	57,0 ± 0,87*	62,8 ± 0,98*
Общий билирубин мг% Total bilirubin mg%	0,69 ± 0,03	4,80 ± 0,33	3,20 ± 0,23*	3,67 ± 0,27*

ного действия лекарственных средств, что является специфической особенностью «Октафита» (таблица 3).

**Таблица 3.** Влияние «Октафита» на течение хронической бутадионовой язвы желудка у крыс (21-е сутки опыта)

**Table 3.** Effect of «Octafit» on the course of chronic butadiene gastric ulcer in rats (day 21 of the experiment)

Группы животных Animal groups	Количество крыс с язвами, % The number of rats with ulcers, %	Количество деструкций на 1 крысу Number of destructions for 1 rat	ИП SP	ПД PD
Интактная (H <sub>2</sub> O), n = 10 Intact (H <sub>2</sub> O), n = 10	0	0	0	0
Контрольная (бутадион + H <sub>2</sub> O), n = 10 Control (butadiene + H <sub>2</sub> O), n = 10	100	12,6 ± 0,68	12,6	0
Опытная 1 (бутадион + «Октафит» 150 мг/кг), n = 10 Experienced 1 (butadiene + «Octafit» 150 mg/kg), n = 10	50	5,5 ± 0,21*	3,7	3,4
Опытная 2 (бутадион + бифунгин 0,3 мл/кг), n = 10 Experimental 2 (butadiene + befungin 0.3 ml/kg), n = 10	80	6,0 ± 0,24*	5,0	2,5
Опытная 3 (бутадион + раниитидин 50 мг/кг), n = 10 Experimental 3 (butadiene + ranitidine 50 mg/kg), n = 10	78	7,5 ± 0,22*	6,2	2,0

На основе анализа полученных данных можно предположить, что активация процессов ПОЛ в клеточных структурах желудка является одним из терминальных механизмов повреждения слизистой оболочки: ПОЛ является важным, но не единственным механизмом, участвующим в цитодеструкции при экспериментальном ульцерогенезе [9].

Продолжая начатые исследования по созданию многокомпонентных лекарственных средств, изучено влияние 6-компонентного экстракта под условным названием «Гексафит» на экспериментальных моделях гепатитов и холецистита в экспериментально-терапевтической дозе 250 мг/кг (таблица 4).

**Таблица 4.** Динамика изменений показателей хемилюминесценции липидов (в имп./сек) под влиянием «Гексафита» при экспериментальном CCl<sub>4</sub>-гепатите у крыс

**Table 4.** Dynamics of changes in lipid chemiluminescence indices (in imp/s) under the influence of «Hexafit» in experimental CCl<sub>4</sub>-hepatitis in rats

Сроки исследования Study timing	Интактная, n = 10 Intact, n = 10	Контрольная, (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O), n = 10 Control, (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O), n = 10	Опытная 1 (CCl <sub>4</sub> + «Гексафит» 250 мг/кг), n = 10 Experienced 1 (CCl <sub>4</sub> + «Hexafit» 250 mg/kg), n = 10
7 суток 7 days	38,0 ± 3,8	143,3 ± 12,8	105,8 ± 10,1*
14 суток 14 days	34,0 ± 4,0	134,6 ± 16,0	83,0 ± 8,5*
21 суток 21 days	40,0 ± 3,9	72,5 ± 8,8	73,0 ± 11,0
28 суток 28 days	37,0 ± 5,0	68,3 ± 10,5	50,8 ± 3,2

**Таблица 5.** Динамика изменения скорости секреции желчи под влиянием «Гексафита» при экспериментальном CCl<sub>4</sub>-гепатите у крыс

**Table 5.** Dynamics of bile secretion rate change under the influence of «Hexafit» in experimental CCl<sub>4</sub> hepatitis in rats

Группы животных Animal groups	Скорость секреции желчи в течение 4 часов, мг/мин на 100 г массы животного Bile secretion rate for 4 hours, mg/min per 100 g of animal weight			
	1 ч 1 h	2 ч 2 h	3 ч 3 h	4 ч 4 h
Интактная Intact	5,4 ± 0,3	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4
14 суток 14 days				
Контрольная (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O) Control (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,3	4,0 ± 0,4
Опытная 1 (CCl <sub>4</sub> + «Гексафит» 250 мг/кг), n = 10 Experimental 1 (CCl <sub>4</sub> + «Hexafit» 250 mg/kg), n = 10	6,0 ± 0,5*	5,8 ± 0,4*	6,2 ± 0,3*	6,2 ± 0,2*
Опытная 2 (CCl <sub>4</sub> + аллохол 250 мг/кг), n = 10 Experimental 2 (CCl <sub>4</sub> + allochol 250 mg/kg), n = 10	5,8 ± 0,4	5,6 ± 0,3*	5,8 ± 0,4	5,8 ± 0,3
28 суток 28 days				
Контрольная (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O) Control (CCl <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O)	4,7 ± 0,4	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,4	3,3 ± 0,3
Опытная 1 (CCl <sub>4</sub> + «Гексафит» 250 мг/кг), n = 10 Experimental 1 (CCl <sub>4</sub> + «Hexafit» 250 mg/kg), n = 10	4,8 ± 0,2	5,5 ± 0,1*	5,6 ± 0,3*	5,0 ± 0,1*
Опытная 2 (CCl <sub>4</sub> + аллохол 250 мг/кг), n = 10 Experimental 2 (CCl <sub>4</sub> + allochol 250 mg/kg), n = 10	4,5 ± 0,2	5,2 ± 0,2*	5,3 ± 0,3*	4,7 ± 0,2*

Полученные результаты свидетельствуют, что ингибирующее действие «Гексафита» на перекисное окисление липидов в биологических мембранах при токсических повреждениях печени является его важным молекулярно-биологическим механизмом, обеспечивающим стабилизацию мембранных структур клеток и тем самым оптимизирующим восстановительные процессы в органах (таблица 5).

На основании полученных результатов можно заключить, что наблюдается общая убедительная закономерность повышения желчеобразующей и желчевыделительной функций печени с усилением холереза при введении «Гексафита» на фоне токсического гепатита. Наряду с этим динамика изменений уровня общего билирубина в сыворотке крови крыс свидетельствовала также о позитивных функциональных изменениях в печени [10].

Следует отметить общие закономерности в молекулярно-биологическом действии изучаемых многокомпонентных средств, заключающиеся в способности их ингибировать свободнорадикальное окисление липидов и стабилизировать биологические мембраны клеток желудка и органов гепатобилиарной системы, данное обстоятельство можно сформулировать как трактование базисного механизма действия [11].

Несмотря на некоторую их общность действия на молекулярно-биологическом уровне проявлялись свои особенности. В частности, у «Пентафита» в большей мере проявляются способности предотвращать и уменьшать явления цитолиза, «Октафита» уменьшать ИП и повышать ПД, а у «Гексафита» – предупреждать развитие синдрома холестаза.

Среди изучаемых многокомпонентных средств выгодно отличается «Пентафит» своим многосторонним характером влияния на функциональное состояние и структуру печени. «Октафит» обеспечивает ускоренное заживление и восстановление поврежденных структур функциональных систем желудка. «Гексафит» выделяется поливалентным спектром действия при повреждениях гепатобилиарной системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармакотерапевтическое влияние разработанных средств обусловлено наличием в них комплекса биологически активных веществ, прежде всего соединений фенольной природы. Благодаря их доминирующему содержанию обеспечивается ингибирующее действие экстрактов на свободнорадикальное окисление липидов, стабилизацию биологических мембран с последующим повышением функциональной активности органа.

По результатам проведенных экспериментов на крысах установлено, что наиболее эффективным было использование с лечебной целью при повреждениях печени «Пентафита», «Октафит» оказывал достоверно выраженное действие при коррекции патологий же-

лудка, при повреждениях гепатобилиарной системы более выраженный фармакотерапевтический эффект отмечался при назначении «Гексафита».

Таким образом, разработанные многокомпонентные препараты расширят реестр лекарственных средств растительного происхождения отечественного производства для профилактики и лечения заболеваний органов пищеварения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лубсандоржиева П.-Н. Б. Разработка и стандартизация фитосредств для лечения и профилактики заболеваний органов пищеварения. Улан-Удэ: БНЦ СО РАН, 2016. 280 с.
2. Kharratian D. et al. Gastrointestinal Diseases: Recent Research and Commentary (translated by Bochagov V.). Available at: [appliedkinesiology.ru/book/107](http://appliedkinesiology.ru/book/107) (accessed 06.07.2020).
3. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения 07.07.2020).
4. Лубсандоржиева П. Б., Ферубко Е. В., Даргаева Т. Д. Методологический подход к созданию многокомпонентных лекарственных растительных средств для лечения заболеваний органов пищеварения. *Традиционная медицина*. 2018;3:35–39.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
6. Боровиков В. П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Горячая линия. Телеком, 2014. 288 с.
7. Ферубко Е. В., Николаев С. М., Даргаева Т. Д. Результаты экспериментальных исследований растительного экстракта на модели токсического поражения печени в эксперименте на животных. *Традиционная медицина*. 2019;3:45–49.
8. Ferubko E. V., Nikolaev S. M., Pupykina K. A., Dargaeva T. D. Estimation of antiulcerous effect of multicomponent plant extract in experiment. *Yakut Medical Journal*. 2019;1:45–47.
9. Ferubko E. V., Nikolaev S. M., Dargaeva T. D., Rendyuk T. D. Correction of toxic liver damage with a multicomponent herbal extract in an animal experiment. *Pharmacognosy Journal*. 2020;1 2(1):168–172.
10. Николаев С. М. Фитофармакотерапия и фитофармакопрофилактика заболеваний. Улан-Удэ: БГУ, 2012. 286 с.

## REFERENCES

1. Lubsandorzhiyeva P.-N. B. Development and standardization of herbal medicines for the treatment and prevention of digestive diseases. Ulan-Udeh: BNC SO RAN, 2016. 280 p. (In Russ.).
2. Kharratian D. et al. Gastrointestinal Diseases: Recent Research and Commentary (translated by Bochagov V.). Available at: [appliedkinesiology.ru/book/107](http://appliedkinesiology.ru/book/107) (accessed 06.07.2020).
3. State Register of Medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (accessed 07.07.2020). (In Russ.).
4. Lubsandorzhiyeva P. B., Ferubko E. V., Dargaeva T. D. Methodological approach to the creation of multicomponent herbal medicines for the treatment of digestive diseases. *Tradicionnaya medicina = Traditional medicine*. 2018;3:35–39. (In Russ.).
5. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. M.: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.).
6. Borovikov V. P. A popular introduction to modern data analysis in the STATISTICA system. M.: Goryachaya liniya. Telekom, 2014. 288 p. (In Russ.).
7. Ferubko E. V., Nikolaev S. M., Dargaeva T. D. Results of experimental studies of plant extract on a model of toxic liver damage in an animal experiment. *Tradicionnaya medicina = Traditional medicine*. 2019;3:45–49. (In Russ.).
8. Ferubko E. V., Nikolaev S. M., Pupykina K. A., Dargaeva T. D. Estimation of antiulcerous effect of multicomponent plant extract in experiment. *Yakut Medical Journal*. 2019;1:45–47.
9. Ferubko E. V., Nikolaev S. M., Dargaeva T. D., Rendyuk T. D. Correction of toxic liver damage with a multicomponent herbal extract in an animal experiment. *Pharmacognosy Journal*. 2020;1 2(1):168–172.
10. Nikolaev S. M. Phytopharmacotherapy and disease phytopharmacoprophylaxis. Ulan-Udeh: BGU, 2012. 286 p. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>  
УДК 577.352.2; 615.4



Оригинальная статья/Research article

## Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индокарбазола

Б. Лугэнь<sup>1</sup>, М. В. Дмитриева<sup>2\*</sup>, О. Л. Орлова<sup>2</sup>, И. И. Краснюк<sup>1</sup>, И. И. Краснюк (мл.)<sup>1</sup>,  
Д. О. Боков<sup>1</sup>, О. И. Степанова<sup>1</sup>, А. В. Беляцкая<sup>1</sup>

1 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

2 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НИИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24

\*Контактное лицо: Дмитриева Мария Вячеславовна. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Б. Лугэнь – <https://orcid.org/0000-0002-7740-5562>; М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>;  
И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; И. И. Краснюк (мл.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>; Д. О. Боков – <https://orcid.org/0000-0003-2968-2466>;  
О. И. Степанова – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>; А. В. Беляцкая – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>.

Статья поступила: 20.04.2020. Статья принята в печать: 13.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** В ФГБУ «НИИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России синтезировано оригинальное N-гликозидное производное индокарбазола ЛХС-1269 с углеводным остатком ксилозы, характеризующееся высокой противоопухолевой активностью в отношении ряда перевиваемых асцитных и солидных опухолей в экспериментах *in vivo*. В связи с гидрофобными свойствами субстанции ЛХС-1269 для создания инъекционной лекарственной формы предложен метод ее солюбилизации путем инкапсулирования в фосфолипидные везикулы – липосомы.

**Цель.** Разработка состава модели липосомальной лекарственной формы для инъекционного введения производного индокарбазола ЛХС-1269.

**Материалы и методы.** Субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (ФХ, E PC S, Lipoid, Германия), холестерин ≥99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДСФА, Lipoid, Германия). Для приготовления фосфолипидных везикул применяли метод гидратации липидной пленки с последующей фильтрацией и экструзией. Анализ полученных липосом проводили с использованием метода спектрофотометрии, лазерной спектроскопии рассеяния, метода определения электрофоретической подвижности частиц и вискозиметрии.

**Результаты и обсуждение.** На основе липидных компонентов и активной субстанции в различных молярных соотношениях составляли композиции и получали экспериментальные модели липосомальной дисперсии. Составы оценивали по эффективности включения ЛХС-1269 в липосомы и физико-химическим показателям – вязкость дисперсии, распределение везикул по размеру и их дзета-потенциал. В результате анализа 7 исследуемых составов были определены оптимальные молярные соотношения компонентов лекарственной формы – ЛХС-1269/ФХ 1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДСФА 1:0,33:0,003. Использование данной композиции позволяет получить относительно стабильные (дзета-потенциал –33 мВ) однородные по размеру липосомы диаметром 190 нм с максимальным уровнем инкапсулирования активной субстанции 98 %.

**Заключение.** В результате проведенных технологических и химико-фармацевтических исследований разработан состав модели липосомальной лекарственной формы для инъекционного введения производного индокарбазола ЛХС-1269.

**Ключевые слова:** производное индокарбазола, липосомы, яичный фосфатидилхолин, лекарственная форма, молярное соотношение.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Б. Лугэнь, М. В. Дмитриева осуществили дизайн исследования, обзор публикаций, получение и анализ данных, написание текста рукописи. О. Л. Орлова, И. И. Краснюк сделали дизайн исследования, анализ данных, проверку конечной версии рукописи. И. И. Краснюк (мл.) подготовил рукопись и перевод. Д. О. Боков осуществил обзор публикаций. О. И. Степанова, А. В. Беляцкая сделали обзор публикаций, оформление рукописи.

**Для цитирования:** Лугэнь Б., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Боков Д. О., Степанова О. И., Беляцкая А. В. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индокарбазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):21–26. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>

## Development of a Liposomal Dosage Form based on Hydrophobic Derivative of Indolocarbazole

Bu Lugen<sup>1</sup>, Mariya V. Dmitrieva<sup>2</sup>, Olga L. Orlova<sup>2</sup>, Ivan I. Krasnyuk<sup>1</sup>, Ivan I. Krasnyuk (jr.)<sup>1</sup>,  
Dmitrij O. Bokov<sup>1</sup>, Olga I. Stepanova<sup>1</sup>, Anastasiya V. Belyackaya<sup>1</sup>

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 24, Kashirskoye sh., 115478, Moscow, Russia

\*Corresponding author: Mariya V. Dmitrieva. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Bu Lugen – <https://orcid.org/0000-0002-7740-5562>; Mariya V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Olga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>;  
Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>; Ivan I. Krasnyuk (jr.) – <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>; Dmitrij O. Bokov – <https://orcid.org/0000-0003-2968-2466>;  
Olga I. Stepanova – <https://orcid.org/0000-0002-9885-3727>; Anastasiya V. Belyackaya – <https://orcid.org/0000-0002-8214-4483>.

Received: 20.04.2020. Revised: 13.07.2020. Published: 28.08.2020

© Лугэнь Б., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Боков Д. О., Степанова О. И., Беляцкая А. В., 2020

© Lugen B., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Bokov D. O., Stepanova O. I., Belyackaya A. V., 2020

## Abstract

**Introduction.** An original N-glycoside derivative of indolocarbazole LHS-1269 with a carbohydrate xylose residue was synthesized at the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia. It is characterized by high antitumor activity against a number of transferable ascitic and solid tumors *in vivo* experiments. Due to the hydrophobic properties of the substance LHS-1269, a method of solubilization by encapsulation in phospholipid vesicles – liposomes is proposed for creating an injectable dosage form.

**Aim.** Development of the composition of a model of a liposomal dosage form for injection of an indolocarbazole derivative LHS-1269.

**Materials and methods.** Substance LHS-1269 (N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center Ministry of Health of Russia), egg phosphatidylcholine (PC, E PC S, Lipoid, Germany), cholesterol  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Japan), polyethylene glycol-2000-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-PE, Lipoid, Germany). To prepare phospholipid vesicles, the method of lipid film hydration with subsequent filtration and extrusion was used. The obtained liposomes were analyzed using the method of spectrophotometry, laser scattering spectroscopy, the method of determining the electrophoretic mobility of particles, and viscometry.

**Results and discussion.** On the basis of lipid components and active substance in various molar ratios, compositions were made and experimental models of liposomal dispersion were obtained. The compositions were evaluated based on the effectiveness of LHS-1269 incorporation into liposomes and physical and chemical parameters – dispersion viscosity, vesicle size distribution, and zeta-potential. As a result of the analysis of 7 studied compositions, the optimal molar ratios of the drug form components – LHS-1269/PC 1:160 and PC/cholesterol/PEG-PE 1:0.33:0.003 were determined. The use of this composition allows us to obtain relatively stable (zeta-potential  $-33$  mV) homogeneous liposomes with a diameter of 190 nm with a maximum level of encapsulation of the active substance of 98 %.

**Conclusions.** As a result of technological and chemical-pharmaceutical research, the composition of a model of a liposomal dosage form for injection of the indolocarbazole derivative LHS-1269 has been developed.

**Keywords:** indolocarbazole derivative, liposomes, egg phosphatidylcholine, dosage form, molar ratio.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Bu Lugen, Mariya V. Dmitrieva carried out research design, review of publications, obtaining and analyzing data, writing the text of the manuscript. Ol'ga L. Orlova, Ivan I. Krasnyuk made a research design, data analysis, verification of the final version of the manuscript. Ivan I. Krasnyuk (jr.) prepared the manuscript and translation. Dmitriy O. Bokov reviewed publications. Ol'ga I. Stepanova, Anastasiya V. Belyatskaya made a review of publications, manuscript design.

**For citation:** Lugen B., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Bokov D. O., Stepanova O. I., Belyackaya A. V. Development of a liposomal dosage form based on hydrophobic derivative of indolocarbazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):21–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

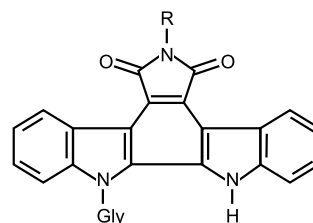
- КВП – количество включенного препарата.
- ЛВ – лекарственное вещество.
- ЛФ – лекарственная форма.
- СО – стандартный образец.
- ТРО – торможение роста опухоли.
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни.

## ВВЕДЕНИЕ

Повышение эффективности лечения онкологических больных – важнейшая социальная задача в России и во всем мире. Одним из подходов к решению этой задачи является разработка новых соединений, воздействующих на мишени (target), которые важны для выживания опухолевых клеток [1]. Среди таргетных препаратов особый интерес представляют производные индокарбазола, противоопухолевая активность которых может быть обусловлена различными механизмами действия, включая интеркаляцию ДНК, ингибирование ДНК-топоизомераз и протеинкиназ [2]. Большинство из этих соединений характеризуются наличием индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолового ядра с присоединенным сахаром [3].

В НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработан оригинальный метод синтеза N-гликозидов производных индокарбазола, позволяющий получать аналоги с различными углеводными остатками и/или модифицированным индокарбазольным агликоном. Данные вещества представляют собой производные малеимидаиндоло[2,3-а]

карбазола, в котором один из индольных атомов азота связан гликозидной связью с остатками различных моносахаров и содержат различные заместители по имидному атому азота (общая формула представлена на рисунке 1) [4].



**Рисунок 1.** Общая формула производных индокарбазола, где Gly – остатки пентоз и гексоз, R – представляет аминогруппу, бензамидогруппу, (пирид-2-ил)аминогруппу, ацетамидогруппу или карбамидогруппу [4]

**Figure 1.** The general formula of indolocarbazole derivatives, where Gly – the remains of pentose and hexose, R – the amino group, benzamidogroup, (pyrid-2-yl)amino group, acetamidogroup, or urea group [4]

В результате изучения противоопухолевой активности указанных соединений *in vivo* для дальнейших углубленных исследований было отобрано соединение ЛХС-1269 с углеводным остатком ксилозой. В отличие от ранее изученного структурного аналога ЛХС-1208, соединение ЛХС-1269 показало более высокий и длительный эффект торможения роста опухоли (ТРО), а также увеличение продолжительности

жизни (УПЖ) опытных животных. Противоопухолевая активность ЛХС-1269 на опухоли Эрлиха достигала 337 % УПЖ животных, на штамме лимфолейкоза P388 – 93 % УПЖ мышей; на раке толстого кишечника АКАТОЛ обнаружен непосредственный эффект 90 % ТРО, сохраняемый до 26-го дня на уровне 62 % в процессе наблюдения после окончания лечения; на раке шейки матки РШМ-5 для субстанции показан непосредственный эффект 80 % ТРО, сохраняемый на уровне 50 % до 15-го дня наблюдения [5, 6].

В связи с гидрофобными свойствами субстанции ЛХС-1269 для создания инъекционной лекарственной формы (ЛФ) во избежание включения органических растворителей в состав лекарственного препарата предложен метод ее солюбилизации путем инкапсулирования в наноструктурированные фосфолипидные везикулы – липосомы. Выбор липосом в качестве системы доставки для данного препарата обусловлен такими их положительными характеристиками, как повышение биодоступности гидрофобных веществ, увеличение терапевтической эффективности новых и широко применяемых противоопухолевых субстанций, в частности за счет повышения избирательности действия [7, 8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Препараты и реактивы:** субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (ФХ, E PC S, Lipoid, Германия), холестерин  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Япония, C8667), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ПЭГ-ДСФА, Lipoid, Германия), хлороформ (х.ч.), стабилизированный этанолом (Химмед, Россия), спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.18.

**Вспомогательные материалы для экстракции:** нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 диаметром 25 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия).

**Приборы и аппаратура:** весы электронные DL-120 (A&D Company Ltd., Япония); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); испаритель роторный Heidolph Hei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph Instruments, Германия); экструдер Lipex™ на 10 мл (Northern Lipids, Inc., Канада); ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия); спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, Австралия); дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания); вискозиметр Vibro Viscometer SV-10 (A&D Company Ltd., Япония).

**Получение липосом с ЛХС-1269.** Для получения липосом ЛХС-1269 использовали метод Бэнгхема с модификацией для гидрофобных веществ. К субстанции ЛХС-1269 добавляли соответствующий объем ацетона и помещали в УЗ-ванну на 5–10 мин для ускорения растворения. Липидные компоненты (ФХ, холестерин и ПЭГ-ДСФА) растворяли в хлороформе. Ацетоновый и

хлороформный растворы смешивали и переносили в круглодонную колбу. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе в условиях пониженного давления при температуре водяной бани  $+(37\pm 1)^\circ\text{C}$  до формирования равномерно распределенной на стенках колбы пленки. Липидную пленку досушивали под вакуумом (120–130 мбар) до полного удаления остатков ацетона и хлороформа, а затем гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии больших многослойных липосом с теоретической концентрацией активного вещества 0,3 мг/мл. Для уменьшения размера липосом ЛХС-1269 дисперсию последовательно экструдировали через нейлоновые мембраны с размером пор 1,2, 0,45 и 0,22 мкм.

**Определение среднего диаметра, индекса полидисперсности (PDI), дзета ( $\zeta$ )-потенциала липосом ЛХС-1269.** Анализ липосом по критериям размера и PDI проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния.  $\zeta$ -потенциал везикул определяли путем измерения их электрофоретической подвижности.

**Пробоподготовка.** Автоматической пипеткой отмеривали 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленной липосомальной дисперсии, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. Для определения размера, PDI и  $\zeta$ -потенциала липосом разведенный образец переносили в полистирольную кювету, которую помещали в ячейку дзетасайзера и проводили измерение данных показателей.

**Определение вязкости липосомальной дисперсии ЛХС-1269.** Значение динамической вязкости образцов липосомальной дисперсии ЛХС-1269, полученной после гидратации липидной пленки, определяли с использованием вибрационного вискозиметра Vibro Viscometer SV-10. Все измерения проводили в интервале температур от 21 до 25  $^\circ\text{C}$ . Для этого 10 мл липосомальной дисперсии помещали в кювету прибора и проводили измерение.

**Количественное определение ЛХС-1269 в липосомах.** Количественное содержание препарата в ЛФ определяли методом спектрофотометрии с использованием рабочего стандартного образца (СО) при  $\lambda 320 \pm 3$  нм. Компоненты, входящие в состав липосом, в этой области спектра практически не поглощают. Оптическую плотность спиртовых растворов липосомального ЛХС-1269 и СО измеряли относительно 95 % этилового спирта.

**Приготовление СО ЛХС-1269.** К навеске субстанции ЛХС-1269 1,0 мг добавляют 1 мл ДМСО и перемешивают до полного растворения. Раствор переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят спиртом до метки, 4 мл данного разведения отбирают в колбу вместимостью 25 мл и доводят спиртом до метки. Полученный раствор применяют свежеприготовленным.

**Приготовление раствора исследуемого образца липосом.** В мерную колбу объемом 50 мл помещают 1 мл липосомальной дисперсии ЛХС-1269, добавляют небольшое количество спирта, перемешивают и доводят спиртом до метки.

**Определение степени включения ЛХС-1269 в липосомы.** В связи с тем, что ЛХС-1269 является гидрофобным веществом и при получении липосом включается непосредственно в липидный бислой, количество включенного препарата (КВП) определяли как соотношение концентрации препарата в липосомальной дисперсии после экструзии к концентрации ЛХС-1269 в дисперсии, полученной после гидратации липидной пленки. Показатель выражали в процентах:

$$\text{КВП} = C_{\phi} / C_n,$$

где КВП – количество включенного препарата, %;  $C_{\phi}$  – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после фильтрации, мг/мл;  $C_n$  – концентрация ЛХС-1269 в дисперсии после гидратации, мг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особая роль в обеспечении надлежащей терапевтической эффективности, биодоступности и биоэквивалентности принадлежит ЛФ, ее составу и технологии производства. Знание технологических факторов, изучение характера их влияния на свойства продукта является необходимым элементом современной фармацевтической разработки. Открытие биофармацевтического значения ЛФ, ее определяющей роли в обеспечении терапевтической эффективности лекарственного препарата послужило отправной точкой для развития особого направления фармацевтической технологии, посвященного созданию систем доставки лекарств, среди которых ведущее место занимают липосомы [9].

Первоначальный этап создания ЛФ на основе липосом, в частности для инъекционного введения, включает в себя комплекс исследований по выбору приемлемого состава для получения качественного продукта. В качестве базового компонента, формирующего липосомальный бислой, применяли натуральный фосфолипид животного происхождения – яичный ФХ. Фосфатидилхолины являются одними из самых распространенных молекул клеточных мембран, они нетоксичны, биосовместимы и биodeградируемы. Для повышения стабильности липосомальной конструкции путем увеличения жесткости и механической устойчивости липидного бислоя в модельные составы добавляли холестерин. С целью предотвращения опсонизации и поглощения липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы в состав липосом вводили фосфатидилэтаноламин, конъюгированный с гидрофильным полимером, – ПЭГ-ДГФА. Известно, что липосомы, содержащие холестерин и пегилированные липиды, сохраняют свой размер в биологической жидкости (сыворотке) и физическую стабильность [10].

Важно, чтобы липосомы содержали максимальное возможное количество активного компонента и обладали оптимальными для терапии размерами (не более 200–220 нм) [11]. Для решения этих задач необходимо было определить оптимальные молярные от-

ношения активного вещества к фосфолипиду и липидных компонентов, входящих в состав липосомальной конструкции.

Молярные соотношения липидных композиций липосом подбирали экспериментально с учетом гидрофобных свойств лекарственного вещества (ЛВ) и данных по разработке липосом аналогичного по структуре производного индокарбазола ЛХС-1208 [12], а также воспроизводимости технологического процесса получения стабильного продукта. В ходе исследования было проанализировано 7 экспериментальных моделей составов липосомального ЛХС-1269 с различными молярными соотношениями компонентов (таблица 1). Полученные образцы липосомальной дисперсии оценивали по критическим показателям – включение ЛВ в липосомы (КВП), вязкость липосомальной дисперсии, размеры и  $\zeta$ -потенциал липосом, PDI.

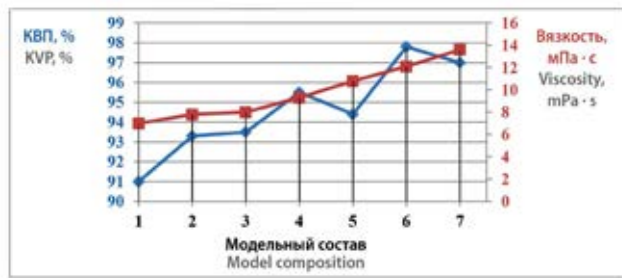
Таблица 1. Модельные составы липосомальной ЛФ ЛХС-1269

Table 1. Model compositions of liposomal dosage form LHS-1269

Состав Composition	Молярное соотношение Molar ratio		Общая концентрация липидов в дисперсии, мг/мл The total concentration of lipids in the dispersion, mg/ml
	ЛХС-1269/ФХ LHS-1269/PC	ФХ/холестерин/ ПЭГ-ДГФА PC/cholesterol/ PEG-PE	
1	1:150	1:0,1:0,003	64,2
2		1:0,2:0,003	67,2
3		1:0,33:0,003	71,2
4	1:160	1:0,2:0,003	71,6
5		1:0,2:0,004	71,8
6		1:0,33:0,003	75,8
7	1:170	1:0,2:0,003	76,0

Поскольку исследуемое ЛВ является гидрофобным веществом, эффективность его включения в липосомальный бислой определяется, в первую очередь, концентрацией фосфолипида, который связывает активное соединение и удерживает внутри липосомы, то есть соотношением ЛХС-1269/ФХ. Так, при снижении отношения ЛВ к фосфолипиду от 1:150 до 1:170 в составах 2, 4 и 7 соответственно, отмечалось зависящее повышение уровня включения ЛХС-1269 – от 93,5 до 97,0 % (рисунок 2). Однако из представленных результатов также видно, что на эффективность инкапсуляции гидрофобного вещества в липосомы значительно влияет количественное соотношение липидных компонентов бислоя – ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА. Увеличение доли холестерина в липосомальной мембране способствует повышению стабильности ее структуры и, как следствие, удерживанию ЛВ внутри везикулы. Например, повышение концентрации холестерина до 25 % от общего содержания липидов (состав 6) позволило получить липосомы, характеризующиеся значением КВП около 98 %. В то же время более высокое содержание ПЭГ-ДГФА в композиции (состав 5) приве-

ло к снижению уровня включения ЛХС-1269, что вероятно обусловлено частичным вытеснением ЛВ из мест связывания в бислое пегилированным липидом.



**Рисунок 2.** Уровень включения ЛХС-1269 в липосомы и вязкость липосомальной дисперсии при приготовлении с использованием модельных составов

**Figure 2.** The level of inclusion of LHS-1269 in liposomes and the viscosity of liposomal dispersion when prepared using model formulations

Для ЛФ также важным является возможность ее инъекционного введения (injectability), что напрямую связано с динамической вязкостью неньютоновских жидкостей. Однако вязкость важна не только как паспортная характеристика готового препарата, но и как характеристика промежуточных продуктов на этапах получения, которая определяет возможности технологического процесса [13]. В результате исследования установлено, что вязкость дисперсии ЛХС-1269 коррелирует с общей концентрацией липосомальных липидов, и ее значения находятся в пределах от 7,0 до 13,6 мПа·с.

Согласно данным таблицы 2, независимо от соотношения ЛХС-1269/ФХ и липидов в липосомальной мембране средний диаметр практически всех модельных липосом не превышает заявленный размер везикул 220 нм, а значения PDI составляют менее 0,3, что свидетельствует об узком распределении частиц по размеру [14]. Исключение представляет состав 5 с более высоким содержанием ПЭГ-ДГФА – диаметр везикул составил 236±15 нм. Кроме того, по результатам анализа измерения электрофоретической подвижности приготовленные по исследуемым составам липосомы ЛХС-1269 имели относительно высокий отрицательный заряд, причем наибольшее значение ζ-потенциала отмечено для 6-й композиции –33,0 мВ. Традиционно абсолютное значение ζ-потенциала выше 30 мВ считается высоким и может вызывать сильное электростатическое отталкивание везикул, улучшая стабильность липосомальной системы.

Таким образом, в результате обобщения полученных данных из исследуемых составов выбрана композиция 6 с молярным соотношением ЛХС-1269/ФХ = 1:160 и ФХ/холестерин/ПЭГ-ДГФА = 1:0,33:0,003, которая обеспечивает включение ЛХС-1269 на уровне 98 % и приемлемые физико-химические характеристики.

**Таблица 2.** Средние значения PDI, размера и ζ-потенциала липосом ЛХС-1269

**Table 2.** Average values of PDI, size and ζ-potential of LHS-1269 liposomes

Состав Composition	Размер липосом, нм Liposome size, nm	PDI	ζ-потенциал липосом, мВ ζ-potential of liposomes, mV
1	208 ± 12	0,297 ± 0,021	-(25,0 ± 1,5)
2	191 ± 9	0,206 ± 0,012	-(27,0 ± 2,4)
3	192 ± 14	0,283 ± 0,015	-(26,0 ± 1,8)
4	197 ± 12	0,239 ± 0,024	-(24,3 ± 2,1)
5	236 ± 15	0,105 ± 0,013	-(27,9 ± 1,8)
6	190 ± 11	0,172 ± 0,016	-(33,0 ± 2,5)
7	190 ± 10	0,185 ± 0,019	-(28,1 ± 2,2)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных фармацевтических исследований разработан состав модели липосомальной ЛФ для инъекционного введения нового оригинального производного индолокарбазола ЛХС-1269. С учетом гидрофобных свойств исследуемого соединения определены оптимальные соотношения ЛХС-1269/ФХ (1:160) и липидных компонентов липосомальной конструкции (1:0,33:0,003), обеспечивающие приемлемые показатели качества полученных везикул. При приготовлении липосомальной дисперсии с использованием указанных соотношений достигается максимальный уровень включения субстанции ЛХС-1269 в липосомы – 98 %, при этом средний размер получаемых везикул составляет около 190 нм с шириной распределения 0,172 и значением поверхностного заряда частиц –33 мВ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Деженкова Л. Г., Цветков В. Б., Штиль А. А. Ингибиторы топоизомераз I и II: химическая структура, механизмы действия и роль в химиотерапии опухолей. *Успехи химии*. 2014;83(1):82–94.
2. Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a Novel Indolocarbazole as Histone Deacetylases Inhibitor against Leukemia Cell Lines. *J Anal Methods Chem*. 2015;675053:1–9. Doi: 10.1155/2015/675053.
3. Sánchez C., Zhu L., Braña A. F. et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102(2):461–466. Doi: 10.1073/pnas.0407809102.
4. Мельник С. Я., Власенкова Н. К., Гараева Л. Д. и др. Способ получения N-гликозидов производных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2427585 от 10.12.2009 г.
5. Яворская Н. П., Голубева И. С., Эктова Л. В. и др. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):125–126.
6. Голубева И. С., Еремина В. А., Моисеева Н. И. и др. Производное класса n-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов – n-[12-(β-d-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил]пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2667906.
7. Санарова Е. В., Полозкова А. П., Меерович И. Г. и др. Влияние технологических факторов на качество липосомальной лекарственной формы нового фотосенсибилизатора – тиосенса. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(12):32–36.
8. Дмитриева М. В., Оборотова Н. А., Санарова Е. В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2012;11(4):21–27.

9. Быковского С. Н., Василенко И. А., Деминой Н. Б. и др., ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо, 2015. 472 с.
10. Foteini P., Pippa N., Naziris N., Demetzos C. Physicochemical study of the protein-liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(4):313–321. Doi: 10.1080/08982104.2018.1468774.
11. Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. *Вестник РАМН*. 2012;67(3):23–30.
12. Гулякин И. Д., Хашем А., Николаева Л. Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(2):55–60.
13. Вискозиметр в кармане – это реальность... *Лаборатория и производство*. 2018;4:52–53.
14. Zweers M. L., Grijpma D. W., Engbers G. H., Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2003;66:559–66.
5. Yavorskaya N. P., Golubeva I. S., Ektova L. V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2016;15(1):125–126 (In Russ.).
6. Golubeva I. S., Eremina V. A., Moiseeva N. I. et al. A derivative of the class of n-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-5,7-diones – n-{12-(β-d-xylopyranosyl)-5,7-dioxo-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-6-yl}pyridine-2-carboxamide, which has cytotoxic and antitumor activity. Patent Russia No. 2667906 (In Russ.).
7. Sanarova E. V., Polozkova A. P., Meerovich I. G. et al. Influence of technological factors on quality of liposomal form of new photosensitizer tiogens. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2011;45(12):32–36. (In Russ.).
8. Dmitrieva M. V., Oborotova N. A., Sanarova E. V. et al. Nanostructured delivery systems anti-drugs. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2012;11(4):21–27 (In Russ.).
9. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B. et al., ed. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Scientific and practical guidance for the pharmaceutical industry. Moscow: Pero, 2015. 472 p. (In Russ.).

## REFERENCES

1. Dezhenkova L. G., Tsvetkov V. B., Shtil A. A. Topoisomerase I and II inhibitors: chemical structure, mechanisms of action and role in tumor chemotherapy. *Uspekhi Khimii*. 2014;83(1):82–94. (In Russ.).
2. Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a Novel Indolocarbazole as Histone Deacetylases Inhibitor against Leukemia Cell Lines. *J Anal Methods Chem*. 2015;675053:1–9. Doi: 10.1155/2015/675053.
3. Sánchez C., Zhu L., Braña A. F. et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102(2):461–466. Doi: 10.1073/pnas.0407809102.
4. Melnik S. Ya., Vlasenkova N. K., Garayeva L. D. et al. Method for producing n-glycosides derived from indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-C]carbazole-5,7-diones with cytotoxic and antitumor activity. Patent Russia No. 2427585 dated 10.12.2009 (In Russ.).
11. Baryshnikov A. Yu. Nanostructured liposomal systems as transport agents for anticancer drugs. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012;67(3):23–30 (In Russ.).
12. Gulyakin I. D., Hashem A., Nikolaeva L. L. et al. The development of new technology of the dosage form for intravenous administration indolocarbazole derivative LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2016;15(2):55–60 (In Russ.).
13. The viscometer in your pocket is reality... *Laboratory and production*. 2018;4:52–53 (In Russ.).
14. Zweers M. L., Grijpma D. W., Engbers G. H., Feijen J. The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2003;66:559–66.

# XII Международная конференция «Что происходит на фармацевтическом рынке?»

14 сентября 2020 г., Radisson Collection Hotel, Москва

## ГЛАВНЫЕ ТЕМЫ:

### **КОМУ АПОКАЛИПСИС, А КОМУ НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ?**

Новая реальность фармацевтического рынка России. Анализ постпандемийной ситуации. Как пандемия изменила спрос на лекарства? Перспективы завершения 2020 года и прогнозы на 2021

### **КОРРЕКТИРОВКА ЦЕЛЕЙ:**

повлияла ли ситуация с пандемией на стратегию ФАРМА2030, будут ли корректироваться ее цели и задачи?  
Как государство поддерживает фармацевтическую отрасль?

### **СМЕНА ПАРАДИГМЫ:**

новые рынки, новые поставщики, новые каналы и форматы сбыта

### **НАЦИОНАЛЬНАЯ ПОДУШКА БЕЗОПАСНОСТИ.**

Производство субстанций в России — шаги к импортонезависимости

### **ЦЕНА ВОПРОСА:**

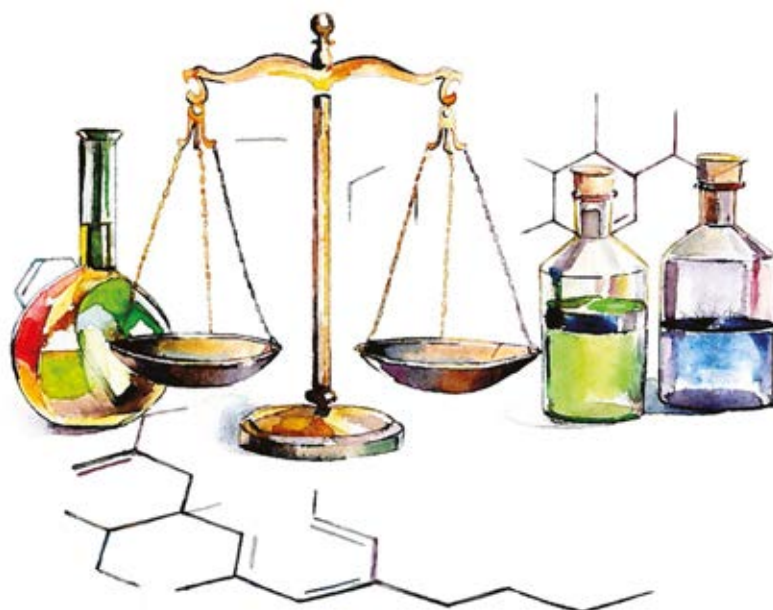
перерегистрация цен и новая методика ценообразования — поправки к правилам и меры, позволяющие обеспечить рентабельность производства лекарственных препаратов

### **ЗОНА НАПРЯЖЕННОСТИ:**

легализация параллельного импорта — плюсы и минусы

### **ОЧЕВИДНАЯ ВЕРОЯТНОСТЬ:**

поможет ли цифровая трансформация выйти из кризиса и найти точки роста?





Оригинальная статья/Research article

## Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии

Т. А. Биткина<sup>1,2\*</sup>, А. В. Басевич<sup>1</sup>, В. М. Родин<sup>3</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

2 – ООО «Фарма Ген», 194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4А

3 – ООО «Сфера-Спектр», 195027, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Пороховская, д. 7А

\***Контактное лицо:** Биткина Татьяна Александровна. **E-mail:** [tatiana.bitkina@pharminnotech.com](mailto:tatiana.bitkina@pharminnotech.com)

**ORCID:** Т. А. Биткина – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; В. М. Родин – <https://orcid.org/0000-0001-9399-0979>.

**Статья поступила:** 20.05.2020. **Статья принята в печать:** 21.08.2020. **Статья опубликована:** 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Насыщаемые полимерные микросферы представляют собой одну из передовых разработок в области химиоэмболизации. В связи со сложным многоэтапным производством на российском рынке представлены в основном зарубежные производители данных изделий, что может свидетельствовать об актуальности изучения данной тематики.

**Цель.** Целью работы была разработка технологической схемы производства полимерных микросфер и описание критических контрольных точек производства.

**Материалы и методы.** Исследование полупродукта осуществлялось при помощи микроскопа Levenhuk D320L (Levenhuk Inc., США). Анализ контрольных точек производства проводился методом ХАССП (НАССР (Hazard analysis and critical control points)).

**Результаты и обсуждения.** В результате исследования выявлены и описаны основные технологические стадии производства микросфер, представляющих собой сополимер винилового спирта и акрилата натрия. Для каждой технологической стадии определены контрольные критические точки с указанием контролируемых параметров и методов контроля. Приведены фотографии полупродукта на промежуточных стадиях.

**Заключение.** Разработана технологическая схема производства микросфер. Проведен анализ критических контрольных точек стадий основного процесса производства. Выявлены необратимые критические точки производства.

**Ключевые слова:** полимерные микросферы, критические точки, технологическая схема, эмболизация, эмболизирующий материал, химиоэмболизация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Т. А. Биткина, А. В. Басевич – авторы идеи. Т. А. Биткина – разработка технологической схемы производства полимерных микросфер. Т. А. Биткина, В. М. Родин – определение и анализ контрольных критических точек производства микросфер. В. М. Родин – получение и физико-химический анализ микросфер. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность компании ООО «Фарма Ген» в лице директора Александра Александровича Резяпкина за содействие при проведении исследований.

**Для цитирования:** Биткина Т. А., Басевич А. В., Родин В. М. Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):28–35. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35>

## Critical Points for the Production of Polymeric Microspheres Used in X-Ray Surgery

Tatyana A. Bitkina<sup>1,2\*</sup>, Anna V. Basevich<sup>1</sup>, Viktor M. Rodin<sup>3</sup>

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – LLC «Pharma Gene», 4A, Tikhoretsky av., Saint-Petersburg, 194064, Russia

3 – LLC «Sfera-Spektr», 7A, Bolshaya Porokhovskaya str., Saint-Petersburg, 195027, Russia

\***Corresponding author:** Tatyana A. Bitkina. **E-mail:** [tatiana.bitkina@pharminnotech.com](mailto:tatiana.bitkina@pharminnotech.com)

**ORCID:** Tatyana A. Bitkina – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; Anna V. Basevich – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; Viktor M. Rodin – <https://orcid.org/0000-0001-9399-0979>.

**Received:** 20.05.2020. **Revised:** 21.08.2020. **Published:** 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Saturated polymer microspheres represent one of the leading developments in the field of chemoembolization. Due to the complicated multi-stage production in the Russian market, mainly foreign manufacturers of these products are represented, which may indicate the relevance of studying this topic.

**Aim.** The aim of the work was to develop a technological scheme for the production of polymer microspheres and a description of critical control points of production.

**Materials and methods.** The study of the intermediate product was carried out using a Levenhuk D320L microscope (Levenhuk Inc, USA). Analysis of production control points was carried out by the HACCP (Hazard analysis and critical control points) method.

**Results and discussion.** As a result of the study, the main technological stages of the production of microspheres, which are a copolymer of vinyl alcohol and sodium acrylate, have been identified and described. For each technological stage, control critical points are determined with an indication of the controlled parameters and control methods. The photographs of the intermediate product at intermediate stages are shown.

**Conclusion.** A technological scheme for the production of microspheres has been developed. The analysis of critical control points of the stages of the main production process is carried out. Identified irreversible critical points of production.

**Keywords:** polymer microspheres, critical points, flow chart, embolization, embolizing material, chemoembolization.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – authors of the idea. Tatyana A. Bitkina – development of a technological scheme for the production of polymer microspheres. Tatyana A. Bitkina, Viktor M. Rodin – determination and analysis of control critical points for the production of microspheres. Viktor M. Rodin – preparation and physico-chemical analysis of microspheres. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to the Pharma Gene LLC company represented by the director Aleksander Aleksandrovich Rezyapkin for assistance in conducting research.

**For citation:** Bitkina T. A., Basevich A. V., Rodin V. M. Critical points for the production of polymeric microspheres used in X-Ray surgery. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):28–35. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35>

## ВВЕДЕНИЕ

Транскатетерная артериальная химиоэмболизация является широко применяемым методом для лечения неоперабельных опухолевых процессов [1]. В основе химиоэмболизации лежит процесс локального введения в артерии эмболического материала, насыщенного противоопухолевым лекарственным средством [2]. Выделяют два основных метода: *масляная химиоэмболизация и химиоэмболизация микросферами*.

Масляные рентгеноконтрастные препараты представляют собой сложные эфиры жирных кислот. В настоящее время широко применяется Липидол®, представляющий собой йодированный сложный эфир, получаемый из масла маковых зерен [3, 4]. Процедура с использованием данных препаратов позволяет поддерживать достаточно высокие концентрации химиопрепарата в опухоли, но лекарственное средство удерживается носителем непродолжительное время (до нескольких часов), кроме того, такие препараты не способны вызывать длительную или необратимую эмболизацию сосудов и нередко тяжело переносятся пациентами, вызывая сильные боли [1, 5].

Одной из последних разработок в области химиоэмболизации стали насыщаемые микросферы. Известные микросферы отрицательно заряжены и могут поглощать различные лекарственные средства с помощью таких механизмов, как ионный обмен или абсорбция. Данный вид эмболического материала позволяет доставить препарат к опухоли, произвести окклюзию сосудов и обеспечить продолжительное контролируемое высвобождение препарата при минимальном выбросе в системный кровоток [6]. По сравнению с масляными эмболическими материалами полимерные микросферы способны высвобождать лекарственное средство в течение длительного времени (не менее месяца), вместе с этим обеспечивая

полное прекращение кровоснабжения злокачественного новообразования [1, 3, 4, 7].

В связи с многоэтапным и сложным процессом производства микросфер в данный момент на Российском рынке представлено всего несколько зарегистрированных изделий. В основном это импортные эмболизирующие микросферы, которые производятся во Франции, Великобритании и США, и только один производитель является отечественным [8].

**Цель настоящего исследования** – разработка технологической схемы производства полимерных микросфер и описание критических контрольных точек производства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стали полимерные микросферы, представляющие собой сополимер винилового спирта и акрилата натрия. Исследование полупродукта на контрольных точках осуществлялось при помощи микроскопа Levenhuk D320L (Levenhuk Inc., США). Анализ контрольных точек производства проводился методом ХАССП (НАССР (Hazard analysis and critical control points)). Согласно Серии технических отчетов ВОЗ № 908 (2003 г.) ХАССП является систематизированным методом выявления, оценки и контроля рисков. Главная концепция данного метода заключается в обеспечении безопасности фармацевтических препаратов [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап исследования заключался в разработке и анализе технологической схемы производства микросфер (рисунок 1). Далее были определены критические стадии. На технологической схеме они обозначены серым цветом.

На втором этапе были определены критические контрольные точки производства стадий основного технологического процесса (таблица 1).

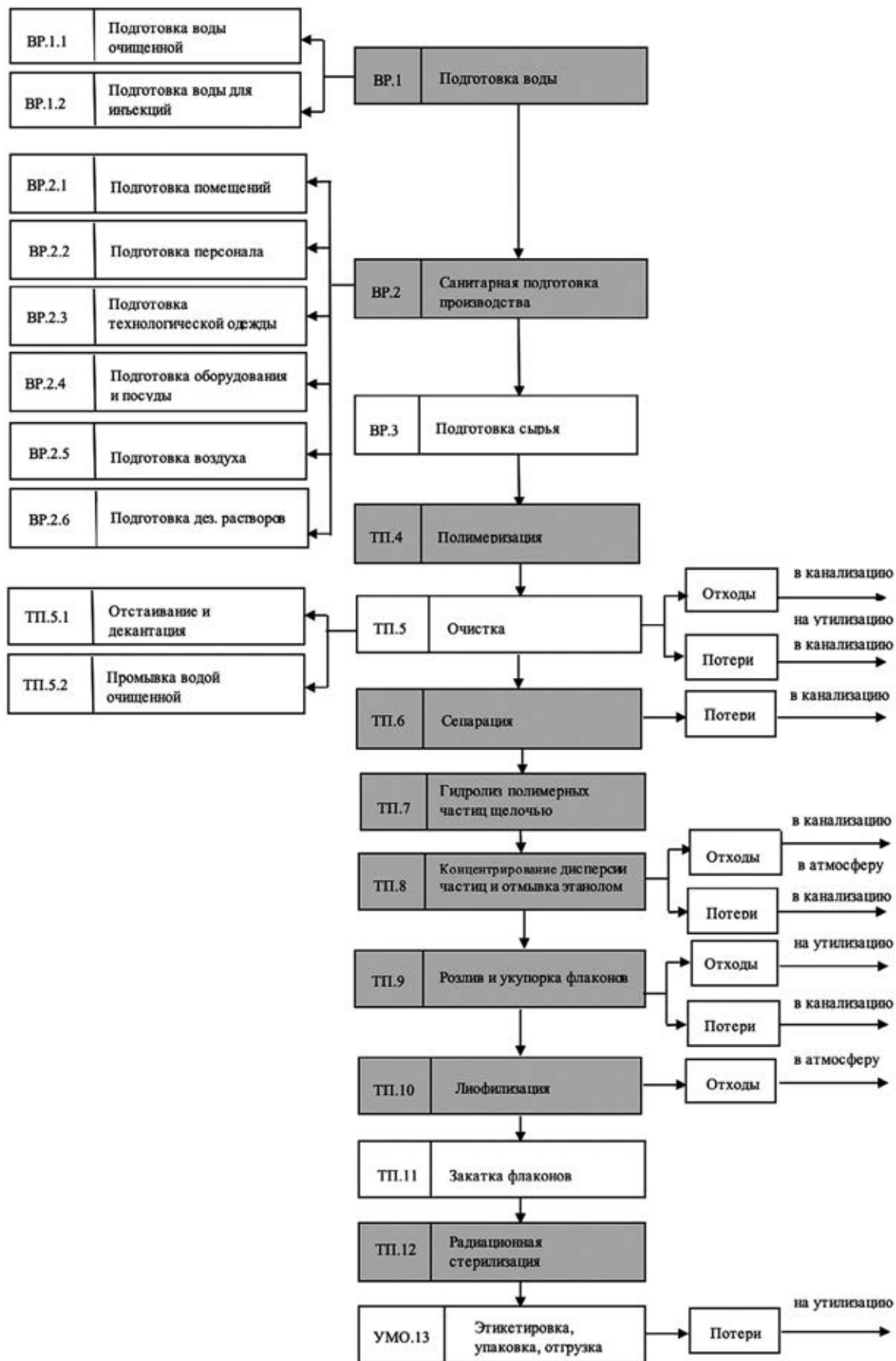


Рисунок 1. Технологическая схема производства микросфер

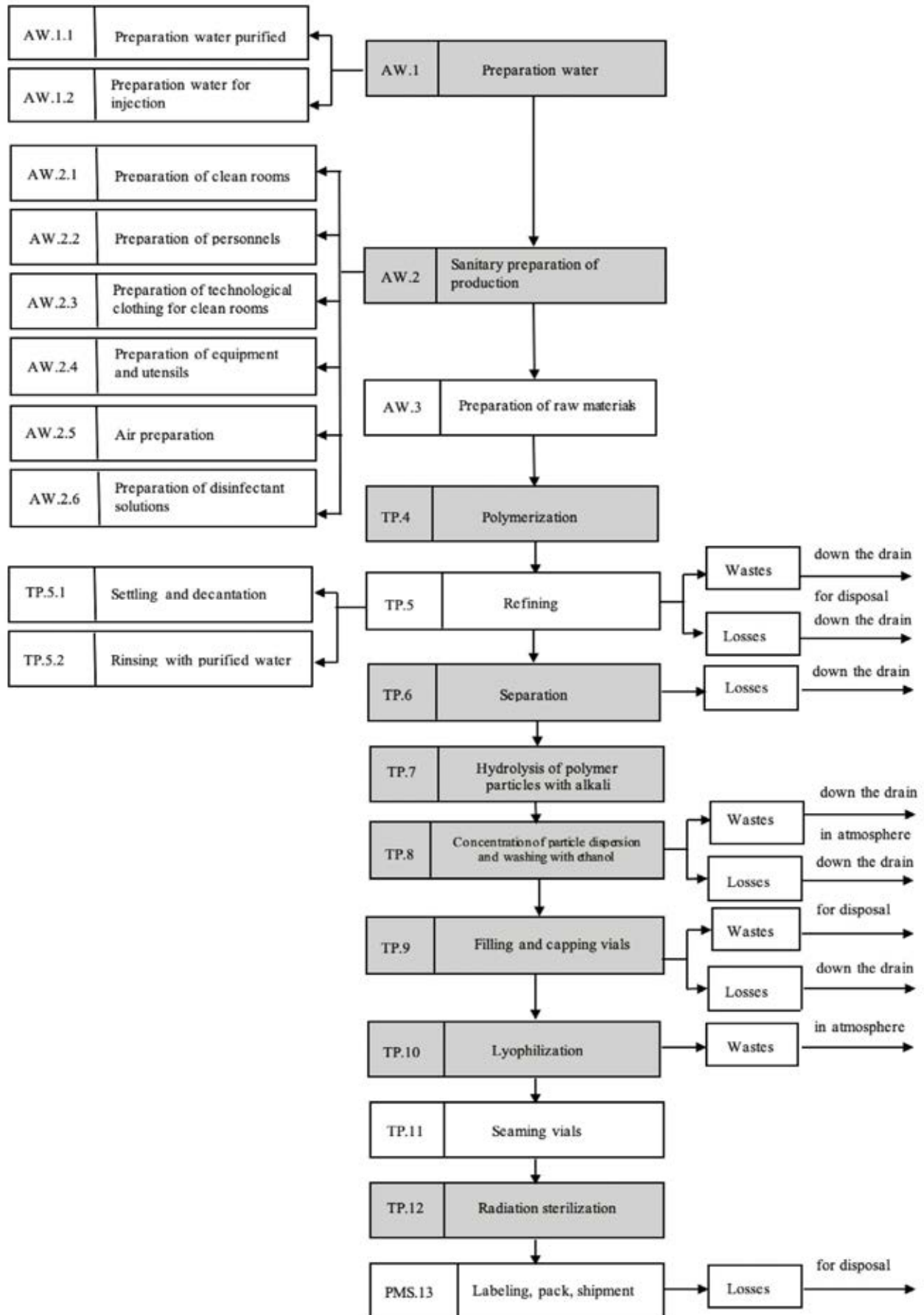


Figure 1. The technological scheme of the production of microspheres

Таблица 1. Критические контрольные точки стадий основного процесса производства микросфер

Table 1. Critical milestones in the stages of the main microsphere manufacturing process

Наименование операции Stage or operation name	Критические контрольные точки Critical control point	Значения контролируемых параметров Values of monitored parameters	Методы контроля Control methods
ТП.4 «Полимеризация» TP.4 «Polymerization»	Температура реакционной массы Reaction mass temperature	68–72 °C	Контактная термометрия Contact thermometry
	Скорость перемешивания Stirring speed	В соответствии с технической спецификацией In accordance with technical specification	Контроль при помощи датчика мешалки Control by stirrer sensor
	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц, частицы не слипаются между собой Spherical shape, particle integrity, particles do not stick together	Микроскопия Microscopy
ТП.6 «Сепарация» TP.6 «Separation»	Размер частиц Particle size	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Микроскопия Microscopy
ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» TP.7 «Hydrolysis of polymer particles with alkali»	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Размер частиц Particle size	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	
ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» TP.8 «Concentration of the dispersion of particles and washing with ethanol»	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Внешний вид частиц Particle appearance	Частицы не слипаются между собой, отсутствуют побочные продукты синтеза Particles do not stick together, there are no synthesis by-products	
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry
ТП.9 «Розлив и укупорка флаконов» TP.9 «Filling and capping vials»	Объем наполнения Filling volume	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Калиброванный шприц Calibrated syringe
ТП.10 «Лиофилизация» TP.10 «Lyophilization»	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry
ТП.12 «Радиационная стерилизация» TP.12 «Radiation sterilization»	Стерильность Sterility	Стерильность Sterility	В соответствии с ГФ XIV According SP XIV
	Пирогенность Pyrogenicity	Апирогенность Apyrogenicity	В соответствии с ГФ XIV According SP XIV
	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry

На стадии ТП.4 «Полимеризация» в течение всего синтеза контролируют температуру и скорость перемешивания реакционной массы, состоящей из винилацетата, метилакрилата и диакрилатдиола [10],

поскольку эти факторы напрямую влияют на форму образующихся частиц и их размер.

Температура реакционной массы не должна превышать температуру кипения мономеров, участвую-

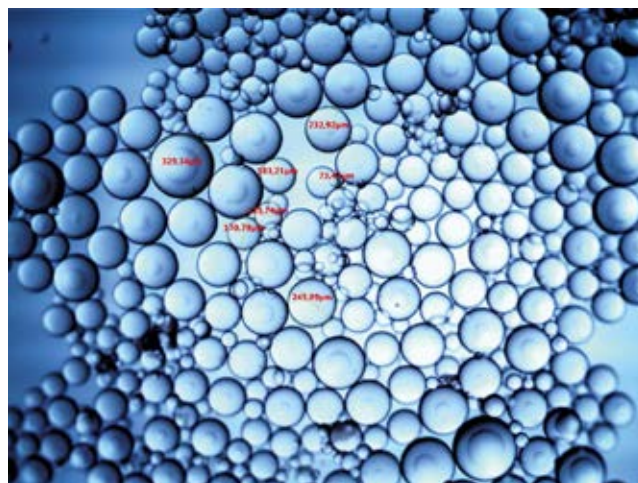
щих в синтезе. При несоблюдении данного параметра и, соответственно, закипании хотя бы одного из мономеров, образующиеся частицы будут иметь пористую неоднородную структуру. При продолжительном отклонении температуры реакционная масса на выходе из стадии может представлять собой слипшийся агломерат. Поскольку самым легкокипящим мономером в исследуемом способе получения микросфер является винилацетат, значение температуры реакционной массы не должно превышать 72 °С. При температуре ниже 68 °С снижается скорость разложения инициатора, что приводит к низкому выходу конечного продукта.

Реакционная масса представляет собой эмульсию смеси мономеров и инициатора в воде, скорость перемешивания которой влияет на размер образующихся капель и, следовательно, размер образующихся микросфер. Чем выше скорость перемешивания, тем меньше размер частиц и наоборот. Однако в случае слишком медленного перемешивания капли могут не образовываться, вследствие чего не образуются и микросферы.

В результате синтеза получают водную дисперсию смеси полимерных частиц, содержащих функциональные сложноэфирные группы, в широком размерном диапазоне и побочных продуктов реакции полимеризации [10]. В конце синтеза осуществляют контроль внешнего вида полимерных частиц (рисунок 2).

На стадии ТП.5 «Очистка» осуществляют очистку продукта сополимеризации от непрореагировавших мономеров и вспомогательных веществ путем отстаивания с последующей промывкой водой очищенной [10].

На стадии ТП.6 «Сепарация» производят разделение микросфер по размерным диапазонам при помощи металлических калиброванных сит. В конце данной стадии каждый размерный ряд методом мик-

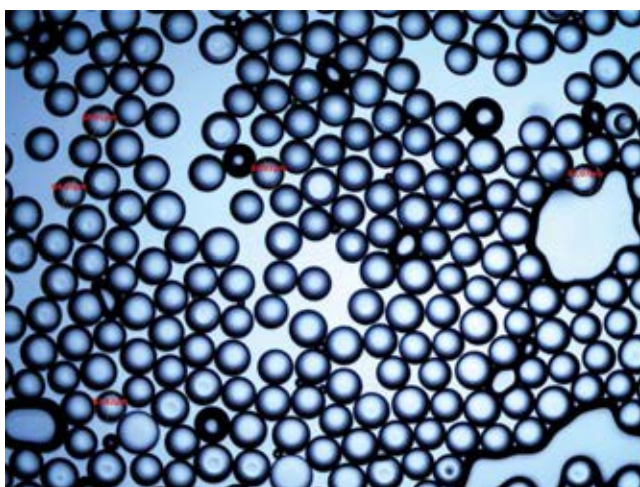


**Рисунок 2.** Микросферы, полученные на стадии ТП.4 «Полимеризация»

**Figure 2.** Microspheres obtained at the stage of TP.4 «Polymerization»

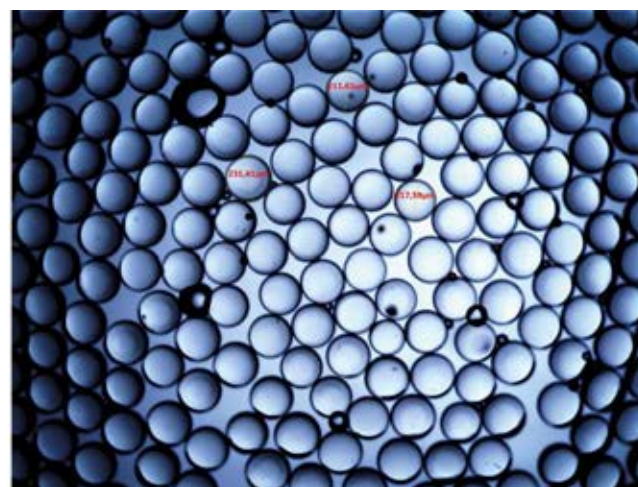
роскопии контролируют на наличие слишком мелких и слишком крупных частиц. После чего выборочно определяют размер частиц при помощи программного обеспечения микроскопа (рисунок 3). При обнаружении частиц, не соответствующих размерному ряду, сепарацию проводят повторно.

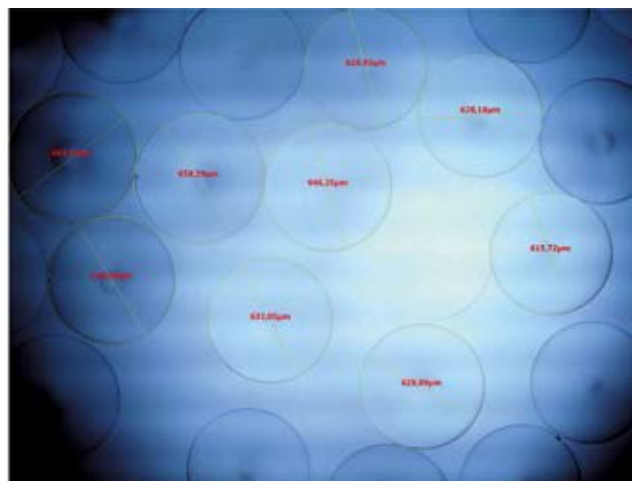
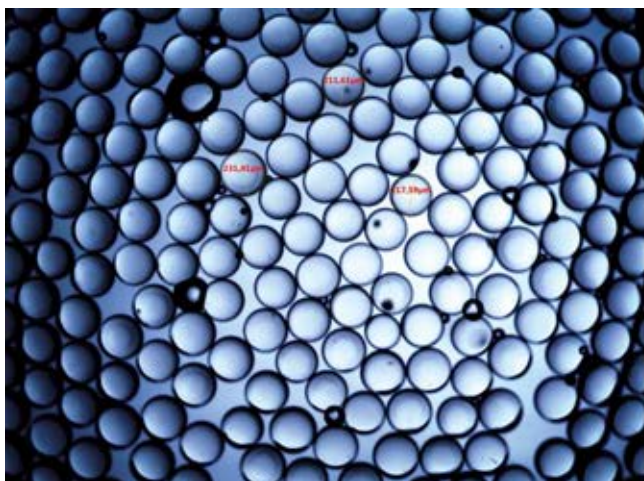
На стадии ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» сложноэфирные группы микросфер переводят в функциональные карбоксилатные группы в солевой форме, что обеспечивает дальнейшую возможность насыщения микросфер лекарственным препаратом [10]. В конце стадии осуществляют контроль внешнего вида частиц и степень их насыщенности раствором хлорида натрия (рисунок 4). При насыщении микросферы должны увеличиваться в диаметре в 3–4 раза и становиться эластичными. Если гидролиз прошел частично, насыщенность микросфер снижается, как следствие рабочий раз-



**Рисунок 3.** Микросферы, полученные на стадии ТП.6 «Сепарация»

**Figure 3.** Microspheres obtained at TP.6 «Separation stage»



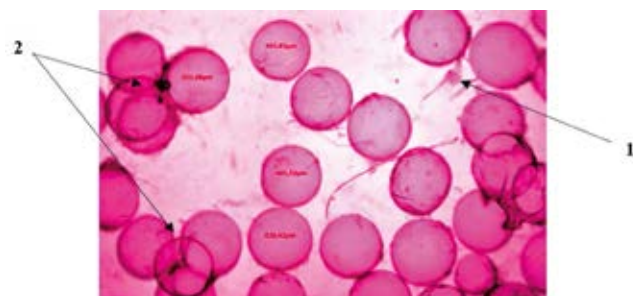


**Рисунок 4.** Микросферы, полученные на стадии ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» (слева – до насыщения раствором хлорида натрия; справа – после насыщения раствором хлорида натрия)

**Figure 4.** Microspheres obtained at the stage TP.7 «Hydrolysis of polymer particles with alkali» (on the left – before saturated with sodium chloride solution; on the right – after saturation with sodium chloride solution)

мер (размер микросфер в насыщенном состоянии) не соответствует требованиям нормативной документации.

На стадии ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» производят отмывку микросфер от избытка щелочи и продуктов гидролиза. На выходе получают этанольную дисперсию микросфер [10]. При помощи микроскопии контролируют качество отмывки, внешний вид микросфер и равномерность их насыщаемости доксорубицином. При недостаточной очистке доксорубицин окрашивает не только микросферы, но и загрязнения органического характера (поз. 1, рисунок 5). При наличии органических загрязнений микросферы могут слипаться между собой, образуя агломераты (поз. 2, рисунок 5).



**Рисунок 5.** Недостаточная очистка микросфер

**Figure 5.** Inadequate microsphere cleaning

Далее контролируют сорбционную емкость микросфер при помощи спектрофотометрии. При недостаточной очистке органические загрязнения абсорбируют часть лекарственного средства, вследствие чего сорбционная емкость микросфер снижается. Если данный показатель не соответствует норма-

тивной документации, отмывку продукта этанолом повторяют.

После стадии ТП.8 микросферы передают в чистые помещения для первичной упаковки. Изучены два способа фасовки микросфер в первичную упаковку. В первом случае после ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» полупродукт лиофилизируют на поддонах, после чего лиофилизат фасуют во флаконы. В данном способе фасовка затрудняется из-за электростатичности микросфер. Во втором случае микросферы после стадии ТП.8 заливают водно-спиртовым раствором, полученную суспензию дозируют во флаконы с последующей укупоркой резиновыми пробками. В процессе розлива осуществляют контроль объема наполнения при помощи градуированного шприца.

Далее флаконы с жидкой водно-этанольной дисперсией перемещают в лиофильную сушилку и задают программу в соответствии с техническим заданием. После лиофилизации осуществляют контроль формы, целостности, насыщаемости и сорбционную емкость микросфер. Флаконы с лиофилизированными микросферами закатывают колпачками.

После стадии ТП.12 «Радиационная стерилизация» осуществляют контроль по показателям стерильности и пирогенности, после чего дополнительно контролируют целостность, форму, насыщаемость и сорбционную емкость микросфер.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе способа получения полимерных микросфер [10] составлена технологическая схема производства. Проведен анализ критических контрольных точек стадий основного процесса производства микросфер.

Показано, что стадии основного технологического процесса содержат семь контрольных критических точек. Среди них необратимыми являются стадии: ТП.4 «Полимеризация»; ТП.10 «Лиофилизация» и ТП.12 «Радиационная стерилизация». В случае несоответствия контролируемых параметров техническим требованиям на данных стадиях полупродукт отбраковывается.

Данные исследования в дальнейшем могут быть использованы для валидации и масштабирования технологического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА

- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):34–49. Doi: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Яковлев В. Н., Араблинский А. В., Хайрутдинов Е. Р., Цуркан В. А., Фомин В. Н., Алексеев В. Г. Возможности эндоваскулярной эмболизации, химиоэмболизации и химиоиммуноэмболизации в условиях многопрофильной больницы. *Клиническая медицина.* 2012;12:65–69.
- Гительзон Д. Г., Рогов Д. А., Васильев А. Э., Гительзон Е. А. Основы химиоэмболизации (обзор литературы). *Вестник РУДН. Серия: медицина.* 2017;21(2):194–204. Doi: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204.
- Серегин А. А. Рентгеноэндоваскулярная химиоэмболизация печеночной артерии – современный метод регионарной химиотерапии злокачественных поражений печени. *Современные технологии в медицине.* 2014;6(2):110–126.
- Долгушин Д. И. Интервенционная радиология в онкологии: история развития и современное состояние проблемы. *Практическая онкология.* 2015;16(4):119–130.
- Попов М. В., Аронов М. С., Восканян С. Э., Карпова О. В. Методика трансартериальной химиоэмболизации при первичных и метастатических опухолях печени. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2016;12(4):716–720.
- Плечев В. В., Муфазалов Ф. Ф., Шестаков А. И., Ишметов В. Ш., Логинов М. О., Утенская И. Д. Эффективность лечения гепатоцеллюлярного рака и метастазов рака других локализаций в печень методом химиоэмболизации. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2012;7(1):80–83.
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. Available at: <https://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch> (дата обращения 09.03.2020).
- Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/ru> (дата обращения 10.06.2020).
- Дунаев А. А., Блинов О. В. Способ получения полимерных микросфер для эмболизации и химиоэмболизации. Патент РФ RU 2646832. 07.03.18.
- Seregin A. A. Radioendovascular Chemoembolization of Hepatic Artery is an Advanced Technique of Regional Chemotherapy in Malignant Hepatic Tumors. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine.* 2014;6(2):110–126. (In Russ.).
- Dolgushin B. I. Interventional radiology in oncology: the history of development and modern state of the problem. *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology.* 2015;16(4):119–130. (In Russ.).
- Popov M. V., Aronov M. S., Voskanyan S. E., Karpova O. V. Transarterial chemoembolization for primary and metastatic liver tumors (review). *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2016;12(4):716–720. (In Russ.).
- Plechev V. V., Mufazalov F. F., Shestakov A. I., Ishmetov V. Sh., Loginov M. O., Utenskaya I. D. Efficacy of treatment by chemoembolization in hepatocellular carcinoma and distant metastases into the liver. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal.* 2012;7(1):80–83. (In Russ.).
- Federal Service for Surveillance in Healthcare. Available at: <https://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch> (accessed 09.03.2020). (In Russ.).
- World Health Organization (WHO). Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/ru> (accessed 10.06.2020). (In Russ.).
- Dunaev A. A., Blinov O. V. Sposob polucheniya polimernykh mikrosfer dlya embolizatsii i khimioembolizatsii. Russian Federation patent RU 2646832. 2018 March 07. (In Russ.).

## REFERENCES

- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):34–49. Doi: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Yakovlev V. N., Arablinsky A. V., Khairutdinov E. R., Tsurkan V. A., Fomin V. N., Alekseev V. G. Potential of endovascular embolization, chemoembolization and chemoimmunoembolization based at a multidisciplinary hospital. *Klinicheskaya meditsina = Clinical medicine.* 2012;12:65–69. (In Russ.).
- Gitelson D.G., Rogov D.A., Vasiliev A.E., Gitelson E.A. Basics of chemoembolization (literature review). *Vestnik RUDN. Seriya: meditsina = RUDN Journal of Medicine.* 2017;21(2):194–204. (In Russ.). Doi: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204.



Оригинальная статья/Research article

## Интерполимерные комплексы на основе Eudragit® EPO/Eudragit® S100 как перспективные носители для пероральных систем контролируемой доставки

А. В. Ситенкова (Буховец)<sup>1</sup>, А. Ю. Ситенков<sup>1</sup>, Р. И. Мустафин<sup>1\*</sup>

1 – Институт фармации ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

\*Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: А. В. Ситенкова (Буховец) – <https://orcid.org/0000-0001-8179-4516>; А. Ю. Ситенков – <https://orcid.org/0000-0002-0192-4585>; Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 13.07.2020. Статья принята в печать: 25.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** На сегодняшний день доказана возможность получения интерполимерных комплексов (ИПК) на основе полианионных типов полимеров Eudragit®, Carborol®, пектина, каррагинана и альгинат натрия с поликатионами – Eudragit® EPO, Eudragit® RS/RL или хитозаном, стабилизированных, как известно, ионными типами связей. В то же время показана и возможность получения, а также перспективы использования ИПК на основе двух химически комплементарных сополимеров Eudragit®, в основе которых лежат не только электростатические, но и донорно-акцепторные типы взаимодействия. Доказано, что поликомплексы с участием сополимеров Eudragit® являются перспективными носителями для систем доставки (СД) активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в различные отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ): ротовая полость (диспергируемые в полости рта и трансбуккальные СД), желудок (гастроретентивные СД), а также толстый кишечник (колон-специфичные СД).

**Цель.** Исследование интерполимерных комплексов на основе пары сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® S100, полученных в среде различных органических растворителей [этилового спирта и смеси изопропанол-ацетон (в соотношении 60:40 по объему)] с позиции применения их в пероральных матричных системах доставки АФИ.

**Материалы и методы.** Синтез ИПК на основе сополимеров Eudragit® осуществляли в среде органических растворителей [этиловый спирт или смесь изопропанол-ацетон (в соотношении 60:40 по объему)]. Структурные особенности полученных поликомплексов оценивали методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 с приставкой однократного НПВО Smart iTR (Thermo Scientific, США) и дифференциальной сканирующей калориметрии с моделируемой температурой (мДСК) на приборе Discovery™ DSC (TA Instruments, США). Состав определяли с использованием метода элементного органического анализа на приборе Thermo Flash 2000 CHNS/O (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Набухающую способность матриц, полученных на основе синтезированных ИПК, оценивали в буферных средах со значениями pH, имитирующих pH различных отделов ЖКТ: 1,2; 5,8; 6,8 и 7,4. Оценка высвобождения теофиллина (ТФ) и диклофенака натрия (ДН) проводилась в течение 7 часов на приборе ERWEKA DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GmbH, Германия) в тех же буферных средах, имитирующих pH различных отделов ЖКТ, что и при изучении набухающей способности поликомплексных матриц.

**Результаты и обсуждение.** Все полученные ИПК характеризуются избытком Eudragit® S100 в своем составе. Полученные ИПК стабилизированы кооперативной системой ионных и водородных связей. ДСК-термограммы образцов ИПК характеризуются наличием единственной температуры стеклования ( $T_g$ ), что подтверждает отсутствие в их составе примесей свободных сополимеров. При этом увеличение содержания Eudragit® S100 в составе ИПК приводит к увеличению значений температур стеклования поликомплексов. Матрицы на основе ИПК-1 распались в течение первых 15 минут эксперимента в среде с pH 1,2, в то время как матрицы на основе остальных образцов ИПК сохраняют свою форму в течение 7 часов и характеризуются pH-независимым набуханием. Высвобождение ТФ из поликомплексных матриц является диффузионно-контролируемым и происходит в соответствии с законом Фика (ИПК-2, ИПК-4 и ИПК-6) или же может быть охарактеризовано как «аномальный транспорт» (ИПК-1, ИПК-3 и ИПК-5) и определяется контролируемо-набухающими способностями поликомплексных матриц. Высвобождение ДН, напротив, происходит по Super Case II транспортному механизму, что соответствует механизму поверхностной эрозии матриц.

**Заключение.** Полученные интерполимерные комплексы Eudragit® EPO/Eudragit® S100 являются перспективными носителями в матричных пероральных системах контролируемой доставки АФИ, обеспечивая пролонгированное высвобождение веществ I класса БКС (ТФ), зависящее от скорости диффузии АФИ из набухшей матрицы, и замедленное высвобождение веществ II класса БКС (ДН), контролируемое процессами поверхностной эрозии матрицы.

**Ключевые слова:** интерполимерные комплексы, Eudragit®, диклофенак натрия, теофиллин, пероральная доставка, контролируемая доставка активных фармацевтических ингредиентов.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** А. В. Ситенкова (Буховец) осуществляла синтез образцов интерполимерных комплексов, оценку набухающей способности и высвобождения, написание статьи. А. Ю. Ситенков осуществлял синтез образцов интерполимерных комплексов, оценку их физико-химических свойств, а также корректировку статьи. Р. И. Мустафин осуществлял концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

**Благодарность.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-65-46007). Авторы выражают благодарность компании ERWEKA GmbH за предоставленную возможность выполнения работы на приборе DFZ II «Проточная ячейка», а также компании Evonik Röhm GmbH за предоставление образцов сополимеров Eudragit®.

**Для цитирования:** Ситенкова (Буховец) А. В., Ситенков А. Ю., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы Eudragit® EPO/Eudragit® S100 как перспективные носители для пероральных систем контролируемой доставки. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):36–43. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-36-43>

# Interpolymer Complexes Based on Eudragit® EPO/Eudragit® S100 as Carriers for Oral Controlled Drug Delivery Systems

Aleksandra V. Bukhovets<sup>1</sup>, Alexander Y. Sitenkov<sup>1</sup>, Rouslan I. Moustafine<sup>1\*</sup>

1 – Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

\*Corresponding author: Rouslan I. Moustafine. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) – <https://orcid.org/0000-0001-8179-4516>; Alexander Y. Sitenkov – <https://orcid.org/0000-0002-0192-4585>;  
Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Received: 13.07.2020. Revised: 25.08.2020. Published: 28.08.2020

## Abstract

**Introduction.** The possibility of obtaining IPC based on polyanions of various structures Eudragit®, Carbopol®, pectin, carrageenan and sodium alginate with oppositely charged polycations – Eudragit® EPO, Eudragit® RS/RL and chitosan, stabilized as already well-known by ionic bonds. It has been proven that interpolymer complexes with the participation of Eudragit® copolymers could be also formatted by hydrogen bonds too as well. Prepared polycomplexes are promising carriers for drug delivery systems (DDS) to various parts of the gastrointestinal tract (GIT): the mouth (orodispersible and buccal DDS), stomach (gastroretentive DDS) and intestine (colon-specific DDS).

**Aim.** Study of interpolymer complexes based on a pair of Eudragit® EPO and Eudragit® S100 copolymers obtained in a medium of various organic solvents (ethyl alcohol and a mixture of isopropanol-acetone (in a ratio of 60:40, v/v) from the point of view of their use in oral matrix systems for the delivery of active pharmaceutical ingredients.

**Materials and methods.** The synthesis of interpolymer complexes based on Eudragit® copolymers was carried out in organic solvents [ethyl alcohol or isopropanol-acetone mixture (in a ratio of 60:40, v/v)]. The structural features of the obtained IPCs were assessed by FTIR spectroscopy using a Nicolet iS5 instrument with a Smart iTR single ATR attachment (Thermo Scientific, USA) and differential scanning calorimetry with modulated temperature (mDSC) using a Discovery™ DSC instrument (TA Instruments, USA). The composition was determined using the method of elemental analysis on a Thermo Flash 2000 CHNS/O device (Thermo Fisher Scientific, UK). The swelling capacity of the obtained IPCs was evaluated in buffer media with pH values that mimic the pH of different parts of the gastrointestinal tract (GIT): 1.2; 5.8; 6.8 and 7.4. The release of theophylline (TEO) and diclofenac sodium (DS) was assessed on a ERWEKA DFZ II (ERWEKA GmbH, Germany) flow through cell apparatus in buffer media simulating the pH of various parts of the gastrointestinal tract for 7 hours.

**Results and discussion.** All obtained IPCs are characterized by an excess of Eudragit® S100 in their composition. The obtained IPCs are stabilized by a cooperative system of ionic and hydrogen bonds. DSC thermograms of IPC samples are characterized by the presence of a single glass transition temperature, which confirms the absence of impurities of free copolymers in their composition, while with an increase in the content of Eudragit® S100 in the IPC composition, the glass transition temperature increases. The matrix based on IPC-1 disintegrated during the first 15 minutes of the experiment in a medium with pH 1.2, while matrices based on the rest of the IPC samples retain their shape for 7 hours and are characterized by pH-independent behavior. The release of TEO from polycomplex matrices is diffusion-controlled and occurs in accordance with Fick's law (IPC-2, IPC-4, and IPC-6) or can be characterized as «abnormal transport» (IPC-1, IPC-3 and IPC-5), and also depends on the swelling capacity of the matrix. In contrast, the release of DS is dependent on surface erosion of the matrix, which is consistent with the Super Case II transport mechanism.

**Conclusion.** The resulting interpolymer complexes Eudragit® EPO/Eudragit® S100 are promising carriers in matrix oral systems for the controlled delivery of active pharmaceutical ingredients, providing a prolonged release of BCS class I substances, depending on the diffusion rate from the swollen matrix, and a delayed release of BCS class II substances, controlled by surface processes erosion of the matrix.

**Keywords:** interpolymer complexes, Eudragit®, diclofenac sodium, theophylline, oral delivery, controlled drug delivery.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Aleksandra V. Bukhovets has carried out the synthesis of samples, evaluation of swelling ability and release properties, writing of the article. Alexander Y. Sitenkov – synthesis of samples, evaluation of physico-chemical properties, writing – review & editing of the article. Rouslan I. Moustafine – conceptualization, methodology, writing – review & editing of the article. The article was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the article.

**Acknowledgment.** This work was financially supported by the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-65-46007 (to A.V.B. and R.I.M.). The authors are also grateful to ERWEKA GmbH for the opportunity to work on the Flow Trough Cell Apparatus DFZ II, and also to Evonik Rohm GmbH for providing samples of Eudragit® copolymers.

**For citation:** Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Moustafine R. I. Interpolymer complexes Eudragit® EPO/ Eudragit® S100 as carriers for oral controlled drug delivery systems. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):36–43. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-36-43>

## ВВЕДЕНИЕ

Сополимеры торговой марки Eudragit® широко используются в современной технологии пероральных лекарственных форм [1]. Однако за счет особенностей их структуры возможно использование данных сополимеров в комбинациях [2], а также и для получения интерполимерных комплексов (ИПК) – продуктов взаимодействия химически комплементарных макромолекул [3]. На сегодняшний день показана возможность получения ИПК с участием различных типов анионных полимеров Eudragit®, Carbopol®, альгината натрия,

пектина и каррагинана с противоположно заряженными катионными полимерами – Eudragit® EPO [4–9], Eudragit® RS/RL [10–13] и хитозана [14, 15].

Впервые нашей научной группой были получены и охарактеризованы ИПК с участием противоположно-заряженных сополимеров Eudragit® и было показано, что поликомплексы на их основе являются перспективными носителями для систем доставки (СД) активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в различные отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ): ротовая полость (диспергируемые в полости рта и трансбуккальные СД) [16, 17], желудок (гастроре-

тентивные СД) [5, 18–20], а также кишечник, включая толстый его отдел (колон-специфичные СД) [6–8, 21].

Весьма перспективными с точки зрения носителей для доставки в толстый отдел кишечника оказались ИПК на основе пары сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® S100, исходно существенно отличающихся по своей растворимости в водно-солевых средах (Eudragit® EPO растворим при значениях pH водных растворов ниже 5,0, а Eudragit® S100 – напротив, растворяется при значениях pH выше 7,0) [6]. Позже была доказана возможность образования поликомплексов на основе данной пары сополимеров и в средах органических растворителей [21, 22].

**Целью** настоящей работы явилось исследование ИПК на основе химически комплементарной пары сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® S100, полученных в среде различных органических растворителей [этилового спирта и смеси изопропанол-ацетон (в соотношении 60:40 по объему)] с позиции применения их в пероральных матричных системах доставки активных фармацевтических ингредиентов, относящихся к различным классам биофармацевтической классификационной системы (БКС) [23].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Eudragit® EPO (EPO) – терполимер диметиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом (молярное соотношение 2:1:1), Eudragit® S100 (S100) – сополимер метакриловой кислоты и метилметакрилата (молярное соотношение 1:2) были любезно предоставлены производителем Evonik Röhm GmbH (Германия). Сополимеры использовались после высушивания под вакуумом при температуре 40 °C в течение 2 дней. В качестве модельных АФИ использовали диклофенак натрия и теофиллин (Sigma-Aldrich, Бельгия).

Синтез ИПК на основе сополимеров Eudragit® осуществляли в среде органических растворителей [этиловый спирт или смесь изопропанол-ацетон (в соотношении 60:40 по объему)] по методике, описанной ранее [21] в лабораторной реакторной системе LR 1000 control (IKA® Werke GmbH, Германия).

Структурные особенности полученных ИПК оценивали методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 с приставкой однократного НПВО Smart iTR (Thermo Scientific, США) и дифференциальной сканирующей калориметрии с моделируемой температурой (мДСК) на приборе Discovery™ DSC (TA Instruments, США).

Состав поликомплексов определяли с использованием метода элементного анализа на приборе Thermo Flash 2000 CHNS/O (Thermo Fisher Scientific, Великобритания).

Для оценки набухающей способности и высвобождения модельных АФИ получали таблетки порошка ИПК и смеси ИПК с АФИ, соответственно, диаметром 9 мм путем прямого прессования на ручном гидрав-

лическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа.

Набухающую способность полученных ИПК оценивали по методике, описанной ранее [24], в буферных средах со значениями pH, имитирующих pH различных отделов ЖКТ: 1,2; 5,8; 6,8 и 7,4.

Оценка высвобождения теофиллина и диклофенака натрия проводилась на приборе ERWEKA DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GmbH, Германия) в буферных средах, имитирующих pH различных отделов ЖКТ в течение 7 часов (таблица 1). Оценка количества высвободившихся в среды растворения ТФ и ДН проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 271 и 276 нм соответственно.

Математическое моделирование высвобождения АФИ проводили с помощью ПО Origin® (Version 7.5, Origin Lab Corp., США) с использованием уравнения Korsmeyer-Peppas [25].

**Таблица 1. Условия проведения оценки высвобождения на приборе «проточная ячейка»**

**Table 1. Conditions of dissolution test using Flow-through cell apparatus**

pH	Время Time	Скорость потока Flow rate
1,2	1 ч 1 h	8 мл/мин 8 ml/min
5,8	2 ч 2 h	4 мл/мин 4 ml/min
6,8	2 ч 2 h	4 мл/мин 4 ml/min
7,4	2 ч 2 h	4 мл/мин 4 ml/min

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя описанную ранее методику [10], было получено шесть образцов ИПК на основе пары химически комплементарных сополимеров Eudragit® EPO и Eudragit® S100 (таблица 2).

Согласно данным элементного анализа все полученные ИПК характеризуются избытком полианионного сополимера (Eudragit® S100) в своем составе (таблица 2).

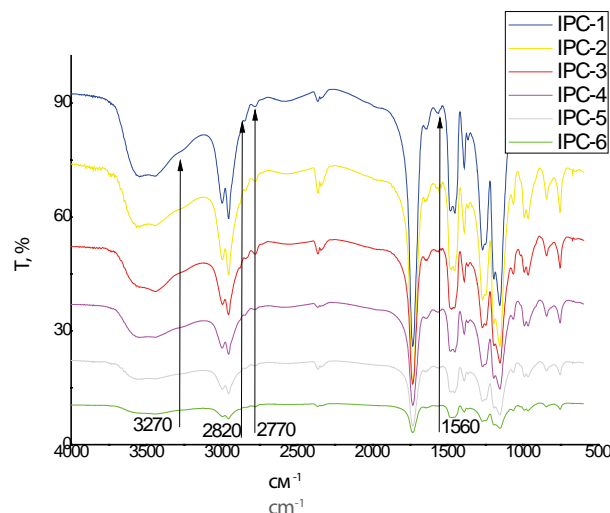
Для подтверждения протекания интерполимерной реакции и оценки структурных особенностей полученных ИПК использовали метод ИК-спектроскопии. ИК-спектры образцов ИПК характеризуются наличием полос, соответствующих валентным колебаниям неионизированных диметиламиногрупп Eudragit® EPO (2820 и 2770 см<sup>-1</sup>) и этерифицированной карбоксильной группы Eudragit® S100 (1730 см<sup>-1</sup>), присутствующих также на ИК-спектрах индивидуальных сополимеров (рисунок 1). Также на ИК-спектрах ИПК обнаруживаются характеристические полосы при 1560 и 3270 см<sup>-1</sup>, доказывающие, что полученные ИПК стабилизированы кооперативной системой как ионных, так и водородных связей соответственно.

**Таблица 2.** Характеристика полученных образцов ИПК на основе Eudragit® EPO/Eudragit® S100

**Table 2.** Characteristics of prepared samples of IPC based on Eudragit® EPO/Eudragit® S100

Обозначение Sign	Соотношение сополимеров [EPO]:[S100] (моль/моль) Polymer ratio [EPO]:[S100] (mol/mol)	Растворитель Solvent	$T_g$ , °C $T_g$ , °C
ИПК-1 IPC-1	1:2,12	этиловый спирт ethanol	143,24 ± 0,56
ИПК-2 IPC-2	1:2,13	этиловый спирт ethanol	141,48 ± 1,24
ИПК-3 IPC-3	1:2,51	смесь изопропанол-ацетон (60:40) mixture isopropanol-acetone (60:40)	149,11 ± 1,26
ИПК-4 IPC-4	1:2,96	смесь изопропанол-ацетон (60:40) mixture isopropanol-acetone (60:40)	152,94 ± 0,34
ИПК-5 IPC-5	1:3,64	смесь изопропанол-ацетон (60:40) mixture isopropanol-acetone (60:40)	160,55 ± 0,39
ИПК-6 IPC-6	1:3,68	смесь изопропанол-ацетон (60:40) mixture isopropanol-acetone (60:40)	159,95 ± 0,17

Согласно данным мДСК (таблица 2), термограммы образцов ИПК характеризуются наличием единственной  $T_g$ , что подтверждает отсутствие в их составе примесей свободных сополимеров. При этом с увеличением содержания Eudragit® S100 в составе ИПК

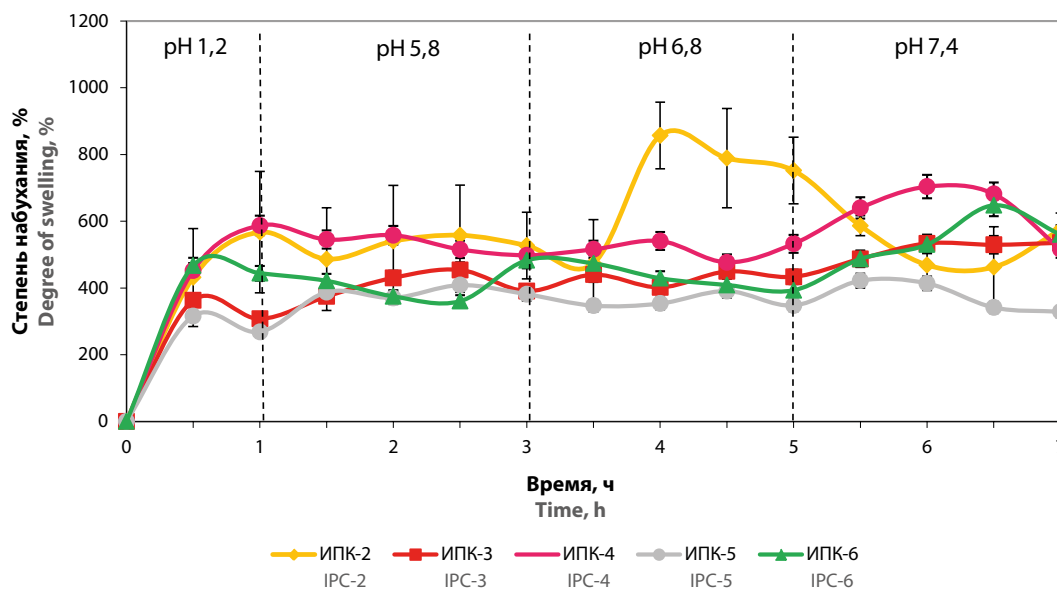


**Рисунок 1.** ИК-спектры образцов интерполимерных комплексов Eudragit® EPO/Eudragit® S100

**Figure 1.** FTIR-spectra of interpolymer complexes Eudragit® EPO/Eudragit® S100

значение температуры стеклования увеличивается, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [8, 10].

Для определения перспективности применения полученных ИПК в качестве носителей для пероральных матричных систем контролируемой доставки АФИ была проведена оценка набухающей способности матриц, полученных прямым прессованием из порошка ИПК, в буферных средах с различными значениями pH, имитирующих отделы ЖКТ (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Профили набухания матриц на основе различных типов ИПК Eudragit® EPO/Eudragit® S100 в буферных средах, имитирующих pH желудочно-кишечного тракта

**Figure 2.** Swelling behavior profiles of matrices based on different types of IPCs Eudragit® EPO/Eudragit® S100 in the media mimicking pH of gastrointestinal tract

Согласно полученным результатам матрица на основе ИПК-1 распалась в течение первых 15 минут эксперимента в среде с pH 1,2 (данные не представлены), в то время как матрицы на основе остальных образцов ИПК сохраняют свою форму в течение 7 часов и характеризуются pH-независимым набуханием. Матрица же на основе ИПК-2 характеризуется значительно более высокими значениями набухающей способности в буферной среде с значением pH 6,8.

Для оценки транспортных свойств полученных ИПК было проведено исследование высвобождения модельных АФИ, относящихся к различным классам БКС – ТФ, обладающего высокой растворимостью и высокой проницаемостью (I класс БКС), и ДН, обладающего низкой растворимостью и высокой проницаемостью (II класс БКС).

Как видно из полученных результатов, все матрицы на основе ИПК с ТФ обеспечивают классический пролонгированный профиль высвобождения АФИ (рисунок 3), при этом минимальное количество ТФ высвободившегося в среду растворения обеспечивает матрица на основе ИПК-6, характеризующегося большим содержанием Eudragit® S100. В то же время максимальная концентрация ТФ в среде растворения к концу эксперимента наблюдается в случае образца ИПК-1, полученного в среде этилового спирта и характеризующегося наименьшим содержанием Eudragit® S100.

Профили высвобождения ДН из поликомплексных матриц имеют совершенно иной характер (рисунок 4). Данный тип высвобождения можно охарактеризовать как «замедленный» – высвобождение ДН начинается только в среде с pH 6,8 с постепенным повышением концентрации высвободившегося

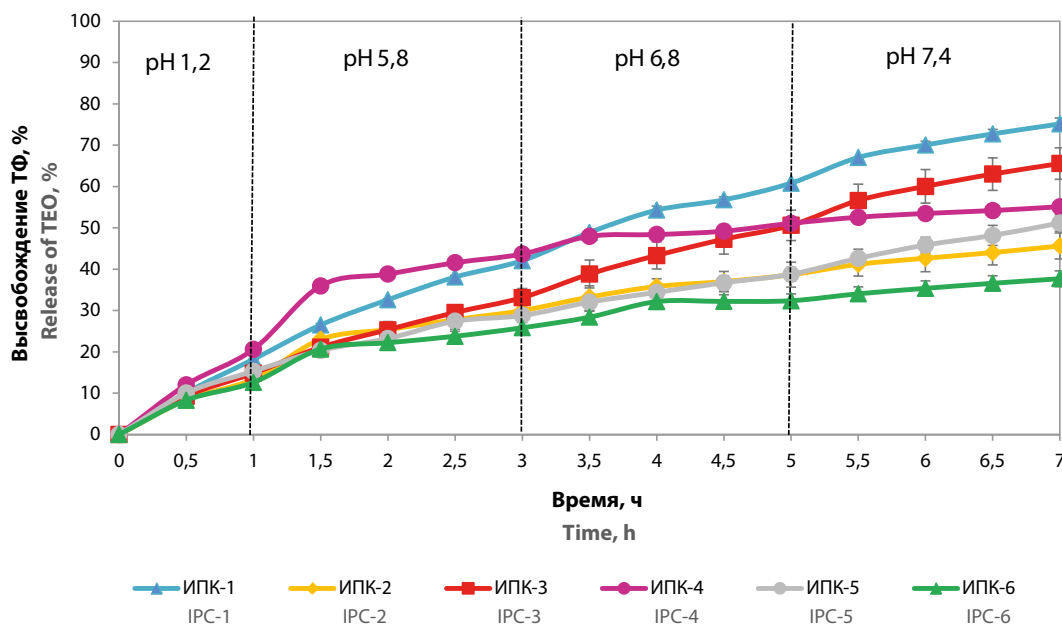
АФИ за оставшееся время эксперимента. Следует отметить, что образец ИПК-6, характеризующийся наиболее высоким содержанием сополимера Eudragit® S100 и обеспечивающий наименьшую скорость высвобождения ТФ, обеспечивает наиболее высокую концентрацию ДН в среде с pH 7,4 в последние два часа эксперимента.

Для оценки механизма, лежащего в основе процесса высвобождения модельных АФИ из поликомплексных матриц, было проведено математическое моделирование высвобождения с использованием уравнения Korsmeyer-Peppas [12].

Как видно из данных, представленных в таблице 3, высвобождение ТФ из поликомплексных матриц является по механизму диффузионно-контролируемым и происходит в соответствии с законом Фика (ИПК-2, ИПК-4 и ИПК-6). В то же время, в случае остальных поликомплексов (ИПК-1, ИПК-3 и ИПК-5), высвобождение может быть охарактеризовано как «аномальный транспорт», зависящее от набухающей способности матриц. Высвобождение ДН, напротив, зависит от поверхностной эрозии матрицы, что соответствует Super Case II транспортному механизму (таблица 4) и согласуется с нашими ранее опубликованными данными в отношении ИПК на основе пар противоположно-заряженных сополимеров Eudragit® EPO/Eudragit® L100-55 и Eudragit® EPO/Eudragit® L100, но полученных в водно-солевых средах [4–5].

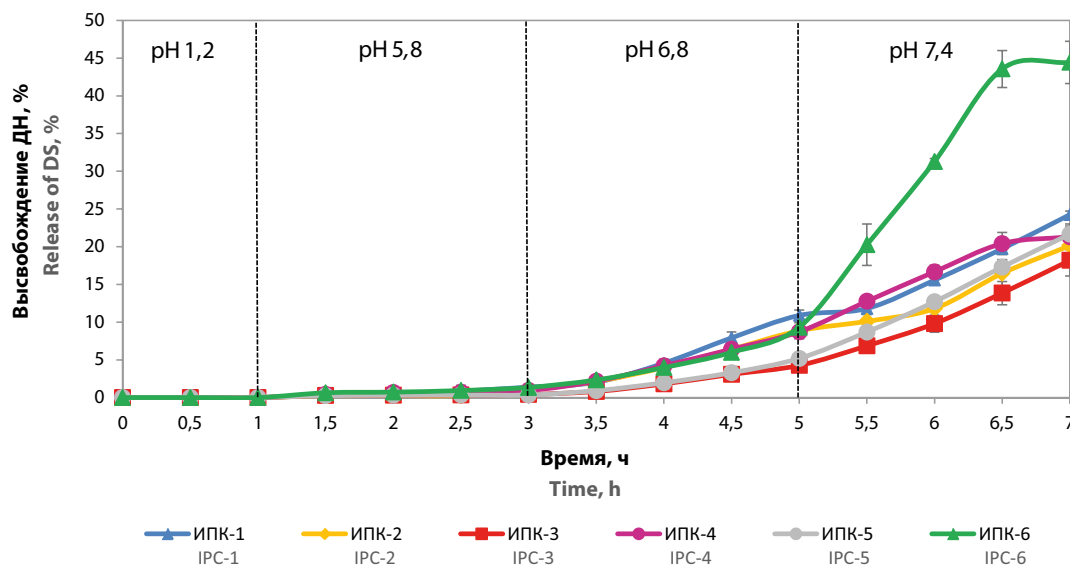
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные образцы интерполимерных комплексов Eudragit® EPO/Eudragit® S100 являются перспективными носителями в матричных



**Рисунок 3.** Профили высвобождения теofilлина из матриц на основе ИПК Eudragit® EPO/Eudragit® S100 в буферных средах, имитирующих pH желудочно-кишечного тракта

**Figure 3.** Release profiles of theophylline from IPC Eudragit® EPO/Eudragit® S100 in the media mimicking pH of gastrointestinal tract



**Рисунок 4.** Профили высвобождения диклофенака натрия из матриц на основе ИПК Eudragit® EPO/Eudragit® S100 в буферных средах, имитирующих pH желудочно-кишечного тракта

**Figure 4.** Release profiles of diclofenac sodium from IPC Eudragit® EPO/Eudragit® S100 in the media mimicking pH of gastrointestinal tract

**Таблица 3.** Результаты математического моделирования высвобождения теофиллина из матриц на основе образцов ИПК Eudragit® EPO/Eudragit® S100

**Table 3.** Results of mathematic modeling of theophylline release from matrices based on different samples of IPC Eudragit® EPO/Eudragit® S100

	ИПК-1 IPC-1	ИПК-2 IPC-2	ИПК-3 IPC-3	ИПК-4 IPC-4	ИПК-5 IPC-5	ИПК-6 IPC-6
Экспонента высвобождения Release exponent	0,70 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,77 ± 0,01	0,41 ± 0,04	0,62 ± 0,02	0,48 ± 0,03
Константа высвобождения Release constant	19,84 ± 0,54	16,53 ± 0,72	14,80 ± 0,31	26,55 ± 1,81	14,99 ± 0,40	15,17 ± 0,70
R <sup>2</sup>	0,9980	0,9902	0,9991	0,9559	0,9973	0,9857
Механизм высвобождения Transport mechanism	Аномальный транспорт Abnormal transport	Диффузия по закону Фика Fickian diffusion	Аномальный транспорт Abnormal transport	Диффузия по закону Фика Fickian diffusion	Аномальный транспорт Abnormal transport	Диффузия по закону Фика Fickian diffusion

пероральных системах контролируемой доставки активных фармацевтических ингредиентов, обеспечивая пролонгированное высвобождение веществ I класса БКС, зависящее от скорости диффузии из набухшей матрицы, и замедленное высвобождение веществ II класса БКС, контролируемое процессами поверхностной эрозии матрицы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Patra Ch. N., Priya R., Swain S., Jena G. K., Panigrahi K. C., Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;3(1):33–45. Doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.
- Gallardo D., Skalsky B., Kleinebudde P. Controlled release solid dosage forms using combinations of (meth)acrylate copolymer. *Pharmaceutical Development Technology*. 2008;13:413–423. Doi: 10.1080/10837450802202098.
- Мустафин Р. И. Интерполимерные сочетания химически комплементарных типов сополимеров Eudragit® как новое направление в создании пероральных систем доставки и лекарственных форм с модифицированным высвобождением. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(5):28–39. Doi: 10.30906/0023-1134-2011-45-5-28-39.
- Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Kabanova T. V., Kemenova V.A., Van den Mooter G. Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth)acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100:874–885. Doi: 10.1002/jps.22320.
- Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® EPO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2630–2641. Doi: 10.1021/mp4000635.

**Таблица 4. Результаты математического моделирования высвобождения диклофенака натрия из матриц на основе ИПК Eudragit® EPO/Eudragit® S100**

**Table 4. Results of mathematic modeling of diclofenac sodium release from matrices based on different samples of IPC Eudragit® EPO/Eudragit® S100**

	ИПК-1 IPC-1	ИПК-2 IPC-2	ИПК-3 IPC-3	ИПК-4 IPC-4	ИПК-5 IPC-5	ИПК-6 IPC-6
Экспонента высвобождения Release exponent	2,31 ± 0,10	2,32 ± 0,11	3,41 ± 0,06	2,29 ± 0,15	3,35 ± 0,11	3,21 ± 0,34
Константа высвобождения Release constant	0,38 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,38 ± 0,10	0,06 ± 0,01	0,16 ± 0,09
R <sup>2</sup>	0,9965	0,9959	0,9995	0,9923	0,9984	0,9831
Механизм высвобождения Transport mechanism	Super Case II транспорт Super Case II	Super Case II транспорт Super Case II	Super Case II транспорт Super Case II	Super Case II транспорт Super Case II	Super Case II транспорт Super Case II	Super Case II транспорт Super Case II

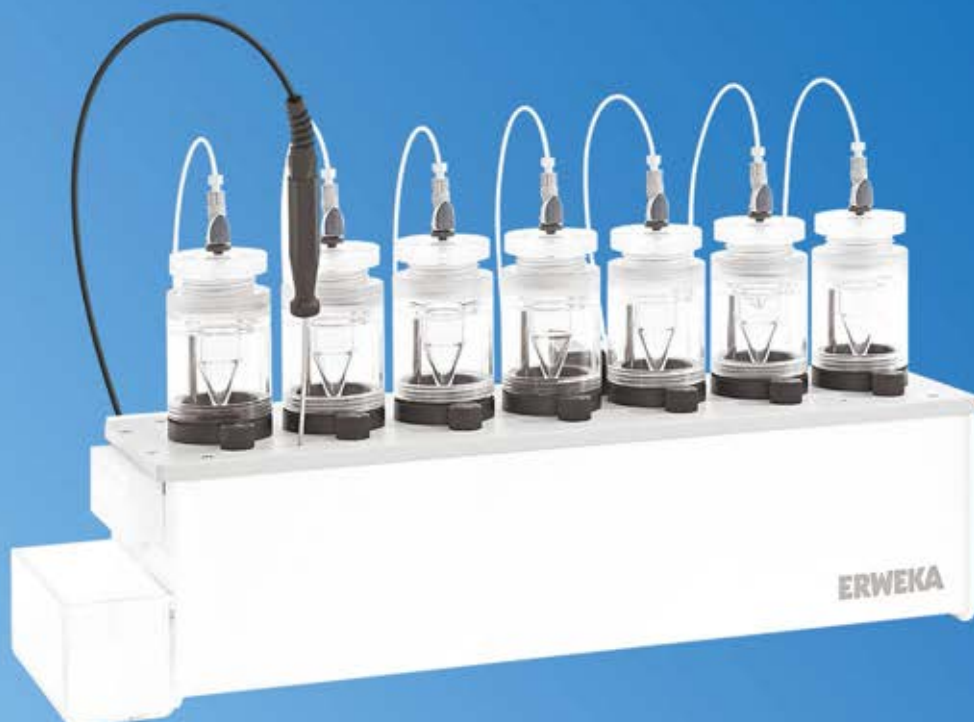
- Mustafin R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Yu., Garipova V. R., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Synthesis and characterization of a new carrier based on Eudragit® EPO/S100 interpolyelectrolyte complex for controlled colon-specific drug delivery. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45:568–574. Doi: 10.1007/s11094-011-0681-0.
- Mustafin R. I., Кабанова Т. В., Семина И. И., Буховец А. В., Гарипова В. Р., Шиловская Е. В., Насибуллин Ш. Ф., Ситенков А. В., Казакова Р. Р., Кеменова В.А. Биофармацевтическая оценка поликомплексной матричной системы доставки в толстый отдел кишечника на основе Carbomer 940/Eudragit® EPO. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(8):41–44. Doi: 10.30906/0023-1134-2011-45-8-41-44.
- Moustafine R. I., Salachova A. R., Frolova E. S., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® EPO with sodium alginate as potential carriers for colonic drug delivery: monitoring of structural transformation and composition changes during swellability and release evaluating. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35:1439–1451. Doi: 10.3109/03639040902988574.
- Sepulveda-Rivas S., Fritz H. F., Valenzuela C., Santiviago C. A., Morales J. O. Development of Novel EE/Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety. *Pharmaceutics*. 2019;11:103. Doi: 10.3390/pharmaceutics11030103.
- Wulff R., Leopold C. S. Coatings from blends of Eudragit® RL and L55: A novel approach in pH-controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;476:78–87. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.023.
- Khuathan N., Pongjanyakul T. Modification of quaternary polymethacrylate film using sodium alginate: Film characterization and drug permeability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;460:63–72. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.050.
- Semdé R., Amighi K., Pierre D., Devleeschouwer M.J., Moës A. J. Leaching of pectin from mixed pectin/insoluble polymer films intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;174:233–241. Doi: 10.1016/S0378-5173(98)00269-5.
- Lefnaouri S., Moulai-Mostefa N. Polyelectrolyte complex based on carboxymethyl-kappa-carrageenan and Eudragit RL 30D as prospective carriers for sustained drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*. 2015;97:165–174. Doi: 10.1016/j.cherd.2014.12.006.
- Moustafine R. I., Margulis E. B., Sibgatullina L. F., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of Chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70:215–225. Doi: 10.1016/j.ejpb.2008.04.008.
- Mustafin R. I., Семина И. И., Гарипова В. Р., Буховец А. В., Ситенков А. В., Салахова А. Р., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Сравнительное исследование поликомплексов на основе Carbopol® и противоположно заряженных полиэлектролитов как новых систем пероральной доставки. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(1):3–8. Doi: 10.30906/0023-1134-2015-49-1-3-8.
- Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018; 10(2): 85. Doi: 10.3390/polym10010085.
- Mustafin R. I., Будников В. В., Абдуллина С. Г., Насибуллин Ш. Ф., Салеев Р. А. Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;2(9):81–88. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-13-17.
- Mustafin R. I., Протасова А. А., Буховец А. В., Семина И. И. Исследование интерполимерных сочетаний на основе (мет)акрилатов в качестве перспективных носителей в поликомплексных системах для гастроретентивной доставки. *Фармация*. 2014;5:3–5.
- Mustafin R. I., Буховец А. В., Протасова А. А., Шайхрамова Р. Н., Ситенков А. Ю., Семина И. И. Сравнительное исследование поликомплексных систем для гастроретентивной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):48–50.
- Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Mustafin R. I. Интерполиэлектrolитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;2(9):72–76. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
- Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes of Eudragit® copolymers as novel carriers for colon-specific drug delivery. *Polymers*. 2020;12:1459. Doi: 10.3390/polym12071459.
- Mustafin R. I., Ситенкова А. В., Ситенков А. Ю., Семина И. И. Интерполимерный носитель для пероральных систем контролируемой доставки активных фармацевтических ингредиентов. Патент РФ № 2725879 (заявл. 26.07.2018; опубл. 07.07.2020, бюл. № 19).
- Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P., Crison J. R. Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(3):413–420. Doi: 10.1023/a:1016212804288.
- Lorenzo-Lamoza M. L., Remuñán-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;52:109–118. Doi: 10.1016/S0168-3659(97)00203-4.
- Korsmeyer R. W., Gurny R., Docler E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15:25–35. Doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.

## REFERENCES

- Patra Ch. N., Priya R., Swain S., Jena G. K., Panigrahi K. C., Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;3(1):33–45. Doi: 10.1016/j.fjps.2017.02.001.

2. Gallardo D., Skalsky B., Kleinebudde P. Controlled release solid dosage forms using combinations of (meth)acrylate copolymer. *Pharmaceutical Development Technology*. 2008;13:413–423. Doi: 10.1080/10837450802202098.
3. Mustafin R. I. Interpolymer combinations of chemically complementary grades of Eudragit® copolymers: A new direction in the design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45:285–295. Doi: 10.1007/s11094-011-0618-7. (In Russ.).
4. Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Kabanova T. V., Kemenova V.A., Van den Mooter G. Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth)acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100:874–885. Doi: 10.1002/jps.22320.
5. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® EPO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2630–2641. Doi: 10.1021/mp4000635.
6. Mustafin R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Yu., Garipova V. R., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Synthesis and characterization of a new carrier based on Eudragit® EPO/S100 interpolyelectrolyte complex for controlled colon-specific drug delivery. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45:568–574. Doi: 10.1007/s11094-011-0681-0.
7. Mustafin R. I., Kabanova T. V., Semina I. I., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Shilovskaya E. V., Nasibullin S. F., Sitenkov A. Y., Kazakova R. R., Kemenova V. A. Biopharmaceutical assessment of polycomplex matrix system based on Carbomer 940 and Eudragit® EPO for colon-specific drug delivery. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45(8):41–44. Doi: 10.30906/0023-1134-2011-45-8-41-44. (In Russ.).
8. Moustafine R. I., Salachova A. R., Frolova E. S., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® EPO with sodium alginate as potential carriers for colonic drug delivery: monitoring of structural transformation and composition changes during swellability and release evaluating. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35:1439–1451. Doi: 10.3109/03639040902988574.
9. Sepulveda-Rivas S., Fritz H. F., Valenzuela C., Santiviago C. A., Morales J. O. Development of Novel EE/Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety. *Pharmaceutics*. 2019;11:103. Doi: 10.3390/pharmaceutics11030103.
10. Wulff R., Leopold C. S. Coatings from blends of Eudragit® RL and L55: A novel approach in pH-controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;476:78–87. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.023.
11. Khuathan N., Pongjanyakul T. Modification of quaternary polymethacrylate film using sodium alginate: Film characterization and drug permeability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;460:63–72. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.050.
12. Semde R., Amighi K., Pierre D., Devleeschouwer M.J., Moës A. J. Leaching of pectin from mixed pectin/insoluble polymer films intended for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;174:233–241. Doi: 10.1016/S0378-5173(98)00269-5.
13. Lefnaouri S., Moulai-Mostefa N. Polyelectrolyte complex based on carboxymethyl-kappa-carrageenan and Eudragit RL 30D as prospective carriers for sustained drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*. 2015;97:165–174. Doi: 10.1016/j.cherd.2014.12.006.
14. Moustafine R. I., Margulis E. B., Sibgatullina L. F., Kemenova V. A., Van den Mooter G. Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of Chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70:215–225. Doi: 10.1016/j.ejpb.2008.04.008.
15. Mustafin R. I., Semina I. I., Garipova V. A., Bukhovets A. V., Sitenkov Y. A., Salakhova A. R., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Comparative study of polycomplexes based on Carbopol® and oppositely charged polyelectrolytes as a new oral drug delivery system. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(1):1–6. Doi: 0091-150X/15/4901-0001. (In Russ.).
16. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(2):85. Doi: 10.3390/polym10010085.
17. Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A. Polycomplex carrier for buccal mucoadhesion delivery of metronidazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;2(9):81–88. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-13-17. (In Russ.).
18. Mustafin R.I., Protasova A.A., Bukhovets A.V., Semina I.I. Investigation of interpolymers based on (meth)acrylates as promising carriers in multiplex gastroretentive drug delivery systems. *Farmatsiya = Farmatsiya*. 2014;5:3–5. (In Russ.).
19. Mustafin R.I., Bukhovets A.V., Protasova A.A., Shaykhamova R.N., Sitenkov A.Y., Semina I.I. Comparative investigation of polycomplex systems for gastroretentive metformin delivery. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2015;1(10):48–50. (In Russ.).
20. Gordeeva D.S., Sitenkova (Bukhovets) A.V., Moustafine R.I. Interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers as carriers for bioadhesive gastroretentive metronidazole delivery system. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;2(9):72–76. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76. (In Russ.).
21. Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine, R. I. Interpolymer complexes of Eudragit® copolymers as novel carriers for colon-specific drug delivery. *Polymers*. 2020;12:1459. Doi: 10.3390/polym12071459.
22. Mustafin R. I., Sitenkova A. V., Sitenkov A. Y., Semina I. I., Interpolymer carrier for oral systems of controlled delivery of active pharmaceutical ingredients. Russian Patent (RU) № 2725879 (filed. 26.07.2018; publ. 7.07.2020, bul. No. 19). (In Russ.).
23. Amidon G. L., Lennerns H., Shah V. P., Crison J. R. Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(3):413–420. Doi: 10.1023/a:1016212804288.
24. Lorenzo-Lamoza M. L., Remuñán-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;52:109–118. Doi: 10.1016/S0168-3659(97)00203-4.
25. Korsmeyer R. W., Gurny R., Docler E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15:25–35. Doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.

# Тестер растворения «Проточная ячейка» Erweka DFZ II



Ячейка для  
таблеток 12 мм



Ячейка для  
таблеток 22,6 мм



Ячейка  
для порошков  
и гранулятов



Ячейка  
для имплантов



Ячейка  
для суппозиториев



Ячейка  
для стентов



Ячейка для таблеток  
22,6 мм  
с диализным  
адаптером



Ячейка  
для таблеток  
22,6 мм  
с адаптером  
для кремов



Ячейка для таблеток  
22,6 мм  
со стеклянными  
шариками и  
держателем  
таблетки



Ячейка для таблеток  
22,6 мм  
со стеклянной  
дробью и  
без держателя  
таблетки

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-45-50>  
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

## Изучение высвобождения галоперидола из поликомплексных наночастиц на основе сополимеров Eudragit®

Н. Н. Порфирьева<sup>1</sup>, В. В. Хуторянский<sup>1,2</sup>, Р. И. Мустафин<sup>1\*</sup>

1 – Институт фармации ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16  
2 – Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

\*Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: Н. Н. Порфирьева – <https://orcid.org/0000-0002-7110-2093>; В. В. Хуторянский – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>; Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 13.07.2020. Статья принята в печать: 25.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Развивающимся направлением современной фармацевтической технологии является поиск полимерных носителей для разработки микро- и наноразмерных систем доставки лекарственных средств. Актуальным вопросом при этом остаётся поиск эффективных методов для исследования высвобождения из такого рода систем.

**Цель.** Провести исследование высвобождения модельного лекарственного средства (ЛС) галоперидола из поликомплексных наночастиц, полученных на основе интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК) различными методами.

**Материалы и методы.** Получены ИПЭК в виде наночастиц на основе полимеров фармацевтического назначения (Eudragit® EPO и Eudragit® L100-55). Размер получаемых поликомплексных наночастиц измеряли методом динамического светорассеяния с помощью Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Изучение высвобождения галоперидола было проведено в среде имитирующей назальную жидкость с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца (PermeGear, США), а также модифицированным методом USP IV на тестере растворения DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GMBH, Германия).

**Результаты и их обсуждение.** При использовании вертикальной диффузионной ячейки Франца, по прошествии практически 2,5 часов, наблюдается статистически значимое увеличение высвобождения галоперидола из поликомплексных наночастиц в сравнении с контролем (раствор галоперидола). В тоже время высвобождение ЛС с использованием метода «Проточной ячейки» (USP IV) осуществить не удалось, ввиду, по всей видимости, эффекта кристаллизации галоперидола на поверхности диализных мембран в наноадаптерах Float-A-Lyzer® G2. Не увенчались успехом попытки устранить этот эффект и улучшить проницаемость мембраны по отношению к галоперидолу, добавлением поверхностно-активных веществ (твин-80) и усилителей проницаемости (ДМСО).

**Заключение.** Оба метода, безусловно, являются перспективными для исследования высвобождения ЛС из наноразмерных носителей, однако в случае трудно растворимых ЛС, к которым относится и галоперидол, диффузионный метод с использованием вертикальной ячейки Франца оказался наиболее эффективным.

**Ключевые слова:** поликомплексные носители, наночастицы, галоперидол, высвобождение, ячейка Франца, «Проточная ячейка».

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Н. Н. Порфирьева осуществляла приготовление образцов интерполиэлектrolитных комплексов, получение поликомплексных наночастиц с галоперидолом и оценку высвобождения, участвовала в написании статьи. В. В. Хуторянский и Р. И. Мустафин принимали участие в концептуализации и методологии исследования, а также в рецензировании и корректировке статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

**Благодарность.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-65-46007). Авторы выражают благодарность компании ERWEKA GmbH за предоставленную возможность выполнения работы на приборе DFZ II «Проточная ячейка», а также компании Evonik Röhm GmbH за предоставление образцов сополимеров Eudragit®.

**Для цитирования:** Порфирьева Н. Н., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Изучение высвобождения галоперидола из поликомплексных наночастиц на основе сополимеров Eudragit®. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):45–50. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-45-50>

## A Study of Haloperidol Release from Polycomplex Nanoparticles Based on Eudragit® Copolymers

Natalia N. Porfiriyeva<sup>1</sup>, Vitaliy V. Khutoryanskiy<sup>1,2</sup>, Rouslan I. Moustafine<sup>1\*</sup>

1 – Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amir Khan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia  
2 – Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

\*Corresponding author: Rouslan I. Moustafine. E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: Natalia N. Porfiriyeva – <https://orcid.org/0000-0002-7110-2093>; Vitaliy V. Khutoryanskiy – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>; Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Received: 13.07.2020. Revised: 25.08.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** The development of polymer carriers for micro- and nanoscale drug delivery systems is an emerging area of modern pharmaceutical technology. One of the urgent needs in this area is the development of effective methods to study the drug release from these systems.

**Aim.** This work aimed to study the release of a model drug (MD) haloperidol from polycomplex nanoparticles prepared based on interpolyelectrolyte complexes (IPEC) using various methods.

© Порфирьева Н. Н., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И., 2020

© Porfiriyeva N. N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I., 2020

**Materials and methods.** IPECs were prepared in the form of nanoparticles based on pharmaceutical polymers (Eudragit® EPO and Eudragit® L100-55). Size distribution of these nanoparticles were determined using dynamic light scattering on Zetasizer Nano-ZS equipment (Malvern Instruments, UK). The release of haloperidol was studied in a medium simulating an artificial nasal fluid using a vertical Franz diffusion cell (PermeGear, USA) as well as a modified USP IV method in a flow-through cell apparatus (DFZ II, Erweka, Germany).

**Results and discussion.** Statistically significant increase in the release of haloperidol from polycomplex nanoparticles in contrast with the control (haloperidol solution) is observed when using a vertical diffusion or Franz cell, after almost 2.5 hours. At the same time, it was not possible to study the release of drug using the flow-through cell method (USP IV), due, apparently, to the effect of crystallization of haloperidol on the surface of dialysis membranes in the Float-A-Lyzer® G2 nanoadapters. The attempts to eliminate this effect and to improve the membrane permeability to haloperidol by adding surfactants (tween-80) and penetration enhancers (DMSO) were not successful.

**Conclusion.** Both methods are promising for studying the release of drugs from nanosized carriers; however, in the case of using poorly-soluble drugs, including haloperidol, the diffusion method using a vertical Franz cell is effective.

**Keywords:** polycomplex carriers, nanoparticles, haloperidol, release, Franz cell, flow-through cell.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Natalia N. Porfiryeva carried out the preparation of samples of interpolyelectrolyte complexes, fabrication of polycomplex nanoparticles with haloperidol, assessment of the release and participated in writing the article. Vitaliy V. Khutoryanskiy and Rouslan I. Moustafine participated in the conceptualization and methodology of the research, as well as in reviewing and correcting the article. The article was written with the participation of all co-authors. All authors agreed on the final version of the article.

**Acknowledgment.** The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-65-46007 (to N.N.P., V.V.K. and R.I.M.). The authors are also grateful to ERWEKA GmbH for the opportunity to work on the Flow Through Cell Apparatus DFZ II, and also to Evonik Rohm GmbH for providing samples of Eudragit® copolymers.

**For citation:** Porfiryeva N. N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. A study of haloperidol release from polycomplex nanoparticles based on Eudragit® copolymers. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):45–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-45-50>

## ВВЕДЕНИЕ

Перспективным и быстро развивающимся направлением в современной фармацевтической технологии является разработка систем доставки лекарственных средств (ЛС), благодаря которым становится возможно увеличить эффективность фармакотерапии путем придания им определенных физико-химических свойств.

В последние десятилетия особое внимание уделяется использованию наноразмерных носителей, таких как полимерные наночастицы [1], липосомы [2], ниосомы [3], наногели [4], наноэмульсии [5], нанотрубки [6], наноконтейнеры и т. д. [7], преимуществом которых является увеличение биодоступности лекарств, их проницаемости, растворимости. Это открывает возможности для преодоления различных физиологических барьеров и снижения вероятности возникновения побочных эффектов [8, 9]. Более того, применение наноразмерных носителей позволяет направленно (таргетно) доставлять ЛС к месту локализации заболевания, что особенно важно при терапии заболеваний мозга, ишемической болезни сердца и онкологии [10, 11].

Накоплен также опыт получения носителей на основе интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК), образующихся путем межмолекулярного взаимодействия двух противоположно-заряженных полимеров [12–15]. Использование ИПЭК открывает возможности для получения носителей с различными свойствами, в частности, для обеспечения их контролируемого высвобождения. Так, были получены поликомплексы на основе пары сополимеров фармацевтического назначения Eudragit® EPO и Eudragit®

S100, выпускаемые немецким концерном Evonik Röhm GmbH, которые обладали не зависящей от значения pH способностью к набуханию в средах, имитирующих желудочно-кишечный тракт и способствовали осуществлению доставки ЛС – индометацин в толстый отдел кишечника [16]. Рассматривалось использование ИПЭК как носителей, обладающих мукоадгезивными свойствами, для буккальной [17] и гастроретентивной доставки ЛС [14]. На основе вышеизложенного, интересным является получение носителей на основе ИПЭК в виде поликомплексных наночастиц, увеличивающих эффективность доставки лекарств. Однако при этом одной из основных проблем является выбор эффективного метода для исследования высвобождения ЛС из наноразмерных носителей.

*Метод непрерывного потока* – модифицированный метод проточной ячейки USP IV с использованием диализных наноадаптеров является основным рекомендуемым вариантом для изучения высвобождения ЛС из наноразмерных систем доставки. В то же время, куда более доступным и значительно чаще используемым методом является вариант с использованием диффузионной вертикальной ячейки Франца, признанным методом оценки высвобождения для трансдермальных систем доставки в качестве модели чрезкожной проницаемости ЛС из наружных лекарственных форм (ЛФ) (гели, мази, пластыри и др.) [18]. Как известно, диффузионный метод (метод диализа) рекомендуется для использования в том случае, если разрабатываемая наноразмерная система должна обеспечивать пролонгированное высвобождение ЛС, продолжительностью 7–10 дней [19–20]. Не-

смотря на различие в принадлежности двух методов, оба они, по сути, являются вариантами с использованием либо диализных, либо биологических мембран. При этом диффузионный метод диализа является наиболее широко используемым способом оценки высвобождения ЛС из наноразмерных систем *in vitro*.

В этом методе наноразмерная система доставки ЛС отделена от среды растворения диализной мембраной, проницаемой для свободного ЛС и непроницаемой для наночастиц. Возможность использования слоев из различных материалов обеспечивает реальные условия скорости диффузии как для гидрофобных, так и для гидрофильных веществ. Метод очень широко используется для исследования высвобождения из липосом [21–22], полимерных наночастиц, а также весьма бурно развивающегося направления по получению и исследованию полимер-липидных, или так называемых гибридных наночастиц [23]. Как известно, основными параметрами, влияющими на высвобождение ЛС в методах диализа, являются: условия перемешивания, соотношение между объемами донорской и акцепторной частей ячейки и материала и молекулярной массы отсеки (ММО) диализной мембраны [19]. Хи и др. [24] высказали предположение, что ММО должна быть примерно в 100 раз больше размера молекулы ЛВ, а внутренний объем диализной мембраны должен быть в 6–10 раз меньше объема среды растворения с тем, чтобы обеспечивать движущую силу для транспорта ЛС из донорской части ячейки в акцепторную. Например, с помощью данного метода была проведена оценка трансдермальной проницаемости липидных наночастиц [21]. Модифицированная ячейка Франца была использована для исследования высвобождения антипсихотического препарата – клозапина из твердых липидных наночастиц; было показано, что диализная мембрана удерживала наночастицы и позволяла переносить ЛС сразу в приемный отсек [22]. Palena и др. [25–26] описали способ получения тройных поликомплексных наночастиц с включением ряда нестероидных противовоспалительных средств, высвобождение из которых было изучено с помощью диффузионной ячейки Франца.

Метод непрерывного потока (на аппарате USP IV), изначально разработанного для тестирования пероральных ЛФ с модифицированным высвобождением, впоследствии был предложен для исследования многих ЛФ, включая и наночастицы [20]. Совмещение аппарата «Проточная ячейка» со вставными диализными адаптерами позволило избежать множества проблем, ранее возникающих при тестировании наноразмерных систем доставки лекарств этим методом (засорение фильтров аппарата USP IV), а также выявило явные преимущества модифицированного метода «Проточная ячейка» в сравнении с традиционными методами диализа (нарушение условий погружения тестируемых образцов и отсутствие перемешивания) [27]. В этой связи именно метод USP IV является наиболее признанным для изучения высвобождения из нано-

частиц, в особенности после того, как оба производителя (Sotax AG, Швейцария; ERWEKA GmbH, Германия) стали оснащать свои аппараты стандартизованными наноадаптерами Float-A-Lyzer® G2 (Merck KGaA, Германия), рекомендованными USP. Так, изучение высвобождения лекарства из липосомальной композиции амфотерицина В было проведено с использованием наноадаптеров Float-A-Lyzer® G2 на USP IV аппарате CE7 Smart (Sotax AG, Швейцария) [28].

Таким образом, данная работа направлена на исследование высвобождения модельного ЛС – галоперидола из поликомплексных наночастиц, полученных с использованием интерполиэлектролитных комплексов в сравнительном исследовании двух различных методов: с помощью наноадаптеров в «Проточной ячейке» и в диффузионной ячейке Франца.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поликомплексные наночастицы были приготовлены на основе пары сополимеров Eudragit® EPO (ММ = 135 кДа) и Eudragit® L100-55 (ММ = 250 кДа) (Evonik Röhm GmbH, Германия) по методике, предложенной нами ранее для получения микро- и наноразмерных частиц индометацина на основе пары сополимеров Eudragit® EPO/Eudragit® S100 [29]. Размер получаемых поликомплексных наночастиц измеряли методом динамического светорассеяния с помощью Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25 °С. В качестве ЛС был использован – галоперидол (Alfa Aesar, Великобритания), обладающий низкой растворимостью и высокой проницаемостью, и относящийся ко II классу биофармацевтической классификационной системы (БКС). В этой связи с целью повышения эффективности доставки галоперидола непосредственно в мозг ввиду того, что он относится к нейролептикам, применяющихся при различных психических расстройствах, были подобраны условия, имитирующие интраназальное введение ЛС. Загрузку галоперидола проводили путем введения ЛС в дисперсию поликомплексных наночастиц под воздействием ультразвука (объем дисперсии 1,5 мл, температура 25 °С) и последующим центрифугированием в течение 20 мин при 5000 об/мин с охлаждением до 4 °С (SL16R, Thermo Scientific, США).

Эксперименты в независимых вертикальных ячейках Франца (PermeGear, США) проводились вручную в течение 3 часов с номинальным объемом акцепторного отсека 19 мл. В качестве буфера использовали искусственную назальную жидкость со значением pH = 5,8 [30]. 1 мл образца или контроля помещали в донорный отсек на диализную мембрану (ММО = 12–14 кДа; Medicell International Ltd, Великобритания), предварительно разрезав ее в виде квадрата размером 1,5 × 1,5 см. Температура среды поддерживалась с помощью водяного термостата HBC 5 control (IKA® Werke GmbH, Германия) при 37,0 ± 0,1 °С. Скорость –

перемешивания была 480 об/мин, что осуществлялось при помощи магнитных стержней, помещенных внутрь ячеек Франца, и магнитных мешалок topolino (IKA® Werke GmbH, Германия). Через каждые 30 минут отбирали аликвоты среды (2 мл) и проводили измерения на УФ/Вид-спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer, США) при 248 нм. Результаты количественно сравнивали с калибровочной кривой, полученной по стандартным растворам галоперидола различной концентрации: 0,2; 1; 2; 5; 10; 15; 20 и 25 мкг/мл ( $r^2 = 0,9999$ ).

Исследование высвобождения также проводили модифицированным методом USP IV на тестере растворения DFZ II «Проточная ячейка» (ERWEKA GmbH, Германия) в конфигурации «закрывающаяся петля». Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Disso.NET USP IV (ERWEKA GmbH, Германия). Скорость потока составляла 16 мл/мин, объем среды – 50 мл, температура поддерживалась при  $37,0 \pm 0,1$  °C. 1 мл образца или контроля помещали сначала в Float-A-Lyzer® G2 с размерами пор, близкими к диализной мембране, используемой в ячейке Франца ММО = 8–10 кДа и, имеющей в 3 раза больший размер пор ММО = 50 кДа (концентрация галоперидола 0,7 мг/мл), после чего устанавливали наноадаптеры в аппарат «Проточная ячейка». Через каждые 30 минут пробы автоматически отбирались с помощью коллектора фракций FRL 724 (ERWEKA GmbH, Германия) и анализировали УФ-спектрофотометрически при 248 нм (Lambda 25, PerkinElmer, США). Результаты также количественно сравнивали с калибровочной кривой по вышеописанной методике.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты были представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение, а вероятность  $P < 0,05$  считалась статистически достоверной. Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.0) и использовалась для анализа результатов с использованием парных  $t$ -тестов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Размер поликомплексных частиц Eudragit® EPO и Eudragit® L100-55 (ИПЭК EPO/L100-55) составил до  $143 \pm 1$  нм и после загрузки галоперидолом  $256 \pm 9$  нм. Данные распределения частиц по размерам представлены на рисунке 1. Эти результаты подтверждают образование частиц в наноразмерном диапазоне (рисунок 1). При этом концентрация галоперидола в поликомплексных наночастицах ИПЭК EPO/L100-55 составила  $770 \pm 6$  мкг/мл.

Гистограммы высвобождения ЛС из поликомплексных наночастиц ИПЭК EPO/L100-55 и контрольного опыта – раствора галоперидола, полученных с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца представлены на рисунке 2.

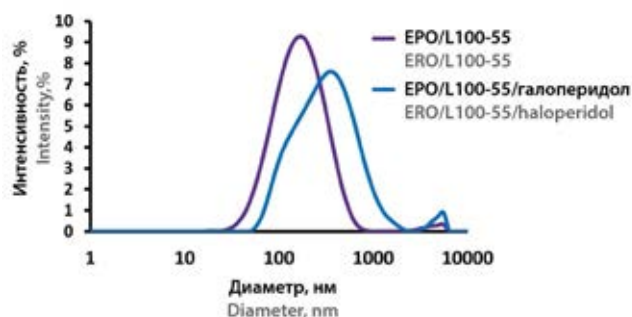


Рисунок 1. Интенсивность распределения размеров поликомплексных наночастиц EPO/L100-55 и EPO/L100-55 с включенным галоперидолом

Figure 1. Size distributions of EPO/L100-55 polycomplex nanoparticles and EPO/L100-55 with and without haloperidol

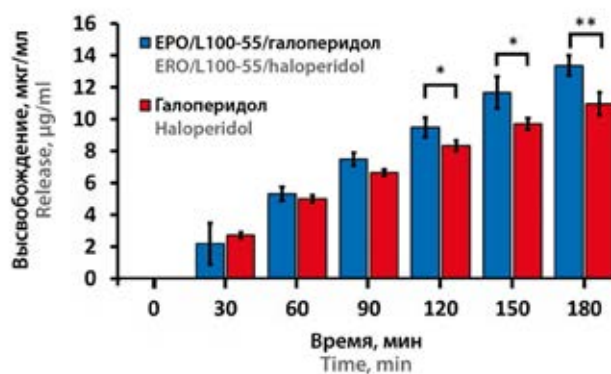


Рисунок 2. Высвобождение галоперидола из раствора и из поликомплексных наночастиц ИПЭК EPO/L100-55, полученных с использованием диффузионной ячейки Франца

Figure 2. Haloperidol release from solution and polycomplex nanoparticles of IPEC EPO/L100-55, obtained using a Franz diffusion cell

В течение первых 90 минут эксперимента не наблюдалось достоверного различия в количестве высвободившегося галоперидола из наночастиц ИПЭК EPO/L100-55 и контрольного раствора. При этом отмечается низкое его содержание в среде: около  $7,5 \pm 0,4$  мкг/мл (ИПЭК EPO/L100-55/галоперидол) и  $6,6 \pm 0,2$  мкг/мл (контрольный опыт). Начиная с 120 минуты наблюдается статистически значимое увеличение степени высвобождения галоперидола из поликомплексных наночастиц по сравнению с раствором галоперидола, что, по всей видимости, может быть следствием отсутствия кристаллизации ЛС на поверхности диализной мембраны в результате возможной потери его растворимости.

Кинетика высвобождения галоперидола из раствора (контроль) и из поликомплексных наночастиц была также изучена методом USP IV «Проточная ячейка» с использованием 2 типов Float-A-Lyzer® G2 с разной величиной ММО: 8–10 и 50 кДа соответственно. Полученные результаты показали отсутствие галоперидола

в среде, имитирующей назальную жидкость, что свидетельствует, по всей видимости, о ранее отмеченной кристаллизации трудно растворимого галоперидола (растворимость в воде составляет 14 мг/л, рКа = 8,66) на поверхности диализных мембран, независимо от их ММО, приводящей к ускоренной закупорке пор и препятствующей диффузии ЛС в акцепторную среду проточной ячейки ввиду особенности ее конструкции с непрерывным потоком среды растворения.

Как известно из данных литературы, для увеличения растворимости галоперидола используют различные методы, в частности, введение солибилизаторов или поверхностно-активных веществ [31–32]. На основании этих данных в среду, имитирующую назальную жидкость, был добавлен в одном случае – 5 % диметилсульфоксид (ДМСО), в другом случае – 0,5 % твин-80. Однако полученные результаты также показали отсутствие галоперидола в среде растворения после проведения эксперимента, что, к сожалению, не позволяет предотвратить возможную кристаллизацию галоперидола на поверхности диализных мембран Float-A-Lyzer® G2 и, по всей видимости, объясняется конструктивными особенностями проточного метода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование диффузионной ячейки Франца демонстрирует увеличение степени высвобождения ЛС – галоперидола (II класс БКС) из поликомплексных наночастиц по сравнению с раствором галоперидола, что, возможно, является результатом предотвращения его кристаллизации на поверхности диализной мембраны. Изучение высвобождения методом «Проточная ячейка» по модифицированному варианту USP IV с применением наноадаптеров, продемонстрировало ускорение процесса кристаллизации галоперидола на поверхности диализных мембран Float-A-Lyzer® G2. Высвобождение ЛС в этом случае, в силу конструктивных особенностей метода непрерывного потока, не наблюдалось не только из поликомплексных наночастиц, но из контрольного раствора галоперидола. Отмеченный эффект оставался неизменным и при добавлении ПАВ и усилителей проницаемости в среду растворения.

Таким образом, оба метода могут быть потенциально использованы для исследования высвобождения ЛС из наноразмерных носителей, но имеют ограничения, обусловленные как различиями физико-химических свойств ЛС, так и конструктивными особенностями разрабатываемых систем их доставки.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kaldybekov D. B., Filippov S. K., Radulescu A., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-functionalised PLGA-PEG nanoparticles as mucoadhesive carriers for intravesical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;143:24–34. Doi: 10.1016/j.ejpb.2019.08.007.
- Wijetunge S. S., Wen J., Yeh C.-K., Sun Y. Wheat germ agglutinin liposomes with surface grafted cyclodextrins as bioadhesive dual-drug delivery nanocarriers to treat oral cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;185:110572. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110572.
- You L., Liu X., Fang Z., Xu Q., Zhang Q. Synthesis of multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PLGA-PEG nano-niosomes as a targeting carrier for treatment of cervical cancer. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;94:291–302. Doi: 10.1016/j.msec.2018.09.044.
- Tsintou M., Wang C., Dalamagkas K., Weng D., Zhang Y.-N., Niu W. Nanogels for biomedical applications: Drug delivery, imaging, tissue engineering, and biosensors. *Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation*. 2017:87–124.
- Ismail A., Nasr M., Sammour O. Nanoemulsion as a feasible and biocompatible carrier for ocular delivery of travoprost: Improved pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;583:119402. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119402.
- Das M., Nariya P., Joshi A., Vohra A., Devkar R., Seshadri S., Thakore S. Carbon nanotube embedded cyclodextrin polymer derived injectable nanocarrier: A multiple faceted platform for stimulation of multi-drug resistance reversal. *Carbohydrate Polymers*. 2020;247:116751. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116751.
- Hegazy M., Zhou P., Rahoui N., Wu G., Taloub N., Lin Y., Huang X., Huang Y. A facile design of smart silica nanocarriers via surface-initiated RAFT polymerization as a dual-stimuli drug release platform. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019;581:123797. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2019.123797.
- Mura P. Advantages of the combined use of cyclodextrins and nanocarriers in drug delivery: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;579:119181. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119181.
- Tagde P., Kulkarni G. T., Mishra D. K., Kesharwani P. Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;56:101613. Doi: 10.1016/j.jddst.2020.101613.
- Gajbhiye K. R., Pawar A., Mahadik K. R., Gajbhiye V. PEGylated nanocarriers: A promising tool for targeted delivery to the brain. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;187:110770. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110770.
- Khan A. R., Yang X., Du X., Yang H., Liu Y., Khan A. Q., Zhai G. Chondroitin sulfate derived theranostic and therapeutic nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers*. 2020;233:115837. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115837.
- Khutoryanskiy V. V., Smyslov R. Y., Yakimansky A. V. Modern Methods for Studying Polymer Complexes in Aqueous and Organic Solutions. *Polymer Science, Series A*. 2018;60(5):553–576. Doi: 10.1134/S0965545X18050085.
- Mustafin R. I., Kabanova T. V., Zhdanova E. R., Bukhovets A. V., Garipova V. R., Nasibullin S. F., Kemenova V. A. Diffusion-transport properties of a polycomplex matrix system based on Eudragit® EPO and Carbomer 940. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2010;44(3):147–150.
- Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. Interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers as carriers for bioadhesive gastroretentive Metronidazole delivery system. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):13–17. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76. (In Russ.).
- Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A. Polycomplex Carrier for Buccal Mucoadhesion Delivery of Metronidazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. Doi: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90. (In Russ.).
- Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes of Eudragit® copolymers as novel carriers for colon-specific drug delivery. *Polymers*. 2020;12(7):1459. Doi: 10.3390/polym12071459.
- Garipova V., Gennari C., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. Mucoadhesive interpolyelectrolyte complexes for the buccal delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(1):85. Doi: 10.3390/polym10010085.

18. Rapedius M., Blanchard J. Comparison of the Hanson Microtett and the Van Kel Apparatus for *In Vitro* Release Testing of Topical Semisolid Formulations. *Pharmaceutical Research*. 2001;18(10):1440–1447. Doi: 10.1023/A:1012256923340.
19. Heng D., Culter D. J., Chan H.-K., Yun J., Raper J. A. What is suitable dissolution method for drug release nanoparticles? *Pharmaceutical Research*. 2008;25(7):1696–1701. Doi: 10.1007/s11095-008-9560-0.
20. Shohin I. E., editor. Dissolution test in drug development and registration. Practical-research text book for the specialists in pharmaceutical industry. Moscow: *Publisher Pero*, 2015. 320 p. (In Russ.).
21. Alves A. C., Ramos I. I., Nunes C., Magalhães L. M., Sklenářová H., Segundo M. A., Lima J. L. F. C., Reis S. On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talanta*. 2016;146:369–374. Doi: 10.1016/j.talanta.2015.08.070.
22. Venkateswarlu V., Manjunath K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2004;95(3):627–638. Doi: 10.1016/j.jconrel.2004.01.005.
23. Dalmoro A., Bochicchio S., Nasibullin S. F., Bertoincin P., Lamberti G., Barba A. A., Moustafine R. I. Polymer-hybrid lipid nanoparticles as enhanced indomethacin delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;121:16–28. Doi: 10.1016/j.ejps.2018.05.014.
24. Hu X., Khan M. A., Burgess D. J. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;426:211–218. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.030.
25. Palena M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carriers. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14:867–878. Doi: 10.1007/s11051-012-0867-8.
26. Palena M. C., García M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and *in vitro* release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;30(A):45–53. Doi: 10.1016/j.jddst.2015.09.014.
27. Bhardwaj U., Burgess D. J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;388:287–294. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.01.009.
28. Tang J., Srinivasan S., Yuan W., Ming R., Liu Y., Dai Z., Noble C. O., Hayes M. E., Zheng N., Jiang W., Szoka F. C., Schwendeman A. Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;134:107–116. Doi: 10.1016/j.ejpb.2018.11.010.
29. Moustafine R. I., Sitenkov A. Y., Bukhovets A. V., Nasibullin S. F., Appeltans B., Kabanova T. V., Khutoryanskiy V. V., Van den Mooter G. Indomethacin-containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® EPO/S 100 copolymers as a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;524:121–133. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.053.
30. Porfiryeva N. N., Nasibullin S. F., Abdullina S. G., Tukhbatullina I. K., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® EPO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:241–248. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.027.
31. Choi J. M., Kim H., Cho E., Choi Y., Lee I. S., Jung S. Solubilization of haloperidol by acyclic succinoglycan oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(2):564–570. Doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.048.
32. Kumbhara S. A., Kokare C. R., Shrivastava B., Gorain B., Choudhury H. Preparation, characterization, and optimization of asenapine maleate mucoadhesive nanoemulsion using Box-Behnken design: *In vitro* and *in vivo* studies for brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;586:119499. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119499.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-51-58>  
УДК 61.45.15



Оригинальная статья/Research article

## Разработка таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением методов планирования эксперимента и инструментов QbD

А. Н. Голубев<sup>1</sup>, Т. Ш. Нгуен<sup>1</sup>, В. В. Сорокин<sup>1\*</sup>, И. Е. Каухова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

\*Контактное лицо: Сорокин Владислав Валерьевич. E-mail: spcpa@outlook.com

ORCID: А. Н. Голубев – <https://orcid.org/0000-0002-6832-6918>; Т. Ш. Нгуен – <https://orcid.org/0000-0002-6758-6152>; В. В. Сорокин – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>; И. Е. Каухова – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>.

Статья поступила: 13.07.2020. Статья принята в печать: 26.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Качество, наряду с эффективностью и безопасностью, являются ключевыми характеристиками лекарственного препарата. Поэтому важно в рамках фармацевтической разработки закладывать основы для получения качественного продукта и достижения желаемых характеристик продукта. Одним из инструментов, применяемых для этого, является подход «Quality by design» (QbD) – качество через разработку. В руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» он определяется как системный подход к разработке, который начинается с заранее определенных целей и фокусирует внимание на понимании продукта и процесса, а также управлении процессом, основанном на надежных научных данных и управлении рисками по качеству.

**Цель.** Цель исследования – разработка состава таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением инструмента QbD с использованием математической модели, связывающей состав таблеток (СМА) с показателями ее качества (СQA).

**Материалы и методы.** В основе исследования лежала концепция QbD (quality by design) – качество через разработку. Центральным методом проведения процесса разработки был метод design of experiments (планирования эксперимента) с созданием индивидуального дизайна. Планирование эксперимента проводилось в программном пакете JMP Pro 14 (ver.14.3.0), SAS Institute Inc., США. Для оценки рисков в работе применялся метод анализа рисков FMEA (failure mode and effects analysis) – анализ видов и последствий отказов. В качестве методов анализа смеси для таблетирования и самих таблеток выступали тесты: распадаемость таблеток, прочность таблеток на раздавливание, определение гигроскопичности, определение индексов Карра и Хауснера.

**Результаты и обсуждение.** Проведена разработка состава таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы, получаемых методом прямого прессования. Для разработки состава таблеток в соответствии с руководством ICH Q8, на первом этапе был составлен «quality target product profile» (целевой профиль качества готового продукта). Для обеспечения свойств, заданных в целевом профиле качества продукта, был подобран компонентный состав разрабатываемых таблеток исходя из выбранной технологии получения и ключевых характеристик как смеси для таблетирования, так и готовой продукции. Оценка риска для состава препарата определила, что количественные содержания 4 вспомогательных веществ, рассматриваются как критические атрибуты качества материалов (СМА). СМА оказывают влияние на критические атрибуты качества (СQA) лекарственной формы, которые определяют эффективность состава. На основании первичного анализа данных были установлены оптимальные границы содержания для каждого компонента. Определены потенциально критические качественные признаки разрабатываемого лекарственного средства (СQA). Получена и проанализирована математическая модель, связывающая критические параметры качества и состав таблеток.

**Заключение.** На основании математической модели определен оптимальный состав массы для таблетирования и таблеток, получаемых из нее. Рассчитаны показатели качества таблеток, соответствующих выбранному составу, произведена оценка адекватности полученной модели путем сравнения расчетных и реальных показателей. Показано, что погрешность расчетов не превышает 10 %, а предложенный алгоритм оптимизации и полученная на его основе модель может успешно использоваться для оптимизации состава таблеток.

**Ключевые слова:** планирование эксперимента, разработка лекарственных препаратов, quality by design.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** А. Н. Голубев, Т. Ш. Нгуен – постановка задачи, выполнение практических опытов, обработка результатов; В. В. Сорокин, И. Е. Каухова – постановка задачи, обработка результатов.

**Для цитирования:** Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Сорокин В. В., Каухова И. Е. Разработка таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением методов планирования эксперимента и инструментов QbD. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):51–58. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-51-58>

## Tablets Development Based on Clover Meadow Grass Phytosubstance Using Design of the Experiment Method and QbD Tools

Artyom N. Golubev<sup>1</sup>, Thi S. Nguen<sup>1</sup>, Vladislav V. Sorokin<sup>1\*</sup>, Irina E. Kauhova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

\*Corresponding author: Vladislav V. Sorokin. E-mail: spcpa@outlook.com

ORCID: Artyom N. Golubev – <https://orcid.org/0000-0002-6832-6918>; Thi S. Nguen – <https://orcid.org/0000-0002-6758-6152>; Vladislav V. Sorokin – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>; Irina E. Kauhova – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>.

Received: 13.07.2020. Revised: 26.08.2020. Published: 28.08.2020

© Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Сорокин В. В., Каухова И. Е., 2020

© Golubev A. N., Nguen T. S., Sorokin V. V., Kauhova I. E., 2020

## Abstract

**Introduction.** Quality, along with efficacy and safety, are the key characteristics of a drug. Therefore, it is important in frame of pharmaceutical development to lay the foundation for obtaining a quality product and achieving the desired product characteristics. One of the tools used for this is the «Quality by design» approach (QbD) – quality through development. The ICH Q8 «Pharmaceutical development» manual defines it as a systematic approach to development that starts with pre-defined goals and focuses on understanding the product and process, as well as managing the process based on reliable scientific data and quality risk management.

**Aim.** The aim of the research is to develop the composition of tablets based on clover meadow grass phytosubstance using the QbD tool with application of mathematical model that links the composition of tablets (CMA) with its quality attributes (CQA).

**Materials and methods.** The research was based on the concept of quality by design/quality through development. The main method for conducting the development process was design of experiments method/experiment planning with creating of individual design. The experiment planning was performed in the software package JMP Pro 14 (ver. 14. 3. 0), SAS Institute Inc., USA. The method of risk analysis-failure mode and effects analysis (FMEA)/analysis of the types and consequences of failures was used for risk assessment in research. As methods of analysis of the tablet mixture and the tablets were used the following tests: disintegration of tablets, crushing strength of tablets, determination of hygroscopicity, determination of Carr's and Hausner index.

**Results and discussion.** The composition of tablets based on the clover meadow grass phytosubstance obtained by direct pressing was developed. In order to develop the composition of tablets in accordance with the ICH Q8 guidelines, the first step was to create a quality target product profile. To ensure the properties specified in the quality target product profile, the component composition of the developed tablets was selected based on the selected production technology and key characteristics of both the tablet mixture and the finished product. The risk assessment for the product composition determined that the quantitative content of 4 excipients are considered as critical quality attributes of materials (CMA). CMAs affect the critical quality attributes (CQA) of the dosage form, which determine the effectiveness of the composition.

Based on the initial data analysis, optimal content boundaries for each component were established. Potentially critical qualitative characteristics of the drug under development (CQA) were identified. A mathematical model linking critical quality parameters and tablet composition was obtained and analyzed.

**Conclusion.** Based on a mathematical model, the optimal composition of tablet mixture and tablets obtained from it was determined. The tablets quality indicators corresponding to the selected composition were calculated, and the adequacy of the obtained model was evaluated by comparing calculated and real indicators. It is shown that the calculation error does not exceed 10 %, and the proposed optimization algorithm and the model derived from it can be successfully used to optimize the composition of tablets.

**Keywords:** design of experiment, drug development, quality by design.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Artyom N. Golubev, Thi S. Nguyen – setting the problem, performing practical experiments, processing the results; Vladislav V. Sorokin, Irina E. Kaukhova – setting the problem, processing the results.

**For citation:** Golubev A. N., Nguen T. S., Sorokin V. V., Kauhova I. E. Tablets development based on clover meadow grass phytosubstance using design of the experiment method and QbD tools. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):51–58. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-51-58>

## ВВЕДЕНИЕ

Качество, наряду с эффективностью и безопасностью, являются ключевыми характеристиками лекарственного препарата. Поэтому важно в рамках фармацевтической разработки закладывать основы для получения качественного продукта и достижения желаемых характеристик продукта. Одним из инструментов, применяемых для этого, является подход «Quality by design» (QbD) – качество через разработку [1, 2]. В руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» он определяется как системный подход к разработке, который начинается с заранее определенных целей и фокусирует внимание на понимании продукта и процесса, а также управлении процессом, основанном на надежных научных данных и управлении рисками по качеству. Согласно данной методологии, фармацевтическая разработка должна включать, как минимум, следующие элементы и фазы:

- определение профиля качественных характеристик лекарственного средства (QTPP);
- выявление потенциально критических качественных признаков лекарственного препарата (критические атрибуты качества – CQA);

- определение критических параметров процесса (CPP);
- определение характеристик фармацевтической субстанции, вспомогательных веществ (критических атрибутов качества материалов – CMA);
- проектировка пространства дизайна (DS) и его оптимизация, определение стратегии контроля (CS) и улучшений [1].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки таблеток на основе клевера лугового травы использовался подход «quality by design» и рекомендации руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».

Для проектировки пространства дизайна использовали DoE (Design of Experiments) – планирование эксперимента. Разработка плана эксперимента проводилась в программном пакете JMP Pro 14 (ver.14.3.0), SAS Institute Inc., США. Используем критерий D-оптимальности для определения того, какие входные данные влияют на выходные данные. Критерий D-оптимальности фокусирует внимание на точках на внешних краях проектного пространства, что позво-

ляет подчеркнуть обнаружение входных параметров (СМА), которые связаны с изменениями в выходных параметрах (СQA).

Анализировали следующие показатели готовой продукции:

- 1) распадаемость, которая проводилась в соответствии с ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» [3], на тестере распадаемости ZT 220 (ERWEKA GmbH, Германия);
- 2) прочность на раздавливание – в соответствии с ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» [3] на тестере прочности ТВН 125 (ERWEKA GmbH, Германия);
- 3) влагопоглощение. Определялось измерением прироста влаги таблетками. Таблетки помещали в стеклянные бюксы (с заранее измеренной массой), закрывали крышкой. Взвешивали бюкс с таблеткой на аналитических весах, с точностью до 4 знака после запятой. После чего бюкс помещали в эксикатор с водой, крышки бюксов открывались. По истечении 6 и 12 часов проводилось взвешивание таблеток. Бюксы закрывали крышками, вынимали из эксикатора и взвешивали с точностью до 4 знака после запятой. Далее производился расчет прироста влаги в процентах по формуле (1), где: масса пустого бюкса; масса бюкса с таблеткой до эксикатора; масса бюкса с таблеткой по истечении 6 и 12 часов.

$$X = \frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1} \quad (1)$$

- 4) сжимаемость порошка, оцениваемая по показателю – число Хауснера (Н) – характеристика сжимаемости порошка. Для расчета использовалась формула,  $p_y$  – плотность после уплотнения,  $p$  – насыпная плотность до уплотнения.

$$H = \frac{p_y}{p}$$

- 5) сыпучесть порошка – индексу Карра (J). Для расчета использовалась формула [4]:

$$J = 100\% \cdot \frac{p_y - p}{p_y}$$

Определение плотностей производилось в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [3] на тестере насыпной плотности SVM 121 (ERWEKA GmbH, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки состава таблеток в соответствии с руководством ICH Q8, на первом этапе был составлен «quality target product profile» (целевой профиль качества готового продукта). В его основу легли показатели качества для таблеток описанные в Государственной фармакопее РФ XIV издания. Для разработки состава и технологии таблеток, на основании опыта разработки, ключевыми выбраны показатели, описанные в таблице 1.

Таблица 1. Целевой профиль качества продукта

Table 1. Quality target product profile

Показатель качества Level of quality	Метод анализа Analysis method	Критерий приемлемости Acceptance criterion
Описание Description	ОФС.1.4.1.0015.15 OFS.1.4.1.0015.15	Двояковыпуклые таблетки от серого до светло-коричневого цвета, без сколов, с ровной, однородной поверхностью Biconvex tablets from gray to light brown, no chips, with a smooth, uniform surface
Прочность на раздавливание Crushing strength	ОФС.1.4.2.0011.15 OFS.1.4.2.0011.15	Не менее 40 Н Not less than 40 N
Распадаемость Disintegration	ОФС.1.4.2.0013.15 OFS.1.4.2.0013.15	Не более 15 минут No more than 15 minutes
Растворение Dissolution	ОФС.1.4.2.0014.15 OFS.1.4.2.0014.15	За 45 минут в среду растворения должно перейти не менее 75 % действующего вещества In 45 minutes, at least 75 % of the active substance must pass into the dissolution medium
Прочность на истираемость Abrasion resistance	ОФС.1.4.2.004.15 OFS.1.4.2.004.15	Потеря в массе до 1 % (прибор 1) Weight loss up to 1 % (device 1)
Индекс Карра Carr index	ОФС.1.4.2.0016.15 и математические расчеты OFS.1.4.2.0016.15 and mathematical calculations	Не более 26 % No more than 26 %
Индекс Хауснера Hausner index	ОФС.1.4.2.0016.15 и математические расчеты OFS.1.4.2.0016.15 and mathematical calculations	не более 1,36 no more than 1.36
Влагопоглощение Moisture absorption	СОП лаборатории SOP laboratory	–

В качестве технологии получения таблеток выбран метод прямого прессования. Для обеспечения свойств, заданных в целевом профиле качества продукта, был подобран компонентный состав разрабатываемых таблеток исходя из выбранной технологии получения и ключевых характеристик как смеси для таблетирования, так и готовой продукции. На основании первичного анализа данных были установлены оптимальные границы содержания для каждого компонента.

Оценка риска для состава препарата определила, что количественные содержания 4 вспомогательных веществ (МКЦ, аэросила, натрия карбоксиметилцеллюлозы, стеарата кальция) рассматриваются как СМА. СМА оказывают влияние на СQA лекарственной формы, которые определяют эффективность состава. Выбранный компонентный состав таблеток, границы варьирования компонентов, а также показатели качества готового продукта, на которые могут значительно влиять используемые вспомогательные вещества, представлены в таблице 2.

Предварительно было определено, что прочность на истираемость ряда модельных таблеток и проч-

ность на раздавливание коррелируют друг с другом, а время растворения 75 % действующего вещества как правило не превышает 1,2–1,5 времени, требующегося для распадаемости таблетки, что вероятно обусловлено ярко-выраженными гидрофильными свойствами сухого экстракта.

Так как в случае получения таблеток с использованием композиций из выбранных вспомогательных веществ показатели «прочность на раздавливание» и «распадаемость» первыми выходят за нормативные границы в случае отклонения, в качестве потенциально критических качественных признаков разрабатываемого лекарственного средства (СQA) использовали следующие показатели: распадаемость, прочность на раздавливание, индексы Карра и Хауснера, влагопоглощение.

Надлежащая распадаемость обеспечивает высвобождение действующего вещества, прочность на раздавливание – внешний вид и устойчивость формы таблетки; низкое влагопоглощение – стабильность лекарственной формы с растительным экстрактом; число Хауснера характеризует сжимаемость порошка; индекс Карра – сыпучесть порошка.

Таблица 2. Оценка влияния компонентов на показатели качества продукции

Table 2. Evaluating the impact of components on product quality indicators

Компонент Component	Назначение Appointment	Оценка влияния на показатели качества продукта Assessment of the impact on product quality indicators	Границы содержания Content boundaries
Высокоочищенный экстракт клевера лугового Highly purified meadow grass clover extract	Действующее вещество, обеспечивает комплексное воздействие на организм The active substance provides a complex effect on the body	-	75 мг (20 % здесь и далее от массы таблетки) 75 mg (20 % hereinafter of the tablet weight)
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) Microcrystalline cellulose (MCC)	Связывающий вещество, определяет прочность и целостность таблетки Binder, determines tablet strength and integrity	Истираемость, прочность на раздавливание, индекс Хауснера Abrasion, crush strength, Hausner index	20–56 %
Лактоза Lactose	Наполнитель и корригент вкуса, предназначен для придания массы таблетки, увеличивает распадаемость Filler and flavoring agent, intended to impart bulk to the tablet, increases disintegration	Распадаемость, растворение Disintegration, dissolution	17,7–52,2 %
Аэросил Aerosil	Антифрикционное вещество, повышает сыпучесть смеси для таблетирования, препятствует прилипанию таблеток к матрице и пуансонам Antifriction agent, increases the flowability of the tableting mixture, prevents the tablets from sticking to the matrix and punches	Однородность массы, однородность дозирования, сыпучесть (индекс Карра) Mass uniformity, dosage uniformity, flowability (Carr index)	1,0–3,0 %
Натрия карбоксиметилцеллюлоза Sodium carboxymethylcellulose	Супердизинтегрант, помогает таблетке быстрее распадаться при контакте с влагой Superdisintegrant, helps the tablet disintegrate faster upon contact with moisture	Распадаемость, растворение Disintegration, dissolution	2–6 %
Стеарат кальция Calcium stearate	Стеарат кальция, опудривающий агент, облегчает выход таблеток из пуансона и повышает сыпучесть смеси для таблетирования Calcium stearate, a dusting agent, facilitates the release of tablets from the punch and improves the flowability of the tableting mix	Однородность массы, однородность дозирования, описание Mass uniformity, dosage uniformity, description	1,1–3 %

Для разработки и оптимизации состава таблеток был разработан следующий алгоритм проектирования в среде JMP:

- 1) используем **DOE > Custom Design (индивидуальный дизайн)**;
- 2) задаем **Responses (ответы)**: вводим **Response Name (наименование отклика)**; **Goal (целевое значение дальнейшей оптимизации)**; **Lower/Upper Limit (максимальный/минимальный предел признака)**;
- 3) в **Factors (факторы)** вводим наименования компонентов, которые планируем изменять и их **Values (границы изменения)**, тип факторов **Continuous (непрерывные)**, тип изменения – **Easy (простое)**. В данном исследовании планируем изменять количество 4 из 6 выбранных компонентов: экстракт, как действующее вещество, не включен в перечень факторов, так как его содержание постоянно, а содержание лактозы будет использоваться в качестве зависимой переменной, и будет вычисляться как остаточная масса после сложения всех компонентов. Масса таблетки принята 375 мг. Заполненное окно факторов представлено на рисунке 1. Существует высокая вероятность того, что изменение выходных данных обусловлено комбинированным эффектом между двумя или более переменными – взаимодействием. В Model (модель) в раскрывающемся списке Interactions (взаимодействия) выбираем 2nd (двойные взаимодействия факторов).

- 4) в **Design Generation (генерирование плана)**, в поле **Number of Replicate Runs (количество повторных прогонов)** – ввели 1; выбираем **User Specified (заданные пользователем)** и используем план из 16 опытов, предложенных программой (рисунок 2)
- 5) далее вводим столбец с содержанием действующего вещества, лактозы и общей массой таблетки, дополнительно для удобства вводим рядом с каждым столбцом процентное содержание компонента в таблетке в процентах (для создания столбца необходимо нажать **Cols (колонки) > New Columns (новая колонка)**, в **Column Name (имя колонки)** ввести имя, остальные настройки по умолчанию);
- 6) так как лактоза является зависимой переменной, ее масса в таблетках рассчитывается, как остаточный компонент. Итоговый план эксперимента представлен на рисунке 3.

Второй этап исследования состоял в получении таблеток согласно плану эксперимента и в их дальнейшем анализе. Для каждого из предложенных составов были получены партии таблеток, которые в дальнейшем анализировались по определенным показателям качества. Данные, полученные в результате анализа, были занесены в таблицу плана и затем на основании полученных данных была построена математическая модель для оптимизации состава.

Для оптимизации состава использовали функции желательности по каждому оцениваемому CQA. Для этого задавались граничные значения и жела-

Имя переменной Name	Тип переменной Role	Вид изменения Changes	Граничные значения Values	
2 Микрористаллическая целлюлоза 2 Microcrystalline cellulose	Непрерывный Continuous	Простой Easy	75	210
4 Аэросил 4 Aerosil	Непрерывный Continuous	Простой Easy	3,8	15
5 Натрия крахмал гликолят 5 Sodium starch glycolate	Непрерывный Continuous	Простой Easy	7,5	22,5
6 Стеарат магния 6 Magnesium stearate	Непрерывный Continuous	Простой Easy	1,1	3

Рисунок 1. Скриншот окна Factors при создании плана

Figure 1. Screenshot of the Factors window when creating a plan

	2 МКЦ 2 MCC	4 Аэросил 4 Aerosil	5 Натрия крахмала гликолят 5 Sodium starch glycolate	6 Стеарат магния 6 Magnesium stearate	Число Хауснера Hausner number	Индекс Карра Carr index	Прочность таблеток Tablet strength	Распадаемость Disintegration	Прирост влагопоглощения 6 ч Increase in moisture absorption 6 h	Прирост влагопоглощения 12 ч Increase in moisture absorption 12 h
1	210	15	7,5	1,1	*	*	*	*	*	
2	210	3,8	22,5	1,1	*	*	*	*	*	
3	75	15	7,5	3	*	*	*	*	*	
4	75	15	22,5	3	*	*	*	*	*	

Рисунок 2. Скриншот фрагмента полученного первичного плана

Figure 2. Screenshot of a fragment of the received primary plan

	1 Экстракт клевера (мг/табл.) 1 Clover extract (mg/tab.)	1 Экстракт клевера (%) 1 Clover extract (%)	2 МКЦ (мг/табл.) 2 MCC (mg/tab.)	2 МКЦ (%) 2 MCC (%)	3 Лактоза (мг/табл.) 3 Lactose (mg/tab.)	3 Лактоза (%) 3 Lactose (%)	4 Аэросил (мг/табл.) 4 Aerosil (mg/tab.)	4 Аэросил (%) 4 Aerosil (%)	5 Натрия крахмала гликолят (мг/табл.) 5 Sodium starch glycolate (mg/tab.)	5 Натрия крахмала гликолят (%) 5 Sodium starch glycolate (%)	6 Стеарат магния (мг/табл.) 6 Magnesium stearate (mg/tab.)	6 Стеарат магния (%) 6 Magnesium stearate (%)	Масса таблетки Tablet weight
1	75	20	210	56	66,4	177,7	15	4	7,5	2	1,1	0,29	375
2	75	20	75	20	195,7	52,2	3,8	1,01	22,5	6	3	0,8	375
3	75	20	210	56	51,4	13,7	15	4	22,5	6	1,1	0,29	375
4	75	20	210	56	60,7	16,2	3,8	1,01	22,5	6	3	0,8	375
5	75	20	75	20	201,4	53,7	15	4	7,5	2	1,1	0,29	375
6	75	20	75	20	212,6	56,7	3,8	1,01	7,5	2	1,1	0,29	375
7	75	20	210	56	75,7	20,2	3,8	1,01	7,5	2	3	0,8	375
8	75	20	210	56	62,6	16,7	3,8	1,01	22,5	6	1,1	0,29	375
9	75	20	75	20	199,5	53,2	15	4	7,5	2	3	0,8	375
10	75	20	75	20	197,6	52,7	3,8	1,01	22,5	6	1,1	0,29	375
11	75	20	75	20	210,7	56,2	3,8	1,01	7,5	2	3	0,8	375
12	75	20	142,5	38	131,05	34,9	9,4	2,51	15	4	2,053	0,55	375
13	75	20	75	20	184,5	49,2	15	4	22,5	6	3	0,8	375
14	75	20	210	56	77,6	20,7	3,8	1,01	7,5	2	1,1	0,29	375
15	75	20	210	56	64,7	17,2	15	4	7,5	2	3	0,*	375
16	75	20	75	20	186,4	49,7	15	4	22,5	6	1,1	0,29	375

Рисунок 3. План эксперимента

Figure 3. Plan of experiment

тельность (desirability). Задавали максимальное, минимальное и целевое (желательное) значение показателя, соответствующие им параметры функции желательности, а также «значимость» (на основе проведенного анализа рисков) рассматриваемого показателя CQA (чем больше введенное значение, тем выше его важность для алгоритмов модели).

На рисунке 4 показана суммарная оценка полученной модели. Из анализа данной диаграммы, можно сделать вывод, что на рассматриваемые критические атрибуты качества таблеток (показатели CQA) оказывают значительное влияние содержания МКЦ, натрия крахмала гликолята, их взаимодействие, а также взаимодействие МКЦ с аэросилом.

Проведена оценка адекватности полученной модели с помощью графиков «Actual by Predicted Plot» (показывает разброс данных относительно корреляционной прямой) и числу Rsq (описывает модель с точки зрения точности), которая показала, что все составляющие модели адекватны.

Для непосредственного вывода оптимального состава использовали графики Prediction Profile (профиль прогнозирования), на которых отражается влияние каждого компонента на каждый показатель

CQA. Для нахождения оптимального состава в меню Prediction Profile, подменю Optimization and desirability (оптимизация и желательность), выбирали Maximize Desirability (максимальная желательность). Полученный в результате оптимизации состав представлен в таблице 3. Прогнозируемые показатели качества таблеток, полученных из данного состава, представлены в таблице 4.

Таблица 3. Состав смеси для таблетирования

Table 3. The composition of the mixture for tableting

Состав на одну таблетку, мг Composition for one tablet, mg					
Действующее вещество (фитосубстанция клевера лугового) Active ingredient (phytostubstance of meadow clover)	МКЦ MCC	Лактоза Lactose	Аэросил Aerosil	Натрия крахмала гликолят Sodium starch glycolate	Стеарат магния Magnesium stearate
75	170,14	91,26	15	22,5	1,1
ИТОГО: 375 TOTAL: 375					

Отчет о влиянии переменных			
Исходные данные	LogWorth		PValue
2 Микрористаллическая целлюлоза (мг/табл.) (75; 210)	3,244		0,00057
5 Натрия крахмал гликолят (мг/табл.) (7,5; 2,25)	1,787		0,01634
2 Микрористаллическая целлюлоза (мг/табл.) * 4 Аэросил (мг/табл.)	1,396		0,04014
2 Микрористаллическая целлюлоза (мг/табл.) * 5 Крахмал гликолят натрия (мг/табл.)	1,350		0,04469
2 Микрористаллическая целлюлоза (мг/табл.) * 6 Стеарат магния (мг/табл.)	1,285		0,05182
4 Аэросил (мг/табл.) * 6 Стеарат кальция (мг/табл.)	1,147		0,07129
5 Крахмал гликолят натрия (мг/табл.) * 6 Стеарат кальция (мг/табл.)	0,854		0,13994
4 Аэросил (мг/табл.) * 5 Крахмал гликолят натрия (мг/табл.)	0,842		0,14388
4 Аэросил (мг/табл.) (3; 8; 15)	0,786		0,16383
6 Стеарат кальция (мг/табл.) (1; 1; 3)	0,262		0,54749

Рисунок 4. Скриншот суммарной оценки модели

Effect summary			
Source	LogWorth		PValue
2 Microcrystalline cellulose (mg/tab.) (75; 210)	3,244		0,00057
5 Sodium starch glycolate (mg/tab.) (7,5; 2,25)	1,787		0,01634
2 Microcrystalline cellulose (mg/tab.) * 4 Aerosil (mg/tab.)	1,396		0,04014
2 Microcrystalline cellulose (mg/tab.) * 5 Sodium starch glycolate (mg/tab.)	1,350		0,04469
2 Microcrystalline cellulose (mg/tab.) * 6 Magnesium stearate (mg/tab.)	1,285		0,05182
4 Aerosil (mg/tab.) * 6 Calcium stearate (mg / tab.)	1,147		0,07129
5 Sodium starch glycolate (mg/tab.) * 6 Calcium stearate (mg / tab.)	0,854		0,13994
4 Aerosil (mg/tab.) * 5 Sodium starch glycolate (mg/tab.)	0,842		0,14388
4 Aerosil (mg/tab.) (3; 8; 15)	0,786		0,16383
6 Calcium stearate (mg/tab.) (1; 1; 3)	0,262		0,54749

Figure 4. Screenshot of the total model rating

Таблица 4. Оптимальный состав и его ожидаемые характеристики

Table 4. The selected optimal composition and its expected characteristics

Показатель качества (CQA) Quality Score (CQA)	Критерий приемлемости Acceptance criterion	Прогнозируемый Projected	Полученный (реальный) Received (real)	Отклонение, % Deviation, %
Прочность таблеток на раздавливание, Н Crushing strength of tablets, N	Не менее 40 Н Not less than 40 N	196	178	10 %
Истираемость таблеток Abrasion of tablets	Потеря в массе не должна превышать 1 % Weight loss should not exceed 1 %	–	0,2	–
Распадаемость, мин Disintegration, min	Не более 15 минут No more than 15 minutes	14	13	8 %
Растворение, мин Dissolution, min	Не более 45 минут No more than 15 minutes	–	24	–
Прирост влагопоглощения через 6 часов, % Increase in moisture absorption after 6 hours, %	–	2,33	2,51	8 %
Прирост влагопоглощения через 24 часа, % Increase in moisture absorption after 24 hours, %	–	7,52	7,73	3 %
Индекс Карра Carr index	Не более 26 % Not more than 26 %	25,7	25,0	3 %
Индекс Хауснера Hausner index	Не более 1,36 No more than 1.36	1,35	1,32	3 %

Далее были получены таблетки соответствующего состава. Проведен их анализ по показателю качества (таблица 4). Оценено отклонение прогнозируемой величины CQA от расчетной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования рассмотрено влияние количества вспомогательных веществ на критические показатели качества таблеток: построена математическая модель, связывающая состав таблетки с показателями качества разрабатываемого лекарственного средства, выделены как CQA.

Определен оптимальный состав массы для таблетирования и таблеток, получаемых из нее, исходя из построенной модели. Рассчитаны показатели качества таблеток, соответствующих выбранному составу, произведена оценка адекватности полученной модели путем сравнения расчетных и реальных показателей. Показано, что погрешность расчетов не превышает 10%, а предложенный алгоритм опти-

мизации и полученная на его основе модель может успешно использоваться для оптимизации состава таблеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. ICH Q8 Pharmaceutical development. Available at: <http://www.ich.org>.
2. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48>.
3. Государственная фармакопея XIV издания.

## REFERENCE

1. ICH Q8 Pharmaceutical development. Available at: <http://www.ich.org>.
2. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kauhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.). Doi: <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48>.
3. State Pharmacopoeia Russian Federation XIV edition. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66>  
УДК 615.19.072



Оригинальная статья/Research article

## Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами

О. В. Тринева<sup>1\*</sup>, А. И. Сливкин<sup>1</sup>, Е. Ф. Сафонова<sup>2</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

2 – БПОУ ВО «Воронежский базовый медицинский колледж», 394055, Россия, г. Воронеж, ул. Космонавтов, д. 46

\*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

ORCID: О. В. Тринева – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>; А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; Е. Ф. Сафонова – <https://orcid.org/0000-0003-0081-1113>.

Статья поступила: 13.03.2020. Статья принята в печать: 15.06.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта различных препаратов с использованием тестов *in vivo* и *in vitro* в литературе уделяется большое внимание. Постоянно растет интерес к определению антиоксидантной активности (АОА) лекарственных препаратов, в том числе фитопрепаратов, лекарственного растительного сырья и входящих в их состав биологически активных веществ. Известно, что такое официальное лекарственное растение, как крапива двудомная, по своему фитохимическому составу богата природными антиоксидантами: флавоноиды, каротиноиды, аскорбиновая кислота и др. В отдельных публикациях имеются сведения об антиоксидантной активности листьев крапивы и препаратов на ее основе. Однако, информации о сравнительной характеристике применения различных методов для определения антиоксидантной активности данного вида лекарственного растительного сырья и полученных результатов, в научной литературе не обнаружено.

**Цель.** Целью настоящей работы являлось сравнительное определение антиоксидантной активности лекарственного растительного сырья крапивы двудомной различными методами.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлось готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной (*Folia Urticae*) в фильтр-пакетах, выпускаемое отечественным производителем. АОА водных и водно-спиртовых извлечений определяли титриметрически по методике, разработанной Т. В. Максимовой с соавторами; по способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro*. Культура клеток *Paramecium caudatum* была также использована в качестве биологической модели для определения антиоксидантного действия водных извлечений из изучаемого сырья на живую клетку. Определение качественного и количественного состава фенольных АО проводили методом ВЭЖХ-ДМД-МС.

**Результаты и обсуждение.** Определена суммарная антиоксидантная активность водных и водно-спиртовых извлечений из листьев крапивы двудомной с использованием различных методик, рекомендуемых в литературе. Исследовано влияние полярности экстрагента на величину антиоксидантной активности и выявлена обратно пропорциональная зависимость. Установлено, что наибольшее содержание антиоксидантов в извлечении наблюдается при использовании 96 % этанола в качестве экстрагента. Оценка антиоксидантного действия исследуемого объекта биологическим методом проводили в соответствии со значениями индекса биологической активности. ВЭЖХ-ДМД-МС анализ водно-метанольного извлечения из листьев крапивы показал присутствие 17 веществ – представителей группы фенольных соединений.

**Заключение.** При помощи четырех независимых методов показана перспективность использования листьев крапивы двудомной и препаратов на ее основе в качестве источника АО. Полученные данные, несомненно, открывают новые возможности применения давно известного растения и подтверждают целесообразность и перспективность его использования для получения новых лекарственных форм.

**Ключевые слова:** крапива двудомная, антиоксидантная активность.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы О. В. Тринева и А. И. Сливкин осуществляли проведение экспериментальных исследований. Автор Е. Ф. Сафонова участвовал в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

**Для цитирования:** Тринева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Определение антиоксидантной активности извлечений из листьев крапивы двудомной различными методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):59–66. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66>

## Determination of Nettle Leaves Extracts Antioxidant Activity by Various Methods

Olga V. Trineeva<sup>1\*</sup>, Aleksey I. Slivkin<sup>1</sup>, Elena F. Safonova<sup>2</sup>

1 – Voronezh State University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

2 – Voronezh Basic Medical College, 46, Cosmonauts str., Voronezh, 394055, Russia

\*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

ORCID: Olga V. Trineeva – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>; Aleksey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>; Elena F. Safonova – <https://orcid.org/0000-0003-0081-1113>.

Received: 13.03.2020. Revised: 15.06.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Recently, much attention has been paid in the literature to the primary assessment of the pharmacological effect of various drugs using *in vivo* and *in vitro* tests. Great interest in determining the antioxidant activity (AA) of drugs, including herbal remedies, medicinal plant materials and their biologically active substances (BAS). It is known that such an officinal medicinal plant, like dioica nettle, is rich in natural antioxidants (AO) in its phytochemical composition: flavonoids, carotenoids, ascorbic acid, etc. In some publications, there is information about the AA of nettle leaves and preparations based on it. However, information on the comparative characteristics of the use of various methods for determining the AA of this type of medicinal plant material and the results obtained are not found in the scientific literature.

© Тринева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф., 2020

© Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F., 2020

**Aim.** The aim of this work was a comparative determination of the AA of medicinal plant raw materials of nettle dioica by various methods.

**Materials and methods.** The object of the study was the finished crushed raw material of dioica nettle leaves (*Folia Urticae*) in filter bags produced by a domestic manufacturer. AA of water and water-alcohol extracts was determined titrimetrically according to the method developed by T. V. Maksimova with co-authors; the ability to inhibit the autooxidation of adrenaline *in vitro*. The *Paramecium caudatum* cell culture was also used as a biological model to determine the AA of aqueous extracts from the studied raw material on a living cell. The determination of the qualitative and quantitative composition of phenolic AO was determined by HPLC-DMD-MS.

**Results and discussion.** The total AA of water and water-alcohol extracts from dioica nettle leaves was determined using various techniques recommended in the literature. The effect of the extractant polarity on the value of AA was investigated and an inversely proportional relationship was revealed. It was found that the highest content of AO in the extraction is observed when using 96% ethanol as an extractant. Evaluation of the AA of the test object by the biological method was carried out in accordance with the values of the index of biological activity. HPLC-DMD-MS analysis of water-methanol extraction from nettle leaves showed the presence of 17 substances – representatives of the group of phenolic compounds.

**Conclusion.** Using four independent methods, the prospects of using dioica nettle leaves and preparations based on it as a source of AO are shown. The data obtained undoubtedly open up new possibilities for the use of a long-known plant and confirm the feasibility and prospects of its use for obtaining new dosage forms.

**Keywords:** *Nettle leaves* L., antioxidant activity.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors Olga V. Trineeva and Aleksey I. Slivkin carried out experimental studies. The author Elena F. Safonova participated in the writing of the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

**For citation:** Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. Determination of nettle leaves extracts antioxidant activity by various methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):59–66. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-59-66>

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта различных препаратов с использованием тестов *in vivo* и *in vitro* в литературе уделяется большое внимание. Постоянно растет интерес к определению антиоксидантной активности (АОА) лекарственных препаратов, в том числе фитопрепаратов, лекарственного растительного сырья (ЛРС) и входящих в их состав биологически активных веществ (БАВ). Основные природные антиоксиданты (АО) – это витамины Е и С, каротиноиды, флавоноиды, ароматические оксикислоты, антоцианы и др. Особую значимость представляют биофлавоноиды, обладающие антиканцерогенными, антисклеротическими, противовоспалительными и антиаллергическими свойствами. Биофлавоноиды по антиоксидантной активности в десятки раз превосходят витамины С и Е. Известно, что такое официальное лекарственное растение, как крапива двудомная, по своему фитохимическому составу богата природными АО: флавоноиды, каротиноиды, аскорбиновая кислота и др. [1–6]. В отдельных публикациях имеются сведения об АОА листьев крапивы и препаратов на ее основе, изготовленных как в домашних условиях, так и в условиях заводского производства [6–8]. Однако информации о сравнительной характеристике применения различных методов для определения АОА данного вида ЛРС и полученных результатов в научной литературе не обнаружено.

**Целью работы** – сравнительное определение антиоксидантной активности извлечений из лекарственного растительного сырья крапивы двудомной различными методами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной (*Folia Urticae*) в фильтр-пакетах, выпускаемое отечественным производителем, соответствующее требованиям нормативной документации. Извлечения готовили путем нагревания ЛРС с экстрагентом в соотношении 1,5:100 на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 минут. Полученные извлечения декантировали с остатка сырья и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата. Для оценки влияния полярности экстрагента на АОА получаемого извлечения использовали воду, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт. Полученные извлечения представляет собой сложную смесь БАВ, а также сопутствующих компонентов, извлекаемых из сырья в ходе экстракции.

По данным литературы, самыми широко используемыми методами для определения АОА являются спектральные, самыми простыми и доступными – титриметрические, самыми точными и наиболее полно отражающими реальное содержание БАВ-АО – хроматографические, а наиболее близкими к оценке действия на макроорганизм – биологические [7–19], что обусловило выбор методов ведения эксперимента в данной работе.

АОА водных и водно-спиртовых извлечений определяли, во-первых, титриметрически по методике, разработанной Т. В. Максимовой с соавторами [20]. В качестве растворов сравнения использовали такие известные АО, как кверцетин и рутин. Суммарную АОА (мг/г), соответствующую содержанию БАВ восстанавливающего характера в пересчете на указанные АО, рассчитывали по известной формуле [20].

АОА водных извлечений, во-вторых, изучали по их способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода [21]. Анализ проводили по известной методике, выражая результат в процентах ингибирования аутоокисления адреналина. Величина АОА > 10 % свидетельствует о наличии АОА.

Культура клеток *Paramecium caudatum* была также использована в качестве биологической модели для определения антиоксидантного (регулирующего перекисное окисление липидов) действия водных извлечений из изучаемого ЛРС на живую клетку [22]. Извлечения готовили по типу настоя в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ «Настои и отвары» [23–24]. Из нескольких существующих методик нами был выбран «Метод разрешающего воздействия» с использованием культуры инфузорий *Paramecium caudatum*. Определение проводили по известной методике [22]. В качестве разрешающего фактора использовали 3 % раствор водорода пероксида, вызывающего 100%-ю гибель клеток в течение 5 минут. В работе использовали культуру инфузорий, содержащую в экспоненциальной фазе не менее 2500–3000 особей в мл среды, а в стационарной не менее 6500–7500 особей [22].

Определение качественного и количественного состава фенольных АО определяли методом ВЭЖХ-ДМД-МС (ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies, США; МС-детектор (Agilent 6200 TOF LC/MS) по методике [25]. Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software. Идентификация индивидуальных соединений основывалась на хроматографической подвижности, УФ- и масс-спектрах, путем сравнения с имеющимися стандартами. Содержание данных групп БАВ определяли методом абсолютной калибровки.

Статистическую обработку результатов проводили по ОФС ГФ РФ XIV изд. «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения АОА водных и водно-спиртовых извлечений из листьев крапивы двудомной по методике перманганатометрического титрования представлены в таблице 1.

Установлено, что наибольшее содержание АО в извлечении наблюдается при использовании 96 % этанола в качестве экстрагента. Полученные данные согласуются с результатами, свидетельствующими о наибольшем выходе флавоноидов и других полифенольных БАВ – известных природных АО в извлечение при использовании данного растворителя [7]. Статистическая обработка полученных результатов представлена в таблице 2.

При оценке влияние полярности экстрагента на значение суммарной АОА полученных извлечений (рисунок 1), выявлена обратно пропорциональная за-

висимость величины АОА от полярности экстрагента. Полученная зависимость позволит определить АОА извлечений, полученных с применением экстрагентов различной полярности. Уравнение линейной зависимости и коэффициент корреляции приведены на рисунке 1.

Таблица 1. АОА водных и водно-спиртовых извлечений из листьев крапивы двудомной (n = 6, P = 95 %)

Table 1. AOA of water and water-alcohol extracts from dioecious nettle leaves (n = 6, P = 95 %)

№ п/п № p/p	Экстрагент Extractant	АОА, мг/г AOA, mg/g	
		в пересчете на кверцетин in terms of on quercetin	в пересчете на рутин in terms of on routine
1	Вода Water	8,43 ± 0,38	17,80 ± 0,81
2	40 % этанол 40 % ethanol	11,84 ± 0,54	25,00 ± 1,14
3	70 % этанол 70 % ethanol	13,92 ± 0,63	29,38 ± 1,34
4	96 % этанол 96 % ethanol	15,57 ± 0,71	32,87 ± 1,49

Таблица 2. Метрологическая характеристика определения АОА (P = 95 %; n = 6)

Table 2. Metrological characteristics of the determination of AOA (P = 95 %; n = 6)

f	$\bar{x}_{\text{cp}}$ $\bar{x}_{\text{average}}$	S <sup>2</sup>	S	$Sx_{\text{cp}}$ $Sx_{\text{average}}$	t(P, t)	$\Delta x$	$\Delta x_{\text{cp}}$ $\Delta x_{\text{average}}$	$\epsilon, \%$	$\epsilon_{\text{cp}} \%$ $\epsilon_{\text{average}} \%$
5	11,84	0,262	0,512	0,209	2,57	1,32	0,54	11,11	4,55

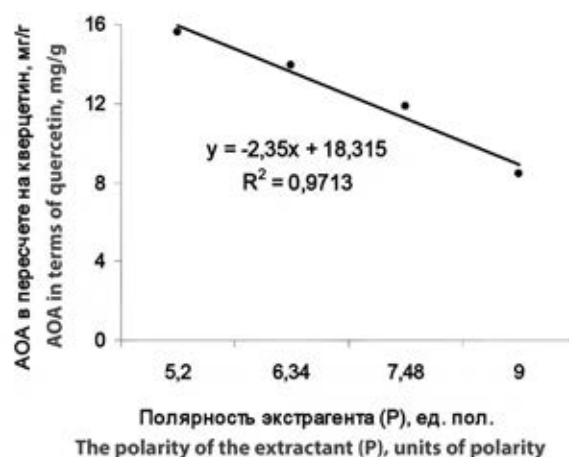


Рисунок 1. Влияние полярности экстрагента на АОА извлечений из листьев крапивы двудомной

Figure 1. Effect of extractant polarity on AOA extracts from dicotyledonous nettle leaves

В таблице 3 представлены литературные данные значений АОА извлечений из различных природных объектов (экстрагент – 96 % спирт этиловый), получен-

ные по аналогичной методике, в сравнении с результатами собственных исследований по определению АОА извлечений из листьев крапивы.

**Таблица 3.** АОА различных природных объектов в пересчете на кверцетин [8]

**Table 3.** AOA of various natural objects in terms of quercetin [8]

№ п/п № p/p	Наименование сырья Name of raw materials	АОА, мг/г AOA, mg/g
1	Листья крапивы Nettle leaves	15,57
2	Кора дуба Oak bark	41,67
3	Плоды черники Blueberries	12,50
3	Чай «Майский» Tea «May»	43,61
4	Плоды шиповника Dog-rose fruit	43,55

Данные таблицы 3 указывают на достаточно высокое содержание АО в спиртовом извлечении из листьев крапивы двудомной, сравнимое с таким известным источником фенольных АО, как плоды черники.

Несомненными достоинствами метода являются простота выполнения, экспрессность, доступность, малая ошибка определения и минимальная стоимость одного анализа, так как отсутствует необходимость использования специального дорогостоящего оборудования. Недостатком данной методики, основанной на окислении веществ-АО перманганатом калия в кислой среде, является то, что способ позволяет определить только суммарное количественное содержание всех веществ, обладающих АОА в пересчете чаще всего на рутин, кверцетин, галловую и аскорбиновую кислоты, а также пирокатехин, но не дифференцировать их по группам [10]. Следует отметить, что данная методика оценивает не АОА, как таковую, а способность объектов восстанавливать перманганат ( $MnO_4^-$ ) в кислой среде. Такими свойствами обладают многие органические соединения, в том числе такие восстановители, как боргидрид натрия  $NaBH_4$  или литийалюмогидрид  $LiAlH_4$ , являющиеся сильнейшими токсикантами для живой клетки. Тем не менее в фармации данный метод широко используется многими исследователями и может быть применен для первичной оценки АОА растительных объектов.

В работе также использован метод оценки АОА на начальных этапах свободнорадикального окисления по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм [21]. Величина АОА водных извлечений из листьев крапивы двудомной, определенная указанным способом, составила 52,45 %, что свидетельствует о наличии АОА (таблица 4). Полученные данные в сравнении с другими известными источниками АО (с применением аналогичной методики) приведены в таблице 4. Результаты свидетельствуют о

перспективности использования данного вида ЛРС и препаратов на его основе в практической медицине в качестве источника АО.

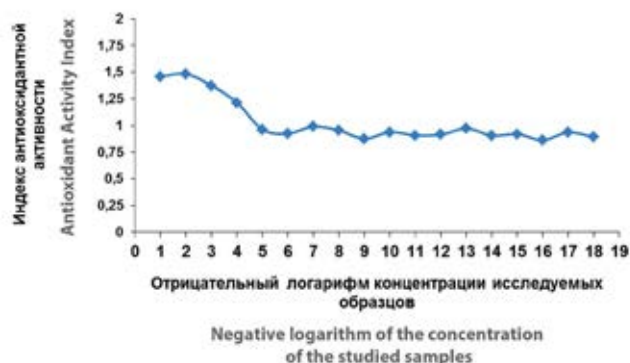
**Таблица 4.** Значения АОА различных растительных объектов, определенных методом аутоокисления адреналина [8]

**Table 4.** AOA values of various plant objects determined by the method of autooxidation of adrenaline [8]

№ п/п № p/p	ЛРС Medicinal plant material	АОА, % AOA, %
1	Трава мяты перечной Peppermint Herb	50,00
2	Листья крапивы двудомной (экспериментальные данные) Nettle leaves dioecious (experimental data)	52,45
3	Плоды облепихи крушиновидной Sea buckthorn fruits	53,86
4	Трава зверобоя продырявленного Hypericum perforatum herb	92,96
5	Листья шалфея лекарственного Sage Leaves	88,28

Однако следует отметить, что наряду с положительными моментами (доступность и экспрессность) данный метод имеет и недостатки. Результаты, полученные в разное время экспозиции, сильно разнятся между собой, что обуславливает большую ошибку определения. Тем не менее данный метод также может быть применен для первичной оценки АОА растительных объектов.

Оценку антиоксидантного действия исследуемого объекта биологическим методом проводили в соответствии со значениями индекса биологической активности (рисунок 2). Анализируя полученные данные, можно отметить, что настой листьев крапивы



**Рисунок 2.** Зависимость индекса антиоксидантной активности\* настоя листьев крапивы двудомной от концентрации в растворе

\* $I_{BA}$  от 1,000 + 0,100 объект активностью не обладает;  
 $I_{BA} > 1,000 + 0,100$  объект повышает жизнеспособность клеток;  
 $I_{BA} < 1,000$  объект снижает жизнеспособность клеток

**Figure 2.** The dependence of the index of antioxidant activity\* infusion of nettle leaves dioecious on the concentration in solution

\* $I_{BA}$  from 1.000 + 0.100 the object does not have activity;  
 $I_{BA} > 1.000 + 0.100$  object increases cell viability;  $I_{BA} < 1.000$  object reduces cell viability

двудомной проявляет активность в концентрациях от  $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-4}$ , повышая устойчивость клеток к воздействию процессов свободнорадикального окисления примерно на 20–30%. Сравнение результатов, полученных для извлечений из листьев крапивы двудомной, с результатами других исследований по аналогичной методике приведены в таблице 5. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования водных извлечений из листьев крапивы двудомной в качестве источника АО, так как значения индексов биологической активности сравнимы с таковыми для природных концентратов БАВ-АО, как плоды рябины черноплодной и облепихи крушиновидной.

**Таблица 5.** Значения АОА различных растительных объектов, определенных биологическим методом

**Table 5.** AOA values of various plant objects determined by the biological method

№ п/п № p/p	ЛРС Medicinal plant material	$I_{\text{БА}}$ ( $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-4}$ )
1	Трава горца перечного [26] Highlander Herb [26]	1,82–3,25
2	Листья крапивы двудомной (экспериментальные данные) Nettle leaves dioecious (experimental data)	1,21–1,48
3	Плоды облепихи крушиновидной высушенные [9] Dried sea buckthorn fruits [9]	1,26–1,30
4	Плоды рябины черноплодной [27] Aronia fruits [27]	1,16–1,45

Основным достоинством данного метода наряду с доступностью и минимальной стоимостью одного анализа, является использование живой культуры инфузорий (тест *in vivo*), что дает возможность ожидать максимальной корреляции полученных результатов с действием исследуемых объектов на более сложно устроенные многоклеточные биологические организмы. Сущность метода заключается в выявлении характера действия исследуемого вещества на механизмы адаптации и резистентности клетки на воздействие на нее разрешающего внешнего неблагоприятного фактора, в частности перекиси водорода. Однако к недостаткам следует отнести трудоемкость и длительность данной методики, а также первичность получаемых результатов, требующих дополнительных исследований.

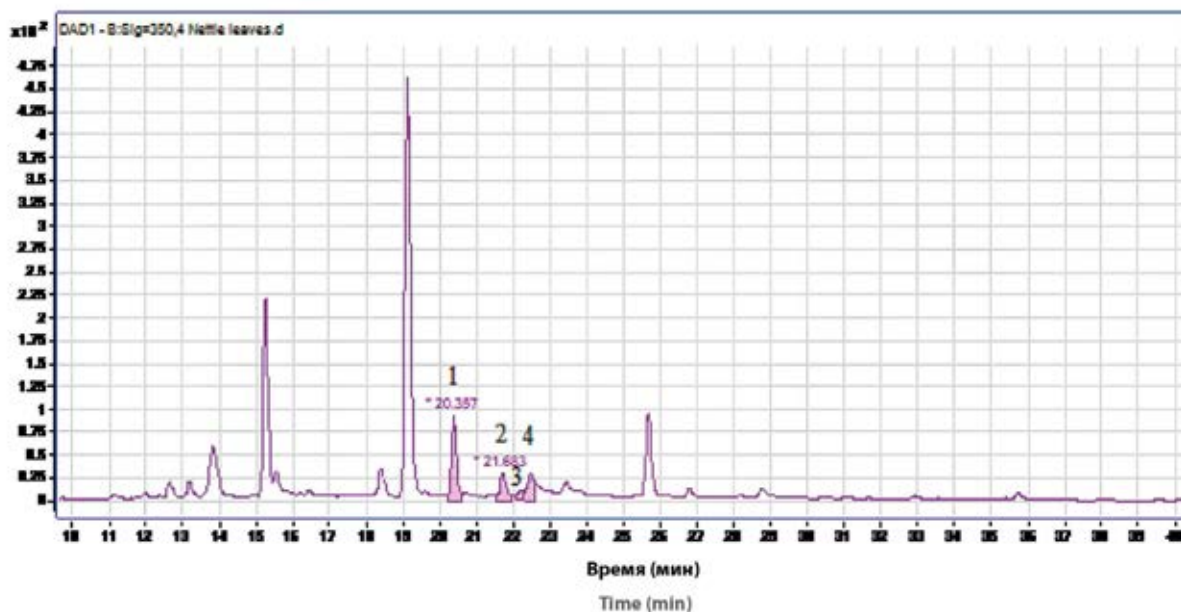
Одной из самых перспективных групп БАВ, обладающей АОА, являются растительные фенольные соединения, среди которых ведущее место занимают полифенолы. В некоторых работах [10] описан ВЭЖХ-метод определения АОА по общему содержанию АО фенольной группы (оксикислот, флавоноидов). ВЭЖХ-ДМД-МС анализ водно-метанольного извлечения из листьев крапивы показал присутствие 13 производных гидроксикоричных кислот (ГКК) и 4 представителя группы флавоноидов. Следует отметить, что основной ГКК была установлена не хлорогеновая кислота (18,2 от суммы производных ГКК

%), а 2-кофеоиляблочная кислота (37,2%). Обнаружено также существенное количество розмариновой кислоты (10,2%). По результатам ВЭЖХ-ДМД-МС флавоноиды в изучаемом образце листьев крапивы двудомной представлены гликозидами кверцетина, кемпферола и изорамнетина, среди которых преобладал рутин (50,9% от суммы флавоноидов). Идентифицированы также изорамнетин-3-О-рутинозид или нарциссин (25,2%), изокверцитрин (17,1%) и кемпферол-3-О-рутинозид или никотифлорин (6,8%). Результаты (в пересчете на абсолютно сухое сырье) представлены в таблице 6. ВЭЖХ извлечения из листьев крапивы двудомной показаны на рисунках 3 и 4.

**Таблица 6.** Результаты ВЭЖХ-ДМД-МС анализа фенольных соединений в листьях крапивы двудомной

**Table 6.** The results of HPLC-DMD-MS analysis of phenolic compounds in the leaves of dioecious nettle

№	Представитель фенольной фракции БАВ Representative phenolic fraction of biologically active substances	Содержание, мг/г Content, mg/g
1	Кофеилхинная кислота Caffeoylquinic Acid	0,22
2	Неохлорогеновая кислота Neochlorogenic acid	0,23
3	Кафтаровая кислота Kaftaric acid	0,68
4	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	1,82
5	Криптохлорогеновая кислота Cryptochlorogenic Acid	0,28
6	Кофейная кислота Coffee acid	0,33
7	2-кофеоиляблочная кислота 2-caffeoylmalic acid	3,72
8	п-кумаровая кислота p-coumaric acid	0,47
9	Производное феруловой кислоты Ferulic Acid Derivative	0,19
10	Розмариновая кислота Rosmarinic acid	1,02
11	Неидентифицированное производное кофейной кислоты Unidentified Caffeic Acid Derivative	0,28
12	Неидентифицированное производное ГКК Unidentified Derivative of HCA	0,26
13	Неидентифицированное производное ГКК Unidentified Derivative of HCA	0,52
14	Рутин Routine	0,67
15	Изокверцитрин Isoquercitrine	0,22
16	Никотифлорин Nicotiflorine	0,09
17	Нарциссин Narcissine	0,33
Суммарное содержание Total content		11,33

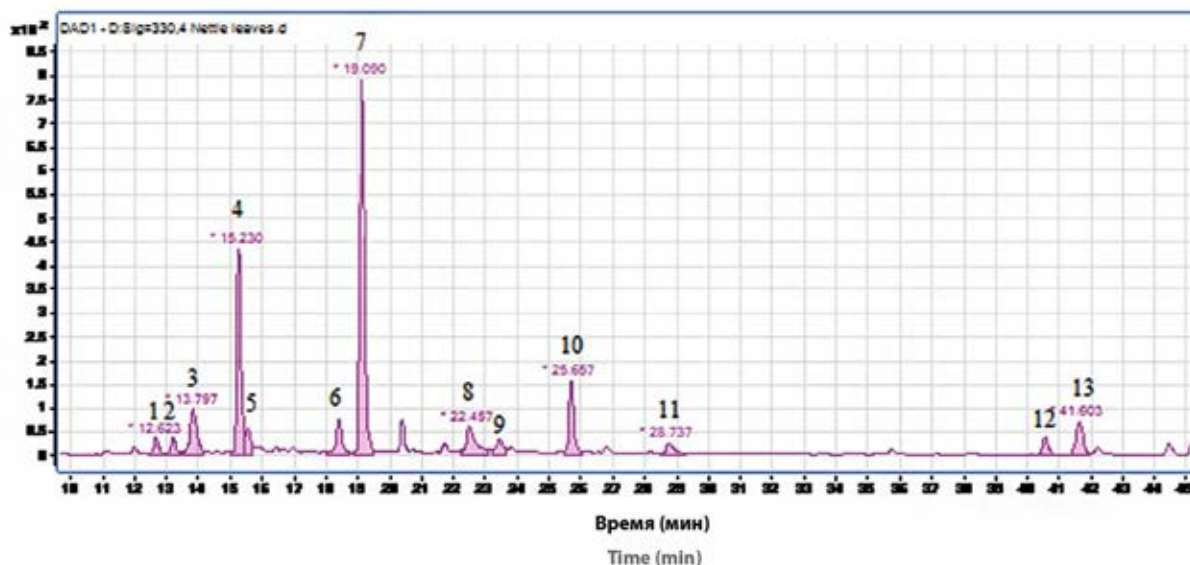


**Рисунок 3.** Хроматограмма извлечения из листьев крапивы двудомной при  $\lambda = 350$  нм. Номера пиков флавоноидов на хроматограмме:

1 – рутин; 2 – изокверцитрин; 3 – никотифлорин; 4 – нарциссин

**Figure 3.** Chromatogram of extraction of dioecious nettle leaves from  $\lambda = 350$  nm. Chromatogram peak numbers for flavonoids:

1 – routine; 2 – isoquercitrine; 3 – nicotiflorine; 4 – narcissine



**Рисунок 4.** Хроматограмма извлечения из листьев крапивы двудомной при  $\lambda = 330$  нм. Номера пиков производных ГКК на хроматограмме соответствуют номерам в таблице 6

**Figure 4.** Chromatogram of extract from the leaves of nettle dioecious at  $\lambda = 330$  nm. The peak numbers of the HCA derivatives in the chromatogram correspond to the numbers in table 6

Основным достоинством данного метода является возможность определить качественный и количественный состав всех представителей группы фенольных АО в изучаемом ЛРС. Это наиболее точный метод исследований из представленных в данной работе. В настоящее время ВЭЖХ-хроматографы с масс-детекторами становятся все более доступными для лаборато-

рий. Однако, к недостаткам следует отнести достаточно высокую стоимость выполнения одного анализа, а также трудность корреляции полученных результатов с другими широко применяемыми методами определения АОА. Данное обстоятельство объясняется тем, что не все БАВ фенольной природы обладают АОА, различными механизмами действия БАВ-АО, а также

неодинаковым вкладом каждого отдельного АО в проявление общей суммарной АОА извлечений, а, следовательно, и лекарственных растительных препаратов. Метод является уточняющим, применяется для проведения более глубоких исследований по оценке АОА, и не используется для первичной оценки данных свойств ЛРС. Этим, по всей видимости, обусловлено редкое использование данного метода анализа для исследования АОА растительных объектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, определена суммарная АОА водных и водно-спиртовых извлечений из листьев крапивы двудомной с использованием различных методик, предлагаемых в научной литературе. Установлено, что наибольшее содержание АО в извлечении наблюдается при использовании 96 % этанола в качестве экстрагента. Исследовано влияние полярности экстрагента на значение суммарной АОА полученных извлечений. Выявлена обратно пропорциональная зависимость величины АОА от полярности экстрагента. ВЭЖХ-ДМД-МС анализ водно-метанольного извлечения из листьев крапивы показал присутствие 13 производных ГКК и 4 представителя группы флавоноидов. При помощи четырех независимых методов показана перспективность использования листьев крапивы двудомной и препаратов на ее основе в качестве источника АО. Полученные данные, несомненно, открывают новые возможности применения давно известного растения и подтверждают целесообразность и перспективность его использования для получения новых лекарственных форм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Копытько Я. Ф., Лапинская Е. С., Сокольская Т. А. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(10):32–40.
2. Дмитрука С. Е., ред. Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты. Томск: СибГМУ. 2004; Ч. 1: 116.
3. Gülçina I. Ö., Küfrevioğlu I., Oktayb M., Büyükkokuroğlu M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90:205–215.
4. Maaroufi L., Hossain M. S., Wiem Tahri, Landoulsi A. New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *J. Med. Plants Res.* 2017;11(4):73–86.
5. Knežević V., Pezo L. L., Lončar B. Lj., Filipović V. S., Nićetin M. R., Gorjanović S. Ž., Šuput D. Antioxidant Capacity of Nettle Leaves During Osmotic Treatment. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2019;63(3):491–498.
6. Ghaima K. K., Hashim N. M., Ali S. A. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(05):96–99.
7. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дис. ... д. фарм. н. 2017. 441 с.
8. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Воропаева С. С., Сливкин А.И. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной. *Фармация*. 2013;1:11–12.
9. Тринеева О. В., Сливкин А. И. Исследование мембраностабилизирующей, антиоксидантной и антитоксической активности водных извлечений из лекарственного растительного сырья (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) на тест-системе *Paramecium caudatum*. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016;1:165–169.
10. Тринеева О. В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):180–197.
11. Кайшев А. Ш., Реккандт С. А., Кайшева Н. Ш., Челомбитко В. А. Антиоксидантная активность биоконпозиций на основе спиртовых отходов. *Фармация*. 2009;5:7–10.
12. Хайруллина В. Р., Гарифуллина Г. Г., Герчиков А. Я. Антиокислительная активность экстрактов растений сем. *Geraniaceae*, *Rosaceae* на примере модельной реакции окисления изопропилового спирта. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;3:28–30.
13. Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов. *Химия растительного сырья*. 2004;3:63–75.
14. Лапин А. А., Борисенков М. Ф., Карманов А. П., Бердник И. В., Кочева Л. С., Мусин Р. З., Магдеев И. М. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения. *Химия растительного сырья*. 2007;2:79–83.
15. Самусенко А. Л. Исследование антиоксидантной активности эфирных масел лимона, розового грейпфрута, кориандра, гвоздики и их смесей методом капиллярной газовой хроматографии. *Химия растительного сырья*. 2011;3:107–112.
16. Конкина И. Г., Грабовский С. А., Муринов Ю. И., Кабальнова Н. Н. Сравнительная оценка реакционной способности кверцетина и дигидрокверцетина по отношению к пероксильным радикалам. *Химия растительного сырья*. 2011;3:207–208.
17. Огай М. А., Степанова Э. Ф., Холодов Д. Б., Николаевский В. А. Антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект таурина. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2011;1:186–191.
18. Шадрин И. А. Токсикологический анализ некоторых кормов по реакции выживаемости инфузории *Paramecium caudatum*. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2008;2:128–134.
19. Хасанова С. Р., Плеханова Т. И., Гашимова Д. Т., Галияхметова Э. Х., Клыш Е. А. Сравнительное изучение антиоксидантной активности растительных сборов. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2007;1: 163–166.
20. Максимова Т. В., Никулина И. Н., Пахомов В. П. и др. Способ определения антиокислительной активности. Номер патента: 2170930. Дата публикации: 20.07.2001 г. Заявитель(и) и патентообладатель: Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова.
21. Рябинина Е. И., Зотова Е. Е., Ветрова Е. Н. и др. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина. *Химия растительного сырья*. 2011;3:117–121.
22. Бузлама В. С. Способ отбора веществ – адаптогенов: Авт. свид. СССР № 9901189. 1982.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М. 2015;2:1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/).
24. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание. М. 2018;4:7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php>.
25. Тринеева О. В., Перова И. Б., Сливкин А. И., Эллер К. И. Исследование состава фенольной фракции листьев крапивы двудомной. *Биофармацевтический журнал*. 2017;9(3):44–48.
26. Мальцева А. А., Чистякова А. С., Юрова Е. Ю. Антиоксидантная активность травы горца перечного, заготовленной в воронежской области. В сборнике: «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016». ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». 2016. 382–384 с.
27. Логвинова Е. Е. Исследование групп биологически активных веществ плодов рябины черноплодной различных сортов. Автореф. канд. фарм. н. М., 2017. 22 с.

## REFERENCES

1. Kopyt'ko Ya. F., Lapinskaya E. S., Sokol'skaya T. A. Application, chemical composition and standardization of raw materials and preparations of *Urtica* (review). *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical chemistry journal*. 2011;45(10):32–40. (In Russ.).
2. Dmitruka S. E., editor. Medicinal plants, raw materials and herbal remedies. Tomsk: Siberian State Medical University. 2004; Part 1: 116. (In Russ.).
3. Gülçina I. Ö., Küfrevioğlu I., Oktayb M., Büyükkokuroğlu M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90:205–215.
4. Maaroufi L., Hossain M. S., Wiem Tahri, Landoulsi A. New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *J. Med. Plants Res.* 2017;11(4):73–86.
5. Knežević V., Pezo L. L., Lončar B. Lj., Filipović V. S., Nićetin M. R., Gorjanović S. Ž., Šuput D. Antioxidant Capacity of Nettle Leaves During Osmotic Treatment. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2019;63(3):491–498.
6. Ghaima K. K., Hashim N. M., Ali S. A. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(05):96–99.
7. Trineeva O. V. T Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant materials and oil extracts based on it. The dissertation ... Dr. of Sci. (Pharm.). 2017. 441 p. (In Russ.).
8. Trineeva O. V., Safonova E. F., Voropaeva S. S., Slivkin A. I. Antioxidant activity of water-alcohol extracts of dioica nettle leaves. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2013;1:11–12. (In Russ.).
9. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Study of the membrane-stabilizing, antioxidant and antitoxic activity of aqueous extracts from medicinal plant materials (for example, buckthorn buckthorn fruits and dioica nettle leaves) using the *Paramecium caudatum* test system. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016;1:165–169. (In Russ.).
10. Trineeva O. V. Methods of determination of antioxidant activity of plant and synthetic origins in pharmacy (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;4(4):180–197. (In Russ.).
11. Kaishev A. Sh., Rekkandt S. A., Kaisheva N. Sh., Chelombit'ko V. A. Antioxidant activity of biocomposites based on alcohol waste. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2009;5:7–10. (In Russ.).
12. Khairullina V. R., Garifullina G. G., Gerchikov A. Ya. Antioxidant activity of plant extracts of the family. Geranlaceae, Rosaceae on the example of a model reaction of oxidation of isopropyl alcohol. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical chemistry journal*. 2005;3:28–30. (In Russ.).
13. Khasanov V. V., Ryzhova G. L., Mal'tseva E. V. Methods for the study of antioxidants. Chemistry of plant materials. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2004;3:63–75. (In Russ.).
14. Lapin A. A., Borisenkov M. F., Karmanov A. P., Berdnik I. V., Kocheva L. S., Musin R. Z., Magdeev I. M. Antioxidant properties of plant products. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2007;2:79–83. (In Russ.).
15. Samusenko A. L. Study of the antioxidant activity of essential oils of lemon, pink grapefruit, coriander, cloves and their mixtures by capillary gas chromatography. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2011;3:107–112. (In Russ.).
16. Konkina I. G., Grabovskii S. A., Murinov Yu. I., Kabal'nova N. N. Comparative evaluation of the reactivity of quercetin and dihydroquercetin with respect to peroxide-strong radicals. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2011;3:207–208. (In Russ.).
17. Ogai M. A., Stepanova E. F., Kholodov D. B., Nikolaevskii V. A. Antioxidant and membrane-stabilizing effect of taurine. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2011;1:186–191. (In Russ.).
18. Shadrin I. A. Toxicological analysis of some feeds according to the survival reaction of the ciliates *Paramecium caudatum*. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = The Bulletin of KrasGAU*. 2008;2:128–134. (In Russ.).
19. Khasanova S. R., Plekhanova T. I., Gashimova D. T., Galiakhmetova E. Kh., Klysh E. A. Comparative study of antioxidant activity of plant collections. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2007;1:163–166. (In Russ.).
20. Maksimova T. V., Nikulina I. N., Pakhomov V. P. et al. Method for determining antioxidant activity. Patent number: 2170930. Date of publication: July 20, 2001. Applicant(s) and patent holder: Moscow Medical Academy named after I. M. Sechenova. (In Russ.).
21. Ryabinina E. I., Zotova E. E., Vetrova E. N. et al. A new approach to assessing the antioxidant activity of plant materials in the study of the process of autooxidation of adrenaline. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2011;3:117–121. (In Russ.).
22. Buzlama B. C. Method of selection of substances – adaptogens: Auth. testimonial. USSR No. 9901189. 1982. (In Russ.).
23. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. Moscow. 2015;2:1004. Available at: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) (In Russ.).
24. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M. 2018;4:7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (In Russ.).
25. Trineeva O. V., Perova I. B., Slivkin A. I., Eller K. I. Study of the composition of the phenolic fraction of dioica nettle leaves. *Biofarmatsevticheskii zhurnal = Biopharmaceutical journal*. 2017;9(3):44–48. (In Russ.).
26. Mal'tseva A. A., Chistyakova A. S., Yurova E. Yu. Antioxidant activity of the grass of the mountaineer pepper harvested in Voronezh region. In the collection: «Ways and forms of improving pharmaceutical education. Creation of new physiologically active substances. Materials of the 6th International Scientific and Methodological Conference «Pharmaceutical Education-2016». Voronezh State University. 2016. 382–384 p. (In Russ.).
27. Logvinova E. E. Study of the groups of biologically active substances of chokeberry fruits of various varieties. Abstract Cand. of Sci. (Chem.). Moscow, 2017. 22 p. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109>  
УДК 543.865/.867



Обзорная статья/Review article

## Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье (обзор)

О. В. Тринева<sup>1\*</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

\*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

ORCID: О. В. Тринева – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>.

Статья поступила: 18.06.2020. Статья принята в печать: 20.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Микотоксины (МТ) – это вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов, обладающие выраженными токсическими свойствами.

**Текст.** В настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности приобретает особое значение разработка экспресс-методов определения содержания МТ, обладающих мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Создание методов их аналитического контроля продолжает оставаться в центре внимания крупнейших международных организаций (IUPAC, AOAC International и IFJU), специализированных национальных организаций стран ЕС и США, а также академий и министерств многих стран мира. Указом Президента Российской Федерации (РФ) была утверждена Доктрина продовольственной безопасности РФ № 120 от 30.01.2010 г. Министерством сельского хозяйства РФ был издан приказ «О внедрении плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга» № 780 от 30 мая 2003 г. В нашей стране исследования МТ, согласно плану мониторинга и Рекомендации Комиссии ЕС, ограничиваются определением содержания шести тестированных МТ – суммы афлатоксинов (АФЛ), охратоксинов (ОТ), зеараленона (ЗЕА), трихотеценов (ТТ), патулина (П), Т-2 токсина в сельскохозяйственном пищевом сырье, пищевых продуктах и кормах. МТ являются природными загрязнителями не только зерна злаковых, бобовых, семян подсолнечника, а также овощей и фруктов, но и лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также фармацевтических субстанций растительного происхождения, в частности, таких как жирные растительные масла, широко применяемые в фармации в качестве самостоятельных лекарственных средств, а также вспомогательных компонентов для производства лекарственных препаратов, БАД, растворителей инъекционных препаратов и др. В РФ содержание МТ в ЛРС пока не нормируется. Предотвратить загрязнение ЛРС МТ практически невозможно, поэтому необходим строгий контроль данных веществ. Однако, данная проблема и необходимость введения подобного исследования в перечень показателей оценки доброкачественности ЛРС требует углубленного изучения и оценки степени его зараженности. Кроме того, стандартные методы определения нормируемых МТ, обычно, не рассчитаны на выявление трансформированных форм, и их содержание остается неучтенным. Поэтому модифицированные лекарственным растением метаболиты МТ, получили название замаскированных (конъюгированных, трансформированных) растением МТ, содержание которых также необходимо оценивать. МТ могут образовываться также при хранении ЛРС под действием развивающихся в них микроскопических грибов. Так как основой для получения лекарственных средств растительного происхождения являются лекарственные растения, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, вирусами, плесневыми грибами, то при этом заражению может подвергаться не только ЛРС, но и почти все субстанции, и лекарственные растительные препараты (ЛРП). Показано, что МТ сохраняются в высушенном ЛРС более 100 лет. Установлено, что многое ЛРС густо обсеменено плесневыми грибами класса Deuteromycetes, что можно обнаружить при проведении микроскопического анализа. Целью настоящей работы являлась систематизация методов определения основных МТ на основе анализа отечественной литературы для возможного дальнейшего их применения в оценке качества ЛРС и ЛРП на его основе.

**Заключение.** МТ негативно действуют на организм животных и человека и с трудом поддаются деконтаминации. МТ могут присутствовать в ЛРС без видимого роста плесени. МТ не теряет токсичности в течение многих лет. Полностью исключить образование МТ в сырье не представляется возможным, поэтому задача контролирующей ее качества служб – выявить наличие МТ и сравнить обнаруженное количество с нормами предельного содержания. Содержание МТ в ЛРС в настоящее время в РФ не определяется по ГФ РФ XIV изд. Однако, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 г. № 15 утверждены Правила надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения, в которых прописана недопустимость образования плесени в процессе первичной обработки, хранения и транспортировки ЛРС. Следовательно накопление экспериментального материала, а также развитие фармакопейных методов анализа ЛРС, постоянно ужесточающих требования к качеству, вероятно, может привести к включению данного показателя в фармакопейные статьи (ФС). В связи с чем, интересным представилось проведение обзора существующих методов анализа МТ, с возможным последующим их включением в ОФС и ФС. Традиционными методами анализа МТ являются физико-химические методы. Наибольшее распространение нашли хроматографические методы: ВЭЖХ, ГЖХ с применением различных детекторов (масс-спектрометрического, флуоресцентного, амперометрического и т. д.). Особое место среди методов разделения занимает ТСХ. Данные методы, безусловно, способны обеспечить достаточную специфичность и необходимую чувствительность определения, однако являются дорогостоящими, рассчитаны преимущественно на специализированные и хорошо оснащенные стационарные лаборатории, а также требуют высокой квалификации персонала. Ни один из них также нельзя отнести к экспресс-методам. Сложность определения МТ в ЛРС связана с продолжительной и трудоемкой пробоподготовкой, а также с использованием дорогостоящих высокочувствительных методов (ВЭЖХ, ЖХ, ГЖХ), которые не могут быть применены непосредственно на месте производства и переработки ЛРС. Наиболее перспективными являются иммунохимические тест-методы определения МТ, основанные на иммунохимической реакции между антителом и антигеном. Показано, что высокая специфичность и возможность выявления МТ в низких концентрациях в сочетании с существующим разнообразным приборным обеспечением позволяют рассматривать иммунохимические методы анализа как наиболее перспективные для широкого практического использования.

**Ключевые слова:** микотоксины, лекарственное растительное сырье, методы анализа, микотоксикозы.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Автор осуществлял обзор литературы, его систематизацию и анализ.

**Для цитирования:** Тринева О. В. Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):67–109. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109>

© Тринева О. В., 2020

© Trineeva O. V., 2020

## Methods and Prospects for Determination of Mycotoxins in Medicinal Herbal Raw Materials (Review)

Olga V. Trineeva<sup>1\*</sup>

1 – Voronezh State University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

\*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

ORCID: Olga V. Trineeva – <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>.

Received: 18.06.2020. Revised: 20.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Mycotoxins (MT) are secondary metabolites of microscopic mold fungi with pronounced toxic properties.

**Text.** Currently, the development of express methods for determining the content of MT with mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties is of particular importance in the food and pharmaceutical industries. The creation of methods for their analytical control continues to be the focus of attention of the largest international organizations (IUPAC, AOAC International and IFJU), specialized national organizations of the EU and the USA, as well as academies and ministries of many countries of the world. By the Decree of the President of the Russian Federation (RF), the Doctrine of Food Security of the RF № 120 dated January 30, 2010 was approved. The Ministry of Agriculture of the RF issued an order «On the implementation of the state veterinary laboratory monitoring plan» № 780 dated May 30, 2003. In our country, MT studies, according to the plan Monitoring and Recommendations of the EU Commission are limited to determining the content of six tested MTs – the sum of aflatoxins (AFL), ochratoxins (OT), zearalenone (ZEA), trichothecenes (TT), patulin (P), T-2 toxin in agricultural raw materials, food products and feed. MTs are natural pollutants not only of grains of cereals, legumes, sunflower seeds, as well as vegetables and fruits, but also of medicinal plant materials (MPM), as well as pharmaceutical substances of plant origin, in particular, such as fatty vegetable oils widely used in pharmacy as independent drugs, as well as auxiliary components for the production of drugs, dietary supplements, solvents for injection drugs, etc. In the RF, the MT content in MPM is not yet standardized. It is almost impossible to prevent contamination of the MPM MT, therefore, strict control of these substances is necessary. However, this problem and the need to introduce such a study into the list of indicators for evaluating the quality of MPM requires an in-depth study and an assessment of the degree of its infection. In addition, standard methods for determining normalized MTs are usually not designed to detect transformed forms, and their content remains unaccounted for. Therefore, MT metabolites modified by a medicinal plant are called masked (conjugated, transformed) MT plants, the content of which also needs to be evaluated. MTs can also form during storage of MPM under the action of microscopic fungi developing in them. Since the basis for obtaining herbal medicines are medicinal plants, which are raw materials that are most contaminated with various microorganisms, viruses, and molds, not only MPM, but also almost all substances and herbal medicines (HM) can be infected. It has been shown that MTs remain in dried MPM for more than 100 years. It was found that a lot of MPM densely seeded with Deuteromycetes class molds, which can be detected by microscopic analysis. The aim of this work was to systematize the methods for determining the main MT based on the analysis of domestic literature for their possible further use in assessing the quality of MPM and HM based on it.

**Conclusion.** MTs adversely affect the body of animals and humans and are difficult to decontaminate. MTs may be present in MPM without visible mold growth. MT does not lose toxicity for many years. It is not possible to completely eliminate the formation of MT in raw materials, therefore, the task of controlling its quality of services is to identify the presence of MT and compare the detected amount with the norms of maximum content. The content of MT in MPM is currently not determined in the RF by the RF GF XIV ed. However, by the decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated January 26, 2018 №15, the Rules of Good Practice for the cultivation, collection, processing and storage of raw materials of plant origin were approved, which stipulate the inadmissibility of mold formation during the primary processing, storage and transportation of cattle. Therefore, the accumulation of experimental material, as well as the development of pharmacopoeial methods for the analysis of MPM, constantly tightening quality requirements, can lead to the inclusion of this indicator in pharmacopoeial articles (PA). In this connection, it was interesting to conduct a review of existing methods of MT analysis, with their possible subsequent inclusion in the GPA and PA. The traditional methods of MT analysis are physicochemical methods. The most widely used chromatographic methods: HPLC, GLC using various detectors (mass spectrometric, fluorescence, amperometric, etc.). TLC occupies a special place among the separation methods. These methods, of course, are able to provide sufficient specificity and the necessary sensitivity of the determination, however, they are expensive, designed primarily for specialized and well-equipped stationary laboratories, and also require highly qualified personnel. None of them can also be attributed to express methods. The complexity of determining MT in MPM is associated with long and laborious sample preparation, as well as with the use of expensive highly sensitive methods (HPLC, GLC), which cannot be applied directly at the place of production and processing of MPM. The most promising are immunochemical test methods for determining MT, based on the immunochemical reaction between the antibody and antigen. It was shown that the high specificity and the possibility of detecting MT in low concentrations in combination with the existing diverse instrumentation make it possible to consider immunochemical methods of analysis as the most promising for wide practical use.

**Keywords:** mycotoxins, herbal raw materials, analysis methods, mycotoxicoses.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** The author carried out a review of the literature, its systematization and analysis.

**For citation:** Trineeva O. V. Methods and prospects for determination of mycotoxins in medicinal herbal raw materials. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):67–109. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109>

## ВВЕДЕНИЕ

**Микотоксины (МТ)** (от греч. *mukes* — гриб и *toxicon* – яд) – это вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов, обладающие выраженными токсическими свойствами. В настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности приобретает особое значение разработка экспресс-методов определения содержания МТ, обладающих мутаген-

ными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Создание методов их аналитического контроля продолжает оставаться в центре внимания крупнейших международных организаций (IUPAC, AOAC International и IFJU), специализированных национальных организаций стран ЕС и США, а также академий и министерств многих стран мира. В настоящее время известно более 400 видов МТ. Классы плесневых грибов (рисунок 1), продуцирующих МТ: *Aspergillus*,

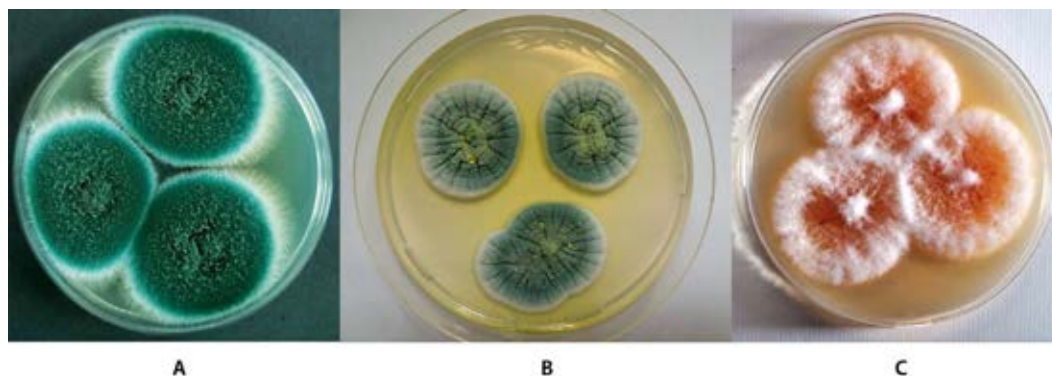
*Penicillium, Fusarium, Claviceps, Neotyphodium, Myrothecium, Stachybotrys, Trichoderma, Trichothecium*. Классифицировать МТ весьма сложно из-за большого разнообразия их химической структуры (таблица 1), биологического действия, штаммов-продуцентов. В медицинских исследованиях руководствуются физиологическим действием МТ, в органической химии – структурой, в биохимии – предшественниками в биосинтезе и др. В таблице 1 суммированы данные об основных МТ, их продуцентах и контаминируемых продуктах.

Предполагают, что с биологической точки зрения МТ выполняют в обмене веществ микроскопических грибов функции, направленные на выживание и конкурентоспособность в различных экологических нишах. Они не являются эссенциальными для роста и развития продуцирующих их микроорганизмов. Экономические потери от МТ только в США оцениваются в размере 10 млрд долларов в год, в странах юго-восточной Азии (Индонезия + Филиппины + Тайланд) – на уровне 400 млн долларов в год, в развивающихся странах до 36 % всех заболеваний прямо или косвенно связаны с МТ. Потери от МТ в Европейском союзе (ЕС) оцениваются более чем 5 миллиардов евро в год [1].

Для контроля пищевой продукции и кормов широко используют традиционные национальные схемы контроля (Федеральные Законы, Ветеринарные НД, ГОСТы, СанПиН 2.3.2.1078-01 и др., ГН 1.2.1323-03 и др.), а также применяют гармонизированные с международными требованиями (Codex Alimentarius, 96/23 ЕС) схемы ветеринарного контроля остатков лекарственных препаратов и МТ в кормах для животных и ксенобиотиков в продукции на всех стадиях ее производства и реализации. Указом Президента Российской Федерации (РФ) была утверждена Доктрина продовольственной безопасности РФ № 120 от 30.01.2010 г. Министерством сельского хозяйства РФ был издан приказ «О внедрении плана государственного ве-

теринарного лабораторного мониторинга» № 780 от 30 мая 2003 г. В нашей стране исследования МТ, согласно плану мониторинга и Рекомендации Комиссии ЕС, ограничиваются определением содержания шести тестируемых МТ – суммы афлатоксинов (АФЛ), охратоксинов (ОТ), зеараленона (ЗЕА), трихотеценов (ТТ), патулина (П), Т-2 токсина в сельскохозяйственном пищевом сырье, пищевых продуктах и кормах.

МТ являются природными загрязнителями не только зерна злаковых, бобовых, семян подсолнечника, а также овощей и фруктов, но и лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также фармацевтических субстанций растительного происхождения, в частности, таких как жирные растительные масла, широко применяемые в фармации в качестве самостоятельных лекарственных средств, а также вспомогательных компонентов для производства лекарственных препаратов, растворителей инъекционных препаратов, БАД и др. Лекарственные растения в специализированных хозяйствах растут значительно хуже, чем в естественных экосистемах. В почве под многолетними травами растений семейств Губоцветные, Розовые, Астровые авторы обнаружили нетипичные для природных экосистем токсигенные виды грибов, что представляет потенциальную угрозу накопления МТ в ЛРС [9]. МТ могут образовываться также при хранении ЛРС под действием развивающихся в них микроскопических грибов. Так как основой для получения лекарственных средств растительного происхождения являются лекарственные растения, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, вирусами, плесневыми грибами, то при этом заражению может подвергаться не только ЛРС, но и почти все субстанции, и лекарственные растительные препараты (ЛРП). Так, в странах с влажным, жарким или теплым климатом чаще встречаются афлатоксины, в умеренном климате Европы, Америки и Азии — трихотеценовые МТ. Основные представители МТ представлены в таблице 1.



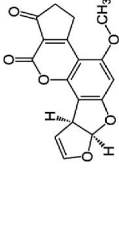
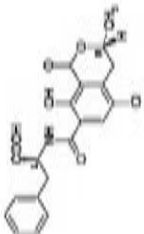
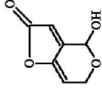
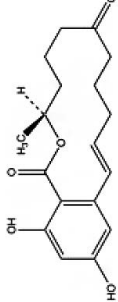
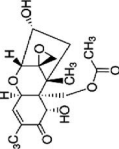
**Рисунок 1.** Виды плесневых грибов – продуцентов основных МТ:

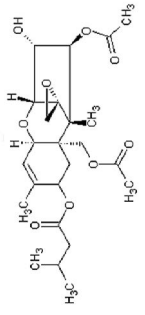
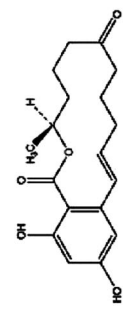
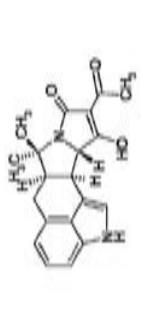
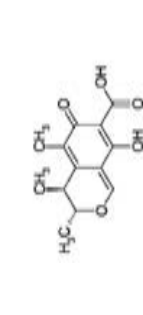
**А – Аспергилл; В – Пенициллиум; С – Фузариум**

**Figure 1.** Types of molds – producers of the main MT:

**A – Aspergillus; B – Penicillium; C – Fusarium**

Таблица 1. Характеристика некоторых МТ  
Table 1. Characteristic of some МТ

МТ MT	Продуцент Producer	Растворимость Solubility	Формула, химический класс Formula, Chemical Class	Климат Climate	Поражаемые объекты Affected objects
Афлотоксин (АФЛ) В <sub>1</sub> Aflatoxin (AFL) В <sub>1</sub>	Токсигенные штаммы грибов <i>Aspergillus flavus</i> и <i>parasiticus</i> Toxigenic strains of the fungi <i>Aspergillus flavus</i> and <i>parasiticus</i>	Легко растворим в умеренно полярных растворителях (хлороформ, метанол, бензол) Easily soluble in moderately polar solvents (chloroform, methanol, benzole)	 Производное фуроскумаринов Furocoumarin derivative	Влажные тропические и субтропические зоны; все сельскохозяйственные зоны России Humid tropical and subtropical zones; all agricultural zones of Russia	Кукуруза, орехи, рис, ячмень, пшеница, молочные продукты Corn, nuts, rice, barley, wheat, dairy products
Охратоксин (ОТ) А Ochratoxin (OT) A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>melaleus</i> , <i>sulphureus</i> , <i>petrakii</i> ; <i>Penicillium viridicatum</i>	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, бензоле, ацетонитриле, спиртах Easily soluble in chloroform, acetone, benzole, acetonitrile, alcohols	 Группа поликетидов Polyketide group	Страны умеренного климата Temperate climate countries	Ячмень, пшеница, соя, зерна кофе, виноматериалы Barley, wheat, soybeans, coffee beans, wine materials
Патулин (П) Patulin (P)	Различные виды <i>Penicillium</i> Various types of <i>Penicillium</i>	Растворим в воде и полярных органических растворителях (спиртах, ацетоне, хлороформе), менее растворим в диэтиловом эфире и бензоле, нерастворим в гексане Soluble in water and polar organic solvents (alcohols, acetone, chloroform), less soluble in diethyl ether and benzole, insoluble in hexane	 4-гидроксифуруриран 4-hydroxyfurofuran	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Temperate, tropical, and subtropical climates	Фрукты и некоторые овощи Fruits and some vegetables
Зеараленон (ЗЕА) Zearalenone (ZEA)	Гриб <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium graminearum</i> fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile	 Лактон фенолрезорциловой кислоты Phenolresorcylic acid lactone	Южная часть РФ Southern part of the Russian Federation	Кукуруза, овес, пшеница, ячмень Corn, oats, wheat, barley
Дезоксиниваленон (ДОН) Deoxynivalenol (DON)	Гриб <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium graminearum</i> fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле. Практически не растворим в воде Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile. Practically insoluble in water	 4-дезоксиниваленон 4-deoxynivalenol	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, пшеница, соя, подсолнечник Corn, wheat, soybeans, sunflowers

MT MT	Продуцент Producer	Растворимость Solubility	Формула, химический класс Formula, Chemical Class	Климат Climate	Поражаемые объекты Affected objects
T-2 токсин T-2 toxin	Гриб <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле. Практически не растворим в воде Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile. Practically insoluble in water	 12,13-эпокситрихотецены 12,13-epoxytrichothecenes	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, рис, соя, подсолнечник Corn, rice, soybeans, sunflower seeds
Фуманизин (ФУМ) В <sub>1</sub> Fumanisine (FUM) B <sub>1</sub>	Гриб <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>moniliforme</i> и <i>proliferatum</i> <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>moniliforme</i> and <i>proliferatum</i> fungus	Растворимость в воде не более 20 мг/мл. Растворим в метаноле, смеси ацетонитрила с водой Solubility in water no more than 20 mg/ml. Soluble in methanol, a mixture of acetonitrile with water	 Диэфир пропан-1,2,3-трикарбоновой кислоты и 2-амино-12,16-диметил-3,5,10,14,15-пентагидроксиэйкозана Diester of propane-1,2,3-tricarboxylic acid and 2-amino-12,16-dimethyl-3,5,10,14,15-pentahydroxycosane	От умеренного климатического пояса до субтропиков From the temperate climate zone to the subtropics	Соя, ячмень, кукуруза, подсолнечник, пшеница Soy, barley, corn, sunflower, wheat
Циклопиазоновая кислота (ЦПК) Cyclopiazonic Acid (CPA)	Грибы <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. ratulum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. camemberti</i> и <i>Aspergillus A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> Fungi <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. ratulum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. camemberti</i> and <i>Aspergillus A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i>	Не растворима в воде, но растворима в других растворителях, таких как этанол и диметилсульфоксид Insoluble in water, but soluble in other solvents such as ethanol and dimethylsulfoxide	 Индол-тетрамовая кислота Indole-tetramic acid	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, зерновые и ореховые продукты (арахис, семена подсолнечника) Corn, grain and nut products (peanuts, sunflower seeds)
Цитринин (Ц) Citrinin (C)	Грибы вида <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Monascus (M. Purpureus)</i> и некоторые виды рода <i>Aspergillus</i> Fungi of the species <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Monascus (M. Purpureus)</i> and some species of the genus <i>Aspergillus</i>	Не растворим в воде, но растворяется в этаноле, бензоле, ацетоне и хлороформе Insoluble in water, but soluble in ethanol, benzole, acetone and chloroform	 (3R, 4S)-4,6-дигидро-8-гидрокси-3,4,5-триметил-6-оксо-3H-2-бензопиран-7-карбоновая кислота (3R, 4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Злаки, кукуруза, пшеница, овес, рожь, ячмень, рис, кокос, подсолнечное и соевое масла Cereals, corn, wheat, oats, rye, barley, rice, coconut, sunflower and soybean oil

В РФ содержание МТ в ЛРС пока не нормируется. В работе [10] показано, что МТ сохраняются в высушенном ЛРС более 100 лет. Другими авторами [2, 3] также установлено, что многое ЛРС густо обсеменено плесневыми грибами класса *Deuteromycetes*, что можно обнаружить при проведении микроскопического анализа (рисунок 2). Предотвратить загрязнение ЛРС МТ практически невозможно, поэтому необходим строгий контроль за качеством ЛРС в местах его заготовки [11]. Однако, данная проблема и необходимость введения подобного исследования в перечень показателей оценки доброкачественности ЛРС требует углубленного изучения и оценки степени его зараженности. Вопросам изучения загрязнения ЛРС различными экотоксикантами, в т. ч. и МТ, посвящено последнее время много исследований [2–7]. Кроме того, стандартные методы определения нормируемых МТ, обычно, не рассчитаны на выявление трансформированных форм, и их содержание остается неучтенным. Поэтому модифицированные лекарственным растением метаболиты МТ, получили название замаскированных (конъюгированных, трансформированных) растением МТ, содержание которых также необходимо оценивать [8].

Токсичность МТ может быть острой и хронической. Последствия токсического действия МТ могут быть обратимыми и необратимыми. Основные проявления токсического действия МТ представлены в таблице 2. Представляет опасность также синергическое действие МТ (даже в низких дозах), оказывающееся больше суммы действия каждого МТ по отдельности.

В связи с этим обнаружение МТ представляет собой одно из приоритетных направлений развития теоретических и прикладных исследований.

Целью работы являлась систематизация методов определения основных МТ на основе анализа отечественной литературы для возможного дальней-

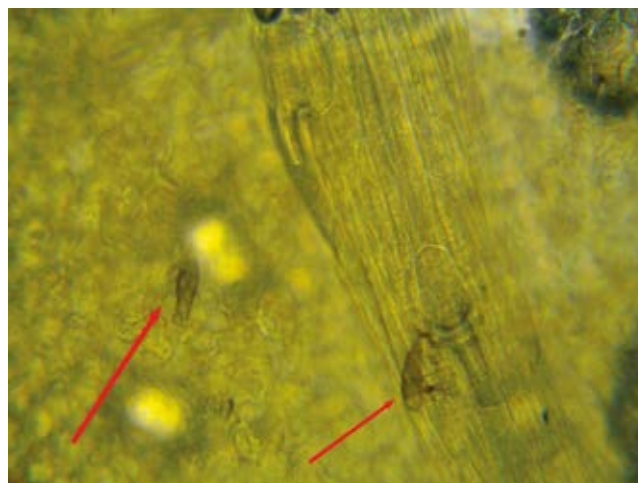


Рис. 2. Вид конидий плесневого гриба класса *Deuteromycetes* при микроскопическом анализе ЛРС [2, 3]

Figure 2. The type of conidia of the mold fungus of the class *Deuteromycetes* during microscopic analysis of MPM [2, 3]

шего их применения в оценке качества ЛРС и ЛРП на его основе.

Нормативной базой для формирования требований к содержанию МТ в ЛРС первоначально могут послужить действующие нормативные документы (НД) в области пищевой и сельскохозяйственной индустрии. В настоящее время для практической работы хозяйств стран СНГ более приемлемыми считаются европейские допустимые нормы [13–15]. Сравнительная характеристика требований к ПДК различных МТ в России и за рубежом [16, 17] приведены в таблице 3. Очень часто объекты поражаются несколькими видами МТ, которые оказывают взаимоусиливающее действие, и опасны даже в небольших количествах, ниже уровня ПДК [18].

Таблица 2. Характеристика токсических свойств наиболее распространенных МТ [12]

Table 2. Characterization of the toxic properties of the most common MT [12]

МТ MT	Токсичность Toxicity	Кумуляция Cumulation	Биологическое действие Biological action	Первичный механизм действия Primary mechanism of action
АФЛ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	Один из наиболее опасных МТ One of the most dangerous MT	+	Острое токсическое действие – гепатропный яд, орган-мишень – печень. Отдаленные последствия действия – канцерогенное, мутагенное и тератогенное Acute toxic effect – hepatropic poison, target organ – liver. Long-term effects of the action – carcinogenic, mutagenic and teratogenic	Образует связь с гуанином (ДНК-аддукт) после метаболической активации в печени Forms a bond with guanine (DNA adduct) after metabolic activation in the liver
ОТ А Ochratoxin A	Высокотоксичный МТ (канцероген второго класса опасности) Highly toxic MT (carcinogen of the second hazard class)	++	Преимущественно поражает почки. При остром токсикозе – патологические изменения выявляются и в печени, и в лимфоидной ткани, и в желудочно-кишечном тракте. Обладает сильным тератогенным действием, вызывает некрозы печени у животных Mostly affects the kidneys. In acute toxicosis – pathological changes are detected in the liver, and in lymphoid tissue, and in the gastrointestinal tract. It has a strong teratogenic effect, causes liver necrosis in animals	Блокируют синтез белков Block protein synthesis

MT MT	Токсичность Toxicity	Кумуляция Cumulation	Биологическое действие Biological action	Первичный механизм действия Primary mechanism of action
П Patuline	Особо опасный MT Particularly dangerous MT	-	<p>Проявляется как в виде острых токсикозов, так и в виде ярко выраженных канцерогенных и мутагенных эффектов. Вызывает симптомы поражения желудочно-кишечного тракта, такие как язва желудка, кровоизлияния в кишечнике, поражения в двенадцатиперстной кишке и изменение функции кишечного барьера</p> <p>It manifests itself both in the form of acute toxicosis and in the form of pronounced carcinogenic and mutagenic effects. Causes gastrointestinal damage, such as a stomach ulcer, intestinal hemorrhage, damage to the duodenum and changes in the function of the intestinal barrier</p>	<p>Блокирует синтез ДНК, РНК и белков, причем блокирование инициации транскрипции осуществляется за счет ингибирования ДНК-зависимой-РНК-полимеразы</p> <p>It blocks the synthesis of DNA, RNA and proteins, and transcription initiation is blocked by inhibiting DNA-dependent RNA polymerase</p>
ЗЕА ZEA	MT с выраженной эстрогенной активностью MT with pronounced estrogenic activity	-	<p>Обладает выраженными гормоноподобными (эстрогенными) свойствами, доказано тератогенное действие</p> <p>Has pronounced hormone-like (estrogenic) properties, proven teratogenic effect</p>	<p>Образует связь с эстрогенными рецепторами у млекопитающих</p> <p>Forms a connection with estrogen receptors in mammals</p>
ДОН DON	Второй класс токсичности Second toxicity class	-	<p>Обладает широким спектром токсического действия на быстроделющиеся клетки, такие как клетки желудочно-кишечного тракта, кожи и лимфоидные клетки</p> <p>It has a wide range of toxic effects on rapidly dividing cells, such as cells of the gastrointestinal tract, skin and lymphoid cells</p>	<p>Механизм токсичности сходен с таковым для других ТТ: ингибирование синтеза белка с последующим нарушением синтеза ДНК и РНК, что препятствует метаболизму мембранных фосфолипидов</p> <p>The toxicity mechanism is similar to that for other TTs: inhibition of protein synthesis with subsequent impairment of DNA and RNA synthesis, which inhibits membrane metabolism phospholipids</p>
Т-2	Первый класс токсичности First Class Toxicity	+		
ФУМ В <sub>1</sub> FUM B <sub>1</sub>	Канцероген второго класса опасности Carcinogen of the second hazard class	-	<p>Развитие рака, гепатотоксическое и нефротоксическое действие, а также угнетает иммунную систему. Вызывает изменение функции кишечного барьера и оказывают синергическое действие с другими MT</p> <p>The development of cancer, hepatotoxic and nephrotoxic effects, and also inhibits the immune system. It causes a change in the function of the intestinal barrier and has a synergistic effect with other MTs</p>	<p>Ингибирует синтез церамидов (биосинтез сфинголипидов)</p> <p>Inhibits the synthesis of ceramides (biosynthesis of sphingolipids)</p>
ЦПК CPA	Проявляет токсичность только в высоких концентрациях It shows toxicity only in high concentrations	-	<p>Поражения нервной системы. Угнетение иммунной системы. Некрозы печени, тканей желудочно-кишечного тракта, почек и скелетных мышц</p> <p>Damage to the nervous system. Oppression of the immune system. Necrosis of the liver, tissues of the gastrointestinal tract, kidneys and skeletal muscles</p>	<p>Нарушение метаболизма кальция (оказывает ингибирующее действие на Ca<sup>2+</sup>-зависимую АТФазу эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума)</p> <p>Violation of calcium metabolism (has an inhibitory effect on the Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase of the endoplasmic and sarcoplasmic reticulum)</p>
Ц C	LD <sub>50</sub> не известна LD <sub>50</sub> not known	-	<p>Нефротоксическое действие, стимулирует перекисное окисление липидов в печени, очаговые поражения почек и печени, эмбриотоксический, генотоксический и тератогенный эффекты, обладает тератогенными и канцерогенными свойствами</p> <p>Nephrotoxic effect, stimulates lipid peroxidation in the liver, focal lesions of the kidneys and liver, embryotoxic, genotoxic and teratogenic effects, has teratogenic and carcinogenic properties</p>	<p>Понижение продукции цитокинов, ингибирование синтеза РНК и ДНК, индукция окислительного стресса, ингибирование экспрессии генов</p> <p>Reduces cytokine production, inhibits RNA and DNA synthesis, induces oxidative stress, inhibits gene expression</p>

**Таблица 3.** Сравнительная характеристика требований к ПДК (мкг/кг) различных МТ в России и за рубежом

**Table 3.** Comparative characteristics of the requirements for maximum permissible concentration (MPC) (mcg/kg) of various MTs in Russia and abroad

Страна Country	Пищевой продукт Food product	ПДК MPC
<i>Зеараленон</i> <i>Zearalenone</i>		
ЕС EU	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	75
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	1000
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, vegetables, juices and smoothies	50
<i>T-2 токсин</i> <i>T-2 Toxin</i>		
ЕС EU	Продукция из кукурузы и рафинированное кукурузное масло Corn Products and Refined Corn Oil	1000
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	100
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, vegetables, juices and smoothies	50
<i>ДОН</i> <i>DON</i>		
ЕС EU	Зерновые для непосредственного потребления человеком Cereals for direct human consumption	750
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	1000
США USA	Продукты переработки пшеницы Wheat Processing Products	1000
<i>Охратоксин А</i> <i>Ochratoxin A</i>		
ЕС EU	Не переработанные зерновые культуры Unprocessed cereals	5
	Все пищевые продукты, полученные из переработанных зерновых культур All food derived from processed cereals	3
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	50
<i>Афлотоксин B<sub>1</sub></i> <i>Aflatoxin B<sub>1</sub></i>		
ЕС EU	Орехи, сухофрукты, пищевые продукты, полученные из переработанных зерновых культур Nuts, dried fruits, processed foods	2
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	5
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, Vegetables, Juices and Smoothies	

Страна Country	Пищевой продукт Food product	ПДК MPC
США USA	Все пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов All food products except milk and dairy products	20
<i>Фумонизины B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub></i> <i>Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub></i>		
РФ Russia	БАД Dietary supplement	200
<i>Патулин</i> <i>Patulin</i>		
РФ Russia	Консервы овощные, фруктовые, ягодные Canned vegetables, fruits, berries	50
	Чай, кофе, какао Tea, coffee, cocoa	5
ЕС и США EU and USA	Не нормируется Not standardized	-
<i>Цитринин</i> <i>Citrinin</i>		
ЕС EC	В пищевых добавках, основанных на рисе, ферментированном красными дрожжами <i>Monascus purpureus</i> In rice supplement fermented with red yeast <i>Monascus purpureus</i>	2000
США и РФ USA and Russia	Не нормируется Not standardized	-

### Методы анализа

В настоящее время для определения МТ в различных объектах параллельно развиваются скрининг-методы, количественные аналитические и биологические методы. Скрининг-методы отличаются быстротой и удобны для проведения серийных анализов, позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. В качестве количественных аналитических методов определения МТ используются химические, радиоиммунологические и иммуноферментные методы. Химические методы являются в настоящее время наиболее распространенными и включают стадии выделения и количественного определения МТ. Стадия выделения включает экстракцию и очистку МТ от соединений с близкими физико-химическими характеристиками. Окончательное разделение и количественную оценку МТ проводят с помощью различных методов хроматографии: ГХ, ГЖХ, ТСХ, ВЭЖХ и масс-спектрометрия. Биологические методы применяются для определения МТ, для которых отсутствуют химические методы анализа. Высококчувствительные и высокоспецифичные радиоиммуно-химические и иммуноферментные методы обнаружения, идентификации и количественного определения МТ находят все более широкое применение [19,20]. Обобщенные данные о методах определения различных МТ, включенных в НД, приведены в таблице 4.

Таблица 4. Методы определения различных МТ по НД

Table 4. Methods for the determination of various MT according to regulatory documentation (RD)

№ п/п	НД RD	Объект анализа Object of analysis	МТ MT	Метод Method
1	ГОСТ Р 52828-2007 [21] GOST P 52828-2007 [21]	Вина и виноматериалы Wines and wine materials	Охратоксин А Ochratoxin A	ТСХ TLC
2	ГОСТ 31653-2012 [22] GOST 31653-2012 [22]	Корма Feed	АФЛ В <sub>1</sub> , роридин А, ОТ А, стеригматоцистин, Т-2, ЗЕА, ФУМ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub> , roridin A, OT A, sterigmatocystin, T-2, ZEA, FUM B <sub>1</sub>	ИФА IFA
3	ГОСТ Р 51116-97 [23] GOST P 51116-97 [23]	Комбикорма, зерно, продукты его переработки Compound feed, grain, products of its processing	ДОН DON	ВЭЖХ HPLC
4	ГОСТ 28001-88 [24] GOST 28001-88 [24]	Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма Feed grain, products of its processing, compound feed	Т-2, ЗЕА и ОТ А T-2, ZEA and OT A	ТСХ TLC
5	МУК 4.1.220407 [25] MUK 4.1.220407 [25]	Продовольственное сырье и пищевые продукты Food Raw Materials and Food Products	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
6	ГОСТ Р 53162-2008 [26] GOST P 53162-2008 [26]	Зерновые культуры, орехи и продукты их переработки Cereals, nuts and their processed products	АФЛ В <sub>1</sub> и общее содержание АФЛ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> и G <sub>2</sub> AFL B <sub>1</sub> and total content of AFL B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> and G <sub>2</sub>	ВЭЖХ HPLC
7	МУ 3940-85 [27] MU 3940-85 [27]	Зерно и зернопродукты Grain and grain products	ДОН (вомитоксин) и ЗЕА DON (vomitoxin) and ZEA	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
8	ГОСТ 34140-2017 [28] GOST 34140-2017 [28]	Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье Food products, feed, food raw materials	Более 50 наименований различных МТ More than 50 items of various MT	ВЭЖХ-МС HPLC-MS
9	ГОСТ 32835-2014 [29] GOST 32835-2014 [29]	Продукция соковая Juice products	Патулин и охратоксин А Patulin and ochratoxin A	ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS
10	ГОСТ 31748-2012 [30] GOST 31748-2012 [30]	Продукты пищевые, зерновые культуры, орехи и продукты их переработки Food products, cereals, nuts and their processed products	АФЛ В <sub>1</sub> и общее содержание АФЛ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> и G <sub>2</sub> AFL B <sub>1</sub> and total content of AFL B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> and G <sub>2</sub>	ВЭЖХ HPLC
11	ГОСТ 30711-2001 [31] GOST 30711-2001 [31]	Продукты пищевые Food products	АФЛ В <sub>1</sub> и М <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub> and M <sub>1</sub>	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
12	ГОСТ 28038-2013 [32] GOST 28038-2013 [32]	Продукты переработки плодов и овощей Products of processing fruits and vegetables	Патулин Patulin	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
13	ГОСТ Р 51435-99 [33] GOST P 51435-99 [33]	Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок Apple juice, concentrated apple juice and drinks containing apple juice		ВЭЖХ HPLC
14	ГОСТ 31691-2012 [34] GOST 31691-2012 [34]	Зерно и продукты его переработки, комбикорма Grain and products of its processing, animal feed	ЗЕА ZEA	ВЭЖХ HPLC
15	ГОСТ ISO 17372-2016 [35] GOST ISO 17372-2016 [35]	Корма для животных Animal feed		
16	ГОСТ EN 15850-2013 [36] GOST EN 15850-2013 [36]	Продукты для детского питания (в т.ч. грудных детей и детей раннего возраста) на основе ячменной, кукурузной и пшеничной муки Products for baby food (including infants and young children) based on barley, corn and wheat flour		
17	МУ 5177-90 [37] MU 5177-90 [37]	Зерно и зернопродукты Grain and grain products	ДОН (вомитоксин) и ЗЕА DON (vomitoxin) and ZEA	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
18	МУ 4082-86 [38] MU 4082-86 [38]	Пищевые продукты Food products	АФЛ AFL	ВЭЖХ HPLC
19	ГОСТ EN 15891-2013 [39] GOST EN 15891-2013 [39]	Продукты пищевые, продовольственное зерно, продукты его переработки и продукты на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста Food products, food grain, products of its processing and grain-based products for feeding infants and young children	ДОН DON	ВЭЖХ HPLC

№ п/п	НД RD	Объект анализа Object of analysis	МТ MT	Метод Method
20	ГОСТ EN 15835-2013 [40] GOST EN 15835-2013 [40]	Продукты на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста Grain-based products for feeding infants and young children	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
21	ГОСТ ISO 15141-2-2013 [41] GOST ISO 15141-2-2013 [41]	Продукты пищевые, зерно и зерновые продукты Food products, grain and grain products		
22	ГОСТ Р EN 15829-2011 [42] GOST P EN 15829-2011 [42]	Продукты пищевые, сухофрукты Food products, dried fruits		
23	ГОСТ 34108-2017 [43] GOST 34108-2017 [43]	Корма, комбикорма и комбикормовое сырье Feed, compound feed and feed raw materials	Суммы АФЛ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , ДОН, ЗЕА, ОТ А, Т-2, сумма ФУМ (по ФУМ В <sub>1</sub> ) Sums AFL B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , DON, ZEA, OT A, T-2, the amount of FUM (according to FUM B <sub>1</sub> )	ИФА IFA
24	ГОСТ Р 52471-2005 [44] GOST P 52471-2005 [44]	Корма Feed	АФЛ В <sub>1</sub> , роридин А, ОТ А, стеригматоцистин, Т-2, ЗЕА, ФУМ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub> , roridin A, OT A, sterigmatocystin, T-2, ZEA, FUM B <sub>1</sub>	ИФА IFA
25	ГОСТ 32587-2013 [45] GOST 32587-2013 [45]	Зерно и продукты его переработки, комбикорма Grain and products of its processing, animal feed	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
26	ГОСТ Р 55448-2013 [46] GOST P 55448-2013 [46]	Корма, комбикорма, комбикормовое сырье Feed, feed, compound feed		

### Спектрофотометрия

Метод УФ-спектрофотометрии применяется только для определения чистоты, аутентичности и расчета концентрации стандартных растворов стандартных препаратов МТ. Данные о коэффициентах молярной экстинкции МТ (растворы в метаноле) в максимумах поглощения в УФ-спектре приведены в таблице 5. Большинство МТ обладают собственной флуоресценцией в УФ-свете, что используется для целей их качественного и количественного определения (таблица 6).

### Масс-спектрометрия

Предложена методология идентификации и определения из одной навески 300 токсикантов различных классов, в т.ч. и 25 МТ, в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом время-пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с ВЭЖХ [47]. В таблице 7 представлены заряженные частицы, время удерживания и отношения масса/заряд для большинства известных и нормируемых МТ. На рисунке 3 представлена масс-хроматограмма АФЛ.

Таблица 5. Спектральные характеристики МТ

Table 5. Spectral characteristics of MT

МТ	$\lambda_{\max}$ , нм $\lambda_{\max}$ , nm	Количественный $\lambda_{\max}$ , нм Quantitative $\lambda_{\max}$ , nm	Е (см <sup>2</sup> /моль) в количественном $\lambda_{\max}$ E (cm <sup>2</sup> /mol) in quantitative $\lambda_{\max}$	МТ	$\lambda_{\max}$ , нм $\lambda_{\max}$ , nm	Количественный $\lambda_{\max}$ , нм Quantitative $\lambda_{\max}$ , nm	Е (см <sup>2</sup> /моль) в количественном $\lambda_{\max}$ E (cm <sup>2</sup> /mol) in quantitative $\lambda_{\max}$
АФЛ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	223 265	362	21800	Стигматоцистин Stigmatocystin	246 277	326	15310
АФЛ В <sub>2</sub> AFL B <sub>2</sub>	223 265	362	24000	ДОН DON	218	218	4500
АФЛ G <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	242 265	362	17700	ЗЕА ZEA	236 316	274	12710
АФЛ G <sub>2</sub> AFL B <sub>1</sub>	242 265	362	19300	Охратоксин А Ochratoxin A	214	333	6400
АФЛ М <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	226 265	357	19000	Патулин Patulin	276	276	14500

Таблица 6. Флуоресценция МТ в УФ-свете

Table 6. MT fluorescence in UV light

№ п/п	МТ	Флуоресценция в УФ-свете UV fluorescence
1	АФЛ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	сине-голубая blue-blue
2	АФЛ В <sub>2</sub> AFL B <sub>2</sub>	
3	АФЛ G <sub>1</sub> AFL G <sub>1</sub>	зеленая green
4	АФЛ G <sub>2</sub> AFL G <sub>2</sub>	
5	АФЛ M <sub>1</sub> AFL M <sub>1</sub>	сине-фиолетовая blue violet
6	АФЛ M <sub>2</sub> AFL M <sub>2</sub>	
7	Охратоксин А Ochratoxin A	зеленая green
8	Охратоксин В Ochratoxin B	голубая blue
9	Охратоксин С Ochratoxin C	бледно-зеленая pale green
10	ЗЕА ZEA	сине-зеленая blue green
11	ТТ (Т-2, диацетоксискирпенол, ниваленол, ДОН) TT (T-2, diacetoxiskirphenol, nivalenol, DON)	не обладают do not possess

Масс-спектрометрия применена для характеристики, идентификации и подтверждения наличия МТ. В качестве подтверждающих методов практикуют использование масс-спектрометрии. Она обеспечивает определение пикограммовых количеств МТ. Наиболее эффективно использование комбинации методов ГЖХ и масс-спектрометрии. Комбинация ГЖХ и масс-спектрометрии обеспечивает большую специфичность, чем при использовании одной ГЖХ, поэтому она и стала стандартной при определении МТ в биомедицинских образцах. Основной недостаток – необходимость предварительного химического преобразования анализируемых соединений, что требует много времени. Одна из последних разработок совместного использования ГЖХ-масс-спектрометрии, предложенная в 2001 г., представляет собой специ-

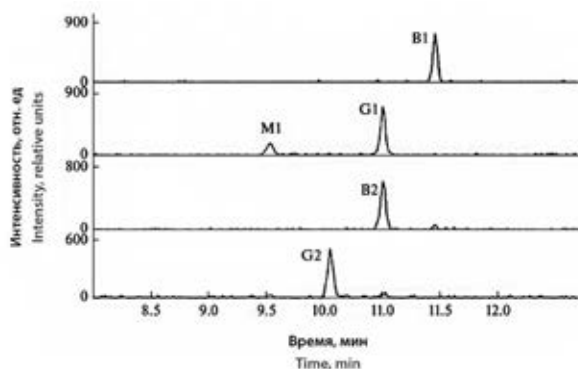


Рисунок 3. Масс-хроматограммы АФЛ [49]

Figure 3. Mass-chromatograms of AFL [49]

фичный и надежный метод идентификации МТ без предварительного химического преобразования компонентов анализируемого образца [50].

Таблица 7. Результаты определения основных МТ методом масс-спектрометрии [48]

Table 7. The results of determining the basic MT by mass spectrometry [48]

№ п/п	МТ	Брутто-формула Gross formula	Ион Ion	Время удерживания, мин Retention time, min	m/z
1	АФЛ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11,0	313,07
2	АФЛ G <sub>1</sub> AFL G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10,5	329,06
3	АФЛ G <sub>2</sub> AFL G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10,1	331,08
4	АФЛ M <sub>1</sub> AFL M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9,5	329,06
5	АФЛ В <sub>2</sub> AFL B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	10,5	315,09
6	ДОН DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	5,2	314,16
7	ЗЕА ZEA	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	11,4	317,14
8	Ниваленол Nivalenol	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	6,0	313,13
9	ОТ А Ochratoxin A	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> NCl	[M+H] <sup>+</sup>	13,4	404,09
10	ОТ В Ochratoxin B	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> NCl	[M+H] <sup>+</sup>	12,1	370,13
11	Патулин Patulin	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	6,1	153,02
12	Стеригматоцистин Sterigmatocystin	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14,1	325,07
13	Т-2 T-2	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	12,8	484,25
14	НТ-2 HT-2	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	11,3	425,21
15	ФУМ В <sub>1</sub> FUM B <sub>1</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> O <sub>9</sub> N	[M+H] <sup>+</sup>	9,9	722,39
16	ФУМ В <sub>2</sub> FUM B <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>14</sub> N	[M+H] <sup>+</sup>	10,9	706,40
17	Цитринин Citrinin	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	11,8	251,09

### Хроматографические методы

Для определения МТ в продуктах питания применяют в основном хроматографические методы. Наиболее распространенными из них в настоящее время являются методики с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС) и их сочетаний. Разнообразие в строении и свойствах МТ часто не позволяет определить их одним методом одновременно, что приводит к значительному усложнению и увеличению продолжительности анализа. В последнее время все чаще предлагают методики одновременного

определения МТ методами газовой или жидкостной (в том числе тандемной и сверхскоростной) хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, СВЭЖХ-МС/МС). По существующим в России ГОСТ и МУ определение ОТ А, ЗЕА, ДОН, Т-2 проводят каждого в отдельности после очистки экстрактов на хроматографических колонках и затем используют методы ТСХ, ВЭЖХ с флуориметрическим или УФ-детекторами. Токсин Т-2 определяют методом ГЖХ после получения производных с трифторуксусным ангидридом. Предлагаемые методики достаточно сложны, длительны и дорогостоящи.

## ТСХ

Для обнаружения, идентификации и количественного определения МТ используют двумерную и одномерную ТСХ. Методы ТСХ доступны почти для всех МТ. Обнаружение и специфическая идентификация разработаны для каждого отдельного МТ. Так, в частности, в работе [51] изучены условия разделения в тонком слое сорбента некоторых представителей МТ (таблица 8). Использованы силикагелевые пластинки Silica Gel G (Merck) размером 20 × 20 см, обработанные 0,4 М водным раствором щавелевой кислоты и активированные последовательным высушиванием при температуре 100 °С – 40 мин и выдерживанием при комнатной температуре. Элюент 1: хлороформ-метилэтилкетон (4:1); элюент 2: хлороформ-метанол (1:1). Зоны просматривали в УФ-свете при 366 нм и обрабатывали проявителями.

Другие работы по ТСХ, которые представлены в литературе в значительном количестве, обобщены в таблице 9.

## Особенности пробоподготовки

Для извлечения МТ из анализируемых объектов в основном используют жидкостно-жидкостную экстракцию. В настоящее время существует ряд способов

одновременного определения МТ. Для одновременного извлечения нескольких токсинов наиболее часто применяют смесь (86:14) ацетонитрила и воды. Наиболее часто используемые экстрагенты для выделения МТ приведены в таблице 10.

Для очистки экстрактов от соэкстрагируемых веществ (белки, жиры, липиды, стеролы, полярные органические кислоты, каратиноиды, хлорофилл) используют твердофазную экстракцию (ТФЭ) и коммерческие иммуноаффинные колонки для избирательного извлечения МТ (единичных или определенного класса).

## Имуноаффинные колонки (ИАФК)

Занимают особое место в ряду иммуноаналитических подходов, представляя собой метод очистки/концентрации, который должен сопровождаться последующим анализом. Сочетание иммуноаффинной очистки/концентрирования с современными системами детекции позволяет выявлять МТ в пикограммовых количествах. Принцип работы ИАФК заключается в том, что в картридж помещен нерастворимый носитель, например, агароза, на котором иммобилизованы специфические антитела (АТ). Носитель может отсутствовать: в этом случае АТ находятся в свободном виде и отделены полупроницаемой мембраной. Экстракт образца пропускается через колонку, при этом МТ связывается с АТ, а остальные экстрагированные соединения проходят через колонку. Затем с помощью элюирующего раствора МТ смывается с колонки и может быть проанализирован с использованием различных методов, чаще всего – ВЭЖХ. ИАФК могут сочетаться и с последующей иммунодетекцией. Совместно с ИАФК может использоваться и ТСХ. Наиболее чувствительное определение обеспечивает иммуноаффинная экстракция в сочетании с ВЭЖХ и масс-спектрометрической детекцией. Хотя ИАФК не используются непосредственно для анализа, имеются работы, в которых на них реализована и очистка образца, и последующая детекция по образованию окрашенных зон.

Таблица 8. Результаты разделения некоторых МТ методом ТСХ

Table 8. The results of the separation of some MT by TLC

МТ	R <sub>f</sub>	Флуоресценция Fluorescence	Цвет зон после проявления Color of zones after development	
			H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FeCl <sub>3</sub>
Аспертоксин Aspertoxin	0,12	Светло-желтая Light Yellow	Зеленовато-желтый Greenish Yellow	–
ОТ В Ochratoxin B	0,20	Голубая Blue	–	Красно-коричневый Red Brown
ОТ А Ochratoxin A	0,48	Зеленая Green	–	Красно-коричневый Red-brown
ЗЕА ZEA	0,72	Слабо-голубая Light Blue	Светло-желтый Light Yellow	Красно-коричневый Red Brown
АФЛ G <sub>1</sub> AFL G <sub>1</sub>	0,30	Зеленая Green	Зеленовато-серый Greenish Gray	–
АФЛ В <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub>	0,40	Голубая Blue	Зеленовато-серый Greenish Gray	–
ЦПК CPA	0,65	Темная Dark	Красно-коричневый Red Brown	Красно-коричневый Red Brown
Стеригматоцистин Sterigmatocystin	0,85	Оранжевая Orange	Зеленовато-серый Greenish Gray	Зеленый Green

Таблица 9. ТСХ-методики для определения МТ [52]  
Table 9. TLC methods for the determination of MT [52]

MT	Элюент Eluent	Проявитель Developer	Дополнительная информация Additional Information	Ссылка Link
ОТ А Ochratoxin A	Изопропиловый спирт-водный раствор аммиака 25 % (4:1) Isopropyl alcohol-aqueous solution of ammonia 25 % (4:1)	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	Идентификацию и количественное определение проводят методом сканирующей денситометрии Identification and quantification are carried out by scanning densitometry	[21]
	Первое направление: эфир-гексан-хлороформ-муравьиная кислота (30:30:30:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (55:35:10) The first direction: ether-hexane-chloroform-formic acid (30:30:30:1). Second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (55:35:10)	Насыщенный водный раствор карбоната натрия УФ-свет при 365 нм A saturated aqueous solution of sodium carbonate UV light at 365 nm	–	[52]
АФЛ В <sub>1</sub> , ЗЕА, Т-2 и ДОН AFL B <sub>1</sub> , ZEA, T-2 and DON	Гексан-ацетон (1:1) Hexane-acetone (1:1)	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	R <sub>f</sub> при совместном присутствии для АФЛ В <sub>1</sub> – 0,45, для ЗЕА – 0,75, для Т-2 – 0,40, для ДОН – 0,42 R <sub>f</sub> with the joint presence for AFL B <sub>1</sub> – 0.45, for ZEA – 0.75, for T-2 – 0.40, for DON – 0.42	[53]
Т-2, ЗЕА и ОТ А T-2, ZEA and ochratoxin A	Первое направление: гексан-этилацетат (1:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6:3:1) или хлороформ-этилацетат-уксусная ледяная кислота (17:3:1) The first direction: hexane-ethyl acetate (1:1). The second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (6:3:1) or chloroform-ethyl acetate-acetic glacial acid (17:3:1)	20%-й спиртовый раствор серной кислоты. УФ-свет при 365 нм 20 % alcoholic solution of sulfuric acid. UV light at 365 nm	Т-2 на хроматограмме в виде пятна с голубой флюоресценцией. R <sub>f</sub> Т-2 составляет 0,23-0,24 или 0,20-0,23 T-2 in a chromatogram in the form of a spot with blue fluorescence. R <sub>f</sub> T-2 is 0.23-0.24 or 0.20-0.23	[24]
Патулин Patulin	Первое направление: хлороформ-ацетон (4:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:1) The first direction: chloroform-acetone (4:1). The second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (5:4:1)	В камере с парами хлора с последующим опрыскиванием раствором бензилина в муравьиной кислоте и просмотром в УФ-свете при 365 нм. Полуколичественную оценку проводят путем визуального сравнения площади полученного пятна с зонами стандартных растворов МТ In a chamber with chlorine vapor, followed by spraying with a solution of benzidine in formic acid and viewing in UV light at 365 nm. A semi-quantitative assessment is carried out by visual comparison of the area of the spot obtained with the zones of standard MT solutions	Обнаруживается в виде зелено-желтых флуоресцирующих пятен на темно-фиолетовом фоне It is detected in the form of green-yellow fluorescent spots on a dark purple background	[32, 54]
	Первое направление: хлороформ-ацетон (80:20). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (50:40:10) The first direction: chloroform-acetone (80:20). Second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (50:40:10)			
	Бензол-уксусная кислота (1:3) Benzene-acetic acid (1:3)			
	Хлороформ-ацетон-муравьиная кислота (80:15:5) или (70:23:7) или (80:18:2) Chloroform-acetone-formic acid (80: 15: 5) or (70:23:7) or (80: 18: 2)			
Хлороформ-ацетон (70:30) или (80:20) или (90:10) Chloroform-acetone (70:30) or (80:20) or (90:10)	Просмотр в УФ-свете при 254 нм UV viewing at 254 nm	R <sub>f</sub> = 0,50 или 0,67 или 0,42 R <sub>f</sub> = 0.50 or 0.67 or 0.42	[55, 56]	

MT	Элюент Eluent	Проявитель Developer	Дополнительная информация Additional Information	Ссылка Link
АФЛ В <sub>1</sub> и М <sub>1</sub> AFL B <sub>1</sub> and M <sub>1</sub>	Этиловый эфир-метанол-вода (94:4,5:1,5) или (90:8:2) Ethyl ether-methanol-water (94: 4.5: 1.5) or (90: 8: 2)	Раствор азотной кислоты в воде (1:2) или пары йода в течение 1–2 мин A solution of nitric acid in water (1:2) or iodine vapor for 1–2 minutes	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	[31]
	Первое направление: этиловый эфир-метанол-вода (94:4,5:1,5). Второе направление: хлороформ-ацетон-вода (90:10:1) The first direction: ethyl ether-methanol-water (94: 4.5: 1.5). Second direction: chloroform-acetone-water (90: 10: 1)	-	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	[52]
ДОН DON	Гексан-ацетон (3:2) Hexane-acetone (3: 2)	10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride	УФ-свет при 365 нм (пятна с синей флуоресценцией и R <sub>f</sub> = 0,25 – 0,30) UV light at 365 nm (spots with blue fluorescence and R <sub>f</sub> = 0.25 – 0.30)	[52]
	Первое направление: гексан-ацетон (3:2). Второе направление: хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (78:12:10) или эфир-гексан-изопропиловый спирт-вода (77:18:4,5:0,5) The first direction: hexane-acetone (3: 2). The second direction: chloroform-acetone-isopropyl alcohol (78:12:10) or ether-hexane-isopropyl alcohol-water (77: 18: 4.5: 0.5)			
ЗЕА ZEA	Гексан-ацетон (7:3) Hexane-acetone (7:3)	1 пластина 1 plate	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	[52]
	Первое направление: гексан-ацетон (7:3). Второе направление: толуол-этилацетат-хлороформ-85 % муравьиная кислота (45:25:25:5) The first direction: hexane-acetone (7:3). The second direction: toluene-ethyl acetate-chloroform-85 % formic acid (45:25:25:5)	10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride		
		2 пластина 2 plate		
		1 % водный раствор прочной синей В-соли или прочной фиолетовой В-соли и затем 5 % раствор натрия карбоната 1 % aqueous solution of strong blue B-salt or strong purple B-salt and then 5 % sodium carbonate solution	Красно-бордовые пятна Maroon spots	
		10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	

Таблица 10. Выделение МТ из объектов анализа

Table 10. Isolation of MT from objects of analysis

МТ	Экстрагент Extractant	Объект анализа Object of analysis
ТТ МТ типа А и В TT MT type A and B	Смеси воды и ацетонитрила или метанола Mixtures of water and acetonitrile or methanol	–
ЗЕА ZEA	Этилацетат, метанол, хлороформ и смесь ацетонитрила и воды Ethyl acetate, methanol, chloroform and a mixture of acetonitrile and water	Зерно или корма Grain or feed
ОТ А Ochratoxin A	Смесь хлороформа и фосфорной кислоты Mixture of chloroform and phosphoric acid	Ячмень Barley
	Хлороформ Chloroform	Зеленый кофе Green Coffee
	Смесь толуол/НСl, хлороформ/этанол/уксусная кислота и дихлорметан/фосфорная кислота A mixture of toluene/HCl, chloroform/ethanol/acetic acid and dichloromethane/phosphoric acid	Пшеница Wheat
	Трет-бутиловый эфир Tert-Butyl Ether	Детское питание Baby Food
АФЛ AFL	Хлороформ или водно-ацетонитрильная смесь, метанол Chloroform or water-acetonitrile mixture, methanol	–
Патулин Patulin	Этилацетат Ethyl acetate	–

В целом следует отметить, что ИАФК позволяют концентрировать образец и исключать влияние матрикса при дальнейшем анализе, но не всегда могут быть многократно регенерированы, что значительно повышает стоимость анализа. Обычно данные методики длительны (пробоподготовка может занимать от 3 до 5 ч), трудоемки, требуют больших количеств токсичных органических растворителей. Наиболее часто используемые сорбенты для очистки МТ в экстрактах от посторонних примесей приведены в таблице 11.

Установлена возможность одновременного извлечения различных МТ (АФЛ; ТТ типа А: Т-2, НТ-2, Т-2-тетраол токсина, Т-2-триол токсина, неосаланиола, диацетоксискрипенола; ТТ типа В: ДОН, ниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона Х; ОТ А и В; ЗЕА; П) из одной навески аналита с использованием пробоподготовки QuEChERS. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) – быстрый, дешевый, весьма эффективный, надежный и безопасный. Метод основан на извлечении МТ из пробы смесью ацетонитрил/вода, добавлении буферирующих неорганических солей. В

результате такой экстракции МТ переходят в органическую фазу, а более полярные примеси – в водный слой. Примеси (некоторые сахара и жирные кислоты), оставшиеся в ацетонитриле, могут быть удалены на дисперсионном сорбенте, содержащем амины (PSA сорбент). Однако из-за кислой природы некоторых МТ использование таких сорбентов не рекомендуется, например, при определении ФУМ.

Таблица 11. Очистка МТ в экстрактах от примесей

Table 11. Purification of MT in extracts from impurities

МТ	Сорбент Sorbent	Объект анализа Object of analysis
МТ	Supelclean LC-CN (силикагель, модифицированный цианопропильными группами) Supelclean LC-CN (silica gel modified with cyanopropyl groups)	–
ЗЕА и П ZEA and Patulin	Sep-Pak с силикагелем Sep-Pak with silica gel	–
МТ	MycoSep®	Зерновые Cereals
ТТ МТ А и В, АФЛ, ОТ, ЗЕА и ФУМ TT MT A and B, AFL, OT, ZEA and FUM	Уголь, цеолит и ионообменные смолы Coal, zeolite and ion exchange resins	Зерновые Cereals
АФЛ, ОТ, ФУМ, ЗЕА, ДОН, Т-2 и НТ-2 AFL, OT, FUM, ZEA, DON, T-2 and HT-2	ИАФК AflaTest, FumoniTest, ZearalaTest (США), Ochra-prep, Donprep (Германия) IAFK AflaTest, FumoniTest, ZearalaTest (USA), Ochra-prep, Donprep (Germany)	–
П Patulin	Сверхсшитые полистиролы (картриджи Purosep, Великобритания) Supercrosslinked polystyrenes (Purosep cartridges, Great Britain)	Соки Juices
ЗЕА ZEA	Сверхсшитые полимеры (Affinimiptm ZON, Polyintell) Super Crosslinked Polymers (Affinimiptm ZON, Polyintell)	Кукуруза и пшеница Corn and Wheat

Появились публикации об успешном применении уникального способа извлечения и концентрирования МТ – дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ). Метод основан на использовании системы растворителей: диспергатор, экстрагент, вода. Растворители выбирают таким образом, чтобы диспергатор растворялся, а экстрагент не растворялся в воде. После впрыскивания с помощью шприца смеси в воду или в водный раствор анализируемой пробы экстрагент выделяется в виде микрочастиц отдельной фазой, концентрирующей аналиты. Экстракт выделяют центрифугированием. При одновременном определении МТ различных классов хроматографическими методами часто прибегают к сочетанию QuEChERS и ДЖЖМЭ [57].

## ГЖХ

Более перспективным оказалось использование техники ГЖХ. Она служит одним из рутинных методов, применяемых для идентификации МТ. Все методы анализа объектов с помощью ГЖХ требуют многоступенчатой и длительной процедуры подготовки проб, а также стадии их химической модификации [50].

Дериватизация ТТ МТ заключается в переводе гидроксильных групп в трифторацетильные, триметилсилильные, пентафторпропионильные, гептафторбутирильные производные и приводит к повышению летучести целевых аналитов и делает их чувствительными к определению на детекторе электронного захвата (ДЭЗ). В качестве дериватирующих реагентов используют бис(триметилсилил)ацетамид, триметилсилилимидазол, смесь триметилсилилимидазола и триметилхлорсилана, коммерческие смеси (3:3:2) бис(триметилсилил)трифторацетамид триметилсилилимидазол-триметилхлорсилан и (3:3:2) бис(триметилсилил)ацетамид-триметилсилилимидазол-триметилхлорсилан. Для получения фторацетильных производных применяют гептафторбутирилимидазол, гептафторбутирильный ангидрид, пентафторпропионилимидазол, пентафторпропионильный ангидрид, трифторуксусную кислоту (ТФУК) и ее ангидрид (ТФА). Для дериватизации ТТ МТ типа В, как правило, применяют фторацетильные или триметилсилильные реагенты (рисунки 4 и 5). ГХ-МС используют обычно для идентификации ФУМов, при этом применяют реакции гидролиза, а затем этерификации с 1,2,3-пропантрикарбоновой кислотой и/или ацилирование. ФУМы после гидролиза также можно определять и методом ГХ-ПИД (пламенно-ионизационный детектор). В таблице 12 обобщены описанные в литературе методики анализа МТ методом ГЖХ.

## ВЭЖХ

Помимо ГЖХ возможно применение и ВЭЖХ. В качестве официальной методики определения ЗЕА Международной Ассоциацией Официальных Аналитиков (АОАС Int) принят метод ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией (ФЛД) [60]. **Колонки.** В основном используют колонки, заполненные сорбентом  $C_{18}$  и  $C_8$  (ОФ ВЭЖХ). В качестве **подвижной фазы (ПФ)** используют смеси метанола или ацетонитрила и во-

ды. **Детектирование.** ТТ типа А мало поглощают УФ-излучение, поэтому наиболее часто для данных МТ используют ФЛД или МС-детектирование. Основным ограничением для метода ВЭЖХ с ФЛД является необходимость перевода МТ в производные, например, при определении АФЛов или ФУМов, так как не все МТ способны интенсивно флуоресцировать. Однако получаемые производные не всегда стабильны. Данную проблему решают подбором условий дериватизации. Переводят АФЛ в производные до разделения на колонке (реакция с ТФУК) или после разделения на колонке (реакция с иодом или бромом). В результате реакции дериватизации происходит насыщение двойных связей в фурановом кольце, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции производных, а также позволяет разделить все исследуемые АФЛ. Установлено, что использование ТФУК позволяет получать устойчивые производные с максимальной интенсивностью флуоресценции (рисунок 8). Важным фактором, определяющим чувствительность определения, являются длины волн возбуждения и детектирования. Установлено, что для пяти АФЛ использование длин волн возбуждения и детектирования 360 и 450 нм является оптимальным, а для ЗЕА и Отов – 333 и 460 нм. Молекулы ФУМов мало поглощают УФ-излучение, поэтому для их определения методом ОФ ВЭЖХ с адсорбентом  $C_{18}$  и ПФ метанол/раствор фосфорной кислоты используют дериватизацию о-дигидром фталевой кислоты с 2-меркаптоэтанолом. Патулин определяют с использованием ВЭЖХ и УФ-детектированием (при длине волны 274 нм). ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС являются также возможными методами при определении патулина, применяя электрораспылительную ионизацию. Для обеспечения надежной идентификации ЗЕА рекомендуют использовать детектор с диодной матрицей, а также применяют ВЭЖХ-МС/МС с химической ионизацией при атмосферном давлении [61]. Применение масс-спектрометрии как с газовой, так и с жидкостной хроматографией в настоящее время становится все более популярным способом определения МТ. Применение такого детектора позволяет работать с экстрактами, не требующими глубокой очистки, метод селективен для типов А и В трихотеценовых МТ и позволяет одновременно определять различные классы МТ. Основные примеры использования ВЭЖХ для анализа МТ обобщены в таблице 13.

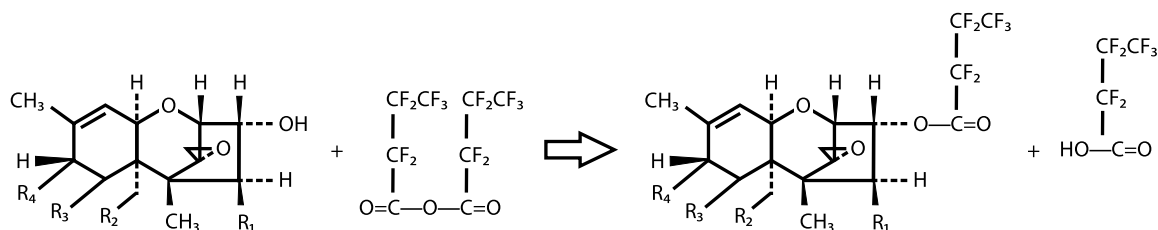


Рисунок 4. Схема реакции дериватизации трихотеценовых МТ

Figure 4. Scheme of the reaction of derivatization of trichothecene MT

Таблица 12. Использование ГЖХ для определения различных МТ [58,59]

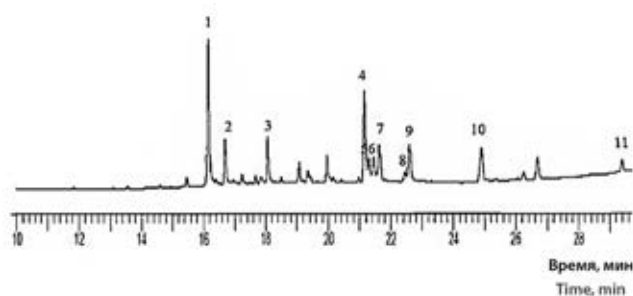
Table 12. The use of GLC to determine various MTs [58,59]

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	ПО* Software*	Пробоподготовка Sample preparation	Примеры Examples
<i>Трихотеценовые МТ</i> <i>Trichothecene MT</i>				
ДЭЗ Electronic capture detector (DEC)	Дериватизация гидроксильных групп фторацетильными производными (пентафторпропионильный ангидрид) Derivatization of hydroxyl groups with fluoroacetyl derivatives (pentafluoropropionyl anhydride)	T-2 и НТ-2 7 и 3 мкг/кг T-2 and НТ-2 7 and 3 µg/kg	Извлечение смесью ацетонитрил/вода и метанол/вода, очищение экстрактов методом ТФЭ на различных сорбентах и далее ИАФК для очистки каждого МТ Extraction with a mixture of acetonitrile/water and methanol/water, purification of the extracts by TFE on various sorbents and then IAPC for the purification of each MT	НТ-2 и Т-2 в паприке НТ-2 and T-2 in paprika
	Триметилсилилимидазол Trimethylsilylimidazole	20–40 мкг/кг	Извлечение ацетонитрилом и водой, очистка на колонках MycoSep® Recovery with acetonitrile and water, purification on MycoSep®	ДОН, ниваленол, 3- и 15-ацетилдезок синиваленол (3-АДОН, 15-АДОН) в кормах DON columns, nivalenol, 3- and 15-acetyldecine sinivalenol (3-ADON, 15-ADON) in feed
	ДОН с переводом в производное при помощи ТФА DON with conversion to derivative using TFAA	5 мкг/кг		
	Ниваленол, ДОН, 3-АДОН, 15-АДОН после их перевода в производное с помощью гептафторбутирильного ангидрида Nivalenol, DON, 3-ADON, 15-ADON after their conversion to a derivative using heptafluorobutyric anhydride	30 мкг/кг		
Гептафторбутирильный ангидрид в присутствии катализатора диметиламинопиридина Heptafluorobutyric anhydride in the presence of a dimethylaminopyridine catalyst	50–200 мкг/кг			
ПИД Flame ionization detector (FID)	ТФУК, полученный дериват выдерживали 1 ч при 60 °С на водяной бане, затем добавляли дигидрофосфат калия TFAA, the resulting derivative was kept for 1 h at 60 °C in a water bath, then potassium dihydrogen phosphate	30–50 мкг/кг	Извлечение метанолом, очистка диэтилхлорметаном и на колонке из оксида алюминия и угля Methanol extraction, purification with dichloromethane and a column of alumina and carbon	T-2, ДОН и диацетоокси-скирпенол (ДАС) в попкорне T-2, DON and diacetoxoxyphenol (DAS) in popcorn
	Триметилсилиловый эфир Trimethylsilyl ether	75 мкг/кг	Извлечение смесью (84:16) ацетонитрил/вода, очистка экстракта с помощью колонок MycoSep® Extraction of aceto-nitrile / water with a mixture (84:16), purification of the extract using MycoSep® columns	ДОН, ниваленол, 3-АДОН, фузаренон Х, Т-2 и НТ-2, ДАС и несоланиол DON, nivalenol, 3-ADON, fusarenone X, T-2 and NT-2, DAS and nesolaniol
МС Mass detector	Гептафторбутирилимидазол. Использовали метод химической ионизации (метан) Heptafluorobutyrylimidazole. Used the method of chemical ionization (methane)	-	-	Неосоланиол, ДАС, Т-2, НТ-2, ДОН, фузаренон Х в кукурузе, ячмене, пшенице и комбикормах Neosolaniol, DAS, T-2, NT-2, DON, fusarenone X in corn, barley, wheat and animal feed
МС Mass detector	Триметилсилильные производные Trimethylsilyl derivatives	-	Экстракция смесью ацетонитрил и вода, очистка – колонка с сорбентом Florisil. Разделение – на колонке DB-5 Extraction with a mixture of acetonitrile and water, purification – column with Florisil sorbent. Separation – on DB-5 column	Одновременное определение нескольких трихотеценовых МТ и ЗЕА Simultaneous determination of several trichothecene MT and ZEA

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	ПО* Software*	Пробоподготовка Sample preparation	Примеры Examples
<i>Охратоксины</i> <i>Ochratoxins</i>				
МС Mass detector	Дериватизация с помощью бистриметилсилилтрифторацетамида Derivatization Using bistrimethylsilyl trifluoroacetamide	0,1 мкг/л 0.1 µg/L	Извлечение дихлорметаном, разделение на капиллярной колонке DB-5MS Dichloromethane recovery, separation on a DB-5MS capillary column	Охратоксин А в вине Ochratoxin A in wine
<i>Патулин</i> <i>Patulin</i>				
МС Mass detector	Перевод в триметилсилил- или ацетилпроизводные Transfer to trimethylsilyl or acetyl derivatives	0,4 мкг/кг	НФ – колонка SLB-5MS NF – column SLB-5MS	Патулин в яблоках, яблочном соке, джеме, детском питании Patulin in apples, apple juice, jam, baby food
<i>Фумонизины</i> <i>Fumonisinis</i>				
ПИД (колонка 30 м) или ГХ-МС (колонка 60 м) FID (column 30 m) or GC-MS (column 60 m)	Перевод в производные гептафтормасляным ангидридом Transfer to heptafluorobutyric anhydride derivatives	50 мкг/кг	Гидролиз экстрактов в присутствии соляной кислоты. Извлечение смесью ацетонитрил/вода, очистка – Sep-Pak C <sub>18</sub> . НФ – DB-5, ПФ – гелий Hydrolysis of extracts in the presence of hydrochloric acid. Recovery with acetonitrile / water, purification – Sep-Pak C <sub>18</sub> . NF – DB-5, PF – helium	Фумонизины в кукурузе Fumonisinis in maize
<i>Одновременное определение МТ различных классов</i> <i>Simultaneous determination of MT of various classes</i>				
МС или ПИД MS or FID	Перевод в производные с N,N-диметилтриметилсилилкарбаматом Conversion to derivatives with N,N-dimethyltrimethylsilylcarbamate	–	Экстракты очищали на ИАФК МусоСеп® The extracts were purified on a MусoСep® IAPC	Трихотецены А и В Trichothecene A and B
ДЭЗ DEC	Перевод в трифторпроизводные Transfer to trifluoride derivatives	–	Разделение – на кварцевой капиллярной колонке RtxPesticides® длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм) Separation – on an RtxPesticides® quartz capillary column 30 m long and 0.32 mm inner diameter (film thickness of the stationary phase 0.25 µm)	МТ ряда трихотеценов, ОТ А, ЗЕА в зерне и продуктах его переработки, кормах и мясе MT of a number of trichothecenes, OT A, ZEA in grain and its processed products, feed and meat
	Получение производных с ТФА Derivation of derivatives with TFA	0,01–5 мг/кг	Экстракция – ацетонитрил, очистка – QuEChERS в сочетании с ДЖЖМЭ Extraction – acetonitrile, purification – QuEChERS in combination with dispersive liquid-liquid microextraction	ТТ МТ, Т-2, НТ-2, ДОН и ниваленол в зерне и комбикормах (рис. 6) TT MT, T-2, NT-2, DON and nivalenol in grain and compound feeds (Fig. 6)
	Получение производных с ТФА (рисунки 6, 7) Derivation of derivatives with TFA (figure 6, 7)	0,1–1,0 мг/кг	Экстракция – ацетонитрил, очистка – QuEChERS Extraction – acetonitrile, purification – QuEChERS	Патулин, ниваленол, дезоксиниваленол, 3- и 15-ацетил-дезоксиниваленол, фузаренон Х, диацетоксискирпенон, токсины НТ-2 и Т-2, зеараленон в зерне и кормах Patulin, nivalenol, deoxynivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol, fusarenone X, diacetoxiskircenol, toxins NT-2 and T-2, zearalenone in grain and feed

**Примечание:** \*Здесь и далее ПО – предел обнаружения.

**Note:** \*Hereinafter, the software is the detection limit.

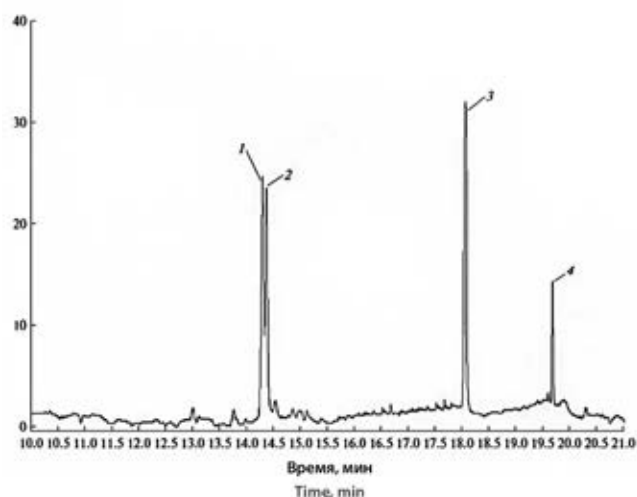


**Рисунок 5.** Хроматограмма стандартной смеси трифторпроизводных трихотеценовых МТ:

1 – Т-2-тетраол; 2 – ниваленол; 3 – дезоксиниваленол; 4 – 15-ацетилдезоксиниваленол; 5 – 3-ацетилдезоксиниваленол; 6 – неосоланиол; 7 – фузаренон Х; 8 – диацетоксискирпенол; 9 – Т-2-триол; 10 – НТ-2; 11 – Т-2

**Figure 5.** Chromatogram of a standard mixture of trifluoride derivatives of trichothecene MT:

1 – T-2-tetraol; 2 – nivalenol; 3 – deoxynivalenol; 4 – 15-acetyldeoxynivalenol; 5 – 3-acetyldeoxynivalenol; 6 – neosolaniol; 7 – fusarenone X; 8 – diacetoxiskirphenol; 9 – T-2-triol; 10 – HT-2; 11 – T-2



**Рисунок 6.** Хроматограмма стандартной смеси МТ:

1 – ниваленол; 2 – ДОН; 3 – НТ-2; 4 – Т-2

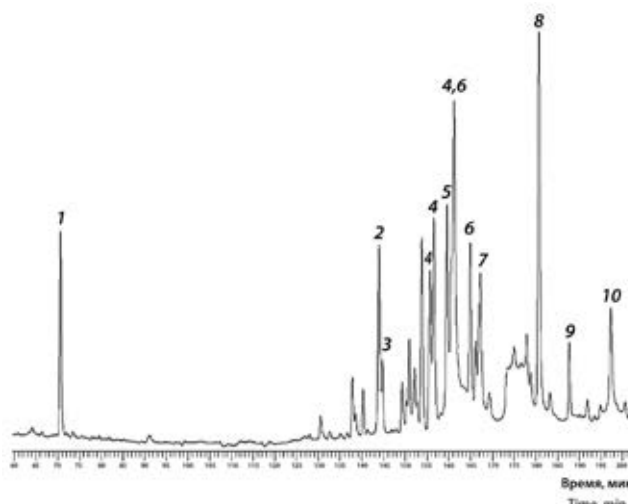
**Figure 6.** Chromatogram of a standard mixture of MT:

1 – nivalenol; 2 – DON; 3 – HT-2; 4 – T-2

Разработаны простые, экономичные и быстрые методики одновременного определения восьми МТ различных классов из зерна и кормов (рисунки 9 и 10). Молекулы АФЛов, ЗЕА и ОТов способны интенсивно флуоресцировать, в связи с этим их можно определять одновременно с помощью ФЛД, путем смены длин волн возбуждения и детектирования в течение анализа [65].

### Электрохимические методы

В настоящее время разработан современный метод определения ОТ А и П в винопродукции – капиллярный электрофорез [66], получивший признание в

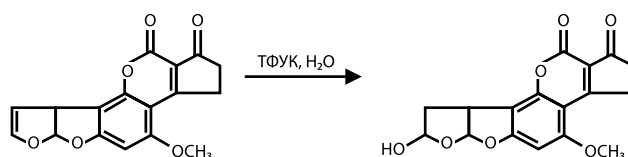


**Рисунок 7.** Хроматограмма стандартной смеси производных МТ:

1 – патулин (2 мкг/мл); 2 – ниваленол (17 мкг/мл); 3 – ДОН (17 мкг/мл); 4 – 15-ацДОН (17 мкг/мл); 5 – Фузаренон Х (8 мкг/мл), 6 – 3-ацДОН (8 мкг/мл); 7 – ДАС (13 мкг/мл); 8 – НТ-2 (3 мкг/мл), 9 – ЗЕА (2 мкг/мл); 10 – Т-2 (17 мкг/мл)

**Figure 7.** Chromatogram of a standard mixture of MT derivatives:

1 – patulin (2 µg/ml); 2 – nivalenol (17 µg/ml); 3 – DON (17 µg/ml); 4 – 15-acDON (17 µg/ml); 5 – Fusarenone X (8 µg/ml); 6 – 3-acDON (8 µg/ml); 7 – DAS (13 µg/ml); 8 – HT-2 (3 µg/ml); 9 – ZEA (2 µg/ml); 10 – T-2 (17 µg/ml)



**Рисунок 8.** Схема реакции получения производных АФЛ с ТФУК

**Figure 8.** Reaction scheme for the preparation of AFL derivatives with trifluoroacetic acid

странах Евросоюза (рисунок 11). Экспериментальным путем были подобраны: буферный раствор, длина волны спектрофотометрического детектора, напряжение, дозирование пробы (пневматическое при 30 мбар – для ОТ А); время анализа (12 минут – для ОТ А), температура термостатирования капилляра (25 °С – для ОТ А). Наилучшие результаты по экстракции МТ показал растворитель хлористый метилен. Методику предложено внести в проект технического регламента на вино [67].

Преимущество капиллярного электрофореза в высокой эффективности разделения компонентов, наличие отечественной приборной базы, малых объемах анализируемой пробы и буферного раствора, экспрессности анализа, в отсутствии дорогостоящих хроматографических колонок, насосов, необходимых для ВЭЖХ и упрощенной пробоподготовке.

Таблица 13. Использование ВЭЖХ для определения различных МТ [62-64]  
Table 13. The use of HPLC to determine various MT [62-64]

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
<i>Трихотеценовые МТ Trichothecene MT</i>				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 470 нм соответственно Fluorescence detector (FD) with excitation and detection wavelengths of 360 and 470 nm, respectively	Постколоночная дериватизация Post-column derivatization	ПФ – ацетонитрил/вода и ПФ – C <sub>18</sub> Mobile phase (MP) – acetonitrile/water and NF – C <sub>18</sub>	2–20 мкг/кг 2–20 µg/kg	ДОН и ниваленол в хлебных злаках DON and nivalenol in cereals
	Предколоночная дериватизация – кумарин-3-карбонилхлорид Pre-Column Derivatization – Coumarin-3-Carbonyl Chloride	ПФ – вода/ацетонитрил с добавлением 0,75 % уксусной кислоты MP – water/acetonitrile with the addition of 0.75 % acetic acid	T-2 – 10 мкг/кг; ДАС, T-2, НТ-2, не-соланиол – 15 мкг/кг; ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН, фузааренон Х – 0,2–1 мкг/кг T-2 – 10 µg/kg; DAS, T-2, НТ-2, nivalenol – 15 µg/kg; nivalenol, 3-ADON, 15-ADON, fusarenone X – 0,2–1 µg/kg	ДАС, T-2, НТ-2, несоланиол, ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН, фузааренон Х DAS, T-2, nivalenol, fusarenone X
УФ-детектор (218 нм) UV detector (218 nm)	–	Экстракция полиэтиленгликолем, очистка экстрактов с помощью ИАФК. ПФ – ацетонитрил и вода Extraction with polyethylene glycol, purification of extracts using immunoaffinity columns (IAC). MP – acetonitrile and water	ДОН – 20 мкг/кг DON – 20 µg/kg	ДОН, 3- и 15-АДОН в зерновых, муке, травах, пиве DON, 3- and 15-ADON in cereals, flour, herbs, beer
УФ-детектор (224 нм) UV detector (224 nm)	–	НФ-ВЭЖХ, колонка с адсорбентом Силасорб-600, ПФ – гексан/ изопропанол/вода Stationary phase (SP)-HPLC, silabag-600 adsorbent column, MP – hexane/isopropanol/water	100 мкг/кг 100 µg/kg	ДОН DON
МС MS	–	Экстракция смесью ацетонитрил – вода, очистка на колонках МусоСер®. Разделение – на колонке Synergi Hydro с градиентным элюированием Extraction with a mixture of acetonitrile – water, purification on MusoSep® columns. Separation – on a Synergi Hydro column with a gradient elution	0,5–1 мкг/кг 0.5–1 µg/kg	T-2, НТ-2, ДОН, фузааренон Х, ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН в зерновых T-2, NT-2, DON, fusarenone X, nivalenol, 3-ADON, 15-ADON in cereals
ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS and HPLC-MS/MS	Способ ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении. m/z для ДАС, T-2, НТ-2 – 263,0; 307,3; 183,2 соответственно The ionization method is chemical ionization at atmospheric pressure. m/z for DAS, T-2, NT-2 – 263.0; 307.3; 183.2, respectively	Экстракция – ацетонитрилом, очистка экстрактов – на колонках МусоСер®. ПФ – ацетат аммония в воде и метаноле Extraction with acetonitrile; purification of extracts with MusoSep® columns. PF – ammonium acetate in water and methanol	0,3 (T-2, ДАС) и 1 (НТ-2) мкг/кг 0.3 (T-2, DAS) and 1 (NT-2) µg/kg	ДАС, T-2, НТ-2 в зерновых DAS, T-2, NT-2 in cereals

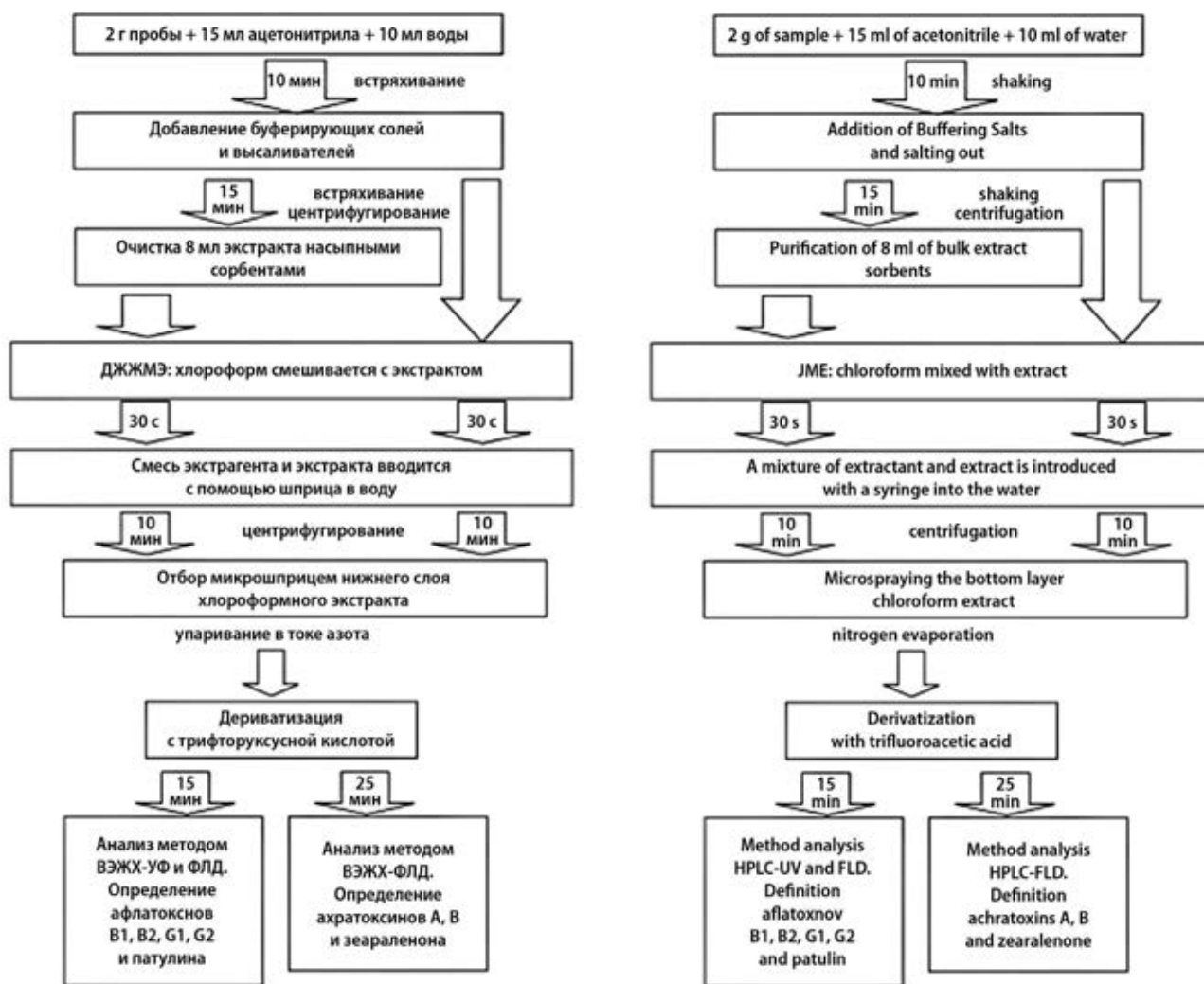
Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
ВЭЖХ-ДМД (220 нм) HPLC-diode array detector (DAD) (220 nm)	–	Сверхкритическая флюидная экстракция, разделение на колонке ODS Hypersil с ПФ – вода/ацетонитрил Supercritical fluid extraction, separation on an ODS Hypersil column with PF – water / acetonitrile	100–500 мкг/кг 100–500 mcg/kg	Трихотецены типа В в пшенице Trichotensens type B in wheat
ВЭЖХ с ФЛД HPLC with FD	Производные НТ-2, полученные по реакции с 1-антроилнитрилом и 4-диметиламинопиридином НТ-2 derivatives obtained by reaction with 1-anthroyl nitrile and 4-dimethylaminopyridine	–	3 нг/л 3 ng/l	НТ-2 ТОКСИН НТ-2 toxin
<b>Афлатоксины Aflatoxins</b>				
ФЛД (440 нм) FD (440 nm)	–	Экстракция метанолом, очистка экстракта на ИАФК. ПФ (18:64:18) метанол/вода/ацетонитрил Extraction with methanol, purification of the extract on IAF-C. MP (18:64:18) methanol/water/acetonitrile	0,1 мкг/кг 0.1 µg/kg	АФЛ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> в зерновых, фруктах, орехах AFL B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> in cereals, fruits, nuts
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 440 nm, respectively	Предколоночная дериватизация с ТФУК Pre-column derivatization with TFAA	ПФ – (70:17:17) вода/ацетонитрил/метанол MP – (70:17:17) water/acetonitrile/methanol	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	АФЛ в арахисе, орехах, семенах тыквы, кукурузы и в арахисовом масле AFL in peanuts, nuts, pumpkin seeds, corn and peanut butter
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 365 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 365 and 440 nm, respectively	Постколоночная дериватизация АФЛов с иодом Post-column derivatization of AFLs with iodine	Разделение – на колонке Spherisorb ODS с ПФ – (60: 30:10) вода/ацетонитрил/метанол Separation – on a Spherisorb ODS column with PF – (60: 30:10) water/acetonitrile/methanol	–	АФЛ в кукурузе, арахисовом масле, сорго, солоде AFL in corn, peanut butter, sorghum, salt
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 362 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 362 and 418 nm, respectively	Постколоночная дериватизация АФЛов с бромом Post-column derivatization of AFLs with bromine	Извлечение смесью метанола и воды, очистка экстрактов на ИАФК. ПФ – 40%-ная смесь (5:4) метанол/ацетонитрил и вода. Разделение – на колонке Spherisorb ODS2 Extraction of a mixture of methanol and water, purification of extracts using IAA. PF – 40 % mixture (5: 4) methanol/acetonitrile and water. Separation – on a Spherisorb ODS2 column	0,06 мкг/кг 0.06 µg/kg	АФЛ <sub>В1</sub> в различных специях AFL B1 in various spices
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 366 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 366 and 440 nm, respectively	Постколоночная фотохимическая дериватизация Post-column photochemical derivatization	Извлечение смесью метанола и фосфатного буферного раствора, очистка твердофазной микроэкстракцией. ПФ – (54:38:8) вода/ацетонитрил/метанол, НФ – C <sub>18</sub> Extraction with a mixture of methanol and phosphate buffer solution, purification by solid-phase microextraction. MP – (54: 38: 8) water/acetonitrile / methanol, SP – C <sub>18</sub>	0,035–0,2 мкг/кг 0.035–0.2 µg/kg	АФЛ в хлебных злаках AFL in cereals

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 365 и 435 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 365 and 435 nm, respectively	–	Выделение и очистка от примесей – ИАФК. ПФ (25:75) – ацетонитрил и вода, НФ – сорбент XDB-08 Isolation and purification from impurities – IAFC. MP (25:75) – acetonitrile and water, SP – sorbent XDB-08	0,04 мкг/л 0.04 µg/L	АФЛ М <sub>1</sub> в молоке и молочных продуктах AFL M <sub>1</sub> in milk and dairy products
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электрораспылительная ионизация. m/z для афлатоксинов В <sub>1</sub> и М <sub>1</sub> 312 и 327 соответственно Electrospray ionization. m/z for aflatoxins В <sub>1</sub> and М <sub>1</sub> 312 and 327, respectively	Очистка на ИАФК МусоСер®. ПФ – ацетонитрил/водный раствор 4-метилморфолина Purification by IAFC MusoSer®. MP – acetonitrile/aqueous solution of 4-methylmorpholine	0,59–0,66 и 14–9,2 нг/л 0.59–0.66 and 14+9.2 ng/l	АФЛ В <sub>1</sub> и М <sub>1</sub> в молоке и молочных продуктах AFL В <sub>1</sub> and М <sub>1</sub> in milk and dairy products
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 340 и 450 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 340 and 450 nm, respectively	АФЛ В <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> перевели в йод-производные AFLs В <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> were converted into iodine derivatives	Сочетание пробоподготовки по QueChERS и ДЖЖМЭ. Жидкостной хроматограф Flexar LC; колонка Kromasil 100-5 C <sub>18</sub> , 5 см, 4,6 × 150 мм; градиентное элюирование: ПФ – ацетонитрил/вода (от 0 до 11 мин 30/70; от 12 до 25 мин 35/65) Combination of sample preparation according to QueChERS and DLLME. Flexar LC Liquid Chromatography; Kromasil 100-5 C <sub>18</sub> column, 5cm, 4.6 × 150 mm; gradient elution: MP – acetonitrile/water (from 0 to 11 min 30/70; from 12 to 25 min 35/65)	В <sub>1</sub> и G <sub>1</sub> – 0,1; В <sub>2</sub> и G <sub>2</sub> – 0,08 мкг/кг В <sub>1</sub> and G <sub>1</sub> – 0.1; В <sub>2</sub> and G <sub>2</sub> – 0.08 µg/kg	АФЛ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> и G <sub>2</sub> в зерне и кормах AFL В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> and G <sub>2</sub> in grain and feed
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 418 nm, respectively	–	Сочетание пробоподготовки по QueChERS и ДЖЖМЭ. Жидкостной хроматограф Flexar LC. Разделение на колонке (150 × 4,6 мм) Kromasil100 – 3,5 C <sub>18</sub> (5 мкм) с ПФ ацетонитрил-вода-метанол (40:40:20) Combination of sample preparation according to QueChERS and DLLME. Liquid chromatography Flexar LC. Separation on a column (150 × 4.6 mm) of Kromasil100 – 3.5 C18 (5 µm) with PF acetonitrile – water – methanol (40:40:20)	–	АФЛ В <sub>1</sub> и М <sub>1</sub> в молоке и молочных продуктах AFL В <sub>1</sub> and М <sub>1</sub> in milk and dairy products
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 333 и 460 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 333 and 460 nm, respectively	–	Экстракция смесью метанола и воды, экстракты очищали на ИАФК Extraction with a mixture of methanol and water, the extracts were purified on IAFC	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	ОТ в лекарственных травах OT in medicinal herbs
УФ-детектор (236 нм) UV detector (236 nm)	Применяют дериватизацию трифтористым бором в метаноле Derivatization with boron trifluoride in methanol	ПФ – 2%-я (по объему) уксусная кислота в смеси (1:1) ацетонитрил/вода MP – 2 % (by volume) acetic acid in a mixture (1:1) acetonitrile/water	–	ОТ А в пшенице OT A in wheat

Охратоксины  
Ochratoxins

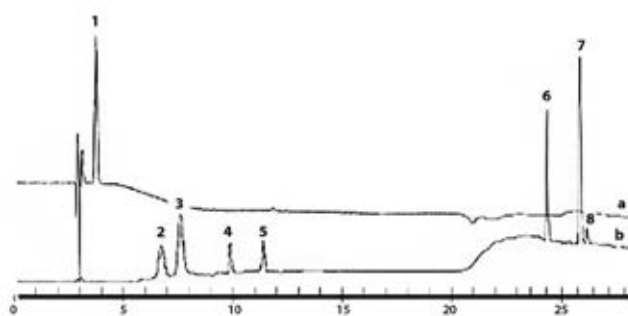
Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Химическая ионизация при атмосферном давлении или электро-распылительную ионизация. $m/z$ 404.0; 239.0; 357.9; 221.1 Chemical ionization at atmospheric pressure or electrospray ionization. $m/z$ 404.0; 239.0; 357.9; 221.1	Градиентное элюирование, ПФ – метанол и вода/ацетат аммония, PF – methanol and water/ ammonium acetate and acetic acid	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	ОТ А в зерновых и фруктах OT A in grains and fruits
ЗЕА ZEA				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 274 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 274 and 418 nm, respectively	–	Экстракция – ацетонитрил, очистка – ИАФК. ПФ – ацетонитрил/уксусная кислота Extraction – with acetonitrile, purification – IAPC. MP – acetonitrile/acetic acid	0,07 мкг/кг 0.07 µg/kg	ЗЕА в зерне и зерновых продуктах ZEA in grain and cereal products
УФ-детектор (236, 274 и 316 нм) UV detector (236, 274 and 316 nm)	–	Извлечение смесью метанол-воды, очистка на колонке с сорбентом Florisil. НФ – C <sub>18</sub> и ПФ – метанол/ацетонитрил/вода Extraction with a mixture of methanol-water, cleaning on a column with Florisil sorbent. SP – C <sub>18</sub> and MP – methanol/acetonitrile/water	0,07 мг/кг 0.07 mg/kg	ЗЕА в кукурузе ZEA in corn
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электро-распылительная ионизация Electrospray ionization	–	1 мкг/кг 1 µg/kg	ЗЕА одновременно с другими МТ ZEA simultaneously with other MT
Патулин Patulin				
УФ-детектор (273 нм) UV detector (273 nm)	–	Экстракты очищали методом ТФЭ. ПФ – гексан/этилацетат/уксусная кислота The extracts were purified by TFE. MP – hexane/ethyl acetate/acetic acid	10 мкг/кг 10 mcg/kg	Соки Juice
ВЭЖХ-ДМД (275 нм) HPLC-DMD (275 nm)	–	НФ – C <sub>18</sub> . ПФ – ацетонитрил/вода SP – C <sub>18</sub> . MP – acetonitrile/water	0,5 мкг/кг 0.5 mcg/kg	Яблоки и яблочный сок, мед, сахар, карамель, уксус и другие продукты Apples and apple juice, honey, sugar, caramel, vinegar and other products
СВЭЖХ-МС/МС SVEZH-MS/MS	$m/z$ 108.7; 80.8	Разделение – на колонке Acquity UPLC ВЕН C <sub>18</sub> . ПФ – ацетонитрил и раствора ацетата аммония Separation – on the Acquity UPLC ВЕН C <sub>18</sub> column, MP – acetonitrile and ammonium acetate solution	1 мкг/кг 1 µg/kg	Продукты на основе яблок Apple-based products

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
Фумонизины Fumonisinis				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 335 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 335 and 440 nm, respectively	Перевод в производные с использованием о-дихлорбензоилового эфира фталевой кислоты Translation into derivatives using phthalic acid o-dichlorobenzoyl ester	ПФ – метанол и раствор дигидрофосфата натрия MP – methanol and sodium dihydrogen phosphate solution	–	ФУМ В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> в кукурузе FUM B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> in corn
ФЛД FD	Перевод в производные с использованием нафталин-2,3-дикарбонилхлорида Translation into derivatives using naphthalene-2,3-dicarbonyl chloride	Экстракция – смесью метанол/вода, очистка на ИАФК Extraction – with a mixture of methanol/water, purification on IAFK	–	ФУМ В <sub>1</sub> и В <sub>2</sub> в пшенице FUM B <sub>1</sub> and B <sub>2</sub> in wheat
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	–	Прободготовка на ИАФК. Разделение на колонке XBridge, ПФ – метанол и муравьиная кислота Sample Preparation at IAFK. Separation on an XBridge column, MP – methanol and formic acid	ФУМы В <sub>1</sub> и В <sub>3</sub> – 0,025 мкг/кг, В <sub>2</sub> – 0,5 мкг/кг FUMs B <sub>1</sub> and B <sub>3</sub> – 0.025 µg/kg, B <sub>2</sub> – 0.5 µg/kg	ФУМы В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , В <sub>3</sub> в травяном чае и лекарственных растениях FUMs B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> in herbal tea and medicinal plants
Одновременное определение МТ различных классов Simultaneous determination of MT of various classes				
ФЛД FD	Перевод в производные с использованием кумарин-3-карбонилхлорида Conversion into coumarin-3-carbonyl chloride derivatives	Экстракты очищали на ИАФК Mucoser® The extracts were purified on Mucoser® IAFK	–	ТТ типа А и В Type A and B TT
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 450 нм соответственно для АФЛов; 333 нм и 460 нм – для Отов и ЗЕА соответственно. Для патулина – УФ-детектор (274 нм) FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 450 nm, respectively, for AFLs; 333 nm and 460 nm for OTs and ZEA, respectively. For patulin – UV detector (274 nm)	–	Извлечение – методы QuEChERS и ДЖЖМЭ совместно. Разделение – на колонке 4,6 x 250 мм SUPELCOSIL™ LC. Градиентное элюирование: ПФ – CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH 1%-й вод. 30:70, CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH 50:50, CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH 60:40, CH <sub>3</sub> CN:CH <sub>3</sub> COOH 70:30 Extraction – QuEChERS and DLLME methods together. Separation – on a 4.6 x 250 mm SUPELCOSIL™ LC column. Gradient elution: MP – CH <sub>3</sub> CN: CH <sub>3</sub> COOH 1% water. 30:70, CH <sub>3</sub> CN: CH <sub>3</sub> COOH 50:50, CH <sub>3</sub> CN: CH <sub>3</sub> COOH 60:40, CH <sub>3</sub> COOH 70:30	–	АФЛ (В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ), ОТ (А и В), ЗЕА и П в зерне и кормах AFL (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> ), OT (A and B), ZEA and P in grain and feed
ВЭЖХ-МС HPLC-MS	–	Экстракты очищали на ИАФК Mucoser® Extracts were purified on Mucoser® IAFK	–	ТТ типа А, В и ЗЕА в кукурузном зерне Type A, B and ZEA TT in corn grain



**Рисунок 9.** Общая схема определения восьми МТ в зерне и кормах при использовании пробоподготовки QuEChERS и ДЖЖМЭ [57]

**Figure 9.** General scheme for the determination of eight MT in grain and feed using QuEChERS sample preparation and dispersive liquid-liquid microextraction [57]



**Рисунок 10.** Хроматограмма стандартной смеси МТ, полученная при параллельном использовании УФ- (а) и флуориметрического (b) детекторов:

1 – патулин; 2 – АФЛ G<sub>1</sub>; 3 – АФЛ B<sub>1</sub>; 4 – АФЛ G<sub>2</sub>; 5 – АФЛ B<sub>2</sub>; 6 – ОТ В; 7 – ОТ А; 8 – ЗЕА [57]

**Figure 10.** Chromatogram of a standard MT mixture obtained using parallel UV (a) and fluorimetric (b) detectors:

1 – patulin; 2 – AFL G<sub>1</sub>; 3 – AFL B<sub>1</sub>; 4 – AFL G<sub>2</sub>; 5 – AFL B<sub>2</sub>; 6 – OT B; 7 – OT A; 8 – ZEA [57]

В последнее время достаточно активно разрабатываются различные биохимические, в том числе иммунохимические, методы определения МТ. Такие методы анализа являются удобным инструментом для первичного скрининга больших партий продукции благодаря своей простоте, экспрессности и относительно невысокой стоимости. Среди них следует отметить работы по использованию различных биосенсоров для решения данной аналитической задачи. Однако, примеры работ по применению биосенсоров для определения МТ пока немногочисленны [68]. Разработаны новые амперометрические биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками (УНТ), наночастицами золота и иммобилизованного фермента – тирозиназы для определения МТ патулина в области концентраций  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $8 \cdot 10^{-12}$  моль/л в пищевых продуктах. Использование биосенсоров для определения отдельных МТ обусловлено еще тем, что они являются удобным инструментом для выполнения таких анализов благодаря своей чувствительности, селек-

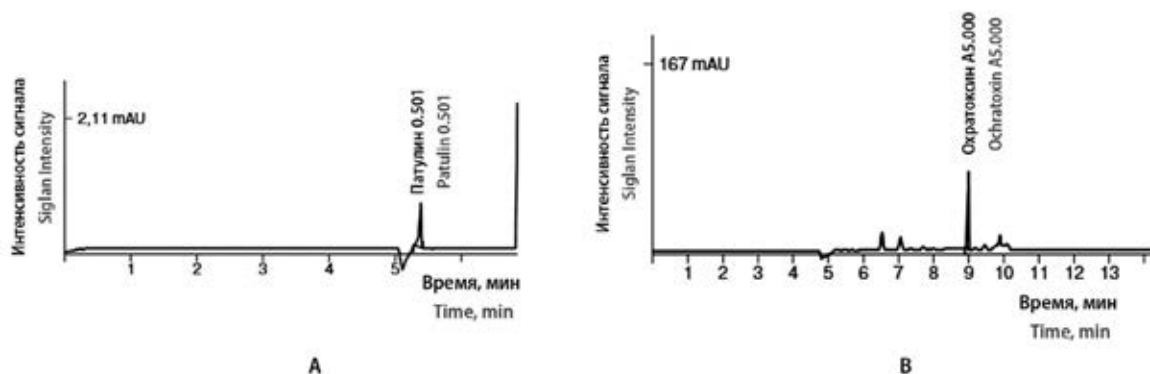


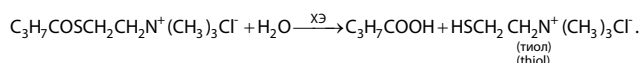
Рисунок 11. Электрофореграммы:

А – стандартного раствора патулина; В – стандартного раствора ОТА

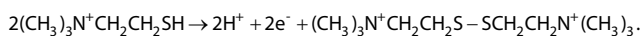
Figure 11. Electrophoregrams:

A – standard solution patuline; B – standard solution OT A

тивности, относительной простоте и экспрессности выполнения, в том числе и для первичного скрининга больших партий образцов. Для определения некоторых МТ предложены амперометрические холинэстеразные (ХЭ) биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, в том числе и модифицированных УНТ. В работе [69] впервые было отмечено ингибирующее действие АФЛ В<sub>1</sub> на этот фермент. Авторы использовали это свойство МТ для разработки соответствующего биосенсора. Отметим, что рассматриваемые холинэстеразные биосенсоры разработаны на основе другого первичного преобразователя (трансдьюсера) и другого способа иммобилизации фермента. Известно, что ХЭ катализирует гидролиз тиохолиновых эфиров по следующему уравнению:



Продукт реакции тиол электрохимически активен. На печатном платиносодержащем электроде тиол подвергается окислению:



Изучение действия АФЛ В<sub>1</sub>, ОТА и ЗЕА на иммобилизованную ХЭ, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора, показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение величины тока окисления продукта ферментативного гидролиза субстрата по сравнению с контрольными опытами, проведенными в отсутствие в растворе МТ. Таким образом, АФЛ В<sub>1</sub>, ОТА и ЗЕА оказывают ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ в составе биосенсора. Полученные результаты показывают, что предлагаемые холинэстеразные биосенсоры могут быть использованы для определения содержания МТ в пищевых продуктах.

В работе [70] описано определение АФЛ В<sub>1</sub> на графитовых печатных электродах, на поверхность которых иммобилизовали иммунореагенты. Авторами

работы в качестве метки, обеспечивающей возникновение аналитического сигнала, использовали ферменты. Субстратом служил 1-нафтилфосфат, окисление которого в 1-нафтол катализирует щелочную фосфатазу. Возникающий ток регистрировали методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии. В других работах описано определение АФЛ В<sub>1</sub> электрохимическим методом с помощью иммуносенсора электрохимического импеданса на стеклоуглеродном электроде, модифицированного силикагель-ионной жидкостью с образованием биопленки в пыльце пчел [71]. В данной работе авторами для увеличения чувствительности сенсора была использована в качестве модификатора ионная жидкость гексафторфосфат 1-амил-2,3-диметилимидазолия. Сенсор дает линейный отклик в диапазоне 0,1–10 нг/мл АФЛ В<sub>1</sub> с пределом обнаружения 0,01 нг/мл.

Описан способ вольтамперометрического определения АФЛ В<sub>1</sub>, включающий следующие операции: АФЛ В<sub>1</sub> переводят из пробы в раствор и проводят вольтамперометрическое накопление МТ в перемешиваемом растворе в течение 30 с при потенциале электролиза E<sub>3</sub> = (0,0 + 0,05) В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода на фоне хлората аммония (NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub>), pH 2,0–3,0 с последующей регистрацией анодных пиков при скорости развертки 30 мВ/с, а концентрацию АФЛ В<sub>1</sub> определяли по высоте пика в диапазоне E<sub>n</sub> = (0,625 ± 0,045) В методом добавок аттестованных смесей [72].

Разработан способ определения АФЛ В<sub>1</sub> методом дифференциальной полярографии [73]. Авторами для совместного определения АФЛ В<sub>1</sub> и G<sub>1</sub> был предложен в качестве фонового электролита 0,1 М по (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NBr и по LiCl, содержащего 40 % CH<sub>3</sub>OH. Образец, содержащий АФЛ В<sub>1</sub> и G<sub>1</sub>, растворяли в 2 мл CH<sub>3</sub>OH, прибавляли 3 мл фона и полярографировали от –1,0 до –1,5 В при 25 ± 1 °С. Потенциалы пиков полуволны были соответственно E<sub>1/2</sub> = (–1,33 ± 0,02) В и E<sub>1/2</sub> = (–1,25 ± 0,02) В относительно AgCl – анода.

### Иммунохимические методы (ИХМ) анализа

Важным направлением в контроле МТ является разработка и внедрение в практику ИХМ. Из-за высокой чувствительности, специфичности, экспрессности, портативности, сравнительно низкой стоимости оборудования, отсутствия существенной пробоподготовки, возможности обнаружения МТ на месте без привлечения квалифицированного персонала ИХМ основаны на специфическом взаимодействии определяемого вещества-антигена (АГ) и антител (АТ). Идентификацию и количественное определение комплекса проводят с помощью введенной метки. ИХМ эффективно применяют для анализа большого количества образцов. Они пригодны в основном для избирательного определения одного или небольшого числа МТ. Для подтверждающего анализа используют уже более точные и высокочувствительные хроматографические методы [74]. В настоящее время преобладающее количество работ по определению МТ в различных объектах посвящено ИХМ анализа. Описаны различные варианты ИФА [75–77].

#### Получение АТ

Основой любого иммуноанализа является взаимодействие АТ с АГ – МТ, различие лишь в способах детекции взаимодействия и условиях проведения анализа. В 1976 г. Лангоном и Ван Вунакисом были получены первые АТ на МТ – поликлональные АТ на АФЛ В<sub>1</sub>. С их использованием был разработан радиоиммуноанализ АФЛ и проведены первые измерения в образцах кукурузы и арахиса. Первые моноклональные АТ на МТ (АФЛ В<sub>1</sub>) были описаны Сан с соавт. в 1983 г. Позже появились моноклональные АТ и на остальные МТ. В настоящее время разработаны стандартные процедуры иммунизации животных, получения и тестирования поли- и моноклональных АТ. Поликлональные АТ против МТ, как правило, получают иммунизацией кроликов. Для определения ОТА, ЗЕА, ДОН, Т-2 получены АТ (IgY), выделенные из желтка куриных яиц. Большую чувствительность и специфичность определения МТ обеспечивают моноклональные АТ, которые широко применяют в последнее время. Современные технологии получения рекомбинантных АТ также используют при определении МТ методом ИФА.

#### Получение конъюгатов МТ с белками

МТ – низкомолекулярные соединения, не обладающие собственной иммуногенностью, поэтому перед иммунизацией необходима их пришивка к белку-носителю. Способы пришивки индивидуальны для каждого МТ.

В качестве ферментативной метки при определении МТ обычно используют пероксидазу хрена (ПХ), реже – щелочную фосфатазу (ЩФ). Активность фермента определяют, как правило, фотометрическим или хемилюминесцентным методом. Кроме ферментных, могут быть использованы флуоресцентные мет-

ки на основе европия, тетраметилродамина, квантовых точек и др. Твердой фазой в ИФА может быть не только поверхность лунки микропланшета, но и, например, магнитные частицы. Гарден и Стратен предложили автоматическую систему анализа, в которой в качестве твердого носителя использовали микросферы. Шарики иммобилизовали в проточной ячейке прибора, после чего проводили конкурентное связывание и детекцию образовавшихся иммунных комплексов посредством взаимодействия с антивидовыми АТ, мечеными фосфатазой.

#### Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА)

ИФА является гетерогенным методом, для его реализации используют микропланшеты на 96 или 384 ячейки, на поверхность которых иммобилизуют иммунореагенты. Наиболее часто применяют *прямой конкурентный ИФА*, в котором определяемое вещество конкурирует с меченым ферментом АГ за связывание с АТ, иммобилизованными на твердом носителе (рисунок 12). После инкубации несвязавшиеся компоненты удаляют промывкой. Ферментативную активность носителя определяют по реакции с субстратом, она обратно пропорциональна концентрации определяемого МТ. В варианте *непрямого конкурентного ИФА* с твердой фазой связан АГ, конъюгированный с макромолекулярным носителем [например, бычьим сывороточным альбумином (БСА)]. При проведении анализа к пробе добавляют специфические АТ. Свободный АГ и конъюгат АГ, инкубированный на твердой фазе, конкурируют за связывание со специфическими АТ в растворе. Для определения количества связанных АТ добавляют антивидовые АТ, меченные ферментом. Чувствительность определения МТ по разным схемам сопоставима, однако введение дополнительных стадий в непрямом формате требует большего времени для проведения анализа. Поскольку МТ являются моновалентными АГ, для их определения используют преимущественно конкурентные форматы ИФА, схемы которых представлены на рисунке 13.

Широко производятся и получили статус официальных коммерческие тест-наборы для контроля содержания наиболее распространенных МТ методом твердофазного ИФА. Значительное внимание уделяется разработке сенсорных устройств, которые позволяют проводить экспресс-определение загрязнителей в полевых условиях и не требуют высококвалифицированного персонала. При определении МТ некоторые успехи достигнуты в разработке иммуносенсоров – сенсорных устройств, основанных на регистрации взаимодействия АГ – АТ. Иммуносенсоры позволяют регистрировать сигнал, генерируемый в процессе иммунохимической реакции и преобразуемый в измеряемый электрический сигнал. Принцип действия большинства сенсоров основан на различных форматах конкурентного твердофазного ИФА (рисунок 13). АТ или аналит, конъюгированный



Рисунок 12. Основные этапы ИФА [22]

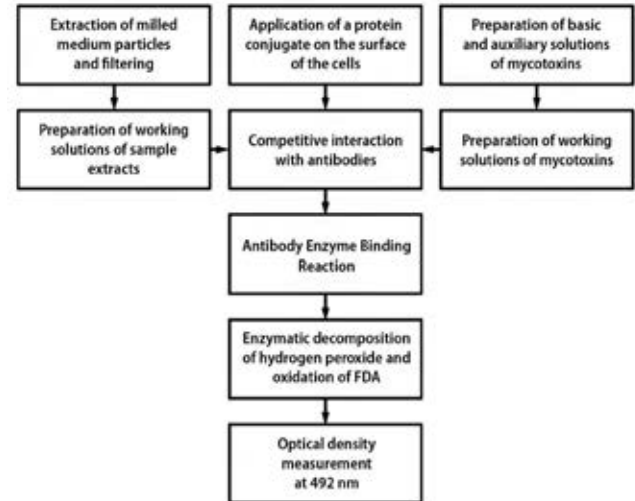


Figure 12. The main stages of IFA [22]

с белком, иммобилизуют на поверхность сенсорного элемента путем ковалентного связывания, физической адсорбции или включения в гель. Аналитический цикл включает следующие основные стадии: 1) конкурентное взаимодействие с образованием иммунного комплекса, 2) регистрация аналитического сигнала, 3) регенерация сенсорного слоя, заключаю-

щаяся в разрушении образовавшегося иммунного комплекса, путем изменения pH, введения небольших количеств органических растворителей или других органических соединений. Это позволяет использовать один сенсорный элемент для 50-100 циклов измерения. Примеры сенсоров, разработанных для определения МТ, представлены в таблице 14.

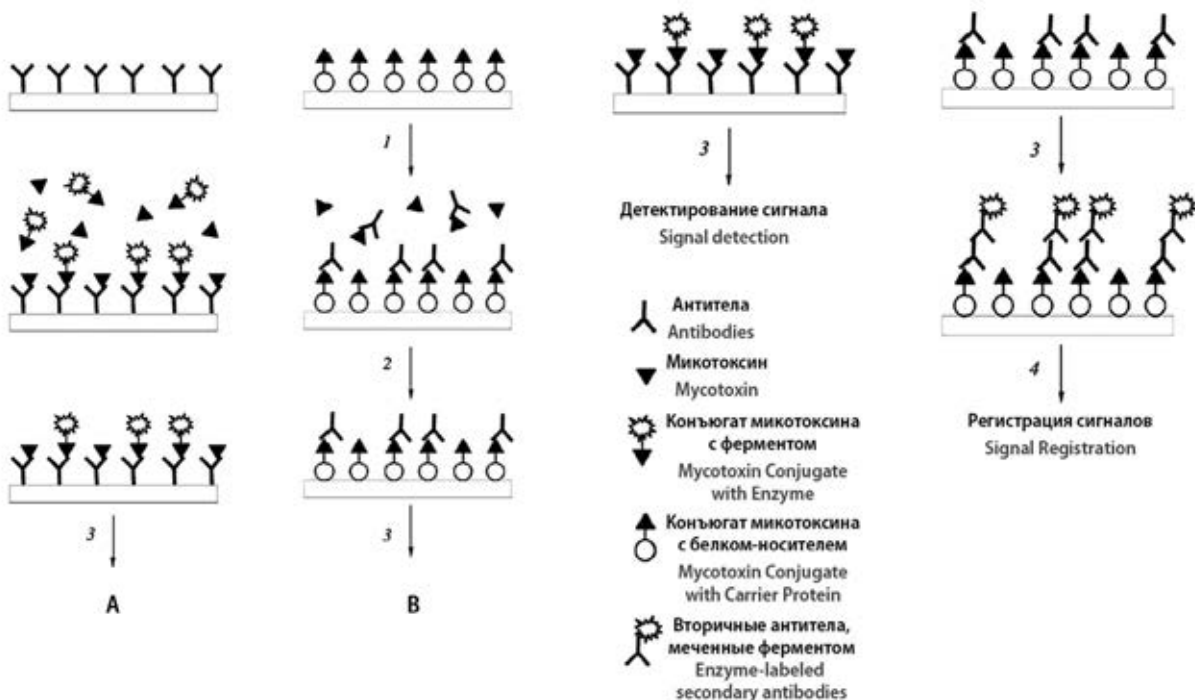


Рисунок 13. Варианты ИХМ анализа:

А) прямой, включающий следующие стадии: 1 – добавление образца в смеси с конъюгатом; 2 – промывка; 3 – добавление субстрата. В) непрямой, включающий следующие стадии: 1 – добавление образца в смеси с АТ; 2 – промывка; 3 – добавление вторичных АТ, меченных ферментом; 4 – добавление субстрата

Figure 13. Variants of the immunochemical method of analysis:

A) direct, comprising the following stages: 1 – adding a sample to a mixture with conjugate; 2 – washing; 3 – adding a substrate. B) indirect, including the following stages: 1 – adding a sample to a mixture with antibodies; 2 – washing; 3 – adding secondary antibodies labeled with an enzyme; 4 – adding a substrate

Таблица 14. Виды сенсоров, применяемых в ИХМ анализа [71, 79]  
Table 14. Types of sensors used in immunochemical methods of analysis [71, 79]

Вид сенсора Type of sensor	Принцип работы Principle of operation	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
Флуориметрические/колориметрические сенсоры Fluorimetric/colorimetric sensors	Иммунореагенты иммобилизуют на различных участках оптического волокна, планарных волноводах или микрогранулах. Используют флуоресценцию в качестве регистрируемого сигнала. Наличие собственной флуоресценции МТ позволяет реализовать неконкурентный формат иммуноанализа без использования каких-либо меток Immunoagents are immobilized in various sections of the optical fiber, planar waveguides or micro-granules. Use fluorescence as a recorded signal. The presence of MT fluorescence of its own makes it possible to implement a non-competitive format for immunoassay without using any labels	Открывают широкие возможности для мультианализа (мультисенсорные системы для одновременного определения нескольких МТ) It opens up great opportunities for multi-analysis (multisensor systems for simultaneous detection of several MTs)	Требуются дальнейшие усилия по увеличению чувствительности и времени жизни сенсора, снижению времени отклика и независимая валидация данных Further efforts are required to increase the sensitivity and lifetime of the sensor, reduce response time and independent data validation
Спектрофотометрические сенсоры Spectrophotometric sensors	Основаны на регистрации окраски продукта ферментативной реакции Based on registration of the color of the product of the enzymatic reaction	-	Существуют только единичные работы для определения МТ There are only few works to determine MT
Пьезоэлектрические сенсоры Piezoelectric sensors	Пьезокварцевый сенсор представляет собой пластину тонко срезанного кристалла природного или синтетического α-кварца, на обеих сторонах которой сформированы электроды из разных металлов – Ag, Au, Pt, Al, Ni, Cr и др. Под действием напряжения кристалл начинает колебаться. При изменении массы на поверхности пластины частота колебаний изменяется, что является аналитическим сигналом данной системы. АТ иммобилизованы на кварцевой пластине только за счет магнита, и их удаление обеспечивается просто снятием магнитного поля и последующей промывкой A piezoelectric quartz sensor is a plate of a finely cut crystal of natural or synthetic α-quartz, on both sides of which electrodes are formed from different metals – Ag, Au, Pt, Al, Ni, Cr, etc. Under the influence of voltage, the crystal begins to oscillate. When the mass on the surface of the plate changes, the oscillation frequency changes, which is the analytical signal of this system. ATs are immobilized on a quartz plate only due to a magnet, and their removal is provided simply by removing the magnetic field and subsequent washing	Применение магнитных частиц существенно упрощает регенерацию сенсора The use of magnetic particles is essential simplifies sensor regeneration	-
Опволоконные иммуносенсоры Fiber-optic immunosensors	На границе раздела фаз оптоволоконно – внешняя среда с более низким индексом преломления (например, жидкость) образуется нераспространяющаяся волна. Флуоресцентные молекулы, адсорбированные на границе, могут поглощать энергию от этой волны и флуоресцировать. Часть излучения падает в оптоволоконно и уходит обратно, где может быть зарегистрирована. На поверхности оптоволоконно иммобилизованы АТ, за связывание с которыми конкурируют свободные МТ, содержащиеся в пробе, и конъюгат МТ с флуоресцентной меткой At the interface, the optical fiber is an external medium with a lower refractive index (for example, liquid) a non-propagating wave is formed. Fluorescent molecules adsorbed at the boundary can absorb energy from this wave and fluoresce. Part of the radiation enters the fiber and goes back where it can be registered. ATs are immobilized on the surface of the fiber, free MTs contained in the sample compete for binding, and MT conjugate with a fluorescent label	Технологическая простота миниатюризации и возможность проводить анализ в режиме реального времени Technological simplicity of miniaturization and the ability to conduct real-time analysis	Имеет ограничение по чувствительности и в значительной степени подвержено влиянию растворителей, так как они изменяют индекс преломления среды It has a sensitivity limit and is largely affected by solvents, since they change the refractive index of the medium

Вид сенсора Type of sensor	Принцип работы Principle of operation	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
<p>Анализ с использованием молекулярно импринтированных полимеров (МИП) или полимеров с молекулярными отпечатками</p> <p>Analysis using molecularly imprinted polymers (MIP) or polymers with molecular imprints</p>	<p>Получаются в результате кополимеризации функционального и швивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов. При полимеризации комплексы мономеров фиксируются в определенных позициях жесткой полимерной структуры. Последующее удаление шаблона приводит к возникновению в полимере молекулярных отпечатков – полостей, комплементарных молекуле-шаблону по размеру, форме и расположению функциональных групп. Такие участки способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом</p> <p>Obtained by copolymerization of functional and crosslinking monomers in the presence of template molecules. During polymerization, the monomer complexes are fixed in certain positions of the rigid polymer structure. Subsequent removal of the template leads to the appearance of molecular imprints in the polymer – cavities complementary to the template molecule in size, shape and location of functional groups. Such areas are capable of repeated highly specific interaction with the template or its structural analogue</p>	<p>Могут быть созданы практически для любой низкомолекулярной структуры, стабильны в широких диапазонах pH и температур, работают (в отличие от АТ) в органических растворителях, характеризуются низкой стоимостью</p> <p>They can be created for almost any low molecular weight structure, stable in wide ranges of pH and temperature, work (unlike АТ) in organic solvents, are characterized by low cost</p>	<p>Относительно невысокая аффинность, вероятность деформации и потери селективности при изменении состава растворителя</p> <p>Relatively low affinity, and the probability of deformation. and selectivity loss when changing the composition of the solvent</p>
<p>Электро-химические иммуносенсоры Electrochemical immunosensors</p>	<p>Устройства основаны на совмещении взаимодействия АГ-АТ с электрохимическим преобразователем сигнала (электродом) – каталитически неактивным материалом, к которому относится золото и некоторые углеродные материалы. Для их создания, как правило, используют ферменты, связанные с либо с АТ, либо с АГ. При этом электроактивный продукт может генерироваться ферментом из соответствующего субстрата. В других видах электрохимических иммуносенсоров используется эффект прямого биоэлектрокатализа – появления электрокаталитического тока на электроде при взаимодействии АГ и АТ, меченного ферментом, без дополнительного добавления субстрата. В качестве метки, обеспечивающей возникновение аналитического сигнала, используют ферменты. Субстратом служит 1-нафтилфосфат, окисление которого в 1-нафтол катализирует ЩФ. Возникающий ток регистрируют методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии либо хроноамперометрии</p> <p>The devices are based on combining the interaction of antigen-antibodies with an electrochemical signal converter (electrode) – a catalytically inactive material, which includes gold and some carbon materials. To create them, as a rule, enzymes associated with either antibodies or antigen are used. In this case, the electroactive product can be generated by the enzyme from the corresponding substrate. In other types of electrochemical immunosensors, the effect of direct bioelectrocatalysis is used – the appearance of an electrocatalytic current on the electrode during the interaction of antigens and antibodies labeled with an enzyme without additional substrate addition. Enzymes are used as a label providing the occurrence of an analytical signal. The substrate is 1-naphthylphosphate, the oxidation of which to 1-naphthol catalyzes alkaline phosphatase. The arising current is registered by methods of differential pulse voltammetry or chronoamperometry</p>	<p>Определение малых количеств компонента, дешевизна большинства электрохимических преобразователей и детекторов, а также простота их использования</p> <p>Determination of small amounts of a component, low cost of most electrochemical converters and detectors, as well as ease of their use</p>	<p>Дрейф сигнала и сложность регенерации АТ. Регенерирующие растворы могут снижать связывающую способность иммобилизованных АТ, а повторная иммобилизация для каждого анализа делает процесс крайне нетехнологичным</p> <p>Signal drift and antibodies regeneration complexity. Regenerating solutions can reduce the binding ability of immobilized antibodies, and repeated immobilization for each analysis makes the process extremely low-tech</p>

Вид сенсора Type of sensor	Принцип работы Principle of operation	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
<p>Сенсоры на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР-сенсоры) Surface plasmon resonance sensors (PPR sensors)</p>	<p>Для тонких электропроводящих пленок на поверхности между средами с разным показателем преломления описано явление ППР, выраженность которого зависит от свойств пленки на границе раздела фаз. Сигнал прямо пропорционален массе вещества, связанного с чувствительным слоем. На поверхность сенсора наносят конъюгат МТ, с которым взаимодействуют высокомолекулярные АТ из раствора. В результате образования иммунного комплекса изменяются оптические характеристики сенсорного слоя, что приводит к изменению угла ППР (угла, при котором интенсивность отраженного света уменьшается в результате резонанса со свободными электронами на поверхности сенсора). На основе полученных сенсограмм рассчитывают кинетические характеристики процесса и содержание определяемого МТ</p> <p>For thin electrically conductive films on the surface between media with different refractive indices, the SPR phenomenon is described, the severity of which depends on the properties of the film at the phase boundary. The signal is directly proportional to the mass of the substance bound to the sensitive layer. MT conjugate is applied to the surface of the sensor, with which high molecular weight antibodies from the solution interact. As a result of the formation of the immunocomplex, the optical characteristics of the sensor layer change, which leads to a change in the SPR angle (the angle at which the intensity of the reflected light decreases as a result of resonance with free electrons on the sensor surface). Based on the obtained sensograms, the kinetic characteristics of the process and the content of the determined MT</p>	<p>Измерения в реальном времени; для анализа необходим очень малый объем пробы; чип может быть регенерирован и использован многократно; метод автоматизирован</p> <p>Measurements are calculated in real time; analysis requires a very small sample volume; the chip can be regenerated and reused; automated method</p>	<p>Чрезвычайно высокая чувствительность системы к примесям в анализируемом образце и, как следствие, необходимость тщательной подготовки проб. Стоимость анализа (чипов и реагентов) в целом довольно высока</p> <p>Extremely high sensitivity of the system to impurities in the analyzed sample and, as a consequence, the need for thorough sample preparation. The cost of analysis (chips and reagents) is generally quite high</p>

Разработаны ИФА тест-системы для определения в кормах Т-2, ДОН, ЗЕА, ФУМ В<sub>1</sub>, ОТ А, цитринина и АФЛ В<sub>1</sub> и др. Так, например, внедрены наборы реагентов для прямого конкурентного ИФА в микропланшетном формате в кормах и пищевых продуктах таких МТ, как АФЛ В<sub>1</sub>, ЗЕА [79], ФУМов группы В и Т-2 [80]. Разработаны методики одновременного тест-определения нескольких МТ (ЗЕА, ОТА и ФУМ В<sub>1</sub>) методом мембранного иммунофилтрационного анализа с применением в качестве ферментной метки – ЩФ [81], а также одновременного тест-определения ДОН и суммы Т-2 и НТ-2 методом мембранного иммунофилтрационного анализа с применением ПХ. Путем непрямого конкурентного ИФА проводят количественное определение Т-2, АФЛ В<sub>1</sub>, ФУМ В<sub>1</sub>, ОТ А, ЗЕА, ДОН [82].

Метод ИФА обладает рядом существенных преимуществ, таких как высокая производительность (одновременно на одном планшете проводится несколько десятков анализов), низкая стоимость, малый объем тестируемого образца, способность обеспечить приемлемую точность и быстроту, более простая подготовка проб, чем для ТСХ или ВЭЖХ. Метод относительно экологичен, поскольку исключает большое количество токсичных реагентов. Однако МТ мало растворимы в водной среде, поэтому для выполнения анализа требуется экстракция органическими или водно-органическими смесями. Экстракт не может непосредственно использоваться в ИФА и требует разбавления до минимального содержания органической составляющей, – как правило, не более 5 %. Поскольку минимальная концентрация МТ, выявляемая в конечной реакционной смеси, фиксирована, разбавление пробы пропорционально ухудшает чувствительность аналитического метода в целом. Вторым существенным недостатком ИФА является большая продолжительность взаимодействий между иммобилизованными в лунке микропланшета и находящимися в растворе иммунореагентами; в результате общее время определения составляет 2–3 часа. Для решения этих проблем был предложен вариант проведения ИФА МТ в экстрактах с использованием в качестве твердой фазы магнитных наночастиц [83]. У метода имеются дополнительные ограничения, связанные в большей степени с матричным эффектом и перекрестной чувствительностью, то есть идентифицируется не только искомым МТ, но и в различной степени его аналоги и метаболиты. Например, при определении Т-2 на конечное его содержание будет оказывать влияние НТ-2, если он тоже присутствует в образце; ЗЕА, как правило, определяется вместе с  $\alpha$ - и  $\beta$ -зеараленолом и т.д. Поэтому для таких объектов должны применяться другие методы исследования, например ВЭЖХ [84]. Поэтому, несмотря на высокую специфичность АТ, определение МТ в сложных матриксах требует детальной оптимизации протоколов анализа [85].

## Гомогенные ИХМ анализа

Наиболее распространенным гомогенным ИХМ анализа является поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). Его широкое применение связано с простотой методики определения, малым временем выполнения, наличием портативной переносной аппаратуры. Формат проведения анализа предполагает конкуренцию определяемого вещества и трейсера (определяемого вещества или его аналога, связанных с флуоресцентной меткой) за ограниченное число мест связывания с АТ. В качестве метки, как правило, используют молекулу флуоресцеина, аналитическим сигналом служит величина поляризации флуоресценции метки. За время жизни возбужденного синглетного состояния флуоресцеина (4 нс) происходит практически полная деполяризация флуоресценции, что приводит к малому значению поляризации. В присутствии АТ образуется иммунокомплекс, скорость вращения резко снижается, полной деполяризации флуоресценции не происходит, что приводит к высокой величине поляризации флуоресценции. При наличии аналита в растворе он связывается с АТ, трейсер остается свободным и величина поляризации флуоресценции снижается. Таким образом, значение аналитического сигнала, как и в других конкурентных методах, находится в обратной зависимости от концентрации определяемого вещества. В отличие от рассмотренных ранее методов, ПФИА не требует разделения аналита и иммунокомплекса, что и определяет быстроту и простоту процедуры определения. Как правило, образование иммунокомплексов протекает с высокой скоростью. Из других преимуществ следует выделить методическую простоту ПФИА, из недостатков – влияние матрикса пробы (не отделяемого перед проведением измерений) на регистрируемый сигнал [86, 87].

Сочетание капиллярного электрофореза и взаимодействия АГ-АТ позволяет совмещать эффективное электрофоретическое разделение аналитов с их определением с высокой чувствительностью, например, при использовании флуоресцентных детекторов с лазерным возбуждением. В этом методе используют иммунореагенты, аналогичные таковым в ПФИА. Процедура анализа включает инкубирование образца с раствором АТ и трейсера и последующее разделение этой смеси в капилляре под действием электрофоретических сил. Капиллярный электрофорез позволяет напрямую визуализировать образование и диссоциацию иммунокомплекса, что упрощает интерпретацию результатов.

## Неинструментальные ИХМ

На фоне общего внимания к разработке быстрых скрининговых методов для определения МТ особый интерес вызывают неинструментальные тест-методы, пригодные для проведения анализа *on-site*, на месте производства и переработки продукции. Возможность

проведения скрининга во внелабораторных условиях, даже в отсутствие электрической сети, позволяет оперативно выделить загрязненные партии продукции и предотвратить их объединение с большими объемами сырья при дальнейшей переработке, транспортировке, хранении. Результаты, получаемые с помощью неинструментальных тест-методов, оцениваются на основе визуального детектирования. В связи с этим субъективизм восприятия человека, интерпретирующего конкретные результаты, является одним из основных источников погрешности. Для визуализации полученных результатов используют различные метки: ферменты, коллоидные частицы (как правило, частицы коллоидного золота), флуоресцентные метки, липосомы, содержащие солюбилизованные красители. В большинстве случаев неинструментальные тесты дают качественную оценку концентрации, характеризующую присутствие (либо отсутствие) целевого аналита в концентрации выше установленного контрольного уровня. Как правило, при разработке неинструментальных тестов определения МТ стараются достичь ПО, соответствующего законодательно установленному максимально допустимому содержанию данного МТ в анализируемом продукте. Небольшое число тестов предполагает полуколичественную оценку на основе сравнения интенсивности окраски. В настоящее время ряд фирм производит большое количество тест-методов для определения МТ в различных объектах; постоянно разрабатываются новые тесты.

### Иммунохроматографические тесты

Иммунохроматографические тесты, называемые также стрипами или стрип-полосками (*immuno-chromatographic strip tests*), представляют собой уникальный удобный в использовании одностадийный метод, не требующий ни аппаратуры, ни реагентов. Процедура анализа состоит в погружении тест-полоски до заданного уровня в анализируемый образец с визуальной оценкой результатов через определенное время. Как правило, стрип-полоска состоит из пористой мембраны-носителя и адсорбента (рисунок 14). После погружения полоски в анализируемый раствор его компоненты начинают перемещаться вдоль мембраны к адсорбенту, закрепленному в верхней части. Анализируемый раствор, таким образом, играет роль подвижной фазы. Вместе с компонентами раствора движутся и иммунореагенты, предварительно нанесенные на нижнюю часть мембраны. Для определения МТ наиболее часто используют меченные коллоидным золотом специфические АТ. Частицы коллоидного золота диаметром около 40 нм образуют зоны красного цвета.

Разработаны и доведены до коммерческого производства иммунохроматографические тесты для определения АФЛ, ДОН, ОТА, Т-2 и ЗЕА [88]. Некоторые производители предлагают также специальные портативные устройства (ридеры) для обработки ре-

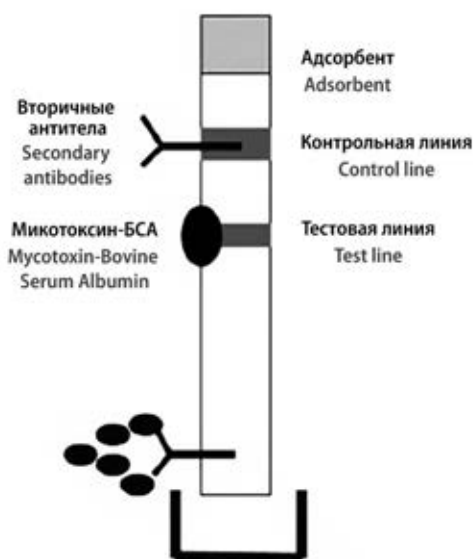


Рисунок 14. Иммунохроматографический стрип-тест [71]

Figure 14. Immuno-chromatographic strip test [71]

зультатов анализа. Их использование позволяет повысить чувствительность определения и устранить субъективизм восприятия цвета человеком. Публикуемые в настоящее время исследовательские работы направлены на расширение круга определяемых МТ, применение тестов для анализа новых объектов и повышение их чувствительности. Разработано также несколько стрип-тестов с ферментной меткой для одновременного определения нескольких МТ (АФ В1, Т-2, 3-ацДОН, роридина А и ЗЕА в образцах зерна). Для определения структурно-родственных МТ (АФЛ В1, В2, G1 и G2, а также ЗЕА и  $\alpha$ -зеараленола) предложен тест-метод, сочетающий разделением методом ТСХ, перенесение разделенных зон МТ на мембрану с привитыми специфическими АТ и последующее иммунохимическое определение. Разработаны высокочувствительные иммунохроматографические тест-системы детекции ЗЕА и Т-2 с использованием наночастиц магнетита в качестве маркера [89]. Основное преимущество иммунохроматографии – быстрое (5–15 мин) получение результата. Однако метод иммунохроматографии не является количественным; он может использоваться лишь для предварительного скрининга, свидетельствующего о наличии МТ в концентрации выше пороговой.

### Иммунофилтрационные тесты

Традиционные иммунофилтрационные тест-методы [*flow-through* или *immunofiltration assay (IFA)* или *enzyme-Linked immunofiltration assay (ELIFA)*] основаны на использовании полимерных мембран с привитыми специфическими АТ. Мембрану помещают на слой адсорбента, поглощающий проходящую через мембрану жидкость. При прохождении анализируемого раствора сквозь мембрану присутствующий в нем

МТ образует иммунокомплекс с АТ, нанесенными на тест-зону мембраны. Затем добавляют раствор конъюгата анализатора с ферментом; последним шагом является введение хромогенного субстрата, который в присутствии ферментных меток вызывает развитие окраски. Использование в качестве метки коллоидного золота позволяет избежать использования хромогенного субстрата, однако в отличие от иммунохроматографических стрип-тестов, в иммунофильтрационных тестах такая метка не получила широкого распространения из-за низкой чувствительности. Формат метода, основанный на использовании ферментной метки, использован при определении ОТ А в пшенице, Т-2 в пшенице, кукурузе, овсе и ржи.

Для снижения себестоимости и времени проведения анализа предложены различные подходы, в частности одновременное определение одного МТ в нескольких образцах параллельно, а также одновременное определение нескольких МТ в одном образце. Для одновременного скрининга нескольких МТ в одном образце создан прототип ячейки с восемью лунками для одновременного иммунофильтрационного определения семи МТ: АФЛ В<sub>1</sub>, Фум В<sub>1</sub>, Т-2, роридина А, ДОН, диацетоксискирпенола и ОТ А. Мембраны с нанесенными специфическими АТ фиксируют под каждой лункой, восьмую мембрану используют как отрицательный контрольный тест. Под мембраны помещают слой адсорбента. Процедура анализа совпадает с таковой для определения одного анализатора, за исключением того, что в лунки вносят смесь конъюгатов. Иммунофильтрационные тесты с использованием мембран имеют такие достоинства, как простота и экспрессность (время анализа составляет 5–25 мин). Имеется ряд недостатков: для проведения анализа необходимо выполнять последовательное добавление реагентов, входящих в комплектацию тест-набора; на получаемые результаты влияет присутствие мешающих компонентов в образце, а также недостаточная чувствительность анализа. Для устранения выше указанных недостатков был предложен колоночный тест-метод, в котором в качестве носителя используют гель. Замена мембраны-носителя на гель, приготовленный на основе сефарозы с привитыми специфическими АТ, позволяет повысить чувствительность определения МТ. Анализ проводится в колонке для твердофазной экстракции и включает стадии последовательного пропускания образца, АГ, конъюгированного с ПХ, и хромогенного субстрата через объем геля. Включение АТ в объем геля позволяет концентрировать МТ по принципу, аналогичному действию ИАФК, т.е. гель с иммобилизованными АТ служит одновременно для выделения, концентрирования и определения. Использование колонок позволяет также включать дополнительный очищающий слой, необходимый для матриц обладающих интенсивной окраской. Очищающий слой может быть помещен над или под детектирующим слоем (рисунки 15, А и В). При анализе матриц, не обладающих интенсивной окраской,

очищающий слой не используют (рисунок 15, С). Для упрощения процедуры анализа возможно введение в колонку конъюгата на дополнительном пористом фильтре (рисунок 15, D). Одновременное определение двух МТ стало возможным при введении в колонку двух регистрирующих иммунослоев, с привитыми АТ, специфичными к соответствующим МТ (рисунок 15, E). Как и в случае мембранных тестов, для упрощения интерпретации результатов время развития окраски геля и ее интенсивность подбирают близкими для обоих анализаторов. Формат проведения анализа в колонках позволяет использовать больший объем пробы, что позволяет достичь уникально высокой для тест-методов чувствительности.

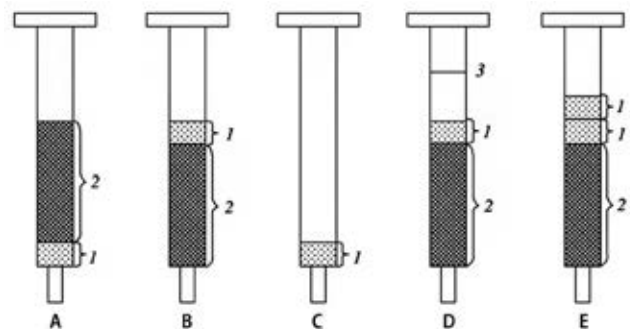


Рисунок 15. Тест-колонки для определения МТ методом иммунофильтрации:

1 – детектирующий иммунослой; 2 – очищающий слой; 3 – пористый фильтр с нанесенным конъюгатом [70]

Figure 15. Test columns for determining MT by immunofiltration:

1 – detecting immunolayer; 2 – a cleaning layer; 3 – porous filter coated with conjugate [70]

Иммунофильтрация – быстрый и удобный в использовании метод, который не требует сложного оборудования и специальной подготовки. Однако интерпретация результатов для образцов с концентрацией, близкой к пороговой, неоднозначна, а количественный анализ требует дополнительной унификации и калибровки. ПО иммунофильтрации хотя и выше, чем в ИФА, но может быть близок к нему. Разработаны иммунофильтрационные тесты как на отдельные МТ, так и для одновременного определения нескольких МТ с компьютерной обработкой результатов.

В результате сопоставительного анализа определены преимущества и недостатки методик измерений МТ (таблица 15), основанных на вышеуказанных методах. Установлено, что идеального метода измерений, отвечающего всем предъявляемым требованиям, не существует. Однако, использование в лабораторной практике экспресс-методик ИФА, благодаря простоте и скорости проведения испытаний, а также высокой чувствительности и экономичности, является наиболее перспективным в настоящий момент.

Таблица 15. Результаты сравнительного анализа определения МТ различными методами [90]

Table 15. The results of a comparative analysis of the determination of MT by various methods [90]

Метод Method	Характеристики Specifications	
	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
ТСХ TLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Низкий ПО.</li> <li>Возможность работы с малыми и сверхмалыми количествами образца.</li> <li>Возможность проведения количественного анализа</li> <li>Low Software.</li> <li>Ability to work with small and ultra-small quantities of the sample.</li> <li>Ability to conduct quantitative analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Длительное время анализа (2,5–3) ч.</li> <li>Сложность пробоподготовки.</li> <li>Многоэтапность.</li> <li>Большой расход реагентов.</li> <li>При использовании УФ-детекции – отсутствие высокой точности.</li> <li>Необходима высокая квалификация персонала.</li> <li>Использование дорогостоящего оборудования и вспомогательных материалов</li> <li>Long analysis time (2.5 – 3) h.</li> <li>The complexity of sample preparation.</li> <li>Multi-stage.</li> <li>High consumption of reagents.</li> <li>When using UV detection – the lack of high accuracy.</li> <li>Highly qualified staff is needed.</li> <li>Use of expensive equipment and auxiliary materials</li> </ul>
ВЭЖХ HPLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>Низкий ПО;</li> <li>Возможность работы с малыми и сверхмалыми количествами образца;</li> <li>Высокая точность количественного анализа;</li> <li>Воспроизводимость;</li> <li>Возможность одновременного определения 10-ти и более МТ в одном образце;</li> <li>Защита анализируемых веществ от воздействия дневного света</li> <li>Low Software.</li> <li>Ability to work with small and ultra-small quantities of the sample.</li> <li>High accuracy of quantitative analysis.</li> <li>Reproducibility.</li> <li>The ability to simultaneously determine 10 or more MTs in one sample.</li> <li>Protection of analytes from exposure to daylight</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Длительное время анализа (2,5 – 3) ч.</li> <li>Сложность пробоподготовки.</li> <li>Значительный расход реагентов.</li> <li>Требуется обслуживания высококвалифицированным персоналом.</li> <li>Требуется использования дорогостоящего оборудования и вспомогательных материалов</li> <li>Long analysis time (2.5 – 3) h.</li> <li>The complexity of sample preparation.</li> <li>Significant consumption of reagents.</li> <li>Requires service by highly qualified personnel.</li> <li>Requires the use of expensive equipment and auxiliary materials</li> </ul>
ИФА IFA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Экспрессность и высокая производительность.</li> <li>Простота и удобство пробоподготовки и анализа.</li> <li>Высокая чувствительность и специфичность метода.</li> <li>Гибкость – анализ может быть проведен вручную или автоматически.</li> <li>Экономичность.</li> <li>Удобство в использовании.</li> <li>Не требует специальных знаний</li> <li>Expressness and high performance.</li> <li>Simplicity and convenience of sample preparation and analysis.</li> <li>High sensitivity and specificity of the method.</li> <li>Flexibility – analysis can be carried out manually or automatically.</li> <li>Profitability.</li> <li>Ease of use.</li> <li>Does not require special knowledge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Визуальная (субъективная) оценка результатов исследования.</li> <li>Пригоден в основном для избирательного определения одного или небольшого числа МТ.</li> <li>Для подтверждающего анализа используют более точные и высокочувствительные хроматографические методы</li> <li>Visual (subjective) assessment of the results of the study.</li> <li>Suitable mainly for the selective determination of one or a small number of MT.</li> <li>For confirmatory analysis using more accurate and highly sensitive chromatographic methods</li> </ul>

Таким образом, можно отметить бурное развитие различных направлений использования ИХМ для определения МТ, как инструментальных, так и неинструментальных. Важность их контроля обусловлена высоким уровнем загрязнения, обнаружением все новых МТ, расширением групп продуктов питания и кормов, контаминированных МТ. ИХМ анализа являются удобным инструментом для первичного скрининга больших партий продукции, благодаря своей простоте, экспрессности и невысокой стоимости. В настоящее время продолжается поиск путей повы-

шения чувствительности, упрощения процедуры и сокращения времени анализа, снижения матричного эффекта образца [50, 70].

### Биологические методы

В первое время широко использовались для определения МТ. В качестве тест-объектов используют широкий круг биологических объектов: от позвоночных животных до клеточных культур различных микроорганизмов (куриные эмбрионы, различные лабораторные животные, культуры клеток и тканей). Образцы

зерна подвергаются экстракции с помощью органических растворителей, а полученную липидную фракцию, содержащую МТ, тестируют с помощью дрожжевой культуры или же испытывают на голубях. Один из традиционных тестов основан на регистрации раздражения кожи животного после нанесения на нее МТ. Величина дозы коррелирует со степенью раздражения, но индивидуальная чувствительность вносит фактор неопределенности и поэтому этот метод считается полуколичественным. Известны разработки по использованию клеточных систем для оценки токсического действия Т-2 и его производных. Простейшие подходы включают попытки применения суспензии эритроцитов (Т-2 обладает гемолитической активностью). Применение более сложных клеточных систем в сочетании с цитологическими методами расширило возможности исследователей. Биотесты получили наибольшее развитие при использовании различных штаммов дрожжей. Этому предшествовали длительные исследования по подбору подходящих культур клеток, чувствительных к МТ. Первые варианты сводились к качественному определению МТ по наличию зон подавления роста микроорганизмов в исследуемых экстрактах. Такие тесты проводили в сочетании с тестами на голубях. Биологические методы довольно быстро совершенствуются. Появляются новые модификации и варианты биотестов с улучшенными характеристиками. Так запатентован способ определения МТ в кормах, основанный на кормлении кур, предварительно сенсibilизированных АГ из грибов рода *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*, исследуемым кормом. Наличие МТ в корме оценивают по силе аллергической реакции [91].

Эти методы отличаются простотой и дешевизной, хотя им присущи существенные недостатки, такие как малая специфичность, низкая чувствительность, сложность разработки четко стандартизированных процедур, которые бы обеспечивали высокую воспроизводимость и с их помощью нельзя определить отдельные виды МТ в анализируемой смеси. Кроме того, для осуществления такого анализа требуется достаточно много времени. Биологические методы обычно применяются в тех случаях, когда отсутствуют химические методы выявления МТ или в дополнение к ним в качестве подтверждающих тестов.

Биоавтографический метод, который представляет собой совмещение преимуществ ТСХ и микробиологического анализа, дает возможность не только количественно оценивать МТ, но и одновременно определять несколько их видов в одном образце. При этом, после нанесения экстракта проводят двухмерную хроматографию на пластинках типа «Сулифол» в системе диэтиловый эфир:гексан (1:1). Далее пластинку высушивают, наносят на нее в качестве вещества-свидетеля раствор Т-2 токсина и хроматографируют вторично в перпендикулярном направлении в системе этанол-толуол (3:1). На высушенную пластинку наносят сусло-агар и на его поверхности рав-

номерно распределяют суточную культуру штамма дрожжей *S. pseudotropicalis*. После инкубации (16 ч в термостате при температуре 28 °С) отмечают наличие зон подавления роста дрожжей и замеряют их диаметр. Зона подавления роста, идентичная по хроматографической подвижности таковой, вызванной веществом-свидетелем, и указывает на присутствие Т-2 в исследуемом образце.

В настоящее время для оценки зараженности зерна грибами *Fusarium* стали разрабатывать и применять молекулярные методы, позволяющие характеризовать присутствие представителя микобиоты по количественным показателям. В обзоре [92] представлены молекулярные методы выявления трихотеценовых МТ. Используются методы молекулярной идентификации, основанные на выявлении ДНК патогенов с помощью ПЦР. ПЦР может быть использована для выявления МТ-продуцирующих видов рода *Fusarium*. Недавно предложен интегрированный способ ранней диагностики контаминации микотоксигенными штаммами *Fusarium*. Он включает в себя быстрое экстрагирование ДНК из образцов с последующим группоспецифическим анализом в ПЦР. Специфичность разработанного авторами флюорогенного варианта ПЦР в реальном времени подтверждена при исследовании 9 видов *Fusarium* и 33 других видов грибов. При помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) можно оценить количество ДНК-мишени патогена или группы сходных патогенов относительно серии разведений стандартных проб с целевой ДНК известной концентрации. Затем полученные данные приводят к общей концентрации ДНК, выделенной из анализируемого образца, тем самым выразив количество исследуемого патогена. Новый метод – цифровая ПЦР (цПЦР) позволяет определить количество целевого объекта путем подсчета абсолютного числа принадлежащих ему копий ДНК-мишени в исследуемой пробе. Методы ПЦР также имеют неоспоримые преимущества перед микробиологическими методами вследствие высокой скорости анализа, возможности одновременного тестирования большого количества образцов и возможности количественной оценки присутствия того или иного объекта (или группы объектов). Важным дополнительным достоинством молекулярных методов является допустимость проведения анализа исследователем, имеющим навыки только работы в области молекулярной диагностики. Однако для молекулярно-генетических методов существуют ограничения, к которым относятся дороговизна приборов и реактивов и строгие требования к организации помещений лаборатории [93]. Этот метод может явиться альтернативой тестам, базирующимся на выявлении АТ к МТ.

Существуют данные об использовании методик оценки содержания МТ в зернопродуктах и комбикормах всего за 3–4 часа путем определения процента снижения активности глюкоамилазы, иммобилизованной глутаральдегидным способом на предварительно

кондиционированном по стандартной методике анионите АВ-17-2П. Оценку результатов осуществляют путем сравнения каталитической активности фермента в присутствии вытяжки из чистого продукта и при инкубации фермента с экстрактом зараженного МТ зерна или комбикорма [94].

### Детоксикация загрязненных МТ продуктов

В настоящее время с этой целью применяют комплекс мероприятий, которые можно разделить на механические, физические, биологические и химические методы детоксикации МТ. Механические методы детоксикации связаны с отделением загрязненного сырья (материала) вручную или с помощью электронно-колориметрических сортировщиков. Физические методы основаны на достаточно жесткой термической обработке материала (например, автоклавирование), а также связаны с ультрафиолетовым облучением и озонированием. Биологические методы основаны на обработке сырья определенными культурами микроорганизмов, разлагающих МТ. Наиболее выраженную обезвреживающую способность проявил *Bacillus subtilis* – 2006 (снижение загрязнения МТ происходило на 87 %) [95]. Химический метод предполагает обработку материала сильными окислителями. Анализ различных разработок препаратов, нейтрализующих МТ, показывает, что для этой цели применяются препараты различной природы: минерального, растительного, химического происхождения и комплексные. Адсорбенты ингибируют поступление МТ из желудочно-кишечного тракта, снижают токсическое воздействие на организм и предотвращают контаминацию этими соединениями и их метаболитами конечных продуктов, предназначенных для потребления человеком. Методом адсорбции эффективно удаляются полярные МТ (это в основном АФЛ, в некоторой степени ФУМы). В то же время неполярные токсины одними адсорбентами практически не сорбируются, а другими сорбируются недостаточно эффективно. Эффективны органические адсорбенты на основе глюканов дрожжевой клетки, хитозана и других биополимеров, гуминовых веществ, способных эффективно адсорбировать широкий спектр МТ. Разработан фитопрепарат для нейтрализации МТ, представляющий собой натуральный растительный экстракт, в состав которого входят органические кислоты [96]. К сожалению, каждый из названных методов имеет свои существенные недостатки: применение механических и физических методов не дает высокого эффекта, а химические методы приводят к разрушению не только МТ, но и полезных нутриентов и, кроме этого, нарушают их всасывание. Использование химических препаратов для обработки семян, в т. ч. ЛРС, имеет ряд отрицательных последствий, среди которых загрязнение окружающей среды, накопление опасных химических веществ как в почве, так и в продукции растениеводства и фармацевтической промышленности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительная часть продукции растительного происхождения, в т. ч. и ЛРС всех стран мира подвержена контаминации МТ. Они негативно действуют на организм животных и человека и с трудом поддаются деконтаминации. МТ могут присутствовать в ЛРС без видимого роста плесени. Понемногу накапливаясь в организме, МТ через десятилетия могут вызвать тяжелые заболевания, в том числе онкологические. Сложность проблемы защиты человека от микотоксикозов усугубляется тем, что сырье, содержащее МТ не теряет токсичности в течение многих лет. Полностью исключить образование МТ в сырье не представляется возможным, поэтому задача контролирующих ее качество служб – выявить наличие МТ и сравнить обнаруженное количество с нормами предельного содержания. Содержание МТ в ЛРС в настоящее время не определяется по ГФ РФ XIV изд. [97]. Однако, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 г. № 15 утверждены Правила надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения [98], в которых прописана недопустимость образования плесени в процессе первичной обработки, хранения и транспортировки ЛРС. Следовательно, накопление экспериментального материала, а также развитие фармакопейных методов анализа ЛРС, постоянно ужесточающих требования к качеству, вероятно приведет к включению данного показателя в фармакопейные статьи (ФС). В связи с чем, интересным представляется проведение обзора существующих методов анализа МТ, с возможным последующим их включением в ОФС и ФС.

Традиционными методами анализа МТ является физико-химические методы. Наибольшее распространение нашли хроматографические методы: ВЭЖХ, жидкостная, ГЖХ с применением различных детекторов (масс-спектрометрического, флуоресцентного, амперометрического и т.д.). Особое место среди методов разделения занимает ТСХ. В последние годы ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС стали одними из основных инструментальных методов мониторинга загрязнений пищевых продуктов МТ [11]. Данные методы, безусловно, способны обеспечить достаточную специфичность и необходимую чувствительность определения, однако являются дорогостоящими, рассчитаны преимущественно на специализированные и хорошо оснащенные стационарные лаборатории, а также требуют высокой квалификации персонала. Ни один из них также нельзя отнести к экспресс-методам.

Сложность определения МТ в ЛРС связана с продолжительной и трудоемкой пробоподготовкой, а также с использованием дорогостоящих высокочувствительных методов (ВЭЖХ, ЖХ, ГЖХ), которые не могут быть применены непосредственно на месте производства и переработки ЛРС. Наиболее перспективными являются иммунохимические тест-методы определения МТ, основанные на иммунохимической реакции

между АТ и АГ. Иммунохимические тест-методы позволяют анализировать большое количество образцов с целью подтверждения наличия или отсутствия МТ в объекте по определенному концентрационному уровню. Экспрессность выполнения, высокая специфичность АТ к связыванию, точность, возможность проведения эксперимента вне лабораторных условий – все эти критерии способствуют внедрению ИХМ в практику. В связи с этим развиваются методы быстрого и недорогого скрининга МТ: твердофазный ИФА, электро-химические иммуносенсоры, ПФИА, биосенсоры (основанные на измерении флуоресценции), ТСХ с денсиметрическим детектированием. Они не уступают по своей чувствительности, специфичности и простоте проведения анализа лабораторным методам. В настоящее время существует проблема оперативного контроля МТ с помощью экспресс-методов и приборов, пригодных к применению в полевых условиях. Решением проблемы стало использование явления поверхностного плазменного резонанса (ППР). К бесспорным преимуществам можно отнести возможность использования ППР-устройств в полевых условиях, прежде всего, для скрининга ЛРС на местах их естественного произрастания и длительного хранения и на предприятиях фармацевтической промышленности [50]. Общим недостатком перечисленных методов является не всегда достаточная чувствительность из-за малого объема используемой пробы [99]. Показано, что высокая специфичность и возможность выявления МТ в низких концентрациях в сочетании с существующим разнообразным приборным обеспечением позволяют рассматривать ИХМ анализа как наиболее перспективные для широкого практического использования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ахмадышин Р. А., Канарский А. В., Канарская З. А. Микотоксины – контаминанты кормов. *Вестник Казанского технологического университета*. 2007;2:88–103.
- Мальцева А. А., Коренская И. М. О зараженности растительного сырья плесневыми грибами класса *Deuteromycetes*. *Сеченовский вестник*. 2017;1(23):9–10.
- Гудкова А. А. Определение микробиологической чистоты, присутствия плесневых грибов и содержания микотоксинов в лекарственном растительном сырье (на примере травы горца почечуйного). *Биофармацевтический журнал*. 2018;10(6):28–32.
- Тринеева О. В., Сливкин А. И., Дортгулыев Б. Определение микотоксинов в плодах и масле облепихи крушиновидной. *В сборнике: Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства сборник материалов 5-й международной научно-практической телеконференции*. 2015. С. 149–152.
- Тринеева О. В., Сливкин А. И., Дортгулыев Б. Определение микробиологической чистоты и микотоксинов в лекарственном растительном сырье и масляных препаратах на его основе (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной). *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015;3:124–128.
- Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дис. ... д. фарм. наук. 2017. 441 с.
- Гравель И. В. Необходимость оценки безопасности лекарственного растительного сырья по содержанию экотоксикантов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;2:37–39.
- Соколова Г. Д. Замаскированные микотоксины. *Успехи медицинской микологии*. 2015;14:311–314.
- Свистова И. Д., Парамонов А. Ю. Влияние лекарственных растений на микромицеты и биологическую активность почвы. *Проблемы медицинской микологии*. 2011;13(3):50–53.
- Буркин А. А., Толпышева Т. Ю., Кононенко Г. П. Сохранность вторичных метаболитов грибов в гербарных образцах лишайников. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2012;3:28–32.
- Сатюкова Л. П., Смирнова И. Р., Михалев А. В. Современные методы определения микотоксинов в кормах. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2011;2(6):37–39.
- Хайруллин Р. М., Уразбахтина Д. Р. Новый подход к экологически безопасному контролю уровня микотоксинов в продукции растениеводства. *Биомика*. 2012;2(2):68–75.
- Сеидова Г. М. Контаминация афлатоксинами некоторых сортов чая и некоторых зерновых культур в Азербайджане. *Проблемы медицинской микологии*. 2007;9(4):31–33.
- Мазыгула Е. Д., Харламова М. Д. Оценка токсичности и экологической опасности сырья и кормов, содержащих микотоксины. *Вестник РУДН, серия Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2015;1:50–56.
- Ганибалов Ф. Б. Виды рода *Alternaria* в семенах зерновых культур России. *Микология и фитопатология*. 2008;42(4):359–368.
- Науменко Н. В., Ботвинникова В. В., Сотникова В., Грживна Л., Белоглазова Н. В. Микотоксины и безопасность продуктов питания: явные и скрытые угрозы. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии*. 2020;8(1):105–111.
- СанПин 2.3.21078-01 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» от 14.11.2001/22.03.02. Available at: [http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN\\_2\\_3\\_2\\_1078\\_01.htm](http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN_2_3_2_1078_01.htm).
- Дубина И. Н., Рябинкова И. М., Притыченко А. В., Притыченко А. Н. Мониторинг содержания микотоксинов в кормах. *Репозиторий Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины*. 2015;51(1-1):37–41.
- Медянцева Э. П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р. М., Тарасова Е. Ю., Сахапова Г. Р., Будников Г. К. Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2012;154(1):101–111.
- Стёпкин Ю. И., Скопинцева В. Л., Оболенский М. Ф. Использование метода иммуноферментного анализа в лабораторной практике при контроле микотоксинов. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья*. 2014;57:67–70.
- ГОСТ Р 52828-2007. Вина и виноматериалы. Определение содержания охратоксина А. Метод тонкослойной хроматографии. М.: Изд-во Стандартинформ, 2008. 7 с.
- ГОСТ 31653-2012. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. М.: Изд-во Стандартинформ, 2012. 16 с.
- ГОСТ Р 51116-97. Комбикорма, зерно, продукты его переработки. Метод определения содержания дезоксиниваленола. М.: Изд-во Стандартинформ, 1999. 14 с.
- ГОСТ 28001-88. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина А. М.: Изд-во Стандартинформ, 1990. 15 с.
- МУК 4.1.2204-07. Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: Изд-во Стандартинформ, 2007. 6 с.
- ГОСТ Р 53162-2008. Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: Изд-во Стандартинформ, 2008. 15 с.
- МУ 3940-85. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах. М.: Министерство здравоохранения СССР. Главное санитарно-профилактическое управление. 1990. 14 с.

28. ГОСТ 34140-2017. Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (с Поправкой). М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2017. 19 с.
29. ГОСТ 32835-2014. Продукция соковая. Определение микотоксинов методом тандемной высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) (Переиздание). М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2015. 16 с.
30. ГОСТ 31748-2012. Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2014: 19 с.
31. ГОСТ 30711-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В(1) и М(1). Минск. *Издательство стандартов*, 2001. 16 с.
32. ГОСТ 28038-2013. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения микотоксина патулина. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2014. 23 с.
33. ГОСТ Р 51435-99. Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2018. 7 с.
34. ГОСТ 31691-2012. Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение содержания зеараленона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2013. 13 с.
35. ГОСТ ISO 17372-2016. Корма для животных. Определение содержания зеараленона методами иммуноаффинной колоночной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2016. 20 с.
36. ГОСТ EN 15850-2013. Определение зеараленона в продуктах для детского питания на кукурузной основе, ячменной, кукурузной и пшеничной муке, поленте и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2015. 20 с.
37. МУ 5177-90. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах. М.: *Министерство здравоохранения СССР. Главное санитарно-профилактическое управление*, 1990. 5 с.
38. МУ 4082-86. Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию». М.: *Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора*, 2009. 76 с.
39. ГОСТ EN 15891-2013. Определение дезоксиниваленола в продовольственном зерне, продуктах его переработки и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и спектрофотометрического детектирования в ультрафиолетовой области спектра. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2014. 19 с.
40. ГОСТ EN 15835-2013. Продукты пищевые. Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2013. 28 с.
41. ГОСТ ISO 15141-2-2013. Продукты пищевые. Определение содержания охратоксина А в зерне и зерновых продуктах. Часть 2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с очисткой бикарбонатом. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2016. 16 с.
42. ГОСТ Р ЕН 15829-2011. Продукты пищевые. Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и инжире сушеном. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флуоресценции. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2015. 15 с.
43. ГОСТ 34108-2017. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания микотоксинов прямым твердофазным конкурентным иммуноферментным методом. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2017. 23 с.
44. ГОСТ Р 52471-2005. Корма. Иммуноферментный метод определения микотоксинов. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2006. 15 с.
45. ГОСТ 32587-2013. Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2016. 19 с.
46. ГОСТ Р 55448-2013. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. М.: *Изд-во Стандартиформ*, 2014. 16 с.
47. Амелин В. Г., Андоралов А. М., Волкова Н. М. и др. Идентификация и определение токсикантов с использованием стандартной добавки в пищевых продуктах, продовольственном сырье и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / время пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. *Аналитика и контроль*. 2015;19(2):189–207.
48. Амелин В. Г., Большаков Д. С., Авдеева Н. М., Подколзин И. В., Никешина Т. Б. Идентификация и определение контаминантов различных классов в пищевых продуктах и кормах методом масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием стандартной добавки. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2017;15:171–210.
49. Амелин В. Г., Тимофеев А. А. Идентификация и определение микотоксинов и пищевых добавок в кормах методом вэжх-время пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. *Журнал аналитической химии*. 2016;71(4):428–435.
50. Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. А., Стародуб Н. Ф. Трихотеценовые микотоксины: определение в объектах окружающей среды. *Biopolymers and Cell*. 2003;19(3):216–223.
51. Bilan A. The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2015;2(122):99–102.
52. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 июня 2003 г.). М.: *Минздрав России*, 2004. С. 94–95.
53. Мокшина Н. Я., Селеменев В. Ф., Скопинцева В. Л. и др. Определение микотоксинов в пищевых продуктах методом тонкослойной хроматографии. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2005;5(2):254–259.
54. Погосян А. И., Гельфанд С. Ю., Цимбалаев С. Р. Способ количественного определения патулина в пищевых продуктах. Патент РФ 2056044 от 10.03.1996 г. Бюл. № 31.
55. Погосян А. И., Гельфанд С. Ю. Способ определения патулина в пищевых продуктах. Патент SU1585754 от 15.08.1990 г. Бюл. № 30.
56. Амелин В. Г., Третьяков А. В., Карасева Н. М., Никешина Г. Б., Абраменкова О. И. Способ определения микотоксинов в продуктах животного и растительного происхождения. Патент РФ 2514828 от 11.07.2012 г. Бюл. № 13.
57. Авдеева Н. М. Пробоподготовка QuEChERS и дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция при одновременном определении микотоксинов различных классов хроматографическими методами. Автореферат дис. ... канд. хим. наук. Саратов, 2013. 22 с.
58. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Одновременное определение микотоксинов ряда трихотеценов, охратоксина А, зеараленона в зерне и продуктах его переработки, кормах и мясе методом газожидкостной хроматографии. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(1):64–70.
59. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Сочетание метода QUECHERS с дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией и получением производных при определении микотоксинов в зерне и комбикормах газожидкостной хроматографией с детектором по захвату электронов. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(6):612–618.
60. Федорова Т. А., Булгакова О. А. Усовершенствование метода определения зеараленона в пищевых продуктах. *Здоровье и окружающая среда*. 2015;2(25):219–221.
61. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(3):212–223.

62. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Определение афлатоксинов В1 и М1 в молоке: быстрый и простой способ пробоподготовки. *Молочная промышленность*. 2013;9:55–56.
63. Амелин В. Г., Никешина Т. Б., Карасева Н. М. Экспрессный способ определения афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в зерне и кормах. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013;3:12–15.
64. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Сочетание QUECHERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции при определении афлатоксинов В1 и М1 в молоке и молочных продуктах методом ВЭЖХ. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(5):510–515.
65. Авдеева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Одновременное извлечение восьми микотоксинов различных классов из зерна, кормов и их определение методом ВЭЖХ. *Ветеринария сегодня*. 2014;1:27–34.
66. Гонтарева Е. Н. Новый метод определения микотоксинов в винах Кубани. В сборнике: *Научное решение актуальных проблем производства, качества и безопасности сельхозпродукции Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт табака, махорки и табачных изделий Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2010. 113–116 с.
67. Гонтарева Е. Н. Микотоксины под контролем. *Методы оценки соответствия*. 2011;1:15–17.
68. Варламова Р. М., Медянцова Э. П., Хамидуллина Р. Р., Будников Г. К. Определение патулина амперометрическими тирозиназными биосенсорами на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и наночастицами золота. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2016;158(3):351–368.
69. Медянцова Э. П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р. М. и др. Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2012;154(1):101–111.
70. Горячева И. Ю., Русанова Т. Ю., Бурмистров Н. А., Де Саегер С. Иммунохимические методы определения микотоксинов. *Журнал аналитической химии*. 2009;64(8):788–806.
71. Zaijun L., Zhongyun W., Xiulan S., Yinjun F., Peipei C. A sensitive and highly stable electrochemical impedance immunosensor based on the formation of silica gel-ionic liquid biocompatible film on the glassy carbon electrode for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in bee pollen. *Talanta*. 2010;80(5):1632–1637.
72. Гаврилова М. А., Слепченко Г. Б., Дерябина В. И. Способ количественного определения афлатоксина В1 методом дифференциальной вольтамперометрии. Патент РФ 25347322 от 26.07.2013. Бюл. № 34.
73. Gajan R. J., Nesheim H., Campbell A. D. Note on identification of anatoxins by oscillographic polarography. *J. Assoc. Agric. Chemist*. 1964;47(1):27–28.
74. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Одновременное определение патулина, трихотеценовых микотоксинов и зеараленона в зерне и кормах. *Ветеринария сегодня*. 2013;2(5):29–34.
75. Урусов А. Е., Петракова А. В., Возняк М. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Экспрессные иммуноферментные методы определения микотоксинов. В сборнике: «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»: материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева. 2015. С. 394–396.
76. Кононенко Г. П., Пиряева Е. А., Зотова Е. В., Разаков Ш. И., Мирзоев Д. М. Микотоксины и токсинпродуцирующие микроскопические грибы в хлопковом жмыхе из Таджикистана. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2019;1(29):31–38.
77. Буркин А. А., Толпышева Т. Ю., Кононенко Г. П. Сохранность вторичных метаболитов грибов в гербарных образцах лишайников. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2012;3:28–32.
78. Урусов А. Е., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Иммунохимические методы анализа микотоксинов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010;46(3):276–290.
79. Вашкевич И. И., Терентьева Т. В., Корнилович Г. С. и др. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук*. 2016;4:72–79.
80. Разаков Ш. И., Мирзоев Д. М., Кононенко Г. П., Буркин А. А. Микотоксины в бобах арахиса, выращенного в Таджикистане. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2018;4(8):74–77.
81. Бурмистрова Н. А., Русанова Т. Ю., Юрасов Н. А., Де Саегер С., Горячева И. Ю. Одновременное определение нескольких микотоксинов иммунофльтрационным тест-методом. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(6):586–595.
82. Хмара И. Н., Коцаев А. Г., Лунева А. В., Коцаева О. В. Анализ зараженности зернового сырья микотоксинами. *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. 2013;3(6):290–293.
83. Петракова А. В., Урусов А. Е., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Иммуноферментный анализ микотоксинов в водно-органических средах на примере определения афлатоксина В1. *Успехи медицинской микологии*. 2013;11:290–293.
84. Тужикова Т., Титова М. ИФА-наборы для определения микотоксинов. *Комбикорма*. 2011;1:45–49.
85. Стёпкин Ю. И., Скопинцева В. Л., Оболенский М. Ф. Использование метода иммуноферментного анализа в лабораторной практике при контроле микотоксинов. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья*. 2014;57:67–70.
86. Нестеренко И. С., Комаров А. А., Вылегжанина Е. С. и др. Экспрессные иммунохимические методы определения микотоксинов в зерне и кормах. *Ветеринарная медицина*. 2012;11:25–26.
87. Миронов А. Н. и др. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;2:52–56.
88. Урусов А. Е., Костенко С. Н., Свешников П. Г., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Определение охратоксина А иммунохроматографическим методом. *Журнал аналитической химии*. 2011;66(8):884–890.
89. Петракова А. В., Урусов А. Е., Жердев А. В., Лью Л., Ксю Ч., Дзантиев Б. Б. Применение наночастиц магнетита для разработки высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем для определения микотоксинов. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017;53(4):420–426.
90. Белякова З. Ю., Савостеева М. И., Макеева И. А. Методы определения микотоксинов в пищевых продуктах. В сборнике: «Фундаментальные и прикладные исследования по безопасности и качеству пищевых продуктов». *Сборник научных трудов VIII Международной конференции молодых учёных и специалистов. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования»*. 2014. С. 25–27.
91. Джубандыкова М. С., Фадеева Т. В., Сатылганов Т. Т., Ларин С. А. Способ определения микотоксинов в кормах. Авторское свидетельство SU1751664 от 30.07.92 г. Бюл. № 28.
92. Липницкий А. В., Антонов В. А., Гришина М. А. Молекулярно-генетические подходы к идентификации грибов – продуцентов трихотеценовых микотоксинов (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2007;9(3):16–20.
93. Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Орина А. С., Казарцев И. А., Ганнибал Ф. Б. Сравнение методов выявления в зерне токсинпродуцирующих грибов рода FUSARIUM. *Микология и фитопатология*. 2017;51(5):292–298.
94. Ковалева Т. А., Холявка М. Г. Разработка нового способа быстрого определения токсичности зернопродуктов и комбикормов. *Научный журнал «Успехи современного естествознания» Российской Академии Естествознания*. 2008;2:45–46.
95. Еремеев И. М., Иванов Е. Н., Иванов А. А. Использование биологического метода для обезвреживания кормов от микотоксинов. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2012;2(8):21–24.
96. Кондакова И. А., Левин В. И., Льгова И. П., Ломова Ю. В. Фитопрепарат для инактивации микотоксинов, возникающих в зерновой массе. *Вестник Рязанского государственного агроэкономического университета им. П. А. Костычева*. 2018;4(40):18–23.

97. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения 15.06.2020).
98. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 № 15 «Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения». Available at: <http://www.eaeunion.org/>, 27.02.2018 (дата обращения 15.06.2020).
99. Карагушева М. А., Басова Е. Ю., Горячева И. Ю. Разработка иммунохимических тест-методов для определения микотоксинов в продуктах питания. *Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология*. 2008;8(1):39–42.
15. Gannibal Ph. B. Species of the genus *Alternaria* in cereal seeds in Russia. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2008;42(4):359–368. (In Russ.).
16. Naumenko N. V., Botvinnikova V. V., Šottníková V., Hřivna L., Beloglazova N. V. Mycotoxins and security of food products: obvious and hidden threats. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Pishchevye i biotekhnologii = Bulletin of South Ural State University, Series «Food and Biotechnology»*. 2020;8(1):105–111. (In Russ.).
17. SanPin 2.3.21078-01 «Hygienic requirements for the quality and safety of food raw materials and food products» from 14.11.2001/22.03.02. Available at: [http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN\\_2\\_3\\_2\\_1078\\_01.htm](http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN_2_3_2_1078_01.htm) (In Russ.).

## REFERENCES

1. Akhmadshin R. A., Kanarskii A. V., Kanarskaya Z. A. Mycotoxins are feed contaminants. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2007;2:88–103. (In Russ.).
2. Maltseva A. A., Korenskaya I. M. About infection of plant materials with mold fungi of the class *Deuteromycetes*. *Sechenovskii vestnik = Sechenov Medical Journal*. 2017;1(23):9–10. (In Russ.).
3. Gudkova A. A. Determination of the presence of pleasured mushrooms, mikotoxins and microbiological cleanliness in medicinal vegetative raw material (on the example of *Herba polygonum persicaria* L.). *Biofarmaceuticheskij zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2018;10(6):28–32. (In Russ.).
4. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dortgulyev B. Determination of mycotoxins in fruits and buckthorn oil of buckthorn. In: *Pharmaceutical cluster as an integration of science, education and production, a collection of materials from the 5<sup>th</sup> international scientific and practical teleconference*. 2015. P. 149–152. (In Russ.).
5. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dortgulyev B. Determination of microbiological purity and mycotoxins in medicinal plant materials and oil preparations based on it (for example, buckthorn buckthorn fruits and dioica nettle leaves). *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2015;3:124–128. (In Russ.).
6. Trineeva O. V. Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant materials and oil extracts based on it. The dissertation ... Dr. of Sci. (Pharm.). 2017. 441 p. (In Russ.).
7. Gravel I. V. Necessity for safety evaluation of medicinal herbs by contents of ecotoxicants. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;2:37–39. (In Russ.).
8. Sokolova G. D. Disguised mycotoxins. *Uspekhi medicinskoj mikologii*. 2015;14:311–314. (In Russ.).
9. Svistova I. D., Paramonov A. Ju. Influence of medical herbs on micromycetes and biological soil activity. *Problemy medicinskoj mikologii = Problems in medical mycology*. 2011;13(3):50–53. (In Russ.).
10. Burkin A. A., Tolpysheva T. Yu., Kononenko G. P. Safety of fungal secondary metabolites in herbarial lichen specimens. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2012;(3):28–32. (In Russ.).
11. Satyukova L.P., Smirnova I. R., Mikhalev A. V. Contemporary methods on determining the mycotoxins in feeds. *Rossijskij zhurnal «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii*. 2011;2(6):37–39. (In Russ.).
12. Khairullin R. M., Urazbakhina D. R. New approach to ecologically safe control the level of mycotoxins in plant growing production. *Biomika = Biomics*. 2012;2(2):68–75. (In Russ.).
13. Seidova G. M. The Contamination by aflatoxines of some kinds of tea and some cereals in Azerbaijan. *Problemy medicinskoj mikologii = Problems in medical mycology*. 2007;9(4):31–33. (In Russ.).
14. Mazygula E. D., Kharlamova M. D. Assessment of toxicity and environmental hazards of raw materials and feed containing mycotoxins. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2015;1:50–56. (In Russ.).
18. Dubina I. N., Ryabinkova I. M., Pritychenko A.V., Pritychenko A.N. Monitoring the content of mycotoxins in feed. *Repozitorij Vitebskoj ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny*. 2015;51(1-1):37–41. (In Russ.).
19. Medyantseva E.P., May Thi Thanh H., Varlamova R.M., Tarasova E. Yu., Sakhapova G.R., Budnikov G.K. Determination of some mycotoxins by amperometric cholinesterase biosensors. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2012;154(1):101–111. (In Russ.).
20. Styopkin Yu. I., Skopintseva V. L., Obolenkiy M. F. Applying enzyme immunoassay in the laboratory at the control of mycotoxins. *Nauchno-medicinskij vestnik Central'nogo Chernozem'ya*. 2014;57:67–70. (In Russ.).
21. GOST R 52828-2007. Wines and wine materials. Determination of ochratoxin A. Thin layer chromatography method. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2008. 7 p. (In Russ.).
22. GOST 31653-2012. Enzyme immunoassay for the determination of mycotoxins. Moscow: *Publishing house of standards*, 2012. 16 p. (In Russ.).
23. GOST R 51116-97. Compound feed, grain, products of its processing. Method for determining the content of deoxynivalenol. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 1999. 14 p. (In Russ.).
24. GOST 28001-88. Feed grain, products of its processing, animal feed. Methods for the determination of mycotoxins: T-2 toxin, zearalenone and ochratoxin A. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 1990. 15 p. (In Russ.).
25. MUK 4.1.2204-07. Detection, identification and quantification of ochratoxin A in food raw materials and food products by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2007. 6 p. (In Russ.).
26. GOST R 53162-2008. Food Products. Determination of aflatoxin B1 and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and their processed products. Method of high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2008. 15 p. (In Russ.).
27. MU 3940-85. Guidelines for the detection, identification and determination of the content of deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone in grain and grain products. Moscow: *Ministerstvo zdravoohraneniya SSSR. Glavnoe sanitarno-profilakticheskoe upravlenie*. 1990. 14 p. (In Russ.).
28. GOST 34140-2017. Food products, feed, food raw materials. Method for the determination of mycotoxins using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (as amended). Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2017. 19 p. (In Russ.).
29. GOST 32835-2014. Juice products. Determination of mycotoxins by tandem high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-MS/MS) (Reprint). Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 16 p. (In Russ.).
30. GOST 31748-2012. Food Products. Determination of aflatoxin B1 and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and their processed products. Method of high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014: 19 p. (In Russ.).
31. GOST 30711-2001. Food Products. Methods for detecting and determining the content of aflatoxins B (1) and M (1). Minsk. *Standartinform Publishing House*, 2001. 16 p. (In Russ.).
32. GOST 28038-2013. Products of processing fruits and vegetables. Methods for the determination of mycotoxin patulin. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 23 p. (In Russ.).

33. GOST R 51435-99. Apple juice, concentrated apple juice and drinks containing apple juice. Method for determining the content of patulin using high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2018. 7 p. (In Russ.).
34. GOST 31691-2012. Grain and products of its processing, animal feed. Determination of zearalenone content by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2013. 13 p. (In Russ.).
35. GOST ISO 17372-2016. Pet food. Determination of zearalenone content by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 20 p. (In Russ.).
36. GOST EN 15850-2013. Determination of zearalenone in corn-based baby foods, barley, corn and wheat flour, polenta and cereal-based foods for infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 20 p. (In Russ.).
37. MU 5177-90. Guidelines for the detection, identification and determination of the content of deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone in grain and grain products. Moscow: *Ministerstvo zdravoohraneniya SSSR. Glavnoe sanitarno-profilakticheskoe upravlenie*, 1990. 5 p.
38. MU 4082-86. Methodology for the determination of aflatoxins in foods using high performance liquid chromatography. A collection of methodological documents necessary to ensure the application of the Federal Law of June 12, 2008 No. 88-ФЗ «Technical Regulations for Milk and Dairy Products». Moscow: *Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora*, 2009. 76 p. (In Russ.).
39. GOST EN 15891-2013. Determination of deoxynivalenol in food grain, its processed products and grain-based products for feeding infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and spectrophotometric detection in the ultraviolet region of the spectrum. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 19 p. (In Russ.).
40. GOST EN 15835-2013. Food Products. Determination of ochratoxin A in cereal-based products for feeding infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2013. 28 p. (In Russ.).
41. GOST ISO 15141-2-2013. Food Products. Determination of ochratoxin A content in grain and cereal products. Part 2. High performance liquid chromatography with bicarbonate purification. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 16 p. (In Russ.).
42. GOST R EN 15829-2011. Food Products. Determination of ochratoxin A in cinnamon, raisins, raisins, dried fruit mixes and dried figs Method of high performance liquid chromatography using immunoaffinity column purification of the extract and detection by fluorescence. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 15 p. (In Russ.).
43. GOST 34108-2017. Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of mycotoxin content by direct solid-state competitive enzyme immunoassay. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2017. 23 p. (In Russ.).
44. GOST R 52471-2005. Stern. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of mycotoxins. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2006. 15 p. (In Russ.).
45. GOST 32587-2013. Grain and products of its processing, animal feed. Determination of ochratoxin A by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 19 p. (In Russ.).
46. GOST R 55448-2013. Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of the content of ochratoxin A by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 16 p. (In Russ.).
47. Amelin V. G., Andoralov A. M., Volkova N. M. et al. The identification and determination of toxicants in food products and raw food materials by HPLC / TOF high resolution mass spectrometry. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2015;19(2):189–207. (In Russ.).
48. Amelin V. G., Bolshakov D. S., Avdeyeva N. M., Podkolzin I. V., Nikeshina T. B. Identification and determination of contaminants of different classes in food products and feed by high resolution mass spectrometry with standard addition method. *Trudy Federal'nogo centra ohrany zdorov'ya zhivotnyh = FGBI «Federal Centre for Animal Health»*. 2017;15:171–210. (In Russ.).
49. Amelin V. G., Timofeev A. A. Identification and determination of mycotoxins and food additives in feed by HPLC–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(4):428–435. (In Russ.).
50. Artyukh V. P., Goister O. S., Khmel'nitsky G. A., Starodub N. F. Trichothecene micotoxins: determination in environment. *Biopolymers and Cell*. 2003;19(3):216–223. (In Ukraine).
51. Bilan A. The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. *Naukovii visnik veterinarnoї meditsini*. 2015;2(122):99–102. (In Ukraine).
52. Guidance on methods for monitoring the quality and safety of dietary supplements. Guide R 4.1.1672-03 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on June 30, 2003). M.: *Minzdrav Rossii*, 2004. P. 94–95. (In Russ.).
53. Mokshina N. Ya., Selemenev V. F., Skopintseva V. L. et al. Determination of mycotoxins in food by thin layer chromatography. *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy = Sorption and chromatography processes*. 2005;5(2):254–259. (In Russ.).
54. Pogosyan A.I., Gelfand S. Yu., Tsimbalaev S.R. Method for the quantitative determination of patulin in food products. RF patent 2056044 of 10.03.1996, Bull. Number 31. (In Russ.).
55. Poghosyan A. I., Gelfand S. Yu. Method for determining patulin in food products. Patent SU1585754 of 15.08.1990, Bull. Number 30. (In Russ.).
56. Amelin V. G., Tretyakov A. V., Karaseva N. M., Nikeshina G. B., Abramenkova O. I. Method for the determination of mycotoxins in products of animal and plant origin. RF patent 2514828 dated July 11, 2012, Bull. Number 13. (In Russ.).
57. Avdeeva N. M. QuEChERS sample preparation and dispersive liquid-liquid microextraction with the simultaneous determination of mycotoxins of various classes by chromatographic methods. Abstract dis. ... Cand. of Sci. (Chem.). Saratov, 2013. 22 p. (In Russ.).
58. Amelin V. G., Karaseva N. M., Tretyakov A. V. Simultaneous determination of mycotoxins of a number of trichothecenes, ochratoxin A, zearalenone in grain and its processed products, feed and meat by gas-liquid chromatography. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(1):64–70. (In Russ.).
59. Amelin V.G., Karaseva N.M., Tretyakov A.V. Combination of the QUECHERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and production of derivatives for the determination of mycotoxins in grain and compound feeds by gas-liquid chromatography with an electron capture detector. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(6):612–618. (In Russ.).
60. Fiodorova T. A., Bulgakova O. A. Optimization of method for determining zearalenone in food. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda*. 2015;2(25):219–221. (In Belarus).
61. Amelin V. G., Karaseva N. M., Tretyakov A. V. Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food products. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(3):212–223. (In Russ.).
62. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Determination of aflatoxins B1 and M1 in milk: a quick and easy method for sample preparation. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*. 2013;9:55–56. (In Russ.).
63. Amelin V. G., Nikeshina T. B., Karaseva N. M. Rapid Method for Detection of Aflatoxins B1, B2, G1, G2 in Grains and Feeds. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Sel'skokozyajstvennye zhivotnye*. 2013;3:12–15. (In Russ.).
64. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Combination of QUECHERS and dispersive liquid-liquid microextraction in the determination of aflatoxins B1 and M1 in milk and dairy products by HPLC. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(5):510–515. (In Russ.).
65. Avdeeva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Simultaneous detection of eight mycotoxins of different classes from grain and feeds and their identification with the help of HPLC. *Veterinariya segodnya = Veterinary Science Today*. 2014;1:27–30. (In Russ.).

66. Gontareva E.N. A new method for the determination of mycotoxins in wines of the Kuban. In: *Scientific solution of pressing problems of production, quality and safety of agricultural products State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Tobacco, Shag and Tobacco Products of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2010. 113–116 p. (In Russ.).
67. Gontareva E.N. Mycotoxins under control. *Metody ocenki sootvetstviya*. 2011;1:15–17. (In Russ.).
68. Varlamova R. M., Medyantseva E. P., Hamidullina R. R., Budnikov H. C. Determination of patulin using amperometric tyrosinase biosensors based on electrodes modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*. 2016;158(3):351–368. (In Russ.).
69. Medyantseva E. P., May Thi Thanh H., Varlamova R. M. et al. Determination of some mycotoxins by amperometric cholinesterase biosensors. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*. 2012;154(1):101–111. (In Russ.).
70. Goryacheva I. Yu., Rusanova T. Yu., Burmistrov N.A., De Saeger S. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2009;64(8):788–806. (In Russ.).
71. Zajun L., Zhongyun W., Xiulan S., Yinjun F., Peipei C. A sensitive and highly stable electrochemical impedance immunosensor based on the formation of silica gel-ionic liquid biocompatible film on the glassy carbon electrode for the determination of aflatoxin B[1] in bee pollen. *Talanta*. 2010;80(5):1632–1637.
72. Gavrilova M. A., Slepchenko G. B., Deryabin V. I. Method for the quantitative determination of aflotoxin B1 by differential voltammetry. RF patent 25347322 from 07.26.2013. Bull. Number 34. (In Russ.).
73. Gajan R. J., Nesheim H., Campbell A. D. Note on identification of anatoxins by oscillographic polarography. *J. Assoc. Agric. Chemist*. 1964;47(1):27–28.
74. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Simultaneous detection of patulin, trichothecene mycotoxi and zearalenone in grain and feed. *Veterinariya segodnya = Veterinary science today*. 2013;2(5):29–34. (In Russ.).
75. Urusov A. E., Petrakova A. V., Wozniak M. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Express enzyme-linked immunosorbent assays for the determination of mycotoxins. In: «BIOTECHNOLOGY: STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT»: materials of the VIII Moscow International Congress. *CJSC Expo-Biochemical Technologies, RCTU named after D. I. Mendeleev*. 2015. P. 394–396. (In Russ.).
76. Kononenko G. P., Piryazeva E. A., Zotova E. V., Razokov Sh. I., Mirzoev D. M. Mycotoxins and toxin-producing microscopic fungi in cotton-seed cake from Tajikistan. *Rossiyskij zhurnal «Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii*. 2019;1(29):31–38. (In Russ.).
77. Burkin A. A., Tolpysheva T. Yu., Kononenko G. P. Safety of fungal secondary metabolites in herbarial lichen specimens. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2012;3:28–32. (In Russ.).
78. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Immunochemical Methods of Mycotoxin Analysis (Review). *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(3):276–290. (In Russ.).
79. Vashkevich I. I., Terenteva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. A new kit of reagents for the elisa determination of zearalenone in feeds and foods. *Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya himicheskikh nauk. = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*. 2016;4:72–79. (In Belarus).
80. Razokov Sh. I., Mirzoev D. M., Kononenko G. P., Burkin A. A. Mycotoxins in beans of peanuts grown in Tajikistan. *Rossiyskij zhurnal «Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii*. 2018;4(8):74–77. (In Russ.).
81. Burmistrova N.A., Rusanova T. Yu., Yurasov N.A., De Saeger S., Goryacheva I. Yu. Simultaneous determination of several mycotoxins by immunofiltration test method. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(6):586–595. (In Russ.).
82. Khmara I. N., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Koshchaeva O. V. Analysis of mycotoxin contamination of grain raw materials. *Sbornik nauchnykh trudov Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva i kormoproizvodstva*. 2013;3(6):290–293. (In Russ.).
83. Petrakova A. V., Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Enzyme-linked immunosorbent assay for mycotoxins in aqueous-organic media by the example of the determination of aflatoxin B1. *Uspekhi medicinskoj mikologii*. 2013;11:290–293. (In Russ.).
84. Tuzhikova T., Titova M. ELISA kits for the determination of mycotoxins. *Kombikorma*. 2011;1:45–49. (In Russ.).
85. Styopkin Yu. I., Skopintseva V. L., Obolenkiy M. F. Applying enzyme immunoassay in the laboratory at the control of mycotoxins. *Nauchno-meditsinskij vestnik Central'nogo Chernozem'ya*. 2014;57:67–70. (In Russ.).
86. Nesterenko I. S., Komarov A. A., Vylegzhaniina E. S. et al. Express immunochemical methods for the determination of mycotoxins in grain and feed. *Veterinary medicine*. 2012;11:25–26. (In Russ.).
87. Mironov A. N., Sakaeva I. V., Sakanyan E. I., Korsun L. V., Mochkina O. A. Current approaches to standardization of herbal substances. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;2:52–56. (In Russ.).
88. Urusov A. E., Kostenko S. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Sveshnikov P. G. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *Zhurnal analiticheskoy himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2011;66(8):884–890. (In Russ.).
89. Petrakova A. V., Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Liu L., Xu C. Application of magnetite nanoparticles for the development of highly sensitive immunochromatographic test systems for mycotoxin detection. *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(4):420–426. (In Russ.).
90. Belyakova Z. Yu., Savosteeva M.I., Makeeva I.A. Methods for determination of mycotoxins in food products. In: «Fundamental and applied research on food safety and quality.» *Collection of scientific papers of the VIII International Conference of Young Scientists and Specialists. Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Conservation Technology*. 2014. P. 25–27. (In Russ.).
91. Dzhubandykova M. S., Fadeeva T. V., Satylganov T. T., Larin S. A. Method for the determination of mycotoxins in feed. Copyright certificate SU1751664 dated July 30, 1992, Bull. Number 28. (In Russ.).
92. Lipnitsky A. V., Antonov V. A., Grishina M. A. Molecular-genetic approaches to identification of fungi-produceRS of trichothecene mycotoxins (review). *Problemy medicinskoj mikologii*. 2007;9(3):16–20. (In Russ.).
93. Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P., Orina A. S., Kazartsev I. A., Gannibal ph. b. comparison of methods for identification of toxin-producing FUSARIUM fungi in the cereal grain. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2017;51(5):292–298. (In Russ.).
94. Kovaleva T. A., Kholyavka M. G. Development of a new method for the rapid determination of toxicity of grain products and animal feed. *Nauchnyj zhurnal «Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya» Rossijskoj Akademii Estestvoznaniya*. 2008;2:45–46. (In Russ.).
95. Ereemeev I. M., Ivanov E. N., Ivanov A. A. Using the biological method for decontamination of feeds from mycotoxins. *Rossiyskij zhurnal «Problemy veterinarnoy sanitarii, gigieny i ekologii*. 2012;2(8):21–24. (In Russ.).
96. Kondakova I. A., Levin V. I., Lgova I. P., Lomova Ju. V. Phytopreparation to inactivate mycotoxins arising in the grain mass. *Vestnik Ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta im. P. A. Kostycheva*. 2018;4(40):18–23. (In Russ.).
97. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 15.06.2020). (In Russ.).
98. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated January 26, 2018 No. 15 «On approval of the Rules of Good Practice for the cultivation, collection, processing and storage of plant-based feedstock». Available at: <http://www.eaeunion.org/>, 27.02.2018 (accessed 15.06.2020). (In Russ.).
99. Karagusheva M. A., Basova E. Yu., Goryacheva I. Yu. Development of immunochemical test methods for the determination of mycotoxins in food. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Seriya Himiya. Biologiya. Ekologiya*. 2008;8(1):39–42. (In Russ.).

# Сокращение незапланированных простоев с ПО Smart Alerts

Узнайте, чем основанное на данных техническое обслуживание оборудования может быть полезно вашей лаборатории



Регулярное техническое обслуживание прибора играет значимую роль в снижении времени простоя и в поддержании высоких характеристик прибора, а также в снижении продолжительности дорого обходящихся незапланированных простоев. Многие факторы, такие как высокий пробопоток, многосменная работа, сложные условия эксплуатации, могут привести к тому, что прибору будет не хватать технического обслуживания через базовые, рекомендованные производителем периоды времени. Следить за всем этим не так просто, в особенности, если приборов в вашей лаборатории немало.

Agilent  
**CrossLab**  
From Insight to Outcome

## Представляем вам основанное на данных техническое обслуживание оборудования

ПО Agilent CrossLab Smart Alerts следит за интенсивностью использования всего вашего оборудования и на основе долговременной оценки загруженности прибора в различных условиях эксплуатации вовремя предупреждает о необходимости выполнить техническое обслуживание.



Программу Smart Alerts можно установить на любой компьютер в лаборатории. Она собирает у приборов данные, известные как система заблаговременного оповещения о необходимости проведения профилактического обслуживания (EMF). Затем эти данные сравниваются с рекомендованными для каждой конкретной области применения пределами.

## Вам решать

Большую часть времени Smart Alerts незаметно следит за оборудованием. Как только один из приборов достигает предела EMF, Smart Alerts отправляет вам электронное сообщение с рекомендованными действиями. Далее вы сами решаете, как поступить, например, заменить расходные компоненты или провести предложенное профилактическое обслуживание прибора. Все текущие предупреждения для всех приборов в лаборатории собираются в одном сообщении. Программа также сообщает о приближающихся предупреждениях, чтобы у вас было время спланировать техническое обслуживание заранее и через выбранные вами интервалы.

Панель программы Smart Alerts позволяет одним взглядом оценить состояние всех приборов в лаборатории, что дает возможность знать состояние оборудования между сообщениями по электронной почте, а также просматривать текущие предупреждения, если электронная почта недоступна.

Подробнее по адресу

[www.agilent.com/chem/crosslab-smart-alerts](http://www.agilent.com/chem/crosslab-smart-alerts)



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>  
УДК 615.074



Оригинальная статья/Research article

## Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин»

М. Г. Шульженко<sup>1,2\*</sup>, И. А. Василенко<sup>1</sup>, Б. И. Уграк<sup>3</sup>, И. Е. Шохин<sup>1,5</sup>, Ю. В. Медведев<sup>4,5</sup>,  
Е. А. Малашенко<sup>4</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6  
2 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» (НМИЦ кардиологии) Минздрава России, 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а  
3 – ФГБУ науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского» Российской академии наук, 119991, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47  
4 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2  
5 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

\*Контактное лицо: Шульженко Марина Геннадиевна. E-mail: rina.shulzhenko@yandex.ru

ORCID: М. Г. Шульженко – <https://orcid.org/0000-0003-0544-4332>; И. А. Василенко – <https://orcid.org/0000-0002-3135-1917>; Б. И. Уграк – <https://orcid.org/0000-0003-2669-4154>;  
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Е. А. Малашенко – <http://orcid.org/0000-0002-4183-7822>.

Статья поступила: 18.05.2020. Статья принята в печать: 30.06.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Контроль качества лекарственного препарата нуждается в систематическом совершенствовании в связи с непрерывным повышением требований к качеству лекарственных средств. При оценке качества субстанций и лекарственных препаратов важнейшими показателями являются подлинность, содержание основного вещества и примесей. Это делает актуальным внедрение в производственную практику современных физико-химических методов анализа при определении таких параметров, как подлинность, содержание основного вещества и примесей. Выбор и применимость того или иного метода возможна только при проведении сравнительных исследований применения того или иного метода для решения данной задачи. Метод желателен должен быть рекомендован фармакопеей, давать однозначные результаты, а выполнение анализов должно быть не дорогим и доступным. Выбранные для сравнительного анализа методы хорошо известны, но необходимо отметить, что в последние годы приборостроительные компании значительно улучшили приборную базу, расширили их возможности. Поэтому одна из задач данной статьи продемонстрировать возможности выбранных методов для решения задач контроля качества лекарственных препаратов на примере даларгина.

**Цель.** Разработать методы определения подлинности действующего вещества в субстанции-порошок «Даларгин» с использованием ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектроскопии. Провести сравнительный анализ применимости выбранных методов для решения поставленной задачи.

**Материалы и методы.** Для определения подлинности в субстанции-порошок «Даларгин» использовали методы масс-спектроскопии, <sup>13</sup>C-ЯМР- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии.

**Результаты и обсуждение.** Разработаны методы определения подлинности исследуемого вещества методами ЯМР-, ИК- и масс-спектроскопии. Проведено сравнительное изучение возможностей выбранных методов при решении поставленной задачи. Были сделаны выводы о применимости метода ЯМР не только при определении подлинности даларгина, но и при решении задачи определения содержания основного вещества и примесей.

**Заключение.** Разработаны методы подлинности в субстанции-порошок «Даларгин» методами масс-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Установлено, что более информативным методом для установления подлинности является <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопия.

**Ключевые слова:** даларгин, лейцинэнкефалин, определение подлинности, масс-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** М. Г. Шульженко, И. А. Василенко отработали методики определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». М. Г. Шульженко, Б. И. Уграк, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев сняли ЯМР-спектры, масс-спектры и ИК-спектры субстанции-порошок «Даларгин». М. Г. Шульженко, И. А. Василенко проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>

## Comparative Analysis of Dalargin Pharmaceutical Substance Identification Methods

Marina G. Shulzhenko<sup>1,2\*</sup>, Ivan A. Vasilenko<sup>1</sup>, Bagdan I. Ugrak<sup>3</sup>, Igor E. Shohin<sup>1,5</sup>, Yuri V. Medvedev<sup>4,5</sup>,  
Evgeniya A. Malashenko<sup>4</sup>

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia  
2 – Experimental production of biomedical preparations «Of the Federal State Budgetary institution» «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia, 15a, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia  
3 – N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 47, Leninsky Prospekt, Moscow, 119991, Russia  
4 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia  
5 – LLC «СРФА», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

\*Corresponding author: Marina G. Shulzhenko. E-mail: rina.shulzhenko@yandex.ru

ORCID: Marina G. Shulzhenko – <https://orcid.org/0000-0003-0544-4332>; Ivan A. Vasilenko – <https://orcid.org/0000-0002-3135-1917>; Bagdan I. Ugrak – <https://orcid.org/0000-0003-2669-4154>;  
Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Evgeniya A. Malashenko – <http://orcid.org/0000-0002-4183-7822>.

Received: 18.05.2020. Revised: 30.06.2020. Published: 28.08.2020

© Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А., 2020

© Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A., 2020

## Abstract

**Introduction.** The quality control of a medicinal product needs to be systematically improved in connection with a continuous increase in the requirements for the quality of medicines. When assessing the quality of substances and drugs, the most important indicators are authenticity, the content of the main substance and impurities. This makes it relevant to introduce modern physical and chemical methods of analysis into industrial practice in determining parameters such as authenticity, the content of the main substance and impurities. The choice and applicability of a particular method is possible only when conducting comparative studies on the application of a particular method to solve this problem. The method should preferably be recommended by the Pharmacopoeia, give unambiguous results, and the analysis should not be expensive and affordable. The methods chosen for comparative analysis are well known, but it should be noted that in recent years, instrument-making companies have significantly improved their instrument base and expanded their capabilities. Therefore, one of the objectives of this article is to demonstrate the capabilities of the selected methods for solving the problems of drug quality control using dalargin as an example.

**Aim.** To develop methods for determining the authenticity of the active substance in a substance – Dalargin powder using NMR spectroscopy, IR spectrometry, and Mass spectrometry. Conduct a comparative analysis of the applicability of the selected methods to solve the problem.

**Materials and methods.** To determine the authenticity of the substance – the powder «Dalargin» used the methods of mass spectrometry, <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR spectrometry and IR spectrometry.

**Results and discussions.** Methods have been developed for determining the authenticity of the test substance by NMR, IR, and mass spectrometry. A comparative study of the possibilities of the selected methods in solving the problem. Conclusions were drawn about the applicability of the NMR method not only in determining the authenticity of dalargin, but also in solving the problem of determining the content of the main substance and impurities.

**Conclusion.** Authenticity methods have been developed in the substance – Dalargin powder by Mass, IR, and NMR spectrometry. It has been established that <sup>1</sup>H NMR spectrometry is a more informative method for authenticating.

**Keywords:** dalargin, leucine enkephalin, determination of authenticity, Mass spectrometry, NMR spectrometry, IR spectrometry.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Marina G. Shulzhenko, Ivan A. Vasilenko worked out methods for determining the authenticity of a substance – Dalargin powder. Marina G. Shulzhenko, Bagdan I. Ugrak, Igor E. Shohin, Yuri V. Medvedev took the NMR spectra, Mass spectra and IR spectra of the substance – Dalargin powder. Marina G. Shulzhenko, Ivan A. Vasilenko interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

**For citation:** Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>

## ВВЕДЕНИЕ

Способы фармацевтического анализа нуждаются в систематическом совершенствовании в связи с непрерывным повышением требований к качеству лекарственных средств, причем растут требования как к степени чистоты лекарственных веществ, так и к количественному содержанию. Поэтому необходимо широкое использование не только химических, но и более чувствительных физико-химических методов для оценки качества лекарств. Прямые методы определения подлинности субстанции это методы ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии. Наиболее часто встречающийся метод определения подлинности в действующих нормативных документах – это хроматография, при всех достоинствах данного метода это косвенный метод определения подлинности. Предлагаемые методы являются рекомендованными к использованию национальными фармакопеями, включая Российскую фармакопею. Немаловажным вопросом при использовании выбранного метода является его доступность и возможность оснащения лаборатории. Необходимо отметить, что выбранные методы доступны и могут быть использованы при контроле качества продукции, как каждодневные рутинные анализы.

Объектом исследования была субстанция-порошок «Даларгин». Субстанция «Даларгин» производится ООО «Бион» используется для производства лио-

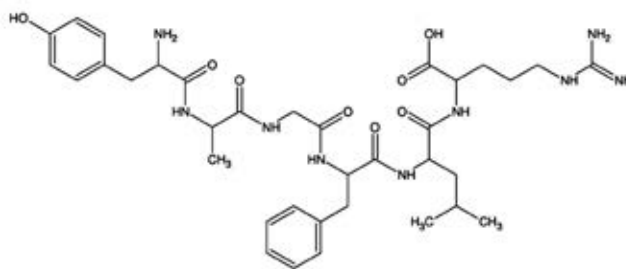
филированного препарата «Даларгин» на заводе ЭПМБП ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России.

Химическое название: тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетат.

Молекулярная масса: 725,835.

Молекулярная формула: C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>.

Структурная формула:



Даларгин – это противоязвенный препарат, синтетический гексапептид, аналог лейцинэнкефалина. Проявляет выраженное цитопротекторное и регенеративное действие и может занимать важное место при лечении заболеваний внутренних органов. Молекула даларгина довольно сложная с одной стороны, но с другой стороны на примере даларгина наиболее ярко можно продемонстрировать достоинства выбранных методов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Определение подлинности с использованием масс-спектрометрии:

1,0 мг субстанции даларгина растворяли в 1 мл воды класса 1, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой класса 1 до метки, перемешивали.

Ввод пробы и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с масс-селективным детектором G6125B. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения OpenLab CDS ChemStation Edition (Rev.C.01.07SR3), Agilent Technologies, США.

#### Подвижная фаза:

Элюент А: 0,1 % раствор (по объёму) муравьиной кислоты в воде класса 1.

Элюент В: ацетонитрил.

Объем вводимой пробы: 20 мкл.

Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 414 кПа, осушающий газ 12,0 л/мин, линия десольватации 300 °С, напряжение на капилляре 1500 В и –1500 В.

Режим ионизации: положительный/отрицательный (50/50 по времени).

Условия детектирования испытуемого образца: сканирование в диапазоне 200–900 m/z.

### Определение подлинности с использованием ЯМР-спектроскопии:

К 300 мг субстанции даларгина добавляют 600 мл воды тяжелой-D2 (D<sub>2</sub>O) – химическая чистота ≥99,9 %, изотопная чистота используемой воды 99,8 % (производитель SOLVEX-D). Полученный раствор переносят в ампулу используемую для ЯМР.

Съемка ЯМР-спектров проводилась на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой на ядрах <sup>1</sup>H – 500 МГц; температура – 300 К (27 °С).

Длительность сбора данных для регистрации спектра не менее 2 с.

Длительность повтора съемки не менее 3 с; Число накоплений спада свободной индукции 32 скана.

### Определение подлинности с использованием ИК – спектроскопии:

1–3 мг даларгина, предназначенного для испытания, растирают с 150–200 мг KBr тщательно измельченного в агатовой ступке, высушенного при 105 °С в вакууме, в течение 12 ч калия бромида. Смесь тщательно перетирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют образующуюся таблетку при давлении около 800 МПа в вакууме (2–3 мм рт. ст.) в течение 2–5 минут. При визуальном осмотре на образующемся диске не должно быть неоднородностей и трещин. Затем помещают диск с испытуемым веществом в специальную кювету и проводят съемку образца.

Съемку спектра проводили на инфракрасном спектрометре Shimadzu FTIR-8400S в рабочей облас-

ти спектра от 4000 до 400 см<sup>-1</sup> при спектральном разрешении 1,0 см<sup>-1</sup> в режиме пропускания, количество сканов 20.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В масс-спектрах испытуемого образца даларгина (рисунки 1 и 2) проявляется пик молекулярного иона 724,4 в отрицательном режиме ионизации и пики молекулярного иона 726,2 (*z* = 1), пик 363,8 (*z* = 2) в положительном режиме ионизации, которые соответствуют расчетной брутто формуле даларгина (C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>). Пик M<sup>+</sup> 727 обусловлен вкладом природного изотопа <sup>13</sup>C, присутствующего в молекуле даларгина. По данным масс-спектрометрии можно однозначно определить брутто формулу молекулы даларгина. Это является принципиальным при доказательстве подлинности препарата «Даларгин». По соотношению пиков M<sup>+</sup> и M<sup>+1</sup> можно определить количество атомов углерода в молекуле даларгина. Расчетное количество атомов углерода – (35 · 1.1) 38,5 %, измеренное по соотношению M<sup>+</sup> и M<sup>+1</sup> – 43,7 %.

В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР (рисунок 3) сигналы при 0,8–1,2 м.д. соответствуют сигналам протонов метильных групп даларгина. Сигнал при 1,8 м.д. соответствует сигналу метильной группы остатка уксусной кислоты. В области 2,5–4,5 м.д. проявляются сигналы CH<sub>2</sub> групп даларгина. В области 6,6–8,6 м.д. проявляются сигналы ароматических остатков молекулы даларгина. Уширенные сигналы в области 5–6 м.д и 7,5–7,8 м.д соответствуют сигналам протонов аминоксислотных групп. Протонный спектр дает информацию о структуре и количественном содержании остатка уксусной кислоты. Сигнал остатка уксусной кислоты (1,8 м.д.) по интегральной интенсивности совпадает с декларируемым содержанием уксусной кислоты 10,6 %. Интегральная интенсивность всех сигналов в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР соответствует количеству протонов в данной группировке.

В спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР (рисунок 4) подтверждается структура молекулы даларгина. Поскольку молекула даларгина асимметричная, количество сигналов и количество атомов углерода не совпадают, а в области 40 ppm идет наложение большого количества сигналов. Поскольку в спектре <sup>13</sup>C используется широкополосная развязка от протонов, то интегральная интенсивность сигналов не может быть использована для определения количества ядер <sup>13</sup>C при данном химическом окружении. Данные спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C-ЯМР позволяют сделать вывод о том, что ЯМР на ядрах протонов более нагляден при доказательстве подлинности субстанции даларгина, чем ЯМР на ядрах углерода. Т. е. метод <sup>1</sup>H-ЯМР является предпочтительным методом при доказательстве подлинности субстанции даларгина.

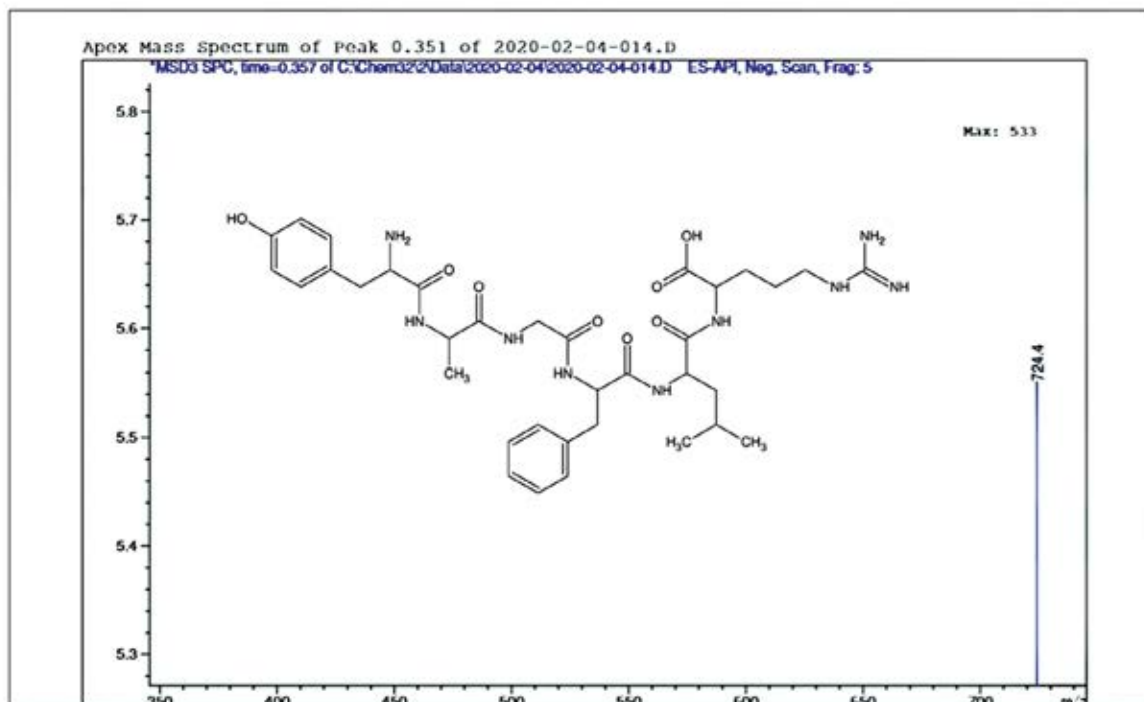


Рисунок 1. Масс-спектр испытуемого образца даларгина, отрицательный режим ионизации

Figure 1. Mass spectrum of the dalargin test sample, negative ionization mode

В ИК-спектре испытуемого образца даларгина (рисунок 5) подтверждается структура молекулы даларгина, но поскольку молекула сложная, то достоверно можно определить наличие гидроксильных групп по полосе поглощения  $3400\text{ см}^{-1}$ ; аминных групп по полосе поглощения  $3200\text{ см}^{-1}$ ; алкильных групп, полоса поглощения  $2900\text{ см}^{-1}$  и карбонильных функциональных групп, полоса поглощения  $1740\text{ см}^{-1}$ . Другие сигналы идентифицировать и однозначно отнести к определенным функциональным группам не представляется возможным из-за сложности молекулы. Поэтому ИК-спектроскопия для данной молекулы может быть использована как дополнительная наряду с  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопией.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы определения подлинности даларгина методами ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрии. При сравнительном анализе используемых методов был сделан вывод о том, что наиболее перспективным методом анализа подлинности даларгина является ЯМР-спектроскопия на протонах.

Было предложено использовать  $^1\text{H}$ -ЯМР как для входного контроля качества субстанций, так и при выходном контроле качества готовой лекарственной формы, а так же для анализа содержания уксусной кислоты. ИК-спектроскопия для даларгина может быть использована как дополнительный метод наряду с  $^1\text{H}$ -ЯМР.

Продемонстрированы возможности методов ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии в контроле качества субстанции даларгин по показателям подлинности, содержание основного вещества и примесей. Был сделан вывод о том, что разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект обновленного НД на субстанцию-порошок «Даларгин».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ, 2003. 493 с.
2. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая химия. М.: Мир, 1974. 1133 с.
3. Малышев Ю. П., Чуприн С. В., Долмова К. А. Использование даларгина в анестезиологии. *Вестник интенсивной терапии*. 2012;S5:91–93.
4. Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 502 p.
5. Беккер Ю. Спектроскопия. М.: Техносфера, 2009. 528 с.

## REFERENCES

1. Lebedev A.T. Mass spectrometry in organic chemistry. Moscow, BINOM, 2003. 493 p. (In Russ.).
2. Morrison R., Boyd R. Organic Chemistry. Moscow, Mir, 1974. 1133 p. (In Russ.).
3. Malyshev Yu. P., Chuprin S. V., Dolmova K. A. The use of dalargin in anesthesiology and intensive care. *Vestnik intensivnoj terapii = Annals of critical care*. 2012;S5:91–93. (In Russ.).
4. Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 502 p.
5. Becker Yu. Spectroscopy. Moscow, Tekhnosfera = Technosphaera, 2009. 528 p. (In Russ.).

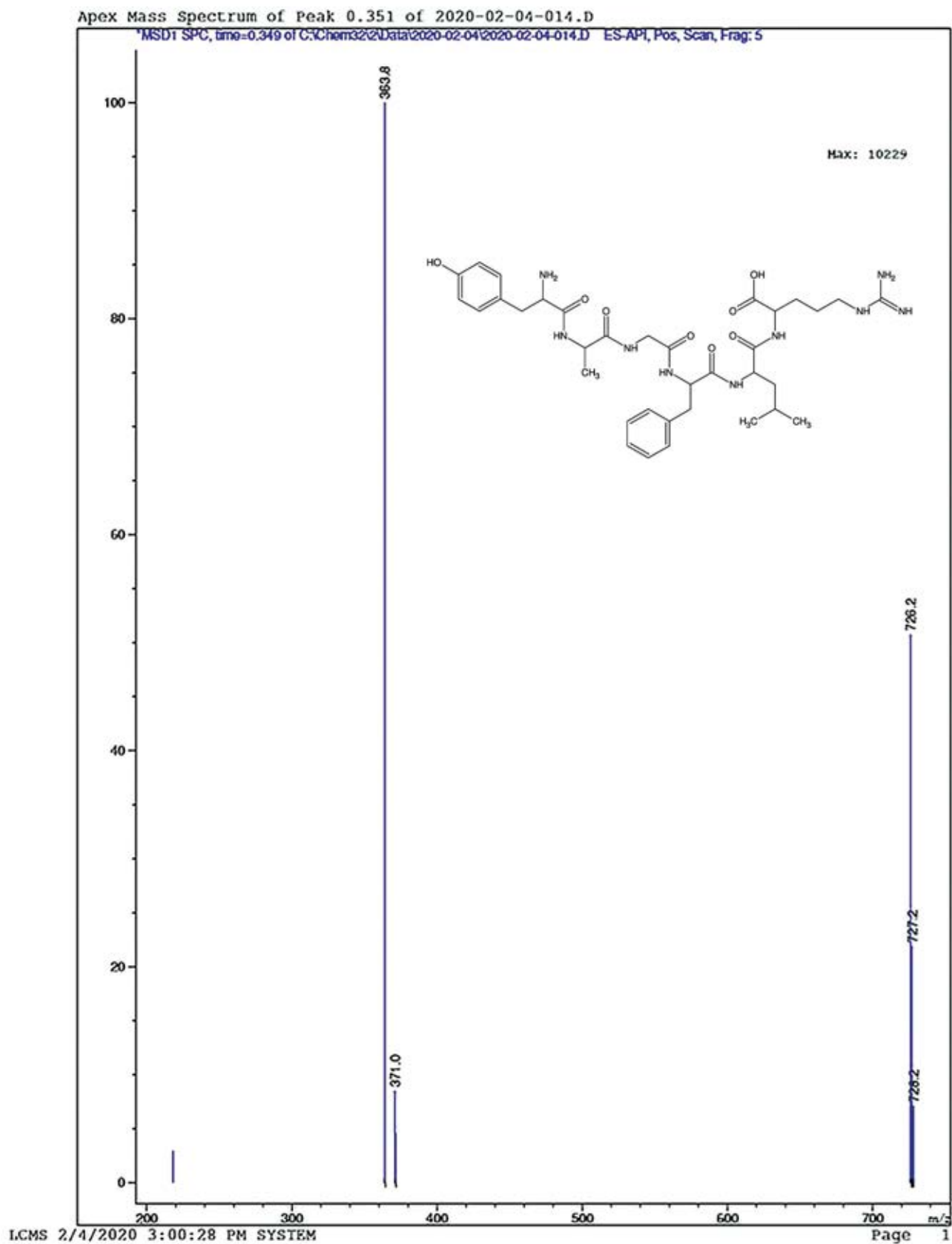


Рисунок 2. Масс-спектр испытуемого образца даларгина, положительный режим ионизации

Figure 2. Mass spectrum of the dalargin test sample, positive ionization mode

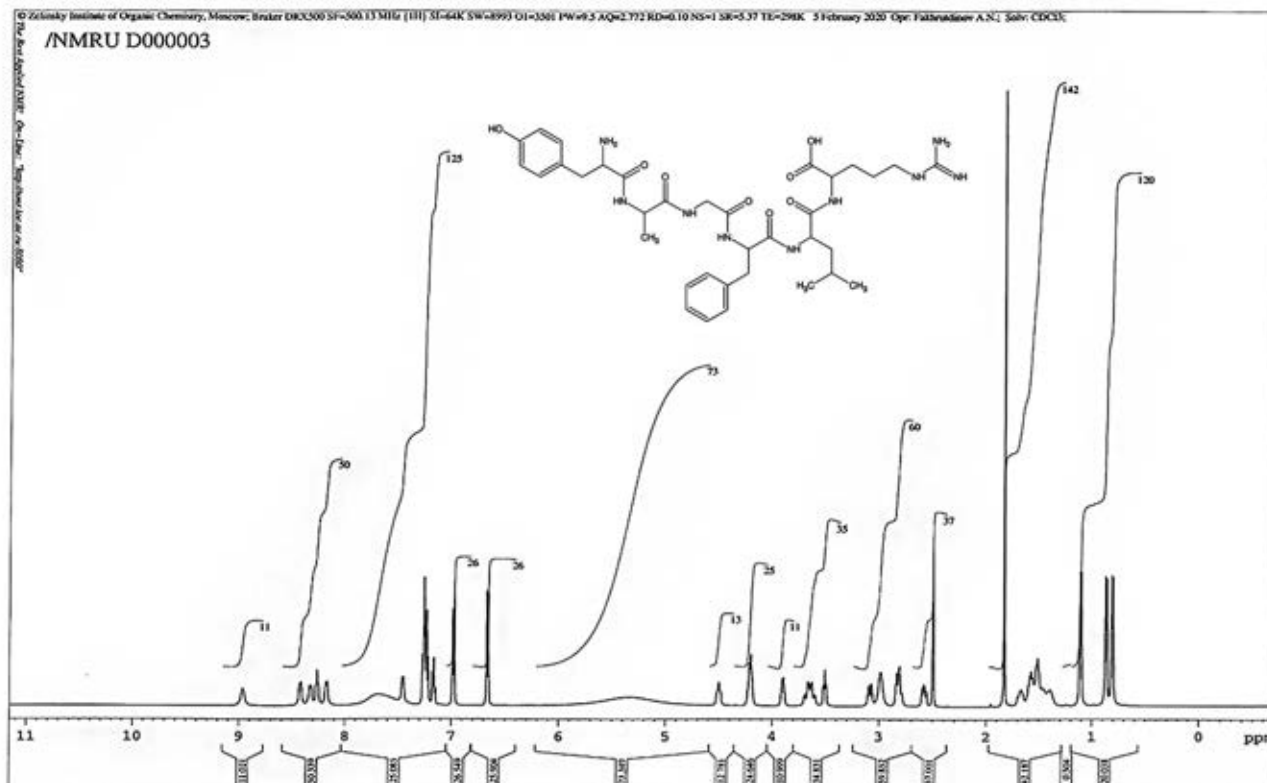


Рисунок 3. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР 500.13 МГц испытуемого образца даларгина в DCCL3

Figure 3. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 500.13 MHz of the dalargin test sample in DCCL3

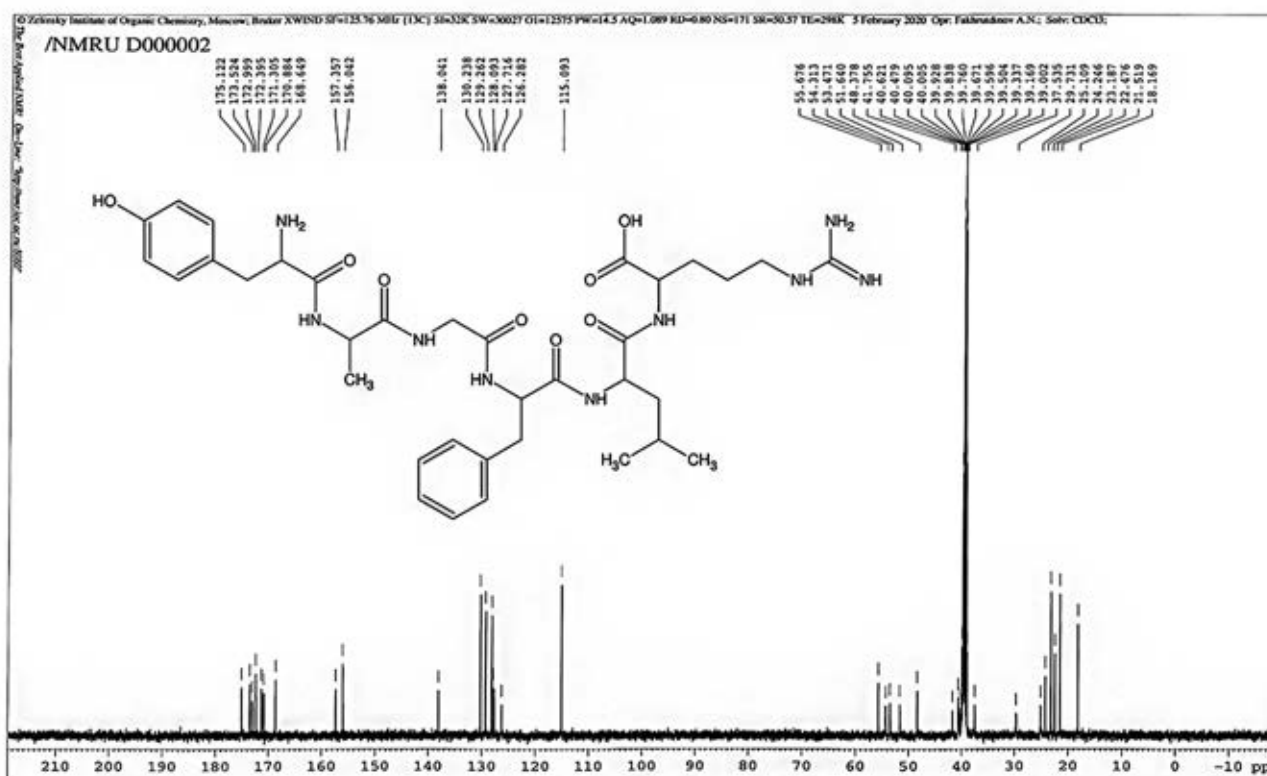


Рисунок 4. Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР 125.6 МГц испытуемого образца даларгина в CDCl3

Figure 4. <sup>13</sup>C NMR spectrum of 125.6 MHz of the test sample of dalargin in CDCl<sub>3</sub>

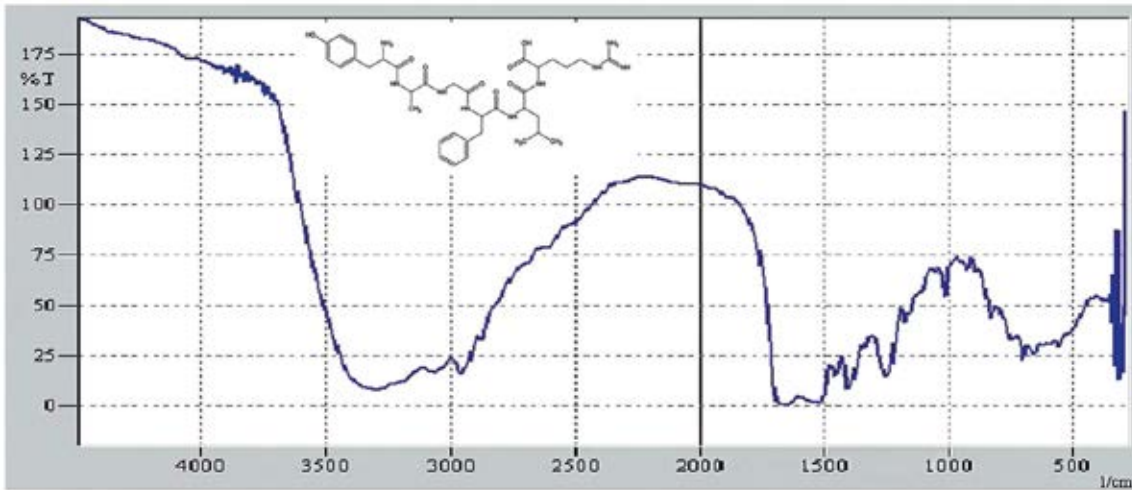


Рисунок 5. ИК-спектр испытуемого образца даларгина в KBr

Figure 5. IR spectrum of the dalargin test sample in KBr



Оригинальная статья/Research article

## Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов

М. А. Джавахян<sup>1</sup>, М. Г. Токарева<sup>1,2\*</sup>, Ю. Э. Прожогина<sup>2</sup>, Е. И. Каленикова<sup>2</sup>

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1  
2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1

\*Контактное лицо: Токарева Мария. E-mail: t-mehri@yandex.ru

ORCID: М. А. Джавахян – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; М. Г. Токаревой – <https://orcid.org/0000-0003-1806-6318>; Ю. Э. Прожогина – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>; Е. И. Калениковой – ORCID: 0000-0003-0068-2788.

Статья поступила: 01.06.2020. Статья принята в печать: 13.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Создание нового седативного препарата растительного происхождения, обладающего минимальным количеством побочного действия, является актуальной задачей современной фармакологии и фармацевтической технологии. Лекарственная форма инновационного лекарственного средства должна учитывать его свойства, обеспечивать эффективность препарата и удобство приема.

**Цель.** Создание твердых желатиновых капсул с растительной композицией – экстрактом сухим – и валидация методик количественного определения суммы флавоноидов для подготовки проекта нормативной документации.

**Материалы и методы.** Изучены физико-химические и технологические свойства разработанного сухого экстракта, а также экспериментальных образцов капсульных масс: потеря в массе при высушивании, насыпной объем и гранулометрический состав, сыпучесть, угол естественного откоса, уплотняемость, и показатели качества полученных капсул (растворимость, распадаемость и т. д.) согласно методикам, описанным в Государственной фармакопее XIV издания. Разработаны методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте и капсулах с помощью дифференциальной спектрофотометрии, которые подверглись валидации.

**Результаты и обсуждение.** При изучении сухого экстракта была установлена его высокая гигроскопичность, ухудшающая технологические свойства и затрудняющая процесс капсулирования. В результате добавления вспомогательных веществ, таких как лактоза безводная и тальк, удалось получить оптимальную для капсулирования массу, которая и послужила основой для создания препарата «Седофлав».

**Заключение.** На основе сухого экстракта растительной композиции разработаны капсулы «Седофлав», произведена их стандартизация. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экспериментальном сухом экстракте и капсулах, произведена их валидация.

**Ключевые слова:** лекарственный растительный препарат, седативное действие, сухой экстракт, капсулы, флавоноиды, валидация методик, дифференциальная спектрофотометрия.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы М. А. Джавахян, М. Г. Токарева и Е. И. Каленикова придумали и разработали эксперимент. Авторы М. Г. Токарева и Ю. Э. Прожогина провели подбор и анализ вспомогательных материалов, выбрали оптимальный состав капсульной массы и исследовали ее технологические характеристики, провели исследования методом дифференциальной спектрофотометрии, участвовали в обработке данных. Автор М. Г. Токарева проводила теоретические расчеты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Джавахян М. А., Токарева М. Г., Прожогина Ю. Э., Каленикова Е. И. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):118–127. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127>

## Pharmaceutical Development of «Sedoflav» Capsules, Standardization and Validation of Flavonoids Assay Methods

Marina A. Dzhavakhyan<sup>1</sup>, Maria G. Tokareva<sup>1,2\*</sup>, Yulia E. Prozhogina<sup>2</sup>, Elena I. Kalenikova<sup>1</sup>

1 – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, 7/1, Green str., Moscow, 117216, Russia  
2 – Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Maria G. Tokareva. E-mail: t-mehri@yandex.ru

ORCID: Marina A. Dzhavakhyan – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Maria G. Tokareva – <https://orcid.org/0000-0003-1806-6318>; Yulia E. Prozhogina – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>; Elena I. Kalenikova – ORCID: 0000-0003-0068-2788.

Received: 01.06.2020. Revised: 13.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Creating a new herbal remedy with a mild generalized effect is an urgent task of modern pharmacology and pharmaceutical technology. The dosage form of an innovative medicinal product should take into account its properties, ensure the effectiveness of the drug and ease of intake.

**Aim.** Creation of hard gelatin capsules with a plant composition-dry extract and validation of methods for quantifying the amount of flavonoids for the preparation of draft regulatory documentation.

© Джавахян М. А., Токарева М. Г., Прожогина Ю. Э., Каленикова Е. И., 2020

© Dzhavakhyan M. A., Tokareva M. G., Prozhogina Yu. E., Kalenikova E. I., 2020

**Materials and methods.** The physicochemical and technological properties of the developed dry extract, as well as experimental capsule masses, such as mass loss during drying, bulk volume and granulometric composition, flowability, angle of natural slope, compaction, and parameters of the obtained capsules (solubility, disintegration, etc.) were studied according to the methods described in the State Pharmacopoeia of the XIV edition. Methods were developed for quantitative determination of flavonoid content in terms of rutin in dry extract and capsules using differential spectrophotometry, which were validated.

**Results and discussion.** During the study of the experimental dry extract, its high hygroscopicity was found, which worsens its technological properties and complicates the encapsulation process. As a result of the addition of auxiliary substances, such as anhydrous lactose and talc, it was possible to obtain an optimal mass for encapsulation, which served as the basis for the creation of the drug «Sedoflav».

**Conclusion.** On the basis of a dry extract of plant composition capsules «Sedoflav» were developed, its standardization was produced. Methods for quantifying the amount of flavonoids in terms of rutin in experimental dry extract and capsules have been developed and validated.

**Keywords:** herbal remedy, sedative effect, dry extract, capsules, flavonoids, validation, differential spectrophotometry. differential spectrophotometry.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors Marina A. Dzhavakhyan, Maria G. Tokareva and Elena I. Kalenikova invented and developed the experiment. Authors Maria G. Tokareva and Yulia E. Prozhogina selected and analyzed auxiliary materials, selected the optimal composition of the capsule mass and studied its technological characteristics, conducted research by differential spectrophotometry, and participated in data processing. The author of Maria G. Tokareva carried out the theoretical calculations. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**For citation:** Dzhavakhyan M. A., Tokareva M. G., Prozhogina Yu. E., Kalenikova E. I. Pharmaceutical development of «Sedoflav» capsules, standardization and validation of flavonoids assay methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):118–127. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127>

## ВВЕДЕНИЕ

Увеличение влияния стрессогенных факторов за последние десять лет приводит к невротическим расстройствам у пациентов значительно чаще, чем ранее [1–5]. С точки зрения ВОЗ (Всемирной организации здравоохранения) сегодня в качестве одного из наиболее приоритетных направлений должна выступать именно охрана психического здоровья людей [6]. Медикаментозное лечение дает возможность устранить нарушения на ранней стадии (не допуская развития более значительных патологий в сфере психического, а затем и физиологического здоровья), а также быстро улучшить состояние и самочувствие человека. При терапии неврозов достаточно высокую эффективность показали седативные средства растительного происхождения, которые, в отличие от синтетических, позволяют проводить лечение длительное время [7]. Одним из показателей, определяющих перспективность их создания, является индекс обновления. Изучение официальных источников информации позволило выявить, что за последние 3 года ассортимент успокаивающих растительных препаратов пополнился лишь пятью новыми наименованиями, индекс обновления ассортимента составил 0,11 [8].

## ЦЕЛЬ

Создание твердых желатиновых капсул с растительной композицией – экстрактом сухим – и валидация методик количественного определения суммы флавоноидов для подготовки проекта нормативной документации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования: растительной композиции экстракт сухой, полученный из растительной композиции, состоящей из травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca*), травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), травы мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis*) и травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*), представляющий собой аморфный гигроскопичный порошок темно-коричневого цвета со специфическим, слегка ароматным запахом, кисло-горького вяжущего вкуса. Содержание суммы флавоноидов в сухом экстракте составляет  $12,5 \pm 0,5$  %. Влажность  $3,6 \pm 0,7$  %.

В качестве вспомогательных веществ использовали: кукурузный крахмал CleanSet 03703 (Cargill, Нидерланды); Эмдекс (JRS Pharma, Германия); лактозу безводную SuperTab 24AN (DFE Pharma, Германия); лактозу 80M (Lactochem Crystals, Нидерланды); микрокристаллическую целлюлозу МКЦ-101; МКЦ-102 (JRS Pharma, Германия); моногидрат  $\alpha$ -лактозы (Acros Organics, Бельгия); моногидратную глюкозу; крахмал; силифицированную микрокристаллическую целлюлозу (PROSOLV® SMCC HD90, JRS Pharma, Германия); кальция стеарат (ООО «ТД «ХИММЕД», Россия).

При получении твердых лекарственных форм необходимым является определение следующих технологических характеристик сухого экстракта, капсульных масс и капсул: потеря в массе при высушивании, насыпной объем и гранулометрический состав, распадаемость, растворение и т. д. Изучение перечисленных показателей проведено согласно требованиям ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при

высушивании», ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков», ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ», ОФС.1.4.1.0005.18 «Капсулы», ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Для определения сыпучести использовали прибор ВП-12А (Мариупольский завод технического оборудования) и тестер для определения сыпучести порошков ERWEKA GTB (ERWEKA GmbH, Германия). Определение насыпного объема, насыпной плотности порошков определяли с помощью прибора – тестера ERWEKA SVM 102 (ERWEKA GmbH, Германия). Потерю в массе при высушивании экстракта сухого и капсульных масс измеряли с помощью прибора Аквилон АВ-50 (ГОСТ-24104-01). Для заполнения капсул использовали устройство капсулозаполняющее механическое (автоматический наполнитель капсул и автоматическая капсульница) фирмы «FETON S.A. International», Бельгия. Тип 100-120. Изучение показателей качества определяли с помощью тестера для определения растворимости ERWEKA DT 128 (Германия), тестера для определения распадаемости ERWEKA ZT 220 (Германия).

Количественное определение содержания суммы фенольных соединений в исследуемых объектах проводили методом дифференциальной спектрофотометрии с комплексообразователем (2 % алюминием хлористым). Регистрацию спектров осуществляли на спектрофотометрах Shimadzu UV-1800 и Cary 100 Scan, со стандартным образцом (СО) рутина (Sigma-Aldrich, кат. номер 207671-50-9 – R5143). В работе также использованы весы аналитические Vibra Shinko Denshi, класс 2, HRT-220CE; весы аналитические AND, класс 2, ER-182A, также использовались реактивы: рутин [Sigma-Aldrich, кат. номер: 153-18-4 ( $\geq 95,0\%$ )]; вода очищенная («Вода очищенная», ФС.2.2.0020.18); спирт этиловый (ГОСТ Р 5962-2013); алюминия хлорид (Panreac, кат. номер: 7784-13-6); кислота уксусная [ГОСТ 61-75 (СТ СЭВ 5375-85)].

*Методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте растительной композиции:*

Аналитическую пробу сухого экстракта, около 0,1 г (точная навеска), в мерной колбе вместимостью 25 мл растворяют в 20 мл спирта этилового 70 %, объём доводят до метки 70 % спиртом этиловым и перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл приливают 1 мл раствора А, 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида и объём доводят до метки 70 % этиловым спиртом (раствор Б). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл приливают 1 мл раствора А, 1 мл 30 % раствора уксусной кислоты и объём доводят до метки этим же спиртом (раствор В). Оптическую плотность раствора Б измеряют через 40 мин на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot A_{1\text{CM}}^{1\%} \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора (раствора А) при длине волны 410 нм;  $A_{1\text{CM}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения комплекса СО рутин с алюминием хлористым при длине волны 410 нм, равный 260;  $m$  – масса сухого экстракта, взятого для анализа, г;  $W$  – влажность сухого экстракта, %.

*Методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в капсулах, содержащих сухой экстракт растительной композиции:*

Аналитическую пробу капсульной массы, около 0,1 г (точная навеска), в мерной колбе вместимостью 25 мл растворяют 20 мл спирта этилового 70 %, объём доводят до метки 70 % спиртом этиловым и перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл приливают 2 мл раствора А, 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида и объём доводят до метки 70 % этиловым спиртом (раствор Б). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл приливают 2 мл раствора А, 1 мл 30 % раствора уксусной кислоты и объём доводят до метки этим же спиртом (раствор В). Оптическую плотность раствора Б измеряют через 40 мин на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мг (X) (в пересчете на 1 капсулу) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 1000}{m \cdot 2 \cdot A_{1\text{CM}}^{1\%} \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора (раствора А) при длине волны 410 нм;  $A_{1\text{CM}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения комплекса СО рутин с алюминием хлористым при длине волны 410 нм, равный 260;  $P$  – средняя масса содержимого капсулы, г;  $m$  – масса капсульной навески, взятой для анализа, г;  $W$  – влажность капсульной массы, %.

Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot A_{1\text{CM}}^{1\%} \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора (раствора А) при длине волны 410 нм;  $A_{1\text{CM}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения комплекса СО рутин с алюминием хлористым при длине волны 410 нм, равный 260;  $m$  – масса капсульной навески, взятой для анализа, г;  $W$  – влажность капсульной массы, %.

Объектом валидации являются методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте растительной композиции, а также капсулах на его основе. Квалификация методик (валидация) проводилась по таким параметрам как: специфичность, линейность, правильность, повторяемость и воспроизводимость.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важнейших критериев выбора вспомогательных веществ при разработке твердых желатиновых капсул, обеспечивающих фармако-технологические свойства лекарственной формы, являются физико-химические свойства субстанции. Как известно, сухой экстракт представляет собой концентрированное извлечение из лекарственного растительного сырья, гигроскопичный порошок с содержанием влаги не более 5%. Соответственно учитывая свойства субстанции и влияние фармацевтических факторов на показатели качества лекарственной формы, необходимо обоснование выбора вспомогательных веществ, обеспечивающих оптимальные характеристики.

Вспомогательные вещества отбирались по влиянию на технологические свойства разработанного сухого экстракта, а именно на сыпучесть и влажность (таблица 1).

По результатам проведенных экспериментов как наиболее оптимальные были отобраны следующие наполнители: лактоза безводная (Supertab), силифицированная микрокристаллическая целлюлоза (PROSOLV® SMCC HD90). Значение влажности экспериментальных образцов лактозы безводной и экстракта сухого в соотношении 1:1 составляет  $3,6 \pm 0,42\%$ , что ниже значения влажности самого экстракта после хранения. Данное обстоятельство можно объяснить низким содержанием влаги и высокой адсорбционной активностью, что позволяет использовать лактозу в качестве наполнителя для гигроскопичных активных субстанций. Добавление же силифицированной микрокристаллической целлюлозы к сухому экстракту увеличивает сыпучесть, но не позволяет избежать увлажнения сухого экстракта (влажность данной композиции в соотношении 1:1 составляет  $5,15 \pm 0,15\%$ ).

Далее, для обоснования выбора первичной упаковки изучены технологические свойства порошков полученных смесей (таблица 2).

Сыпучесть порошков в зависимости от угла естественного откоса оценена для силифицированной микрокристаллической целлюлозы как удовлетворительная, для лактозы безводной – очень хорошая. Таким образом, благодаря высокой адсорбционной активности лактозы безводной и оптимальным технологическим свойствам ее смеси с сухим экстрактом в качестве наполнителя выбрана лактоза безводная в соотношении 1:1.

**Таблица 1. Состав и технологические свойства различных капсульных смесей**

**Table 1. Composition and technological properties of various capsule mixtures**

Субстанция Substance	Соотношение сухой экстракт : наполнитель The ratio of dry extract to filler	Влажность, % Wetness, %	Сыпучесть, г/с Flowability, g/s
Экстракт Extract	-	$4,15 \pm 0,22$	$1,13 \pm 0,15$
Декстроза Dextrose	1:1	$5,25 \pm 0,31$	$1,22 \pm 0,11$
	1:2	$4,12 \pm 0,13$	$1,32 \pm 0,11$
Крахмал Starch	1:2	$10,1 \pm 0,22$	$1,35 \pm 0,05$
Лактоза безводная (Supertab) Lactose Anhydrous (Supertab)	1:1	$3,62 \pm 0,41$	$1,81 \pm 0,12$
	1:2	$4,15 \pm 0,52$	$1,83 \pm 0,06$
PROSOLV® SMCC HD90 (силифицированная микрокристаллическая целлюлоза) PROSOLV® SMCC HD90	1:1	$5,15 \pm 0,15$	$1,53 \pm 0,05$
	1:2	$8,15 \pm 0,32$	$1,59 \pm 0,12$
Лактозы моногидрат (Lactochem) Lactose Monohydrate (Lactochem)	1:2	$3,71 \pm 0,23$	$1,36 \pm 0,08$
МКЦ 101 Microcrystalline cellulose 101	1:1	$8,75 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,12$
	1:2	$5,75 \pm 0,21$	$1,79 \pm 0,11$
МКЦ 102 Microcrystalline cellulose 102	1:1	$8,92 \pm 0,42$	$1,80 \pm 0,13$
	1:2	$5,91 \pm 0,31$	$1,86 \pm 0,05$
Лактоза Lactose	1:1	$8,25 \pm 0,11$	$1,78 \pm 0,04$
	1:2	$9,11 \pm 0,12$	$1,80 \pm 0,03$

Учитывая гигроскопичность субстанции, необходимо предусмотреть возможность поглощения влаги при увеличении площади поверхности контакта с окружающей средой на стадии наполнения капсул, что ведет к ухудшению сыпучести, прилипанию к оборудованию и др. [9] Для обеспечения равномерной сыпучести порошка проведен выбор скользящих веществ, которые, закрепляясь на поверхности частиц (гранул), устраняют их шероховатость и тем самым повышают их текучесть [10]. В качестве потенциальных скользящих веществ рассмотрены тальк, магния стеарат и аэросил А-380. Их добавляли в количестве 0,5% от капсульной массы согласно требованиям нормативной документации. Затем измеряли такие технологические свойства полученной капсульной смеси, как способность к уплотнению, сыпучесть и угол естественного откоса (таблица 3).

Результаты изучения технологических характеристик капсульных масс с различными скользящими веществами указывают на то, что все эксперименталь-

Таблица 2. Технологические свойства капсульных смесей

Table 2. The technological properties of the capsule mixtures

Состав Composition	Сыпучесть, г/с Flowability, g/s	Угол естественного откоса Angle of repose	Уплотняемость Compactibility			
			Способность к уплотнению ( $V_{10} - V_{500}$ ), мл Sealability ( $V_{10} - V_{500}$ ), ml	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup> Bulk density, g/cm <sup>3</sup>		Коэффициент прессуемости* Compressibility factor*
				До уплотнения Before sealing	После уплотнения After sealing	
Лактоза безводная (Supertab) : сухой экстракт 1:1 Lactose Anhydrous (Supertab): dry extract 1:1	1,81 ± 0,12	37°	3	0,554 ± 0,12	0,715 ± 0,13	0,225 ± 0,12
PROSOLV® SMCC HD90 : сухой экстракт 1:1 PROSOLV® SMCC HD90 : dry extract 1:1	1,53 ± 0,13	42°	2,5	0,649 ± 0,11	0,812 ± 0,12	0,215 ± 0,11

Примечание:  $*k = \frac{V_0 - V_{1250}}{V_0}$ .

Таблица 3. Технологические свойства капсульной массы в зависимости от добавленного скользящего вещества

Table 3. Technological properties of the capsule mass depending on the added glidant

Скользящее вещество Lubricant	Сыпучесть, г/с Flowability, g/s	Угол естественного откоса Angle of repose	Уплотняемость Compactibility			
			Способность к уплотнению ( $V_{10} - V_{500}$ ), мл Sealability ( $V_{10} - V_{500}$ ), ml	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup> Bulk density, g/cm <sup>3</sup>		Коэффициент прессуемости* Compressibility factor*
				До уплотнения Before sealing	После уплотнения After sealing	
Тальк Talcum	3,84 ± 0,06	33,6°	2,1	0,561 ± 0,11	0,730 ± 0,13	0,25 ± 0,12
Магния стеарат Magnesium stearate	3,52 ± 0,05	34,6°	2,0	0,535 ± 0,12	0,701 ± 0,13	0,25 ± 0,12
Аэросил А-380 Aerosil А-380	3,73 ± 0,03	35,3°	1,5	0,510 ± 0,12	0,676 ± 0,12	0,22 ± 0,11

Примечание:  $*k = \frac{V_0 - V_{1250}}{V_0}$ .

ные образцы обладают хорошей сыпучестью. Однако наиболее высокие технологические характеристики смеси придает тальк, что позволило ввести его в состав капсульной массы.

В отделе медицины ФГБНУ ВИЛАР была установлена суточная доза изучаемого сухого экстракта – 0,7 г (или 1,4 г капсульной массы), которую оптимально разделить на 3 приема. Тогда масса смеси для заполнения капсулы с учетом разовой дозы составляет 0,47 мг (таблица 4).

Наиболее перспективными с точки зрения технологического процесса являются твердые желатиновые капсулы, так как комплексы некоторых БАВ, входящих в состав сухих экстрактов, подвергаясь механическому воздействию, сопровождающемуся при таблетировании увеличением температуры, способны разрушаться. Наполнение капсул зависит от их размера. Учитывая значения насыпной плотности полученной капсульной массы (0,73 г/см<sup>3</sup>) и разовую дозу препарата «Седофлав», были выбраны капсулы желатиновые твердые № 0 (состав капсул: титана диоксид 2 %, желатин до 100 %) номинального объема 0,68 мл.

Таблица 4. Состав на одну твердую желатиновую капсулу

Table 4. The composition of one hard gelatin capsule

Компонент Component	Масса компонентов, мг Component Weight, mg	Содержание компонентов в одной капсуле, % The content of components in one capsule, %
Сухой экстракт растительной композиции Dry extract	234,0	49,75
Лактоза безводная (Supertab) Lactose Anhydrous (Supertab)	234,0	49,75
Тальк Talcum	2,4	0,5
<b>Общая масса: Total weight:</b>	470,4	100,0

### Стандартизация твердых желатиновых капсул

Стандартизацию капсул проводили согласно ГФ XIV издания, ОФС.1.4.1.0005.18 «Капсулы» по следующим показателям: средняя масса, однородность дозирования, распадаемость и растворение.

Получены капсулы твердые желатиновые, размер № 0, цилиндрической формы, корпус и крышечка белого цвета, непрозрачные.

Средняя масса капсул – 560 мг ± 7,5 %. Время распадаемости – 7 минут. Количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения (воду очищенную), имеющую температуру (37 ± 0,5) °С, в течение 45 мин при скорости вращения корзинки 100 об/мин, составило 87 %. Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) в одной капсуле составляет от 27,8 до 29,0 мг, считая на среднюю массу содержимого одной капсулы. Полученные результаты соответствуют требованиям ОФС «Капсулы» ГФ XIV издания.

### Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сухом экстракте растительной композиции и в капсульной массе

#### Результаты испытания

**Специфичность.** Дифференциальный УФ-спектр суммы флавоноидов сухого экстракта в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм (рисунок 1) имеет максимум поглощения при длине волны 411,1 нм, капсульной массы – 412,1 нм, что соответствует максимуму поглощения дифференциального спектра раствора

стандартного образца рутина, наблюдаемому при длине волны 410 ± 2 нм.

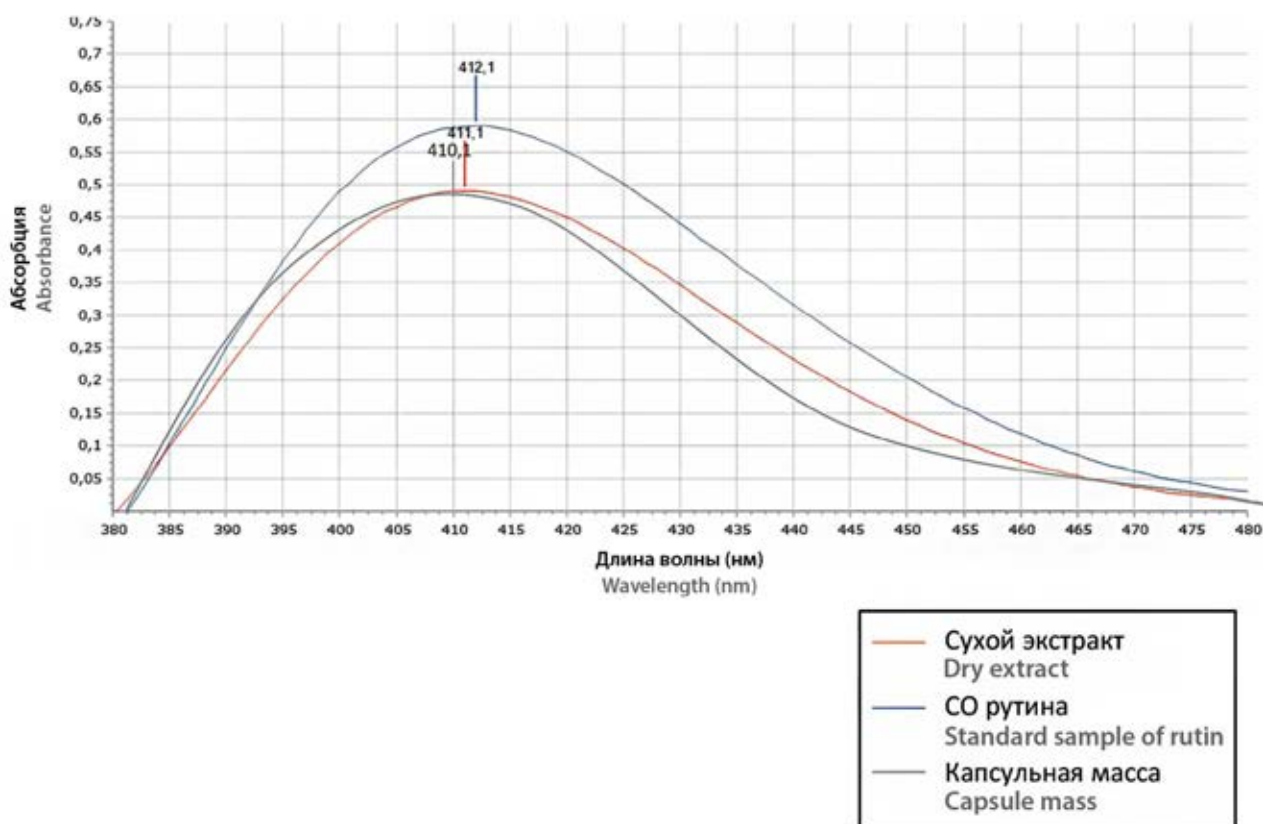
**Контроль линейности методик.** Критерий приемлемости: методика считается линейной, если коэффициент корреляции ( $R^2$ ) между рядом полученных значений будет не ниже 0,99.

Определение линейности проводили на 7 уровнях концентрации: 40 %, 65 %, 75 %, 90 %, 115 %, 130 % и 140 % теоретического содержания суммы фенольных соединений в пересчете на рутин (в диапазоне 6,2–31,8 мкг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,9937, что соответствует критерию приемлемости линейности (не ниже 0,99) (таблица 5).

Коэффициент корреляции составил 0,9937, что соответствует критерию приемлемости линейности (рисунок 2)

**Правильность методик.** Правильность методик оценивали на модельных смесях сухого экстракта и содержимого капсул с добавлением СО рутина 25, 50 и 75 %, к исходной концентрации фенольных соединений в пересчете на рутин в испытуемом растворе (таблицы 6 и 7).

Показано, что для сухого экстракта процент восстановления находится в пределах от 96,33 до 102,72 % и имеет среднее значение 99,6 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости (от 98 до 102 %).



**Рисунок 1.** Дифференциальные УФ-спектры изучаемых сухого экстракта и капсульной массы с алюминия хлоридом и СО рутина с алюминия хлоридом

**Figure 1.** Differential UV-spectra of the studied dry extract and capsule mass with aluminum chloride and standard sample of rutin with aluminum chloride

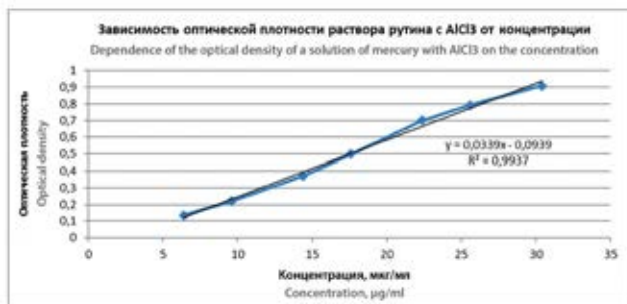


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности раствора рутина в комплексе с  $AlCl_3$  от его концентрации

Figure 2. Dependence of the optical density of rutin solution in complex with  $AlCl_3$  on its concentration

Таблица 5. Результаты испытания линейности методики

Table 5. Results of testing the linearity of the method

№ измерения № measurement	Содержание, % от нормируемого значения (около) Content, % of the normalized value	Объем аликвоты р-ра СО (рутин), мл The volume of aliquots of the solution of rutin, ml	Концентрация СО (рутин), мкг/мл Concentration of rutin, mcg/ml	Аналитический отклик (оптическая плотность) Analytical response (optical density)
1	40	0,4	6,40	0,135
2	60	0,6	9,60	0,219
3	90	0,9	14,40	0,371
4	110	1,1	17,60	0,5
5	140	1,4	22,40	0,701
6	160	1,6	25,60	0,793
7	190	1,9	30,40	0,908

Таблица 6. Результаты испытания правильности методики для сухого экстракта

Table 6. Results of testing the adequacy of technique for dry extract

№ п/п №	Найдено, мг/мл Found, mg/ml	Добавлено СО, мг/мл Added rutin, mg/ml	Ожидаемое значение, мг/мл Expected value, mg/ml	Полученное значение, мг/мл Resulting value, mg/ml	Абсолютная ошибка, мг/мл Absolute error, mg/ml	Выход, % Output, %
1.1	126,36	31,59	157,95	159,50	-1,55	100,98
2.1	126,36	63,18	189,54	194,70	-5,16	102,72
3.1	126,36	94,77	221,13	218,81	2,32	98,95
1.2	126,36	31,59	157,95	155,24	2,71	98,29
2.2	126,36	63,18	189,54	182,58	6,96	96,33
3.2	126,36	94,77	221,13	225,90	-4,77	102,16
1.3	126,36	31,59	157,95	154,98	2,97	98,12
2.3	126,36	63,18	189,54	189,80	-0,26	100,14
3.3	126,36	94,77	221,13	218,94	2,19	99,01
Среднее значение выхода, % The average value of the output, %					99,6	

Таблица 7. Результаты испытания правильности методики для капсульной массы

Table 7. Results of testing the adequacy of technique for capsule mass

№ п/п №	Найдено, мг/мл Found, mg/ml	Добавлено СО, мг/мл Added rutin, mg/ml	Ожидаемое значение, мг/мл Expected value, mg/ml	Полученное значение, мг/мл Resulting value, mg/ml	Абсолютная ошибка, мг/мл Absolute error, mg/ml	Выход, % Output, %
1.1	61,68	15,42	77,10	73,34	3,76	95,12
2.1	61,68	30,84	92,53	89,47	3,05	96,70
3.1	61,68	46,26	107,95	111,40	-3,46	103,20
1.2	61,68	15,42	77,10	77,62	-0,52	100,67
2.2	61,68	30,84	92,53	91,29	1,24	98,66
3.2	61,68	46,26	107,95	112,95	-5,00	104,64
1.3	61,68	15,42	77,10	75,94	1,16	98,50
2.3	61,68	30,84	92,53	93,09	-0,57	100,61
3.3	61,68	46,26	107,95	104,44	3,51	96,75
Среднее значение выхода, % The average value of the output, %					99,43	

Показано, что для капсульной массы процент восстановления находится в пределах от 95,12 до 104,64 % и имеет среднее значение 99,43 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости (от 98 до 102 %).

Сходимость методик. Оценку сходимости методики проводили на одном образце в 6 повторностях. Результаты представлены в таблицах 8 и 9. Критерий приемлемости: коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений должен быть не более 5 %.

Таблица 8. Результаты испытания сходимости для сухого экстракта

Table 8. Results of testing the repeatability of technique for dry extract

№ испытания № of trial	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, % The content of flavonoids in terms of rutin in the analyte, %
1	12,62
2	12,54
3	12,27
4	12,89
5	12,78
6	12,60
Среднее значение содержания, % Average content value, %	12,62
S, % (единица измерения испытаний) S, % (unit of measurement for tests)	0,213
CV, %	1,69
ε, %	1,8

Коэффициент вариации для 6 измерений образцов сухого экстракта имеет значение 1,69 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

**Таблица 9. Результаты испытания сходимости для капсульной массы**

**Table 9. Results of testing the repeatability of technique for capsule mass**

№ испытания № of trial	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, % The content of flavonoids in terms of rutin in the analyte, %
1	6,08
2	6,17
3	6,06
4	6,16
5	5,87
6	5,96
Среднее значение содержания, % Average content value, %	6,05
S, % (единица измерения испытаний) S, % (unit of measurement for tests)	0,117
CV, %	1,93
ε, %	2,0

Коэффициент вариации для 6 измерений образцов капсульной массы имеет значение 1,93 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

**Воспроизводимость методик.** Определение внутрилабораторной воспроизводимости методик проводили 2 аналитика на 3 образцах сухого экстракта растительной композиции и капсульной массы в 3 повторностях каждый, приготовленных независимо друг от друга. Результаты испытаний представлены в таблицах 10 и 11.

Полученные значения коэффициента вариации при измерении образцов сухого экстракта и капсульной массы не превышают 10 %, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ( $F < F_{\text{табл.}}$ ), что позволяет считать внутрилабораторную воспроизводимость результатов приемлемой.

### Заключение по валидации

Полученные экспериментальные данные позволяют оценить методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте растительной композиции и в капсульной массе на его основе положительно по параметрам:

- контроль специфичности методик (совпадение максимумов поглощения при длине волны  $410 \pm 2$  нм);
- контроль линейности методик (коэффициент корреляции 0,9937);

- контроль правильности (точности) методик (диапазон процента восстановления – от 96,33 до 102,72 % для методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте и от 95,12 до 104,64 % в капсульной массе);
- контроль внутрилабораторной прецизионности методик:
  - 1) сходимость методик (коэффициент вариации 1,69 % для методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте и 1,93 % – в капсульной массе);
  - 2) воспроизводимость методик (коэффициенты вариации внутрилабораторной воспроизводимости не превышают 10 %) (таблица 12).

**Таблица 10. Результаты испытания воспроизводимости для сухого экстракта**

**Table 10. Results of testing the reproducibility of technique for dry extract**

	Аналитик 1 Analyst 1	Аналитик 2 Analyst 2
Образец Sample	День 1 Day 1	День 2 Day 2
1	12,62	12,94
2	12,41	12,36
3	12,01	12,57
4	12,46	12,17
5	12,43	12,51
6	12,30	12,57
7	12,94	12,75
8	12,75	12,72
9	12,59	12,65
Среднее содержание рутина, % Average content of rutin, %	12,50	12,58
S, %	0,2663	0,2248
CV, %	2,13	1,79
D	0,07093504	0,05054896
Критерий Фишера F (95 %, $f_1 = 8, f_2 = 8$ ) = 3,44 The Fisher Criterion F (95 %, $f_1 = 8, f_2 = 8$ ) = 3,44	1,40	

### Выводы по результатам валидации

Разработаны методики определения количественного содержания действующих веществ в сухом экстракте растительной композиции, а также в капсулах на его основе. Установлены параметры специфичности, правильности, повторяемости, воспроизводимости и линейности разработанных методик.

**Таблица 11.** Результаты испытания воспроизводимости для капсульной массы

**Table 11.** Results of testing the reproducibility of technique for capsule mass

	Аналитик 1 Analyst 1	Аналитик 2 Analyst 2
Образец Sample	День 1 Day 1	День 2 Day 2
1	6,17	6,16
2	5,94	5,98
3	6,02	5,85
4	5,82	6,09
5	5,79	6,11
6	6,11	6,14
7	6,08	6,18
8	6,13	6,06
9	5,91	5,75
Среднее содержание рутина, % Average content of rutin, %	6,00	6,04
S, %	0,1382	0,1481
CV, %	2,30	2,45
D	0,0191	0,021927778
Критерий Фишера F (95 %, $f_1 = 8, f_2 = 8$ ) = 3,44 The Fisher Criterion F (95 %, $f_1 = 8, f_2 = 8$ ) = 3,44	0,87	

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение технологических характеристик субстанции, наполнителей и скользящих веществ позволило разработать оптимальный состав лекарст-

венной формы. При сравнительном изучении субстанций установлено, что лактоза безводная в соотношении 1:1 обладает выраженной адсорбционной активностью и предотвращает отсыревание смеси с последующим образованием крупных частиц. На основании данных, полученных в результате изучения физико-химических и технологических свойств сухого экстракта, обоснован выбор вспомогательных веществ, обеспечивающих показатели качества, регламентированные требованиями ГФ РФ «Капсулы»: распадаемость – 7 минут; количество действующего вещества, высвободившегося в среду раствора (воду очищенную), имеющую температуру  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , в течение 45 мин при скорости вращения корзинки 100 об/мин – 87 %; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – от 27,8 до 29,0 мг, средняя масса – 470 мг, отклонение в средней массе  $\pm 7,5$  %. Полученные в результате валидационной оценки методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте растительной композиции и в капсулах дают возможность считать их пригодными для достоверного количественного определения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tresserras-Gaju R., Medina-Bustos A., Mompert-Penina A. et al. Individual and population-based risk in mental health in Catalonia, Spain. *Medicina Clínica*. 2011;137:16–21.
2. Wittchen H. U., Jacobi F., Rehm J. et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*. 2011;21(9):655–679.

**Таблица 12.** Результаты валидационной оценки методик спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин

**Table 12.** Results of validation of methods for spectrophotometric determination of the flavonoids amount in terms of rutin

Параметр Parameter	Критерий валидности Criterion validity	Сухой экстракт Dry extract	Капсульная масса Capsule mass
Специфичность Specificity	Стандартный образец рутина Standard sample of rutin	Специфична Specific	Специфична Specific
Сходимость Repeatability	Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений $CV \leq 5$ % Coefficient of variation of parallel definitions for 6 measurements $CV \leq 5$ %	CV = 1,69 %	CV = 1,93 %
Воспроизводимость Reproducibility	$CV < 10$ % $t_{\text{табл.}} \geq t_{\text{выч.}}$ $CV < 10$ % $t_{\text{табл.}} \geq t_{\text{calculated}}$	$CV_1 = 2,13$ % $CV_2 = 1,79$ % $t_{\text{выч.}} = 1,4$ $(t_{\text{табл.}} = 3,44)$ $n = 9$ $CV_1 = 2,13$ % $CV_2 = 1,79$ % $t_{\text{calc}} = 1.4$ $(t_{\text{табл.}} = 3.44)$ $n = 9$	$CV_1 = 2,30$ % $CV_2 = 2,45$ % $t_{\text{выч.}} = 0,87$ $(t_{\text{табл.}} = 3,44)$ $n = 9$ $CV_1 = 2,30$ % $CV_2 = 2,45$ % $t_{\text{calc}} = 0,87$ $(t_{\text{табл.}} = 3,44)$ $n = 9$
Линейность Linearity	$R^2 \geq 0,99$	$R^2 = 0,9937$ ; $y = 0,0339x - 0,0939$	
Правильность (точность) Accuracy	Процент восстановления $R \in [95,0 \text{ \%}; 105,0 \text{ \%}]$ Recovery percentage $R \in [95.0 \text{ \%}; 105.0 \text{ \%}]$	$R \in [96,33 \text{ \%}; 102,72 \text{ \%}]$	$R \in [95,12 \text{ \%}; 104,64 \text{ \%}]$

3. Kessler R. C., Wang P. S. The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annual Review of Public Health*. 2008;29:115–129.
4. Вознесенская Т. Г. Эмоциональный стресс и профилактика его последствий. *Русский медицинский журнал*. 2006;14(9):694–697.
5. Митихина И. А., Митихин В. Г., Ястребов В. С., Лиманкин О. В. Психическое здоровье населения мира: эпидемиологический аспект (зарубежные исследования 2000–2010 гг.). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2011;111(6):4–14.
6. World Health Organization. Comprehensive Mental Health Action Plan 2013–2020. Geneva: *World Health Organization*, 2013. 48 p.
7. Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганапольский В. П., Ятманов А. Н., Шабанов П. Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):56–63.
8. Токарева М. Г., Прожогина Ю. Э., Каленикова Е. И., Джавахян М. А. Анализ ассортимента российского рынка лекарственных растительных препаратов седативного действия. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2019;24(2):4–19.
9. Chu K. K., Chow A. H. Impact of carbohydrate constituents on moistures or ption of herbal extracts. *Pharmaceutical Research*. 2000;17:1133–1137.
10. Jadhav N. R., Paradkar A. R., Salunkhe N. H., Karade R. S., Mane G. G. Talc: a versatile pharmaceutical excipient. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2013;2(6):4639–4660.
2. Wittchen H. U., Jacobi F., Rehm J. et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*. 2011;21(9):655–679.
3. Kessler R. C., Wang P. S. The descriptive epidemiology of commonly occurring mental disorders in the United States. *Annual Review of Public Health*. 2008;29:115–129.
4. Voznesenskaya T. G. Emotional stress and prevention of its consequences. *Russkij medicinskij zhurnal*. 2006;14(9):694–697. (In Russ.).
5. Mitikhina I. A., Mitikhin V. G., Iasterbov V. S., Limankin O. V. Mental health of the world population: epidemiological aspects (the analysis of foreign research results for 2000-2010). *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2011;111(6):4–14. (In Russ.).
6. World Health Organization. Comprehensive Mental Health Action Plan 2013–2020. Geneva: *World Health Organization*, 2013. 48 p.
7. Sambukova T. V., Ovchinnikov B. V., Ganapolsky V. P., Yatmanov A. N., Shabanov P. D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(2):56–63. (In Russ.).
8. Tokareva M. G., Prozhogina Y. E., Kalenikova E. I., Dzhavakhyan M. A. The analysis of modernrussian market of sedative herbal medicines. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennyh sredstv = Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issues*. 2019;24(2):4–19. (In Russ.).
9. Chu K. K., Chow A. H. Impact of carbohydrate constituents on moistures or ption of herbal extracts. *Pharmaceutical Research*. 2000;17:1133–1137.
10. Jadhav N. R., Paradkar A. R., Salunkhe N. H., Karade R. S., Mane G. G. Talc: a versatile pharmaceutical excipient. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2013;2(6):4639–4660.

## REFERENCES

1. Tresserras-Gaju R., Medina-Bustos A., Mompert-Penina A. et al. Individual and population-based risk in mental health in Catalonia, Spain. *Medicina Clínica*. 2011;137:16–21.

# XV АПТЕЧНЫЙ САММИТ

## «Новая аптечная реальность в России и СНГ»

15 сентября 2020 г., Radisson Collection Hotel, Москва

### ГЛАВНЫЕ ВОПРОСЫ:

#### ХРОНИКИ ВЫЖИВШИХ.

Выйти из штопора и выжить в кризис. Как преодолели разрыв кэш-флоу? Как ситуация сказалась на среднем чеке? Платежеспособность граждан: есть ли деньги? Как выстроить отношения с банком? Как обслуживать долги? Можно ли сгладить неприятные последствия кризиса?

#### ПРАВО НА ЖИЗНЬ ДЛЯ МАЛОГО И СРЕДНЕГО БИЗНЕСА:

новая череда слияний и поглощений? Пути развития — объединение с глобалистами или собственный частный опыт?

#### НОВЫЙ АПТЕЧНЫЙ АССОРТИМЕНТ:

чему нас научила самоизоляция? Будет ли пересмотр формата и ассортимента? Ждать ли сокращений на полках БАД и косметики? Что останется на полках для гарантии продаж, а что будет вымыто?

#### ПЛАН Б И ПАРТНЕРСТВО С ДИСТРИБУТОРАМИ:

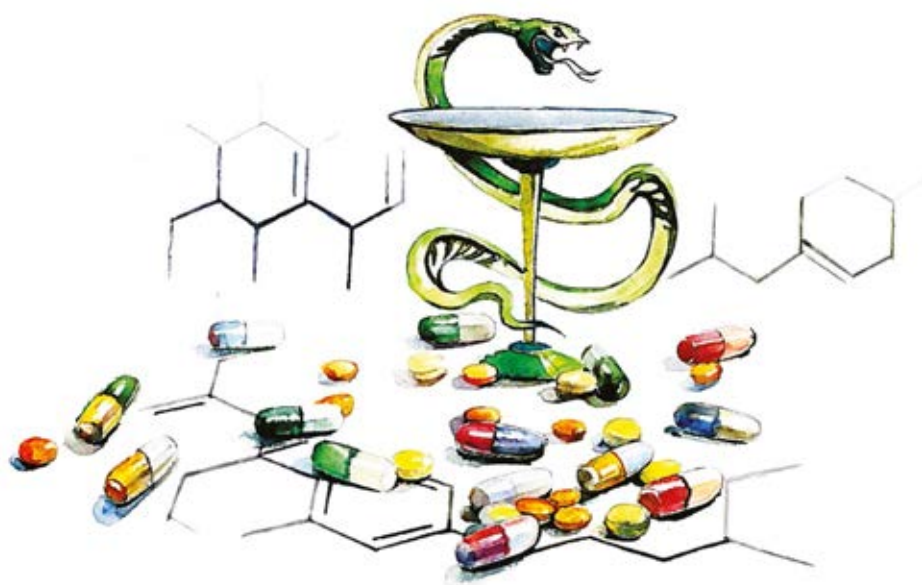
жесткий контроль товарного запаса, адекватность закупок, условия отгрузки, контроль ценообразования — что изменилось?

#### ШАГ НАВСТРЕЧУ:

повышение лояльности покупателей. Дилемма сервиса: клиент всегда прав! Сотрудник всегда не прав?

#### ПРЕОДОЛЕВАЯ ДИСТАНЦИЮ.

Переосмысление аптек: кто мы сегодня? Аптека — место скорби и/или пункт выдачи заказов агрегаторов? Первые результаты работы дистанционной торговли.



Регистрация на сайте: [infor-media.ru](http://infor-media.ru)

Подробности по тел. +7 495 995-80-04 и по e-mail [e.pronenko@infor-media.ru](mailto:e.pronenko@infor-media.ru)

реклама

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>  
УДК 543.544; 615.074



Обзорная статья/Review article

## Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор)

Н. А. Эпштейн<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Департамент регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, д. 13А

\*Контактное лицо: Эпштейн Наум Аронович. E-mail: [naumepshtein@gmail.com](mailto:naumepshtein@gmail.com)

ORCID: Н. А. Эпштейн – <https://orcid.org/0000-0001-8047-4078>.

Статья поступила: 23.06.2020. Статья принята в печать: 09.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** При разработке и валидации методик определения примесей важно тестировать спектральную чистоту пиков (SPP) основных веществ с помощью диодно-матричных детекторов (DAD).

**Текст.** Подчеркнуто, что задачей тестирования SPP является обнаружение незаметных коэлюирующих примесей под пиком основного вещества, а не контроль абсолютной чистоты пика. Тестирование SPP снижает риск получения недостаточно специфичной методики. В связи с этим рассмотрены основные критерии и ключевые моменты для оценки спектральной чистоты пиков при использовании компьютерных программ хроматографов Agilent, Shimadzu и Waters.

**Заключение.** Даны рекомендации, которые следует учитывать для корректной оценки спектральной чистоты пиков при разработке хроматографических методик и валидации их специфичности.

**Ключевые слова:** чистота пика, диодно-матричный детектор, жидкостная хроматография, примеси, Agilent, Shimadzu, Waters.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Автор участвовал в сборе информации, её анализе и в написании текста статьи.

**Для цитирования:** Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>

## Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review)

Naum A. Epshtein<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Department of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky proezd, Moscow, 115446, Russia

\*Corresponding author: Naum A. Epshtein. E-mail: [naumepshtein@gmail.com](mailto:naumepshtein@gmail.com)

ORCID: Naum A. Epshtein – <https://orcid.org/0000-0001-8047-4078>.

Received: 23.06.2020. Revised: 09.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** When developing and validating methods of impurity determination, it is important to test the spectral peak purity (SPP) of the main substances using diode array detectors (DAD).

**Text.** It is emphasized that the task of testing SPP is to detect invisible coeluting impurities under the peak of the main substance, and not the control the absolute purity of the peak. SPP testing reduces the risk of getting non enough specific methods. In this regard, we considered the main criteria and key points for assessing the spectral purity of peaks when using computer programs of Agilent's, Shimadzu's, and Waters's chromatographs.

**Conclusion.** Recommendations are given, which should be taken into account for the correct assessment of spectral purity of peaks during development of chromatographic methods and validation of their specificity.

**Keywords:** peak purity, diode array detector, liquid chromatography, impurities., Agilent, Shimadzu, Waters.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** The author participated in the collection of information, its analysis and in writing the text of the article.

**For citation:** Epshtein N. A. Validation of chromatographic methods: checking the peak purity and the specificity of methods with diode array detectors. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>

## ВВЕДЕНИЕ

При валидации хроматографических методик рекомендуется для подтверждения их специфичности оценивать чистоту хроматографических пиков веществ [1–3]. В руководстве по валидации ЕАЭС говорится: «Для доказательства соответствия пика определяемого вещества только одному компоненту целесообразно провести исследования на чистоту пиков (например, использование диодно-матричного детектирования, масс-спектрометрии)» [3]. Известно, что для оценки чистоты хроматографических пиков наиболее подходят хромато-масс-спектрометрические детекторы [4–6] и ЯМР [7], особенно при их одновременном использовании. При этом могут применяться методы двумерной и препаративной хроматографии [8, 9]. Для таких исследований требуются значительные затраты финансов и времени. Поэтому они используются редко преимущественно при разработке методик анализа новых фармацевтических субстанций. В то же время при разработке и валидации методик анализа лекарственных препаратов и известных фармацевтических субстанций часто проводят оценку спектральной чистоты пиков [10–17]. Для этого применяют диодно-матричные детекторы (DAD). Они широко распространены и дают возможность быстро получать и оценивать подобие спектров в точках пика в заданном диапазоне длин волн. С теоретической точки зрения пик, у которого спектры подобны во всех точках является спектрально чистым. Нарушение подобия спектров, то есть спектральной чистоты пика используется как индикатор наличия примеси (примесей).

Для обычного пользователя компьютерная оценка спектральной чистоты пиков является «черным ящиком», к которому прикладываются определенные общие указания с необходимыми действиями. Однако без знания ключевых моментов даже строгое соблюдение этих действий может приводить как к ложно положительным, так и к ложно отрицательным выводам о коэлюирующихся примесях под пиком основного вещества. Целью статьи является:

- рассмотрение ключевых моментов, знание которых необходимо для корректной оценки спектральной чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов;
- представление рекомендаций по оценке и критериям чистоты пиков для хроматографов Agilent, Waters и Shimadzu.

В литературе имеются справедливые замечания о том, что спектральная чистота пика недостаточна для оценки его реальной чистоты (например, [18]). Тем не менее с практической точки зрения проверка спектральной чистоты пиков (SPP) чрезвычайно важна, так как снижает риск получения недостаточно специфичной методики. В соответствии с этим следует подчеркнуть, что **основной задачей тестирования**

**спектральной чистоты пиков (SPP) при разработке и валидации методик является обнаружение незаметных коэлюирующихся примесей (invisible coeluting impurities) под пиком основного вещества, а не контроль абсолютной чистоты пика.** Речь идет об обнаружении именно незаметных коэлюирующихся примесей, которые не проявляют себя в виде пиков или явных перегибов на фронте или хвосте пика основного вещества.

Компьютерные программы Agilent (ChemStation), Waters (Empower) и Shimadzu (LabSolutions) используют различные критерии и графики для оценки спектральной чистоты пиков (они рассмотрены ниже). Тем не менее эти программы базируются на следующих общих ключевых моментах:

- ✓ Спектр в каждой точке пика представляется в виде вектора (матрицы данных) в  $n$ -мерном пространстве, где  $n$  – число данных «длина волны – оптическая плотность»;
- ✓ Для сопоставления спектров в одном масштабе проводится их нормализация. Обычно она выполняется путем масштабирования спектров по наилучшему совпадению или путем нормализации «по максимуму-минимуму» для представления спектров в одних и тех же пределах [12];
- ✓ Количественную оценку подобия (similarity) спектров в точках хроматографического пика проводят по формуле типа [14]:

$$r = \cos \theta = \frac{\sum (A_{apex,i} - \bar{A}_{apex})(A_{j,i} - \bar{A}_j)}{\sqrt{\sum (A_{apex,i} - \bar{A}_{apex})^2 \sum (A_{j,i} - \bar{A}_j)^2}}, \quad (1)$$

где  $r$  – коэффициент корреляции между спектрами;  $\theta$  – purity angle или spectral contrast angle;  $A$  – оптическая плотность; индекс  $apex$  относится к вершине пика, индекс  $i$  к длине волны, индекс  $j$  к точке пика. Из этой формулы следует, что спектр в вершине пика рассматривается как эталонный, свойственный 100%-му веществу. Для получения эталонного спектра чаще всего используют вершину пика на хроматограмме типа MaxPlot [19–21]<sup>1</sup>. Компьютерная программа Agilent по умолчанию использует усредненный спектр в 5 определенных точках пика в качестве эталонного спектра. В таком случае в формуле (1) индекс  $apex$  следует заменить на  $av$  (average).

*Примечание.* Дополнительно программа Agilent дает возможность альтернативного выбора эталонного спектра: на фронтальной части или на хвосте пика.

С теоретической точки зрения формула (1) является достаточной для оценки подобия спектров в разных точках пика пиков при условии, что «спектральный шум» равен нулю. Однако на практике это не так.

<sup>1</sup> «На хроматограмме MaxPlot для каждого момента времени выводится максимальное значение поглощения в заданном диапазоне длин волн» [19].

Например, шум базовой линии может вносить существенный вклад в вариабельность спектра [14] и приводить к ложноположительному результату. Для минимизации такого риска определяют спектры в области хроматограммы вблизи рассматриваемого пика или в точках непосредственно перед началом и сразу после конца пика – там, где нет пиков веществ и системных пиков. На основании этих спектров оценивают пороговые значения Threshold для допустимого различия между спектрами (не вызванного наличием примеси). В [14] приведены расчетные формулы для определения Threshold компьютерными программами Agilent и Shimadzu. Компьютерная программа Waters для расчета Threshold использует сумму углов Noise Angle (угол шума) и Solvent Angle (угол растворителя).

### Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Agilent

Для оценки подобия спектров в точках пика используют коэффициент подобия *Similarity Factor* [12]:

$$SF = 1000 \cdot r^2, \quad (2)$$

где  $r$  – коэффициент корреляции, вычисляемый по формуле (1). Теоретически при  $SF = 1000$  имеет место полное совпадение спектров. При  $SF < 990$  различие между спектрами рассматривается как значимое, то есть указывает на то, что пик не является спектрально чистым [12, 20].

По значениям  $SF$  в точках пика строится кривая подобия спектров *Similarity Curve*. Предельные значения допустимого различия спектров в точках пика – Threshold вычисляется автоматически или задаются вручную. Критерием спектральной чистоты пика является расположение кривой *Similarity Curve* ниже кривой Threshold в *Purity Window*. То есть у спектрально чистого пика  $SF < Threshold$ . В тех областях пика, в которых кривая  $SF$  расположена заметно выше Threshold высока вероятность наличия коэлюирующей примеси (примесей). Значение Threshold можно вычислять автоматически опцией *Calculate Threshold* или задавать вручную. По нашему опыту, если автоматически определяемое значение Threshold превышает 995, то целесообразно задавать вручную Threshold 995. Это соответствует рекомендации Agilent для ручного выбора Threshold: от 995 до 998 [20].

*Примечание.* Аналогом коэффициента подобия спектров  $SF$  является Match Factor ( $MF$ ). Значения Match Factor вычисляются по формуле [20]:

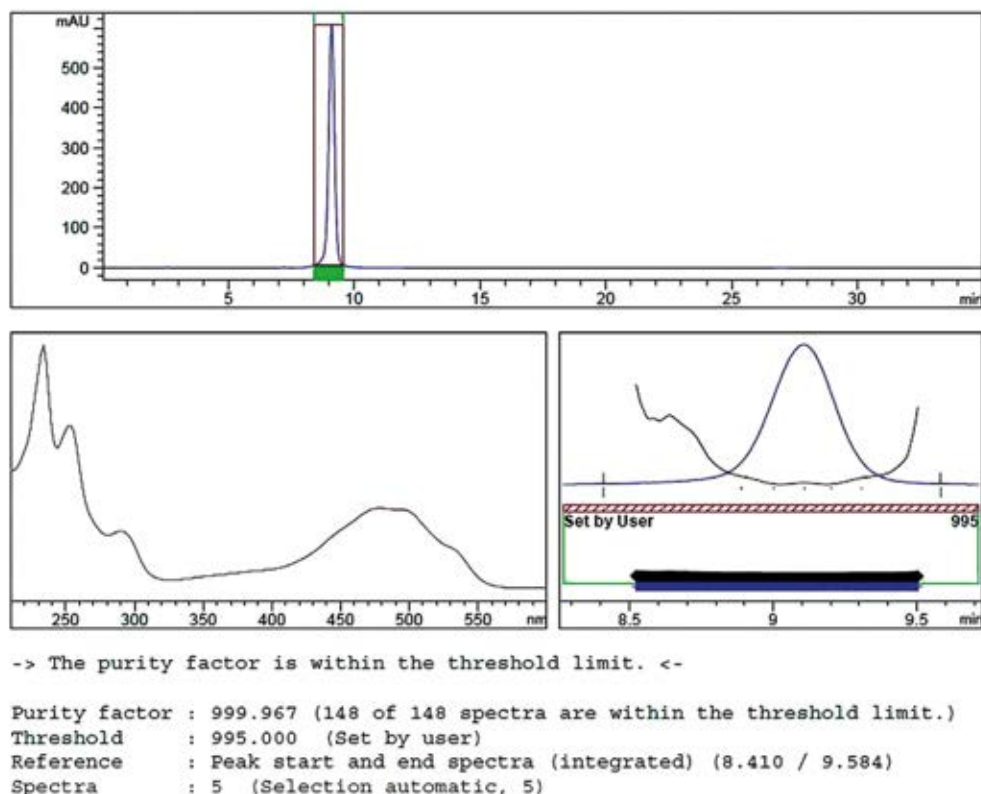
$$MF = 1000 \frac{\left[ \sum x_i \cdot y_i - \left( \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n} \right) \right]^2}{\left[ \sum x_i^2 - \left( \frac{\sum x_i \cdot \sum x_i}{n} \right) \right] \cdot \left[ \sum y_i^2 - \left( \frac{\sum y_i \cdot \sum y_i}{n} \right) \right]}, \quad (3)$$

где  $x_i$  и  $y_i$  – значения абсорбции на первом и втором спектре при одинаковой длине волны  $i$ ;  $n$  – количество точек данных. Спектры идентичны при  $MF = 1000$ ; спектры рассматриваются как разные при  $MF < 990$  [20].

Следует обратить особое внимание на выбор спектра сравнения во вкладке *Reference Spectra*. Его используют для компенсации влияния компонентов подвижной фазы, а также компонентов матрицы образца в испытуемом растворе. Имеются 3 возможности. *None* – без выбора спектра сравнения; этот режим обычно не используют. *Manual* – ручной выбор интервала для определения спектра сравнения. Он является обязательным, если рассматриваемый пик разделен от соседнего пика не на уровне базовой линии (подробности рассмотрены в [12]). *Automatic* – автоматическое определение спектра сравнения. Этот режим задан по умолчанию. При нем обычно выбирают *All Spectra* – используются спектры начала и конца пика вблизи базовой линии. Имеется также режим *Peak controlled Spectra* – только спектр в начале пика. Он менее надежный; при выборе этого режима Agilent рекомендует использовать наименьшее допустимое значение Threshold = 990 [20].

На рисунке 1 приведена типичная форма информации, выводимой при оценке спектральной чистоты пиков компьютерной программой Agilent. Вверху – участок хроматограммы с рассматриваемым пиком. Внизу слева *Spectra Window* – окно спектров. Внизу справа – окно *Purity Window*. В нем показан обесчисливаемый пик без нанесенных размерностей. Под пиком расположены *Similarity Curve* черного цвета и *Threshold Curve* красного цвета (если значения Threshold вычисляются автоматически) или красная полоса (если значение Threshold задано вручную). Еще ниже выводятся две жирные линии: черная и синяя, если пик спектрально чистый; черная и красная, если пик не спектрально чистый. Под графическими данными выводятся числовые значения *Purity Factor* (а не *Similarity*) и *Threshold*. Значение *Purity Factor* вычисляется по специальному алгоритму, использующему спектры в определенных точках пика [12]. Эти точки располагаются под *Similarity Curve* и маркируются в виде красных крестиков или точек [20]. Важно отметить, что критерием спектральной чистоты пика является условие  $Purity Factor > Threshold$ ; оно противоположно по знаку рассмотренному выше условию спектральной чистоты пика  $SF < Threshold$ . В случае спектрально чистого пика выводится сообщение «The purity factor is within the calculated threshold limit». В противном случае выводится сообщение «The purity factor exceeds the calculated threshold limit». При этом «exceed» переводится как «выходит за пределы», а не как «превышает» значение Threshold.

Для более четкого определения места нахождения потенциальной примеси под пиком основного вещества можно сделать следующее. Войти во вкладку



**Рисунок 1.** Пример оценки чистоты пика компьютерной программой Agilent. Вверху – участок хроматограммы с пиком вещества

**Figure 1.** An example of assessment of peak purity by Agilent computer program. At the top is a part of chromatogram with a peak of a substance

Advanced Peak Purity Options, затем в Purity Calculation и выбрать Ratio (вместо Purity Ratio, которое задано по умолчанию). Тогда будет выводиться кривая Similarity/Threshold ratio, вычисляемая в соответствии с формулой:

$$Ratio = \frac{1000 - SF}{1000 - Threshold} \quad (4)$$

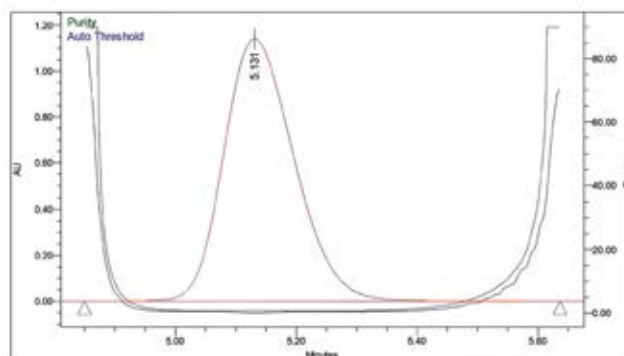
На кривой Similarity/Threshold ratio у спектрально чистого пика значения Ratio будут <1 во всех точках пика. При нарушении спектральной чистоты пика значения Ratio будут >1 в той области пика, в которой велика вероятность нахождения коэлюирующей примеси [12].

### Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Waters

Последовательность действий для оценки чистоты пиков на хроматографах Waters программой Empower подробно изложена в [19; 22–25]. В [22–24] приведены окна с параметрами настраиваемыми пользователями и типичные значения этих параметров. Рассмотрим некоторые ключевые моменты.

Для оценки спектральной чистоты пика определяют угол чистоты пика Purity Angle [θ в формуле (1)]

и пороговое значение допустимого различия между спектрами – Purity Threshold. Условием для спектрально чистого пика является Purity Angle < Purity Threshold. Более надежной альтернативой для оценки чистоты пика является график Purity Plot (рисунок 2). На этом графике для спектрально чистого пика кривая Purity



**Рисунок 2.** Пример оценки спектральной чистоты пика компьютерной программой Waters. Пик спектрально чистый, так как кривая Purity расположена ниже, чем кривая Auto Threshold и расчетное значение Purity Angle 0,286 меньше Purity Threshold 0,768

**Figure 2.** An example of assessment of peak purity by Waters computer program. The peak is spectrally pure because the Purity curve is lower than the Auto Threshold curve and the calculated Purity Angle 0,286 is less than the Purity Threshold 0,768

(зеленого цвета) должна идти ниже кривой Threshold (синего цвета)<sup>1</sup>.

На практике при разработке и валидации методик иногда встречается «противоречивая ситуация». С одной стороны, в таблице обсчета пика наблюдается значение Purity Angle меньше Purity Threshold – пик спектрально чистый. С другой стороны, на графике Purity Plot имеется область, в которой кривая Purity располагается выше, чем кривая Threshold – пик не является спектрально чистым. При этом на графике Purity Plot может выводиться буква «М» (Maximum Impurity) и вертикальная черта в точке условного пика примеси (пояснение дано ниже в примечании). Основная причина рассматриваемого противоречия заключается в следующем. В таблице обсчета пика приводятся средневзвешенные значения Purity Angle и Purity Threshold. В отличие от этого кривые Purity и Threshold строятся на основании значений Purity Angle и Purity Threshold в конкретных точках пика. Поэтому при такой «противоречивой ситуации» надежнее делать вывод о наличии потенциальной коэлюирующей примеси на основании Purity Plot. Характерный пример, подтверждающий этот вывод приведен в [25]. Показано, что при оценке чистоты пика основного вещества в модельной смеси с примесью на сравнительно высоком уровне 0,5 % значение Purity Angle 0,137 < Purity Threshold 0,301. Напротив, на Purity Plot имеется область, в которой кривая Purity идет выше, чем кривая Threshold. Следовательно, оценка чистоты пика на основании Purity Plot более надежна, чем по условию Purity Angle < Purity Threshold.

*Примечание.* На графике Purity Plot вертикальная черта с буквой «М» проводится через точку пика с максимальным превышением значения Purity Angle над Purity Threshold. Для включения этой опции надо пометить в настройках Purity → Plot Properties галочкой Annotate Peak Apex/Max. Impurity. В качестве альтернативы в таблицу обсчета пика можно вводить столбец Maximum Impurity, в котором указывается значение времени удерживания примеси, коэлюирующей под пиком основного вещества.

Для проверки спектральной чистоты пика рассматриваемого вещества целесообразно использовать опцию Auto Threshold. При этом высота пика должна быть в пределах 1000 mAU. В этом режиме программа автоматически вычисляет Noise Angle (в заданном диапазоне) и Solvent Angle. Если окажется, что Purity Angle > Purity Threshold, то результат можно перепроверить. Для этого следует вручную определить Solvent Angle с использованием стандартного образца вещества. Алгоритм этой процедуры подробно изложен в [26]. При отсутствии стандартного образца можно взять значение Solvent Angle = 1,00.

<sup>1</sup> При автоматическом определении кривая Threshold обозначается как Auto Threshold.

### Числовые и графические критерии для оценки спектральной чистоты пика на хроматографах Shimadzu

В [21] рассмотрены общие сведения для оценки чистоты пика на хроматографах Shimadzu, перечислены основные настройки и их назначение. Здесь рассмотрим некоторые ключевые моменты.

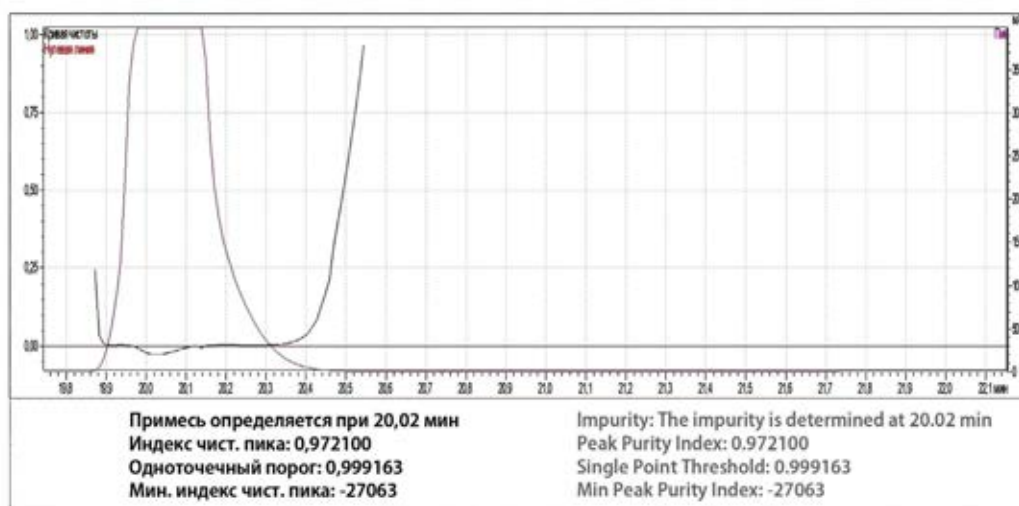
Для оценки спектральной чистоты пика определяют индекс чистоты пика Peak Purity Index (PPI), который соответствует  $r$  в формуле (1) и пороговое значение в точке Single Point Threshold (SPT). Кроме этого, вычисляется минимальный индекс чистоты пика Min Peak Purity Index = (Peak Purity Index – Single Point Threshold) · 10<sup>6</sup>. Пик является спектрально чистым, если PPI ≥ SPT и соответственно Min Peak Purity Index (MPI) ≥ 0. При отрицательном значении MPI указывается время, соответствующее наиболее вероятной точке пика, в которой коэлюируется примесь. Заметим, что абсолютное значение MPI не связано с концентрацией примеси.

Для графического представления результатов оценки чистоты пика можно использовать графики чистоты пика (Purity Curve; рисунок 3) или подобия спектров (Similarity Curve). На графике чистоты пика у спектрально чистого пика кривая чистоты Purity Curve (черного цвета) должна находиться выше нулевой линии (красного цвета). Нарушение этого условия указывает на наличие коэлюирующей примеси. Характерный пример показан на рисунке 3.

Альтернативный график – подобия спектров используется редко. На графике подобия спектров у спектрально чистого пика кривая подобия Similarity Curve (черного цвета) должна находиться выше кривой Threshold Curve (красного цвета). Заметим, что на графике подобия спектров выводится пик, получаемый на хроматограмме MaxPlot. Поэтому высота этого пика может значительно отличаться от той, которая получается при рабочей длине волны.

Программное обеспечение Shimadzu дает возможность использовать 3 метода для оценки чистоты пика [21]:

- The 3-point peak purity method использует спектры в 3 точках: на восходящей ветви пика, в максимуме пика (эталонный спектр) и на нисходящей ветви пика. Это менее точный метод, чем два следующих.
- The N-point peak purity method является расширением предыдущего метода и использует спектры в 5, 7 или 9 точках пика.
- Total peak purity method использует спектры во всех точках пика. Это метод является наиболее надежным. Его особенностью является то, что в качестве эталонного спектра берется спектр той точки пика, в которой поглощение вещества максимально в рассматриваемом диапазоне длин волн. Эта точка соответствует максимуму пика на хроматограмме типа MaxPlot. На практике в настройках рекомен-



**Рисунок 3.** Пример оценки спектральной чистоты пика компьютерной программой Shimadzu. Пик не является спектрально чистым. На это указывает то, что кривая чистоты пика (черного цвета) опускается ниже нулевой линии (красного цвета) и минимальный индекс чистоты пика меньше нуля

**Figure 3.** An example of assessment of peak purity by Shimadzu computer program. The peak is not spectrally pure. This is indicated by the fact that the peak purity curve (black) falls below the zero line (red) and the Min Peak Purity Index is less than zero

днем выбирать *Total peak purity method*, так как методы а) и б) менее надежны при оценке чистоты пика. Они применялись раньше, когда мощность компьютеров была сравнительно невелика.

Обращаем внимание еще на 3 момента. Следует включить:

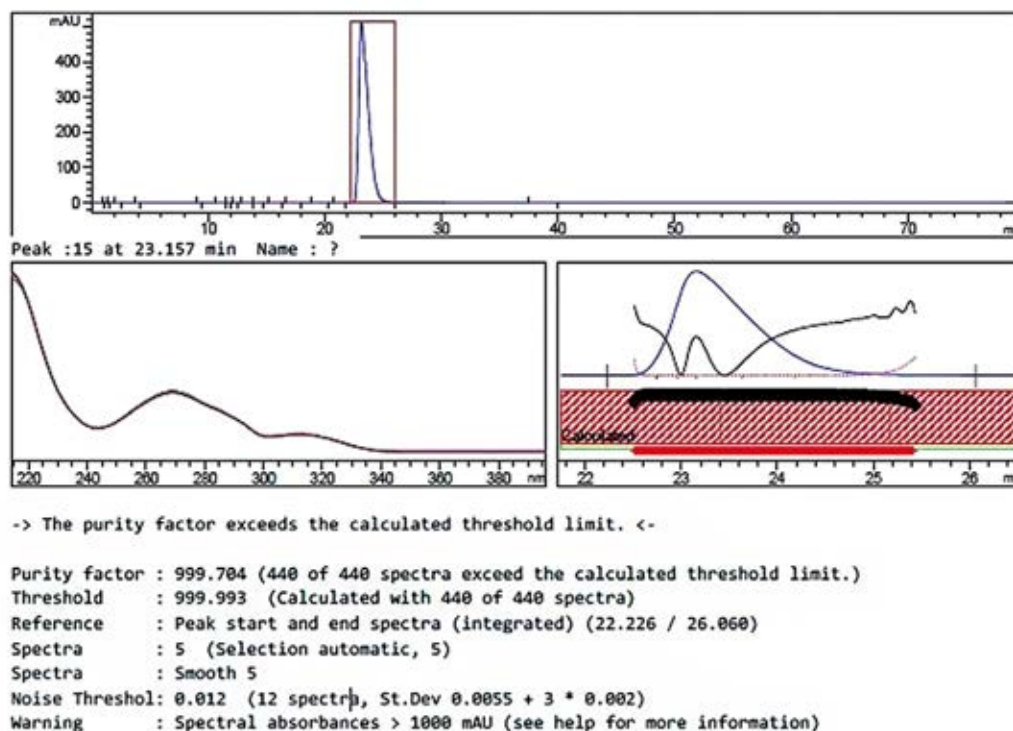
- ✓ *Compute noise spectrum from current data for peak purity* – в противном случае программа может использовать ранее записанный шум базовой линии.
- ✓ *Background Compensation* – для компенсации дрейфа базовой линии.
- ✓ При валидации методики значение *Compensation Coefficient* должно быть 0 (по умолчанию).

### Общие рекомендации для повышения надежности оценки чистоты пиков на хроматографах Agilent, Waters и Shimadzu

1. При оценке чистоты пиков не рекомендуется использовать длины волн  $\lambda$  ниже 210 нм [20, 21]. Это связано с риском значительного увеличения вклада компонентов подвижной фазы в получаемые спектры в области низких длин волн. Обычно выбирают диапазон 210–350 нм или 210–400 нм. При необходимости корректируют границы диапазона длин волн, как показано в следующем пункте.
2. При задании границ диапазона  $\lambda$  целесообразно оценивать максимальную высоту рассматриваемого пика на графике типа *MaxPlot*. Если высота пика будет слишком большой (пункт 7), то может потребоваться коррекция границы диапазона  $\lambda$ . На рисунке 4 приведен характерный пример, получен-

ный на начальной стадии разработки методики на хроматографе Agilent. На нем представлен результат оценки чистоты пика лекарственного вещества в диапазоне 210–400 нм. Видно, что высота пика на снятой хроматограмме около 500 mAU (верхняя часть рисунка). Однако имеется предупреждение о том, что поглощение превышает 1000 mAU: «Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU». Это обусловлено тем, что в максимуме спектра поглощения вещества (внизу рисунок слева) при  $\lambda \approx 215$  нм абсорбция более, чем в 2 раза превышает аналогичный показатель при рабочей длине волны  $\lambda \approx 270$  нм. Для проверки этого предположения взяли начальную  $\lambda$  не 210 нм, а 225 нм. Это привело к исчезновению упомянутого выше предупреждения о недопустимо большой высоте пика.

3. Следует использовать наименьшее разрешение длин волн (*Resolution*), а также такую скорость сбора данных в секунду (*Sampling Rate; SR*), которая обеспечит достаточное количество точек на пик для оценки чистоты пика (*Peak Purity*). В случае Waters этим условиям соответствует *Resolution* 1,2 нм и не менее 12 точек (спектров) на пик [22]. Второе условие особенно важно для узких пиков, которые характерны для градиентной ВЭЖХ (*gradient HPLC*) и УЭЖХ (*UPLC*). Зная ширину рассматриваемого пика  $W$  [сек] и минимально необходимое количество спектров на пик  $N$ , можно вычислить минимальное значение  $SR = N/W$  точек в секунду.
4. Для большей надежности оценки чистоты пика рекомендуем вручную размечать точки начала и конца рассматриваемого пика. Это особенно важно для частично перекрывающихся пиков.



**Рисунок 4.** Результаты обчета чистоты пика лекарственного вещества компьютерной программой Agilent, полученные на начальной стадии разработки методики. Высота пика при рабочей длине волны около 500 mAU. Однако есть сообщение: Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU. Причина этого противоречия объяснена в тексте. *Примечание.* Автоматически рассчитанное значение Threshold слишком большое; надо установить Threshold = 995

**Figure 4.** Results of the calculation of drug peak purity by Agilent computer program, obtained at the initial stage of development of the procedure. The peak height at a working wavelength of about 500 mAU. However, there is a message: Warning: Spectral absorbances > 1000 mAU. The reason for this contradiction is explained in the text. *Note:* The automatically calculated Threshold value is too large. It is necessary to set the Threshold = 995

5. Следует обращать особое внимание на шум базовой линии. Он не должен быть большим, в противном случае можно получить ложноотрицательный результат «пик чистый». Например, для Waters по нашим данным на недопустимо большой уровень шума базовой линии указывают значения Purity Threshold значительно превышающие единицу.
6. Интервал хроматограммы для определения шума базовой линии следует выбирать на хроматограмме типа MaxPlot, а не при рабочей длине волны. Дело в том, что при рабочей длине волны на хроматограмме могут оказаться незаметными пики, высота которых может быть значительно большей при других  $\lambda$  в заданном диапазоне длин волн. Эти пики могут сильно влиять на значение Threshold и, как следствие, на результаты оценки чистоты пика.
7. Рекомендуется, чтобы высота пика (H) не превышала 1000 mAU на хроматограмме типа MaxPlot [19, 20, 23]. В противном случае можно получить ложно положительный результат о наличии коэлюирующей примеси. Дело в том, что при увеличении высоты пика увеличивается различие в концентрации вещества C между его верхней и нижними точками, участвующими в вычислении чистоты пика.
8. При негативном результате оценки чистоты высокого пика целесообразно проверить соблюдение линейной зависимости площади пика S от концентрации C при разведении инжектируемого раствора. Следствием нарушения линейной зависимости S от C является нарушение подобия спектров даже при отсутствии коэлюирующей примеси. Характерный пример рассмотрен в [28]. Нарушение линейной зависимости S от C у высокого пика можно проверить путем разведения инжектируемого раствора, например, в 2 раза. При этом, по нашему опыту, отклонение фактического значения площади пика от теоретического не должно превышать нескольких процентов.

9. Если негативный результат оценки спектральной чистоты пика вещества вызывает сомнение, то рекомендуем хроматографировать при тех же условиях фармакопейный (аттестованный) стандартный образец этого вещества. Затем сравнить результаты оценки чистоты пика, полученные для испытуемого вещества и для его стандартного образца. Предположим, что результаты, полученные для испытуемого вещества, окажутся не хуже, чем для стандартного образца. Тогда этот факт можно использовать для обоснования достаточной чистоты пика основного вещества. Предлагаемый способ особенно важен для градиентных методик. Для них негативный результат может быть вызван изменением состава подвижной фазы в точках хроматографического пика.

Компьютерные программы для оценки спектральной чистоты пиков совершенствуются. Предлагаются новые алгоритмы, которые повышают чувствительность определения примесей и дают возможность оценивать спектральную чистоту пиков при более высоких концентрациях (большей высоте пиков), например [29]. Это повышает надежность определения примесей коэлюирующихся под пиком основного вещества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение подчеркнем, что для разработки и валидации методик определения примесей на современном уровне необходимо контролировать спектральную чистоту пиков основных (лекарственных) веществ. При этом целесообразно рассматривать не только хроматограмму испытуемого раствора для определения примесей, но и хроматограммы растворов, получаемых при стрессовых исследованиях<sup>1</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005. 13 p.
2. United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of compendial procedures. USP41-NF36. 2018.
3. Guidance on the validation of analytical methods for testing drugs. EAEU. 2018. 25 c. (In Russ.).
4. Bylund D., Danielsson R., Markides K. E. Peak purity assessment in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A*. 2001;915: 43–52. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00543-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00543-X).
5. Dyrstad K., Hvattum Er., Jara S., Lie A. Peak-purity by LC-MS and LC-DAD (presentation). 2015.
6. Dong M. W. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, 2<sup>nd</sup> Ed. Hoboken, United States: Wiley. 2019.
7. Shockcor J. P. HPLC-NMR Pharmaceutical Applications. Du Pont Pharmaceuticals Co. Newark, NJ, USA: Elsevier. 2017. 271 p.
8. Shackman J. G., Kleintop B. L. Peak purity assessment in a triple-active fixed-dose combination drug product related substances method using a commercial two-dimensional liquid chromatography system. *J. Sep. Sci.* 2014;37:2688–2695. Doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400515>.
9. Zhang K., Wang J., Tsang M., Wigman L., Chetwyn N. Two-Dimensional HPLC in Pharmaceutical Analysis. *Amer. Pharm. Review*. 2013;16(7):39–44.
10. Polster J., Sauerwald N., Feucht W., Treutter D. New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography. *J. Chromatography A*. 1998;800:21–133. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01132-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01132-1)
11. Levin Sh. Considerations in Peak Purity Measurements (presentation). 1999. 60 p.
12. Stahl M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. Application. Waldbronn, Germany: Agilent Technologies. 2003. 16 p.
13. Papadoyannis I. N., Gika H. G. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. In Encyclopedia of Chromatography. N.Y.: Marcel Dekker, Inc. 2003.
14. Rutan S. C., Venkatramani C. J., Stoll D. R. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part I: Basic Concepts, Commercial Software, and Limitations. *LC-GC North America*. 2018;36(2):100–110.
15. Cook D. W., Rutan S. C., Venkatramani C. J., Stoll D. R. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part II: Potential of Curve Resolution Techniques. *LC-GC North America*. 2018;36(4):248–255.
16. Stoll D. R., Venkatramani C. J., Rutan S. C. Peak Purity in Liquid Chromatography, Part III: Using Two-Dimensional Liquid Chromatography. *LC-GC North America*. 2018;36(6):356–361.
17. Mas S., de Juan A. Peak Purity and Resolution of Chromatographic Data in Chemometrics in chromatography. Boca Raton: CRC Press. 2018.
18. Letter W. Peak Purity Determination by HPLC Diode Array Detector (DAD/PDA) based Chromatography Software (Limitations and Uses). Conference «HPLC diode array method development training course» presented at NJ (USA). 1996. Doi: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29067.90409>.
19. Empower PDA Software Getting Started Guide. Waters Corporation. 2002. 145 p.
20. Agilent ChemStation for LC 3D Systems Understanding Your Spectra Module. Understanding Your Spectra Module. Agilent Technologies. 2008. 48 p.
21. LabSolutions Data Acquisition & Processing Theory Guide. Kyoto: Shimadzu Corporation. 2012. 84 p.
22. Tip #134: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 1). Available at: <https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-134-3d-pda-data>.
23. Tip #135: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 2). Available at: <https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-135-3d-pda-data>.
24. Tip #136: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 3). Available at: <https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-136-3d-pda-data>.
25. Tip #137: Working with 3D PDA data in Empower Software (Part 4). Available at: <https://blog.waters.com/get-empowered-review-window-and-the-processing-method-tip-137-3d-pda-data>.
26. How do you set up the Purity Thresholds in Empower 3? Waters Knowledge Base: WKB11215.
27. Epshtein N. A. About stress experiments by developing / improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2016;3(16):118–132 (In Russ.).
28. Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity III. Interpretation of peak purity plots. Waters. 1996. Available at: [https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en\\_US&lid=1536113](https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=1536113)
29. Mito (Shimadzu) Ya. Chromatogram Peak Purity Determination Apparatus. United States patent US 2014/0067283 A1, 2014 Mar. 6. Available at: <https://patents.google.com/patent/US20140067283A1/en>.

<sup>1</sup> При стрессовых исследованиях разложение лекарственного вещества должно быть сравнительно небольшим, «чтобы минимизировать протекание вторичных реакций, которые маловероятны при хранении фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» [27].

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>  
УДК 615.322



Оригинальная статья/Research article

## Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L.

С. В. Горяинов<sup>1</sup>, С. Эспарса<sup>1</sup>, В. А. Ивлев<sup>1</sup>, Д. И. Писарев<sup>1\*</sup>, Г. Бакореза<sup>1</sup>, Р. А. Абрамович<sup>1</sup>, О. О. Новиков<sup>1</sup>, О. Г. Потанина<sup>1</sup>, С. Лазар<sup>1</sup>, А. В. Хромов<sup>1</sup>, Н. Н. Бойко<sup>2</sup>

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6  
2 – Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

\*Контактное лицо: Писарев Дмитрий Иванович. E-mail: juniper05@mail.ru

ORCID: С. В. Горяинов – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; С. Эспарса – <https://orcid.org/0000-0002-8200-6208>; В. А. Ивлев – <https://orcid.org/0000-0001-9664-9506>; Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Г. Бакореза – <https://orcid.org/0000-0001-7083-704X>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; О. Г. Потанина – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; С. Лазар – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>; А. В. Хромов – <https://orcid.org/0000-0002-6355-5615>; Н. Н. Бойко – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>.

Статья поступила: 25.03.2020. Статья принята в печать: 30.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Семена чернушки посевной – *Nigella sativa* L. широко известны как источник жирного масла с весьма редким компонентом – тимохиноном. Терапевтический потенциал биологически активных соединений семян растения охватывает положительное влияние на желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистую и иммунную систему. Кроме того, у тимохинона обнаружены гипогликемическое, антиоксидантное, противоопухолевое, онкопротекторное, иммуномодулирующее действие. Помимо жирного масла и тимохинона в семенах присутствует ряд других значимых соединений, также составляющих собственный фармакологический актив.

**Цель.** Разработка технологической схемы переработки и анализ липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L.

**Материалы и методы.** В качестве аналитических методов использованы: газожидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектором – для анализа стероидов и тритерпенов; хромато-масс-спектрометрия (газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием) – для исследования эфирного масла; хромато-масс-спектрометрия (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием) – для изучения флавоноидов. Для получения отдельных фракций биологически активных соединений семян *N. sativa* L. использована дробная экстракция.

**Результаты и обсуждение.** Была разработана схема выделения липофильных и гидрофильных компонентов, которая заключается в экстракции всего липидного комплекса семян *n*-гексаном, с последующим удалением экстрагента. Сгущенное гексановое извлечение обрабатывают спиртом этиловым, извлекающим неомыляемые соединения – терпены, хиноны, стерины и не растворяющим триацилглицериды. Шрот семян, оставшийся после гексановой экстракции, обрабатывают спиртом этиловым 70%-ым, в который переходят гидрофильные молекулы, а конкретно флавоноиды.

**Заключение.** В липофильной фракции омыляемых липидов после переэтерификации идентифицировано 5 соединений, доминирующими являются линолевая и олеиновая кислоты. Характерной особенностью данной фракции является присутствие *цис*-11,14-эйкозадиеновой кислоты, которая может выступать в роли маркерного элемента жирного масла семян *N. sativa* L. В неомыляемой фракции обнаружены стерины и тритерпены. Мажорным компонентом данной фракции является β-ситостерин. Помимо указанного стерина присутствуют кампестерин и стигмастерин. Тритерпены представлены циклоартеенолом и его производными. В эфиромасличном комплексе найдены простые фенолы, хиноны и монотерпены, преобладают *n*-цимол, тимохинон и α-туйен. В состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. входят флавоноиды метоксилированного ряда флавонов и гликозиды кемпферола.

**Ключевые слова:** семена чернушки посевной, тимохинон хроматография, триацилглицериды, стерины, флавоноиды.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, Н. Н. Бойко, С. Лазар разработали схему выделения липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L. С. В. Горяинов, В. А. Ивлев, С. Эспарса, Д. И. Писарев, О. О. Новиков, А. В. Хромов и О. Г. Потанина провели аналитическое исследование выделенных фракций семян *N. sativa* L., обработку данных и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

**Для цитирования:** Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):137–141. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>

## A Technology for Isolation and Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Biologically Active Components from *N. sativa* L. Seeds

Sergey V. Goryainov<sup>1</sup>, Cesar Esparza<sup>1</sup>, Vasily A. Ivlev<sup>1</sup>, Dmitry I. Pisarev<sup>1\*</sup>, Gohara Bacorese<sup>1</sup>, Rimma A. Abramovich<sup>1</sup>, Oleg O. Novikov<sup>1</sup>, Olga G. Potanina<sup>1</sup>, Simon Lazar<sup>1</sup>, Arkidiy V. Khromov<sup>1</sup>, Nikolay N. Boyko<sup>2</sup>

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia  
2 – Belgorod National Research University, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

\*Corresponding author: Dmitry I. Pisarev. E-mail: juniper05@mail.ru

© Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н., 2020

© Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N., 2020

ORCID: Sergey V. Goryainov – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Cesar Esparza – <https://orcid.org/0000-0002-8200-6208>; Vasily A. Ivlev – <https://orcid.org/0000-0001-9664-9506>; Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Gohara Bacorese – <https://orcid.org/0000-0001-7083-704X>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0003-3145-6783>; Olga G. Potanina – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Simon Lazar – <https://orcid.org/0000-0002-9339-1180>; Arkidiy V. Khromov – <https://orcid.org/0000-0002-6355-5615>; Nikolay N. Boyko – <https://orcid.org/0000-0001-9222-2935>.

Received: 25.03.2020. Revised: 30.07.2020. Published: 28.08.2020

## Abstract

**Introduction.** Seeds of *Nigella sativa* L. are widely known as a source of fatty oil with a very rare component-thymoquinone. The therapeutic potential of biologically active compounds of plant seeds covers a positive effect on the gastrointestinal tract, cardiovascular and immune systems. In addition, hypoglycemic, antioxidant, antitumor, oncoprotective, immunomodulating effects were found in thymoquinone. In addition to fatty oil and thymoquinone, a number of other significant compounds are present in the seeds, which also make up their own pharmacological asset.

**Aim.** Study was to develop a processing flow chart and analyze the lipophilic and hydrophilic components of the seeds of *N. sativa* L.

**Materials and methods.** The following methods were used as analytical methods: gas-liquid chromatography with a flame ionization detector – for the analysis of sterols and triterpenes; chromatography-mass spectrometry (gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection) – for the study of essential oil; chromatography-mass spectrometry (high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection) – to study flavonoids. To obtain individual fractions of biologically active compounds of seeds of *N. sativa* L., fractional extraction was used.

**Results and discussion.** The principle of this approach in this case is to extract the entire lipid complex of seeds with n-hexane, followed by removal of the extractant. The thickened hexane extract is treated with ethyl alcohol, which extracts unsaponifiable compounds – terpenes, quinones, sterols and does not dissolve triacylglycerides. The seed meal remaining after hexane extraction is treated with ethyl alcohol 70 %, into which hydrophilic molecules, in particular flavonoids, pass.

**Conclusion.** After transesterification, 5 compounds were identified in the lipophilic fraction of saponifiable lipids, the linoleic and oleic acids being dominant. A characteristic feature of this fraction is the presence of cis-11,14-eicosadiene acid, which can act as a marker element of the fatty oil of the seeds of *N. sativa* L. Sterols and triterpenes were found in the unsaponifiable fraction. The major component of this fraction is  $\beta$ -sitosterol. In addition to the indicated sterol, campesterol and stigmaterol are present. Triterpenes are represented by cycloartenol and its derivatives. Simple phenols, quinones and monoterpenes were found in the essential oil complex, p-cymol, thymoquinone and  $\alpha$ -thuyen predominate. The hydrophilic fraction of the seeds of *N. sativa* L. includes flavonoids of the methoxylated series of flavones and kempferol glycosides.

**Keywords:** *N. sativa* L., thymoquinone chromatography, triacylglycerides, sterols, flavonoids.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Nikolay N. Boyko, developed a scheme for the isolation of lipophilic and hydrophilic components of seeds of *N. sativa* L. Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Arkidiy V. Khromov, and Olga G. Potanina conducted an analytical study of the isolated fractions of *N. sativa* L. seeds, data processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

**Acknowledgment.** This work was supported by Program 5-100.

**For citation:** Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):137–141. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141>

## ВВЕДЕНИЕ

Чернушка посевная – *Nigella sativa* L. является ценным растением, семена которого содержат ряд уникальных соединений, перспективных в терапевтическом плане [1, 2]. Принято считать, что наиболее репрезентативными компонентами указанного объекта являются составные липидного комплекса, включающие жирное масло, стерины [3], а также маркерный компонент – тимохинон [4, 5]. Однако в семенах, помимо липофильных, содержатся и гидрофильные компоненты, представленные флавоноидами. Такой разноплановый состав семян *N. sativa* L. может обладать перспективностью для получения компонентов с разной полярностью и, соответственно, имеющих поливалентный фармакологический потенциал [6–8].

**Целью настоящего исследования** явилась разработка технологической схемы выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов семян *N. sativa* L.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разделение метиловых эфиров высших жирных кислот проводили на хроматографе Agilent 7890A (Agilent Technologies, США): колонка капиллярная

VF-23 ms (Agilent Technologies, США, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина фазы 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость потока газа-носителя 1,5 мл/мин; температура инжектора 280 °С. Режим программируемых температур –50 °С (изотерма 2 мин), подъём температуры –10 °С/мин до 180 °С (выдержка 5 мин), затем до 240 °С со скоростью 5 °С/мин. Общее время анализа – 32 мин. Пробу инжестировали в Split режиме (деление потока 1:10). Детектор – пламенно-ионизационный.

Неомыляемую составляющую масла *N. sativa* L. определяли на хроматографе Agilent 6890N (Agilent Technologies, США): колонка капиллярная VF-5MS (Agilent Technologies, США) (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость газа-носителя 1,5 мл/мин. Температура инжектора 280 °С, начальная температура печи хроматографа – 60 °С, затем – изотерма в течение 3 мин, после чего нагрев со скоростью 10 °С/мин. до 290 °С, выдержка при 290 °С в течение 20 мин. Общее время анализа – 46 мин. Режим регистрации масс-спектров: магнитно-секторный масс-детектор JMS GC Mate II (JEOL, Япония), энергия ионизации 70 эВ, температура источника 270 °С, сканирование в диапазоне 40–400 Да со скоростью 2 скан/с. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Полифенольный комплекс анализировали методом ОФ ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

В работе использовали хроматограф Agilent 1290 (Agilent Technologies). Детекторы: диодная матрица и тандемный квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6430 (Agilent Technologies, США). Использовали два варианта хроматографического разделения. Условия № 1: хроматографическая колонка Brownlee SPP C<sub>18</sub> 2,1 × 150 мм, 2,7 мкм, подвижная фаза – 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Скорость подачи элюента – 0,25 мл/мин, в градиентном режиме. Условия № 2: хроматографическая колонка Brownlee SPP C<sub>18</sub> 2,1 × 150 мм, 2,7 мкм, подвижная фаза – 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Скорость подачи элюента – 0,25 мл/мин, в градиентном режиме. Объем вводимой в инжектор пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длинах волн, характеристичных для большинства флавоноидов: λ = 290,0 и λ = 340,0 нм, а также в режиме ионизации электрораспылением (регистрация отрицательных ионов); поток газа-осушителя – 10 л/мин; температура газа-осушителя – 320 °С; напряжение на фрагменторе – 135 В, на капилляре – 4000 В.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Липидный комплекс из анализируемого сырья выделяли с помощью циркуляционной экстракции в аппарате «Soxlet». В качестве экстрагента использовался *n*-гексан. Гексановое извлечение сгущали на ро-

тационном испарителе ИР-1МЗ. Сгущенный остаток обрабатывали спиртом этиловым 96%-ым. При этом в спиртовой слой переходят эфирные масла, тритерпены и стерины, в остатке триацилглицериды.

Качественный состав жирных кислот в составе триглицеридов определялся методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) после предварительной переэтерификации и полученные метиловые эфиры подвергали хроматографированию.

На рисунке 1 представлена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот семян *N. sativa* L.

На хроматограмме видно, что в состав триглицеридов семян *N. sativa* L. входит 5 компонентов. Доминирующим компонентом является линолевая кислота ~60,0 %, в меньшем количестве – олеиновая ~23,0 %. Около 12,0% приходится на пальмитиновую кислоту, ~3,0 % на стеариновую кислоту. Характерной особенностью масла семян *N. sativa* L. является присутствие *цис*-11,14-эйкозадиеновой кислоты.

Спиртовое извлечение после обработки гексановой фракции сгущали и тестировали на предмет наличия неомыляемых липофильных компонентов методом ГХ/МС.

Результаты хроматографирования неомыляемой фракции липидного комплекса семян *N. sativa* L. методом ГХ/МС представлены на рисунке 2.

На представленной хроматограмме видно, что в составе неомыляемой фракции входит 14 компонентов стериновой и тритерпеновой природы. Доминирующими соединениями является стерины, причём в наибольшем количестве обнаружен β-ситостерин (на

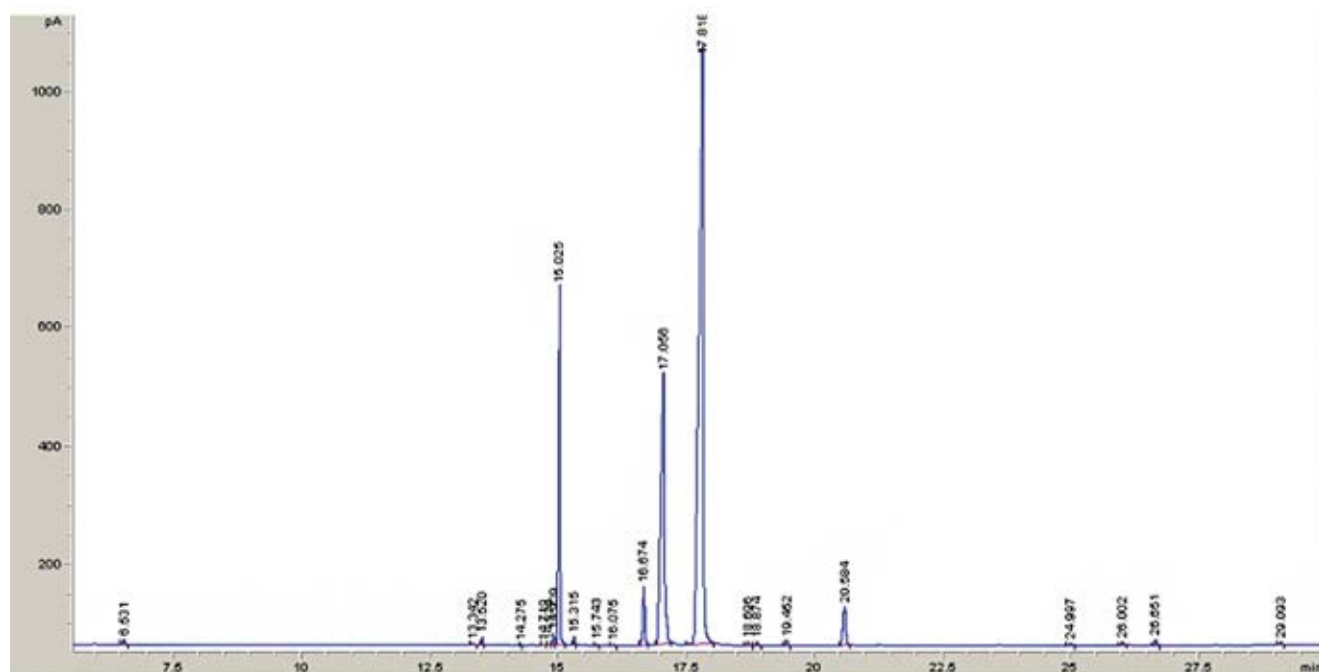


Рисунок 1. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот из липидного комплекса семян *N. sativa* L.

Figure 1. Chromatogram of methyl esters of fatty acids from the lipid complex of seeds of *N. sativa* L.

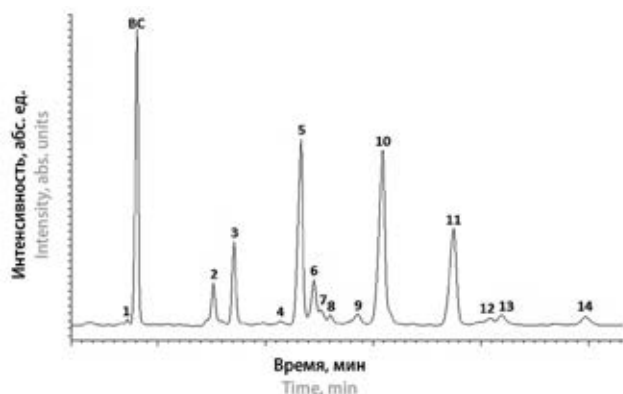


Рисунок 2. Хроматограмма неомыляемой фракции семян *N. sativa* L.

Figure 2. Chromatogram of unsaponifiable fraction of seeds of *N. sativa* L.

хроматограмме обозначен под № 5), в меньших количествах – кампестерин и стигмастерин (на хроматограмме № 2 и 3 соответственно). Из тритерпенов преобладают циклоартенол и 24-метиленциклоартанол (на хроматограмме № 10 и 11 соответственно).

Хроматограмма низкомолекулярной фракции неомыляемого комплекса семян *N. sativa* L. представлена на рисунке 3.

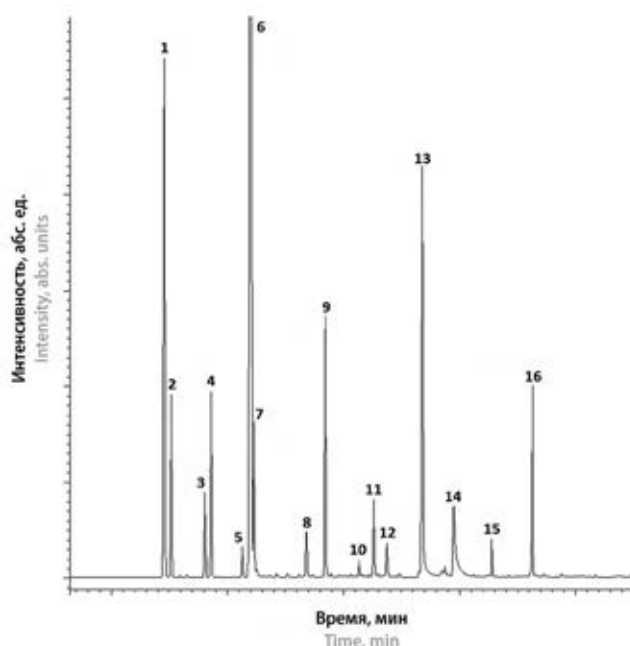


Рисунок 3. Хроматограмма низкомолекулярной неомыляемой фракции семян *N. sativa* L.

Figure 3. Chromatogram of a low molecular weight unsaponifiable fraction of seeds of *N. sativa* L.

В низкомолекулярной фракции неомыляемых компонентов обнаружено 16 соединений, среди которых монотерпены, фенолы и хиноны, основными являются: *n*-цимол ~50,0 % (на хроматограмме № 6),

timoхинон ~20,0 % (на хроматограмме № 13) и  $\alpha$ -туйен ~10,0 % (на хроматограмме № 1).

Далее определялся состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. Для этого использовался шрот семян после экстракции *n*-гексаном, который высушивали и экстрагировали методом мацерации спиртом этиловым 70%-ым. Полученное спиртовое извлечение фильтровали и хроматографировали методом хромато-масс-спектрометрии (ОФ ВЭЖХ/МС).

Хроматограмма спиртового извлечения из шрота семян *N. sativa* L. представлена на рисунке 4.

Результаты хроматографирования показали, что основными компонентами гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. являются флавоноиды, среди которых метоксилированные формы флавонов, а именно: тетраметоксифлавоны (время удерживания на хроматограмме – 7,4 мин); мирицетин (время удерживания – 7,7 мин), однако доминирует монозид кемпферола (время удерживания – 8,1 мин).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена технология комплексной переработки семян *N. sativa* L., обеспечивающей фракционное получение липидных комплексов омыляемых и неомыляемых компонентов, а также гидрофильного комплекса. Разработан спектр методик идентификации биологически активных соединений семян *N. sativa* L. с применением ряда современных хроматографических методов анализа. В составе триацилглицеридов семян обнаружено 5 компонентов, среди которых линолевая и олеиновая кислоты – 80,4 до 83,9 %. Важным компонентом является *cis*-11,14-эйкозодиеновая кислота, этот компонент можно рассматривать как один из маркеров подлинности масла из семян *N. sativa* L. Определён состав неомыляемой липидной фракции, в которой доминирующим компонентом является  $\beta$ -ситостерин. В состав лёгкой фракции неомыляемых липидов входят монотерпены, фенолы и хиноны, три из которых – *n*-цимол,  $\alpha$ -туйен и тимохинон доминируют. Состав гидрофильной фракции семян *N. sativa* L. формируют в основном флавоноиды, включающие метоксилированные формы флавонов и гликозиды кемпферола. Следующим этапом исследований в русле комплексного изучения семян *N. sativa* L. является определение фармакологической активности выделенных фракций.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCE

1. Gali-Muhtasib H., El-Najjar H. Schneider-Stock R. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Advances in Phytomedicine*. 2006;2:133–153. Doi: 10.1016/S1572-557X(05)02008-8.
2. Kooti W., Hasanzadeh-Noohi Z., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2016;14(10):732–745. Doi: 10.1016/S1875-5364(16)30088-7.

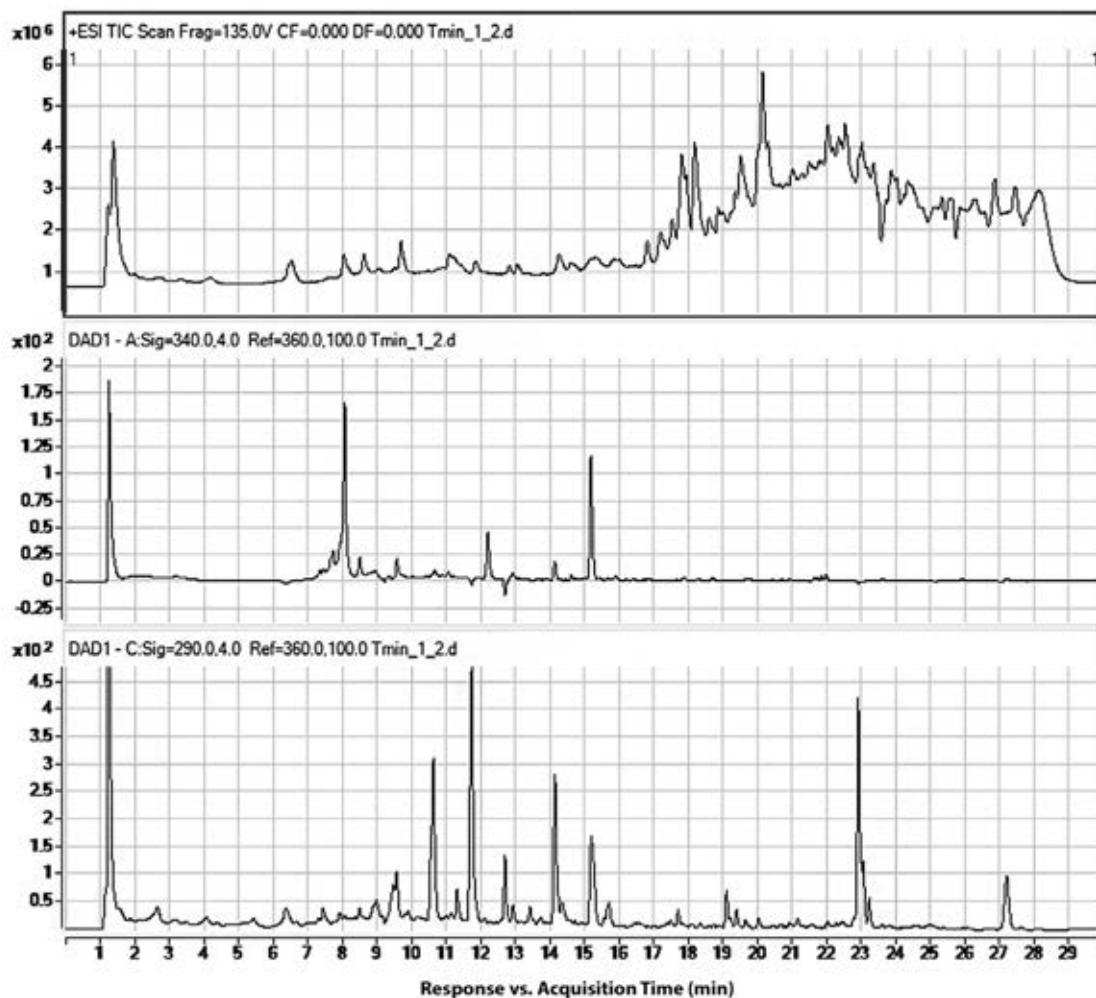


Рисунок 4. Хроматограмма этанольного извлечения из шрота семян *N. sativa* L.

Figure 4. Chromatogram of ethanol extraction from seed meal *N. sativa* L.

3. Ceikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 2007;101(2):673–681. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.022.
4. Chaieb K., Kouidhi B., Jrah H. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial bio film formation. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011;11:29–34. Doi: 10.1186/1472-6882-11-29.
5. Yehualashet B., Ermias D. HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella Sativa* Linn) and identification of thymoquinone conversion with Uv-Vis. *Journal of drug delivery & Therapeutics*. 2014;4(4):1–5. Doi: 10.1186/1472-6882-11-29.
6. El-Dakhakhny M., Mady N., Lembert N., Ammon H. P. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Medica*. 2002;68(5):465-466. Doi: 10.1055/s-2002-32084.
7. Mansour M. A., Nagi M. N., El-Khatib A. S., Al-Bekairi A. M. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: A possible mechanism of action. *Cell Biochem. Funct*. 2002;20(2):143–151. Doi: 10.1002/cbf.968.
8. Salem M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 2005;5:1749–1770. Doi: 10.1016/j.intimp.2005.06.008.



XVI ежегодная межрегиональная конференция

«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ  
И МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ»

21 – 23 сентября  
2020 г.  
онлайн формат

### КОНФЕРЕНЦИЯ СО СВОЕЙ ИСТОРИЕЙ ПРОВЕДЕНИЯ



ИЗВЕСТНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ В НОВОМ  
ФОРМАТЕ • НИКАКИХ СКУЧНЫХ  
ДОКЛАДОВ • ОТ ПРОФЕССИОНАЛОВ И ДЛЯ  
ПРОФЕССИОНАЛОВ • ОБСУДИМ САМОЕ  
ВАЖНОЕ В ОРГАНИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО  
ОБЕСПЕЧЕНИЯ

### УНИКАЛЬНЫЙ СОСТАВ УЧАСТНИКОВ



### ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

#### Пленарное заседание

#### Секционные заседания и круглые столы

- Старые и новые вопросы в системе лекарственного обеспечения с позиции организаторов, возможные пути решения
- Актуальные вопросы экспертизы лекарственных препаратов
- Взаимозаменяемость лекарственных препаратов: медицинские, регуляторные и экономические аспекты
- Реализация задач федерального проекта «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями»
- Евразийское законодательство в сфере лекарств: анонс изменений 2020 г.
- Организация работы медицинских организаций в условиях COVID-19: опыт федеральных и региональных ЛПУ
- Ограничительные Перечни лекарственных препаратов: ассортимент и финансовые аспекты
- Онлайн (интернет) продажа и доставка лекарственных препаратов: регулирование и практика реализации
- Новые правила регистрации цен на лекарственные препараты: что изменилось и первый опыт
- Лекарственное обеспечение на стационарном этапе
- Закупки лекарственных препаратов: реалии 2020 года и лучшие практики
- Фармацевтическое настоящее и фармацевтическое будущее

#### Панельные дискуссии высокого уровня

- Законодательство, регулирующее работу участников системы лекарственного обеспечения: что удалось сделать и над чем продолжаем работать
- Формирование законодательного контура в фармацевтической сфере: последствия для бизнеса и лекарственной доступности

#### Тематическая лекция

- Модернизация лекарственного обеспечения: что удалось и что не удалось сделать. Стресс-факторы системы

### СОВРЕМЕННЫЙ И ТЩАТЕЛЬНО ПРОДУМАННЫЙ ФОРМАТ ПРОВЕДЕНИЯ



- Пленарное заседание
- Секционные заседания
- Круглые столы
- Дискуссии
- Беседа в кулуарах

### ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБСУЖДЕНИЕ



Дополнительная информация  
на сайте [www.fru.ru](http://www.fru.ru),  
по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38,  
e-mail: [fru@fru.ru](mailto:fru@fru.ru)

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>  
УДК 615.322



Оригинальная статья/Research article

## Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.)

Г. В. Адамов<sup>1\*</sup>, Е. С. Мельников<sup>2</sup>, И. А. Лупанова<sup>1</sup>, А. И. Радимич<sup>1</sup>, О. Л. Сайбель<sup>1</sup>

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1  
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Адамов Григорий Васильевич. E-mail: grig.adamov@mail.ru

ORCID: Г. В. Адамов – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>; Е. С. Мельников – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>; И. А. Лупанова – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; А. И. Радимич – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; О. Л. Сайбель – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>.

Статья поступила: 07.05.2020. Статья принята в печать: 16.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Плоды Витекса священного являются перспективным источником получения фармацевтической субстанции для создания на её основе отечественного лекарственного средства для коррекции негативных проявлений предменструального синдрома и нарушений менструального цикла.

**Цель.** Изучить химический состав водно-этанольного экстракта плодов Витекса священного. Установить дофаминергическую активность различных фракций экстракта, разделенных по признаку липофильности для выявления наиболее активной фракции вторичных метаболитов.

**Материалы и методы.** Исследование качественного состава водно-этанольного извлечения проводили методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Идентификацию компонентов экстракта проводили путём сопоставления времен удерживания на хроматограммах испытуемого и стандартного образцов. Суммарный экстракт и фракции, полученные обработкой последовательно органическими растворителями различной полярности кубового остатка водно-спиртового извлечения из исследуемого сырья, были проанализированы с применением тирозингидроксилазной биотест-системы *in vitro*. В качестве препарата сравнения использовали Циклодинон®, капли для приема внутрь, действующим веществом которого является Прутняка обыкновенного плодов экстракт (*Vitex agni casti fructuum extract*).

**Результаты и обсуждение.** В исследуемом экстракте подтверждено наличие соединений: протокатеховая кислота, каftarовая кислота, хлорогеновая кислота, *l*-гидроксibenзойная кислота, агнузид, мизодендрон, 6'-*O*-*p*-гидроксibenзоилмусаенонидная кислота, лютеолин-7-глюкозид, 3,5-дифеолхинная кислота, витексин, лютеолин, апигенин, кастидин, артеметин, маслиниковая кислота, корозоловая кислота, линоленовая кислота, впервые идентифицированы цикориевая, кааftarовая и изохлорогеновая А кислоты. Полученный в лабораторных условиях жидкий экстракт продемонстрировал сопоставимую активность с коммерческим препаратом, на этом же уровне находились и этилацетатная фракция, и агнузид.

**Заключение.** Описаны результаты ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС анализа экстракта плодов Витекса священного. Приведены времена удерживания, максимумы поглощения в УФ области, характерные ионы масс-спектры большинства идентифицированных соединений. После фракционирования по принципу липофильности установлено, что ни одна из фракций экстракта не демонстрирует большую активность, чем суммарный экстракт. Это доказывает синергическое действие компонентов на дофаминовую нейромедиаторную систему и показывает целесообразность использования суммарного экстракта плодов Витекса священного. Агнузид в опытах *in vitro* демонстрирует высокую дофаминергическую активность, что допускает возможность стандартизации экстракта и лекарственного растительного сырья по содержанию агнузида.

**Ключевые слова:** Витекс священный, агнузид, ВЭЖХ-МС/МС, дофаминергическое действие.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы Г. В. Адамов, И. А. Лупанова, О. Л. Сайбель придумали и разработали эксперимент. Авторы Г. В. Адамов, Е. С. Мельников, А. И. Радимич провели химическое изучение плодов Витекса священного. И. А. Лупанова анализировала дофаминергические свойства с помощью тирозингидроксилазной биотест-системы и обработала полученные результаты. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Адамов Г. В., Мельников Е. С., Лупанова И. А., Радимич А. И., Сайбель О. Л. Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):143–149. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>

## Investigation of the Chemical Composition and Dopaminergic Activity of the *Vitex Agnus-castus* Fruits

Grigoriy V. Adamov<sup>1\*</sup>, Evgenij S. Melnikov<sup>2</sup>, Irina A. Lupanova<sup>1</sup>, Andrej I. Radimich<sup>1</sup>, Ol'ga L. Saybel<sup>1</sup>

1 – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Russia, 7/1, Green str., Moscow, 117216, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Grigoriy V. Adamov. E-mail: grig.adamov@mail.ru

ORCID: Grigoriy V. Adamov – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>; Evgenij S. Melnikov – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>; Irina A. Lupanova – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; Andrej I. Radimich – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; Ol'ga L. Saybel – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>.

Received: 07.05.2020. Revised: 16.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** *Vitex agnus-castus* is an important plant in medicine. Extract from its fruits is used as part of drugs for the treatment of premenstrual syndrome.

© Адамов Г. В., Мельников Е. С., Лупанова И. А., Радимич А. И., Сайбель О. Л., 2020

© Adamov G. V., Melnikov E. S., Lupanova I. A., Radimich A. I., Saybel O. L., 2020

**Aim.** To study the chemical composition of water-ethanol extract from Vitex fruits, to establish the dopaminergic activity of various extract fractions separated by lipophilicity, as that of its dominant iridoid-agnuside

**Materials and methods.** The composition of water-ethanol extraction was studied using HPLC-UV and HPLC-MS/MS methods. Identification of the extract components was performed by comparing the retention times on the chromatograms of the test and standard samples. The extract and its fractions were analyzed *in vitro* using the tyrosine hydroxylase biotest system. Cycloclonone® (oral drops, Vitex agni casti fructuum extract) was used as a reference drug.

**Results and discussion.** Protocatechuic acid, chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, agnuside, mizodendron, 6'-O-p-hydroxybenzoylmusaenoside acid, luteolin-7-glucoside, 5-O-caffeoylquinic acid, vitexin, luteolin, apigenin, maslinic acid, corosolic acid and linolenic acid were identified. The liquid extract obtained in the laboratory showed the same activity as Cycloclonone®, ethyl acetate fraction, and agnuside.

**Conclusion.** This work is the most extensive study of the vitex fruit in relation to the nomenclature of identified compounds. The total extract was shown to be more active than any of its fractions proving the synergistic effect of the extract components on the dopamine neurotransmitter system. This observation justifies the feasibility of using the total extract of the vitex fruit. *In vitro* agnuside demonstrates high dopaminergic activity. This makes it possible to standardize the extract and medicinal plant materials according to the agnuside content.

**Keywords:** Vitex agnus-castus, agnuside, HPLC-MS/MS, dopaminergic effect.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors Grigorij V. Adamov, Irina A. Lupanova, Ol'ga L. Saybel the experiment was developed by the authors Grigorij V. Adamov, Evgenij S. Melnikov, Andrej I. Radimich analyzed the chemical composition of the fruit of the Vitex agnus-castus. Irina A. Lupanova investigated dopaminergic properties using the tyrosine hydroxylase biotest-system and processed the results. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

**For citation:** Adamov G. V., Melnikov E. S., Lupanova I. A., Radimich A. I., Saybel O. L. Investigation of the chemical composition and dopaminergic activity of the Vitex agnus-castus fruits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):143-149. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>

## ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства растительного происхождения наряду с синтетическими препаратами широко используются для профилактики и лечения различных заболеваний. Зачастую уступая по эффективности, но при этом обладая меньшей токсичностью и минимальным проявлением побочных реакций, лекарственные растительные средства служат препаратами выбора для устранения симптоматических проявлений, а также и при хроническом течении в комплексной терапии патологических процессов.

Так, в гинекологической практике растительные препараты используются при нивелировании нежелательных проявлений предменструального синдрома (ПМС), коррекции нарушений менструального цикла, профилактики метаболических нарушений в климактерическом периоде и др. [1]. В них часто входит экстракт плодов Витекса священного. На территории РФ зарегистрирован препарат Циклодинон®, выпускающийся в форме таблеток и раствора для приема внутрь, также применяются многочисленные БАД (биологически активные добавки), наиболее популярны из которых мастокапс и мастофит.

Витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.) представляет собой многолетний древовидный кустарник семейства Вербеновые (*Verbenaceae*), произрастающий от Индии до черноморского побережья. Плоды данного растения широко используется в традиционной медицине разных стран для устранения симптомов ПМС, улучшения психоэмоционального состояния женщин,

нормализации менструального цикла, а также служат лекарственным растительным сырьём для получения официальных лекарственных средств.

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке зарегистрирован препарат Циклодинон®, активной фармацевтической субстанцией которого является сухой экстракт плодов Витекса. Опубликованные результаты клинических исследований свидетельствуют об эффективности и безопасности применения данного лекарственного средства для устранения симптомов ПМС, включая предменструальную мастодинию [2, 3].

Согласно данным литературы в основе механизма действия экстракта плодов Витекса лежит взаимодействие его вторичных метаболитов с дофаминовыми рецепторами гипоталамо-гипофизарной системы. Наряду с этим в опытах *in vitro* показано, что фармакологический эффект фракций данного растительного сырья обусловлен взаимодействием с опиоидными рецепторами центральной нервной системы, а также непосредственно эстрогенной активностью, т. е. обладает комплексным действием [4–6].

Таким образом, в рамках расширения номенклатуры отечественных лекарственных препаратов целесообразным является создание лекарственного средства на основе суммы биологически активных веществ плодов Витекса священного, доминирующим компонентом которого служат метаболиты, обладающие дофаминергической активностью.

В связи с этим целью настоящего исследования является выявление группы вторичных метаболитов, обладающих наибольшей дофаминергической актив-

ностью для разработки способа получения и обоснования методик стандартизации отечественной фармацевтической субстанции на основе плодов Витекса священного.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные спелые плоды Витекса священного, произрастающего в Македонии (2018 год заготовки).

В работе были использованы реактивы: спирт этиловый (96 %, ГОСТ Р 5962-2013, Россия), ацетонитрил (for LC-MS, Biosolve Chimie SARL, Франция), трифторуксусная кислота (ТФУ) (99 %, Panreac, Испания), вода очищенная 18,2 МОм·см, хлороформ (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия), этилацетат (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия), изопропанол (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия).

Использованные в исследовании стандартные образцы: хлорогеновая кислота, *n*-гидроксибензойная кислота, лютеолин-7-глюкозид, витексин, цикориевая кислота, лютеолин, апигенин – получены методом препаративной колоночной хроматографии. Стандартизация образцов проводилась методами ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС и ПМР (протонный магнитный резонанс) методом нормализации. Их чистота составляла не менее 90 %. Образец агнузида был стандартизован методом ядерно-магнитного резонансной спектроскопии, чистота составляет более 96 %.

Для фитохимического исследования использовали извлечение, полученное путём экстракции измельченного растительного сырья спиртом этиловым 70 % в соотношении 1:150 на водяной бане при температуре  $60 \pm 5$  °С в течение 60 мин. Извлечение фильтровали через бумажный складчатый фильтр «Синяя лента», отбрасывая первые 20 мл, и использовали для исследования методом ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ проводили на оборудовании ВЭЖХ-МС/МС LCMS-8040 – система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром, диодно-матричным спектрофотометрическим детектором Prominence SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.3). Хроматографическое разделение проводилось на колонке Luna 5 мкм C18 100Å 250 × 4,6 мм в градиентном режиме элюирования. Элюент «А» – 0,1 % об. водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент «В» – ацетонитрил. Начальная объемная доля элюента «В» составляла 10 %, с 3 по 20 мин повышалась до 25 %, на 30 минуте достигала 40 %, на 40 минуте – 60 %, с 55 по 60 минуту составляет 100 %, затем до 62 минуты система возвращалась к начальным условиям и уравновешивалась до 65 минуты. Скорость элюирования – 1 мл/мин, термостатирование колонки при 30 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Идентификацию компонентов экстракта осуществляли по данным УФ-спектров, масс-спектров пиков веществ, их сопоставлению с данными характеристиками ранее выделенных индивидуальных соединений, а также с данными литературы. Для некоторых веществ были подобраны условия детектирования в отличающемся высокой селективностью режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring – MRM).

Получение фракций биологически активных веществ (БАВ) различной липофильности осуществляли путём трёхкратной экстракции измельченного растительного сырья спиртом этиловым 70 % в соотношении 1:10 на водяной бане при температуре  $60 \pm 5$  °С, концентрирования извлечения до водного остатка и последовательной жидкостной экстракции петролейным эфиром 70/100, хлороформом, насыщенным водой этилацетатом, насыщенным водой спиртом бутиловым (трехкратная экстракция каждым растворителем в соотношении 1:1). Все полученные фракции упаривали до густого состояния на ротационном испарителе модели IKA RV 10 при температуре не выше 40 °С, затем досушивали в вакуумном шкафу при той же температуре.

Исследование дофаминергической активности фракций БАВ проводили с использованием специфической тирозингидроксилазной (ТГ) биотест-системы *in vitro*, позволяющей избирательно выявлять вещества, обладающие непосредственным сродством к дофаминергической нейромедиаторной системе [7]. Ее специфичность обусловлена наличием одинаковых участков «узнавания» у дофаминовых рецепторов и тирозингидроксилазы, обеспечивающих избирательное связывание с лигандами, проявляющееся в условиях данного опыта снижением активности последней. Данная ферментная биотест-система входит в состав уникальной научной установки из группы «Биологические коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР».

Тирозингидроксилазу получали из гомогената лейкоцитов крови кроликов породы шиншилла, содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБНУ ВИЛАР. Оценку скорости тирозингидроксилазной реакции, обусловленной окислением 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (ДМПН<sub>4</sub>) в ДМПН<sub>2</sub>, сопряженным с превращением субстрата реакции L-тирозина в L-ДОФА. pH среды 6,2 проводили методом прямой спектрофотометрии на биохимическом анализаторе CLIMA MC-15 (RAL, Испания) при 335 нм, обусловленной окислением 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (ДМПН<sub>4</sub>) в ДМПН<sub>2</sub>, сопряженным с превращением субстрата реакции L-тирозина в L-ДОФА. pH среды 6,2.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 10,0 (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распре-

делением, приближающимся к нормальному, использовался t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости Р при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена хроматограмма водно-спиртового экстракта плодов Витекса священного. При этом детектирование осуществляли при длине волны 254 нм, поскольку в этой области спектра поглощает большинство фенольных соединений.

Для определения молекулярной массы веществ в составе экстракта анализировали соответствующие интересующим пикам на хроматограмме масс-спектры, полученные в режимах сканирование полного ионного тока при положительной и отрицательной ионизации. В случае, если значения  $m/z$  соответствуют молекулярному иону, значение  $m/z$  при отрицательной ионизации должно быть на 2 единицы меньше значения  $m/z$  при положительной ионизации, так как основным направлением формирования молекулярных ионов при ионизации электрораспылением являются процессы протонирования или депротонирования молекул. Иными словами, в масс-спектрах искали  $m/z$ , соответствующие  $[M + H]^+$  и  $[M - H]^-$ . Однако не все компоненты экстракта одинаково хорошо ионизируются в обоих режимах, в связи с чем требовались дополнительные критерии обнаружения молекулярных ионов. Особенностью ионизации электрораспылением является возможность формирования аддуктов

и кластеров веществ и компонентов подвижной фазы. Например, в режиме положительной ионизации помимо  $[M + H]^+$  обычно наблюдаются  $m/z [M + 18]^+$  – присоединение катиона аммония,  $[M + 23]^+$  – присоединение катиона натрия и др. Обнаружение этих аддуктов в масс-спектрах значительно повышает достоверность идентификации веществ по молекулярной массе.

В режиме отрицательной ионизации крайне характерно присоединение к депротонированному молекулярному иону ТФУ, в связи с чем в масс-спектре возникают ионы со значением  $m/z [M - H + ТФУ]^-$ , что на 114 единиц больше, чем  $[M - H]^-$ . Таким образом, обнаружение в масс-спектре, полученном при отрицательной ионизации, пары пиков со значениями  $m/z$ , отличающимися на 114 единиц практически гарантирует достоверное определение молекулярной массы.

В результате анализа полученных данных было идентифицировано в исследуемом извлечении 22 соединения (таблица 1).

Таким образом, комплекс БАВ представлен соединениями, относящимися к группам фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, иридоидов и терпеноидов.

В составе экстракта обнаружено 3 изомера лютеолин-глюкозида, благодаря использованию стандарта по времени удерживания удалось идентифицировать лютеолин-7-глюкозид. Использование витексина также позволило исключить при идентификации пика № 11 аналогичный по УФ и масс-спектру изовитексин.

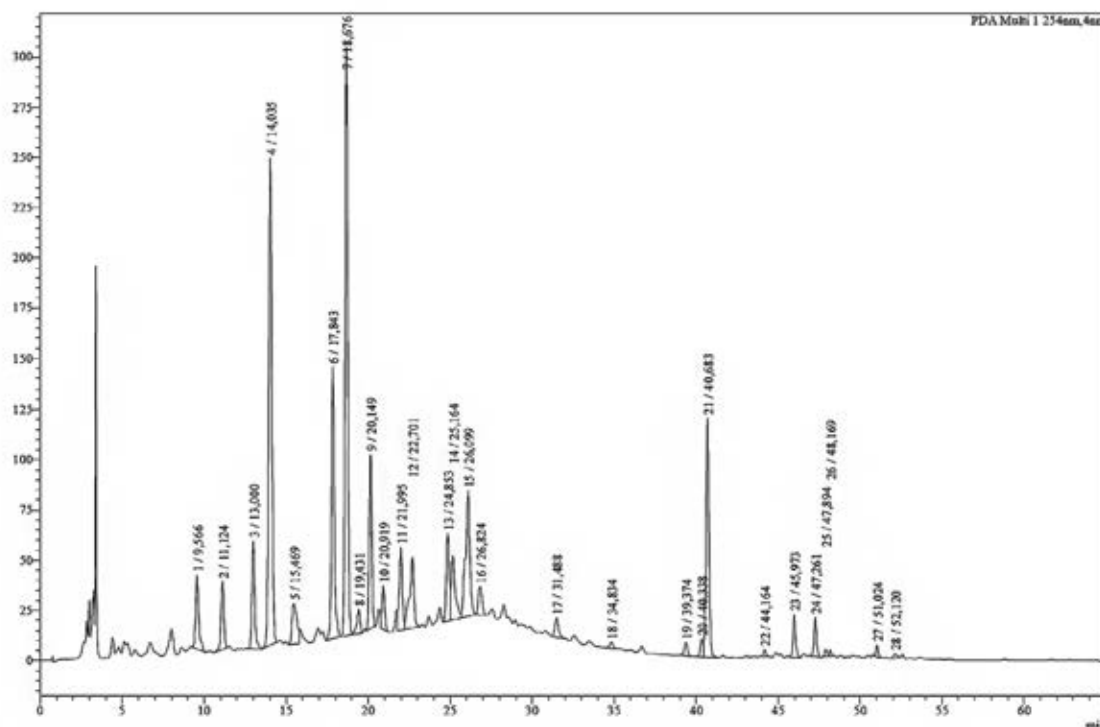


Рисунок 1. ВЭЖХ-УФ хроматограмма водно-спиртового извлечения плодов Витекса священного (254 нм)

Figure 1. HPLC-UV chromatogram of water-alcohol extraction of Vitex agnus-castus fruit (254 nm)

Таблица 1. Характеристика соединений, идентифицированных в плодах витекса священного

Table 1. Characterization of compounds identified in Vitex agnus-castus fruit

	Название Name	Время удерживания, (мин) Retention Time (min)	Молярная масса (Da) Molar mass (Da)	Механизм образования иона The mechanism of ion formation	Основные ионы, (m/z) Basic ions, (m/z)		Максимум поглощения в УФ области, (нм) UV absorption maximum, (nm)	Ранее обнаружено Previously discovered
					положительная ионизация positive ionization	отрицательная ионизация negative ionization		
1	Протокатеховая (3,4-дигидроксibenзойная) кислота Protocatechuic (3,4-dihydroxybenzoic) acid	9,56	154	[M + H] <sup>+</sup>	155		260, 294	[8]
2	Кафтаровая кислота Kaftaric acid	11,12	312	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	313	311	258	–
3	Хлорогеновая кислота <sup>1,3</sup> Chlorogenic acid <sup>1,3</sup>	13,00	354	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	355	353, 467	326	[9]
4	p-гидроксibenзойная кислота <sup>1</sup> p-hydroxybenzoic acid <sup>1</sup>	14,03	138	[M + H] <sup>+</sup>	139	–	250	[8]
5	Лютеолин глюкозид <sup>2</sup> Luteolin Glucoside <sup>2</sup>	17,84	448	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	449	447, 561	349	[10]
6	Агнузид <sup>1</sup> Agnuzide <sup>1</sup>	18,67	466	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	449	447	248	[11]
7	Мизодендрон <sup>2</sup> Misodendron <sup>2</sup>	19,43	342	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	343, 325	341, 455		[12]
8	6'-О-p-гидроксibenзоилмусаено- зидная кислота 6'-O-p- hydroxybenzoylmusaenoside acid	20,14	496	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	497	495, 609	250	[12]
9	Лютеолин-7-глюкозид <sup>1</sup> Luteolin-7-glucoside <sup>1</sup>	21,99	448	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	449	447, 561, 545	346	[10]
10	Изохлорогеновая кислота А <sup>1</sup> Isochlorogenic acid А <sup>1</sup>	24,85	516	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	517, 499	515, 629	328	–
11	Витексин <sup>1</sup> Vitexin <sup>1</sup>	25,16	432	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	433, 386	431	–	[13]
12	Цикориевая кислота <sup>1</sup> Chicory acid <sup>1</sup>	26,09	474	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	475	473, 587	329	–
13	Лютеолин <sup>1,2</sup> Luteolin <sup>1,2</sup>	31,48	286	[M + H] <sup>+</sup>	287	–	330	[14]
14	Апигенин <sup>1</sup> Apigenin <sup>1</sup>	34,83	270	[M + H] <sup>+</sup>	271	–	336	[14]
15	Пендулетин/эупаторин Penduletin/eupatorin	39,37	344	[M + H] <sup>+</sup>	345	–	339	[13, 14]
16	Пендулетин/эупаторин Penduletin/eupatorin	40,33	344	[M + H] <sup>+</sup>	345	–	339	[13, 14]
17	Кастичин Casticin	40,68	374	[M + H] <sup>+</sup>	375	–	348	[15]
18	Артеметин Artemetin	44,16	388	[M + H] <sup>+</sup>	389	–	–	[8]
19	Гидрокси-тетраметоксифлаво <sup>2</sup> Hydroxy-tetramethoxyflavone <sup>2</sup>	45,97	358	[M + H] <sup>+</sup>	359	–	358	[16]
20	Маслянико <sup>1</sup> Butyric acid	47,89	472	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	473, 455, 437, 409,	507	–	[14]
21	Корозоло <sup>1</sup> Corosol Acid	48,16	472	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	473, 455, 437, 409,	507	–	[14]
22	Линоленовая кислота <sup>2</sup> Linolenic acid <sup>2</sup>	52,12	280	[M – H] <sup>-</sup>	–	279	–	[5]

Примечание: <sup>1</sup> Идентификация дополнительно проведена по времени удерживания в соответствии со стандартным образцом.

<sup>2</sup> Идентификация дополнительно проведена с помощью детектирования в режиме MRM.

Note: <sup>1</sup> Identification verified additionally using standard substance retention time.

<sup>2</sup> Identification verified additionally using MRM detection.

В основе механизма фармакологического действия суммарных экстрактов витекса лежит влияние на дофаминергическую нейромедиаторную систему. Снижение секреции дофамина в женском организме, например в условиях хронического стресса, может приводить к повышению содержания пролактина в крови, что в свою очередь способствует возникновению пролиферативных изменений в молочной железе и вызывает мастодению, а также выступает причиной недостаточности лютеиновой фазы и, как следствие, бесплодия. Взаимодействуя с дофаминовыми рецепторами вторичные метаболиты витекса позволяют снижать уровень пролактина в крови и тем самым способствуют устранению её негативных проявлений.

В связи с этим именно оценка дофаминергических свойств выбрана нами для скрининговых исследований для выявления наиболее активных фракций БАВ плодов Витекса священного.

Для установления группы веществ, обладающей дофаминергической активностью, нами были получены фракции БАВ различной липофильности и определена их активность *in vitro*. Специфическая ферментная биотест-система *in vitro* на основе тирозингидроксилазы позволяет специфически выявлять вещества, обладающие непосредственным сродством к дофаминергической нейромедиаторной системе [7]. Это обусловлено тем, что в тирозингидроксилазе и дофаминовых рецепторах имеются одинаковые места «узнавания», обеспечивающие избирательное связывание со специфическими лигандами. Поэтому тирозингидроксилаза может использоваться в качестве модели «узнающих» сайтов дофаминовых рецепторов для выявления дофаминергических БАВ. В течение многих лет ТГ считалась нейроспецифическим ферментом. Но в 1985 году было проведено исследование, в результате которого ТГ была обнаружена в белых клетках крови [17]. По своим кинетическим характеристикам ТГ клеток крови близка к ТГ гипоталамуса мозга. Поэтому ТГ клеток крови может быть использована в качестве основы для теста, позволяющего выявлять дофаминергические вещества *in vitro*.

В качестве препарата сравнения был выбран Циклодинон®, также был исследован иридоид агнузид (чистота не менее 96 %) – доминирующий компонент плодов витекса, выделенный нами ранее из данного сырья.

Предварительно изучив форму зависимости скорости реакции от концентрации вещества в пробе, нами было установлено, что зависимость скорости ферментативных реакций *in vitro* от концентрации изучаемых образцов описывается кривой с максимумом, который соответствует оптимальной его концентрации в пробе. Поэтому сравнительное изучение активности фермента в присутствии объектов исследования проводили при оптимальных концентрациях (3,3 и 6,6 мкг/мл).

В таблице 2 представлены результаты определения активности тирозингидроксилазы, все определения проводились в трех повторностях.

**Таблица 2. Влияние фракций экстракта плодов Витекса священного на ингибирование тирозингидроксилазы *in vitro***

**Table 2. The effect of fractions of the extract of vitex fruit on tyrosinehydroxylase inhibition *in vitro***

Наименование образца Sample Name	Скорость реакции, М ± m The reaction rate, M ± m		
	нмоль/мин на 10 мкл гомогената nmol/min per 10 µl of homogenate	%	
Контроль Control	6,1 ± 0,29	100	
Дофамин, 10 мкМ Dopamine, 10 µM	1,2 ± 0,05*	20	
Суммарный экстракт Total extract	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	3,8 ± 0,17*	61
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,4 ± 0,20*	72
Петролейная фракция Petroleum fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,9 ± 0,21*	80
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,8 ± 0,21*	78
Хлороформная фракция Chloroform fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	6,7 ± 0,30	108
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	6,1 ± 0,29	99
Бутанольная фракция Butanol fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	5,2 ± 0,24*	85
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,9 ± 0,22*	81
Этилацетатная фракция Ethyl acetate fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,8 ± 0,22*	68
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,1 ± 0,19*	65
Водная фракция Water fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	6,0 ± 0,29	97
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	6,0 ± 0,28	97
Агнузид Agnuzid	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	3,9 ± 0,19*	64
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,4 ± 0,21*	71
Циклодинон® Cyclodinone®	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,3 ± 0,20*	70
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,8 ± 0,22*	79

**Примечание:** \* Статистическая значимость отличий от контроля при P ≤ 0,05.

M – средняя арифметическая величина.  
m – ошибка средней арифметической.

**Note:** \* Level of statistical significance at P ≤ 0.05.

M – arithmetic mean.  
m – arithmetic mean error.

Как видно из таблицы 2, дофамин, природный ретроингибитор тирозингидроксилазы и агонист дофаминовых рецепторов, *in vitro* значительно тормозил скорость реакции. Образцы суммарного экстракта, бутанольной, этилацетатной, петролейной

фракций, агнузид 96 %, а также препарат сравнения Циклодинон® оказывали угнетающее действие на активность тирозингидроксилазы. Однако количественно эффекты всех образцов были значительно слабее эффекта дофамина.

Так, в присутствии образца этилацетатной фракции в концентрации 3,3 мкг/мл скорость реакции составляла 68 % от скорости реакции в контроле, в присутствии образца петролейной фракции в большей концентрации – 80 %, в присутствии агнузида (3,3 мкг/мл) – 64 %, в присутствии суммарного экстракта (3,3 мкг/мл) – 61 %. Стоит отметить, что в большей концентрации препарат сравнения Циклодинон® ингибировал фермент слабее: 70 % в присутствии образца в концентрации 6,6 мкг/мл против 79 % при концентрации 3,3 мкг/мл. Аналогичную тенденцию, обратный дозозависимый эффект, продемонстрировал и полученный нами суммарный экстракт.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что суммарный экстракт плодов витекса и препарат Циклодинон® обладают сопоставимой дофаминергической активностью в условиях проведенного эксперимента. Среди фракций БАВ наибольшую активность показала этилацетатная. Согласно проведенному хроматографическому исследованию, в состав данной фракции входят протокатеховая кислота, хлорогеновая кислота, *n*-гидроксibenзойная кислота, лютеолин-7-гликозид и его изомер, агнузид, 6'-*O*-*p*-гидроксibenзоилмусаенозидная кислота, витексин, апигенин. В целом, этилацетатная фракция является самой представительной по номенклатуре фенольных соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что состав вторичных метаболитов плодов Витекса священного представлен фенолкарбоновыми кислотами, флавоноидами, иридоидами и терпеноидами.

Дофаминергическая активность суммарного экстракта плодов витекса сопоставима с таковой у препарата сравнения Циклодинон®. Полученные данные подтверждает рациональность использования суммарного экстракта в качестве фармацевтической субстанции.

Скрининговая оценка биологической активности фракций различной полярности показала, что наибольшее дофаминергическое действие оказывает этилацетатная фракция, в которой находятся идентифицированные иридоиды и многие флавоноиды.

Дофаминергическая активность агнузида аналогична препарату сравнения и суммарному экстракту, что обуславливает возможность стандартизации по содержанию иридоидов группы аукубина, тогда как в настоящее время стандартизация плодов Витекса священного проводится по содержанию кастигина – доминирующего флавоноида плодов витекса, не оказывающего дофаминергических свойств.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wuttke V., Zaydlova-Wuttke D., Yarri G., Artymuk, N. The role of the Vitex agnus castus in gynecological endocrinology. *Zdrov'e zhenshchiny = Health of woman*. 2016;10:24–27. (In Ukraine).
2. Prilepskaya V. N., Ledina A. V., Tagiyeva A. V., Revazova F. S. Vitex agnus castus: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. *Maturitas*. 2006;55:55–63. Doi: 10.1016/j.maturitas.2006.06.017.
3. Jarry H., Spengler B., Wuttke W., Christoffel V. In vitro assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in Vitex agnus-castus. *Maturitas*. 2006;55:526–536. Doi: 0.1016/j.maturitas.2006.06.014.
4. Jarry H., Spengler B., Wuttke W., Christoffel V. In vitro assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in Vitex agnus-castus. *Maturitas*. 2006;55:526–536. Doi: 0.1016/j.maturitas.2006.06.014.
5. Liu J., Burdette J. E., Sun Y., Deng S., Schlecht S. M., Zheng W., Nikolic D., Mahady G., van Breemen R. B., Fong H. S., Pezzuto J. M., Bolton J. L., Farnsworth N. R. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of Vitex agnus-castus L. (chaste-berry). *Phytomedicine*. 2004;11(1):18–23.
6. Meier B., Berger D., Hoberg E., Sticher O., Schaffner W. Pharmacological activities of Vitex agnus-castus extracts *in vitro*. *Phytomedicine*. 2000;7(5):373–381. Doi: 10.1016/S0944-7113(00)80058-6.
7. Mineeva-Vyalykh M. F. A Direct spectrophotometric method for estimation of the rate of tyrosine hydroxylase reaction (Russian). *Voprosy medicinskoj himii = Biomeditsinskaya Khimiya*. 1976;22(2):274–279. (In Russ.).
8. Choudhary M. I., Jalil S., Nawaz S. A., Khan K. M., Tareen R. B. Antiinflammatory and lipoxigenase inhibitory compounds from vitex agnus-castus. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009;23(9):336–339. Doi: 10.1002/ptr.2639.
9. Şarer E., Gökbulut, A. Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of Vitex agnus-castus. *Turk J. Pharm. Sci*. 2008;5(3):167–174.
10. Mari A., Montoro P., D'Urso G., Macchia M., Pizza C., Piacente S. Metabolic profiling of Vitex agnus castus leaves, fruits and sprouts: analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;102:215–221. Doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.018.
11. Hoberg E., Meier B., Sticher O. An analytical high performance liquid chromatographic method for the determination of agnuside and *p*-hydroxybenzoic acid contents in Agni-casti fructus. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2000;11(5):327–329. Doi: 10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<327::AID-PCA523>3.0.CO;2-0.
12. Kuruüzüm-Uz A., Ströck K., Demirezer L. Ö., Zeeck, A. Glucosides from Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*. 2003;63(8):959–964. Doi: 10.1016/S0031-9422(03)00285-1.
13. Hajdú Z., Hohmann J., Forgo P., Martinek T., Dervarics M., Zupkó I., Falkay G., Cossuta D., Máthé I. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus-castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2007;21(4):391–394. Doi: 10.1002/ptr.2021.
14. Chen S. N., Friesen J. B., Webster D., Nikoli, D., van Breemen R. B., Wang Z. J., Pauli G. F. Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. *Fitoterapia*. 2011;82(4):528–533. Doi: 10.1016/j.fitote.2010.12.003.
15. Liu J., Burdette J. E., Xu H., Gu C., Van Breemen R. B., Bhat K. P., Booth N., Constantinou A. I., Pezzuto J. M., Fong H. S., Farnsworth N. R., Bolton J. L. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(5):2472–2479. Doi: 10.1021/jf0014157.
16. Makhmoor T., Choudhary M. I. Radical scavenging potential of compounds isolated from Vitex agnus-castus. *Turkish Journal of Chemistry*. 2010;34(1):119–126.
17. Mineeva M. F. Tyrosinehydroxylase of leukocytes from blood. *Byulleten'eksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1987;104(7):99–101. (In Russ.).



Оригинальная статья/Research article

## Разработка методики количественного определения диосгенина из семян пажитника сеного, *Trigonella foenum-graecum* L.

А. Е. Суханов<sup>1\*</sup>, А. Н. Ставрианиди<sup>2</sup>, Е. Д. Кубасова<sup>1</sup>, А. С. Панасюк<sup>1</sup>, О. В. Буюклинская<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России), фармацевтический факультет, кафедра фармации и фармакологии, 163001, Россия, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51  
2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), химический факультет, кафедра аналитической химии, 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

\*Контактное лицо: Суханов Антон Евгеньевич. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: А. Е. Суханов – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; А. Н. Ставрианиди – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Е. Д. Кубасова – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; А. С. Панасюк – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Статья поступила: 25.03.2020. Статья принята в печать: 23.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Современные фармакогностические исследования направлены на поиск растительных биологически активных индивидуальных соединений (далее – РБАИС), выделяемых из растительных экстрактов.

**Цель.** Изучение содержания стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сеного в растительных экстрактах методом ВЭЖХ-УФ.

**Материалы и методы.** Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сеного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Проведены серии экстракции и хроматографического разделения методом ВЭЖХ-УФ.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе была успешно оптимизирована методика экстракции диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина 5 % водным раствором кислоты хлористоводородной при нагревании в течение не менее 4 часов на песчаной бане при мощности последней в 150 Вт) из сырья семян пажитника сеного с использованием 50 % водного раствора изопропанола, х.ч. Была предложена упрощённая методика хроматографического разделения диосгенина из экстрактов семян пажитника сеного с использованием изократического режима элюирования 99,9 % ацетонитрилом, х.ч.

**Заключение.** Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина) в семенах пажитника сеного с учётом влажности сырья составляет ( $M \pm \sigma$ )  $5,3 \pm 0,05$  мг/г (95 % ДИ:  $5,1-5,4$  мг/г;  $n = 6$ ).

**Ключевые слова:** семена пажитника сеного, диосгенин, экстракция, ВЭЖХ-УФ.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** А. Е. Суханов и А. Н. Ставрианиди разработали и оптимизировали методику экстракции диосгенина из растительного сырья, а также разработали методику количественного определения ВЭЖХ-УФ. Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк и О. В. Буюклинская проводили интерпретацию результатов анализа. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов анализов.

**Для цитирования:** Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В. Разработка методики количественного определения диосгенина из семян пажитника сеного, *Trigonella foenum-graecum* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(3):150–156. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-150-156>

## Method Development for Quantitative Determination of Diosgenin from the Seeds of Fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L.

Anton E. Sukhanov<sup>1\*</sup>, Andrej N. Stavrianiidi<sup>2</sup>, Elena D. Kubasova<sup>1</sup>, Aleksandra S. Panasyuk<sup>1</sup>, Ol'ga V. Buyuklinskaya<sup>1</sup>

1 – Northern State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy and Pharmacology, 51, Troitsky av., Arkhangelsk, 163000, Russia  
2 – Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, 1/3, Leninskie Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Anton E. Sukhanov. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: Anton E. Sukhanov – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; Andrej N. Stavrianiidi – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Elena D. Kubasova – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; Aleksandra S. Panasyuk – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; Ol'ga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Received: 25.03.2020. Revised: 23.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Modern pharmacognostic research is aimed at searching for plant biologically active individual compounds (RBAIS) isolated from plant extracts.

**Aim.** Study of the content of the steroid sapogenin diosgenin in fenugreek seeds in plant extracts by HPLC-UV method.

**Materials and methods.** The object of study was raw materials-fenugreek seeds produced as medicinal plant raw materials by LLC «Sage» (Irkutsk). Series of extraction and chromatographic separation by HPLC-UV method were performed.

**Results and discussion.** In this work, the method of diosgenin extraction was successfully optimized (after acid hydrolysis of dioscin with a 5 % aqueous solution of hydrochloric acid when heated for at least 4 hours in a sand bath at a power of 150 W) from raw fenugreek seeds using a 50 % aqueous solution of isopropanol, h.h. A simplified technique for chromatographic separation of diosgenin from fenugreek seed extracts using an isocratic mode of 99.9 % acetonitrile elution (h.h.) was proposed.

**Conclusion.** The average content of diosgenin (after acid hydrolysis of dioscin) in fenugreek seeds, taking into account the humidity of raw materials, is ( $M \pm \sigma$ )  $5,3 \pm 0,05$  mg/g (95 % CI:  $5,1-5,4$  mg/g;  $n = 6$ ).

© Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В., 2020

© Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V., 2020

**Keywords:** fenugreek seeds, diosgenin, extraction, HPLC-UV.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Anton E. Sukhanov and Andrej N. Stavrianiidi developed and optimized a method for extracting diosgenin from plant raw materials, and also developed a method for quantifying HPLC-UV. Elena D. Kubasova, Aleksandra S. Panasyuk and Ol'ga V. Buyuklinka carried out the interpretation of the results. All the authors participated in the discussion of the results of the analyses.

**For citation:** Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V. Method development for quantitative determination of diosgenin from the seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):150–156. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-150-156>

## ВВЕДЕНИЕ

Современные фармакогностические исследования направлены на поиск растительных биологически активных индивидуальных соединений (далее РБАИС), выделяемых из растительных экстрактов. Определяется то, что в растительных тканях и органах преобладают вещества с низкой молекулярной массой и являются, как правило, вторичными метаболитами. К таким веществам относятся, например стероидные сапонины. Как показали ряд научных исследований, стероидные гликозиды и их сапогенины, в частности диосгенин, обладают противораковым действием, оказывая цитотоксический эффект на клетки разных типов злокачественных опухолей, иммуностропным действием [1–2], гипогликемическим действием, нормализует уровень гормонов щитовидной железы в эксперименте [3–4]. Вместе с тем влияя на функции желез внутренней секреции экспериментальных животных и пролиферацию раковых клеток, диосгенин и другие стероидные сапогенины обладают гипохолестеринемическим действием [5–6]. Стероидные сапонины и их сапогенины оказывают губительное действие на разные виды моллюсков, а также на животных, дышащих жабрами [7]. Стероидный сапогенин диосгенин используется в химико-фармацевтической промышленности как исходный продукт для синтеза стероидных гормонов, для получения препарата «Полиспонин» (в составе сухого экстракта диоскореи ниппонской), и входит в состав сухих экстрактов диоскореи ниппонской и якорцев стелющихся, а также в состав комплексных смесей для пауэрлифтеров «Трибулус».

Диосцин и его агликон диосгенин являются основными хемосистематическими маркерами лекарственных растений диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Mikino) и якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.).

Стероидный сапогенин диосгенин был идентифицирован в сырье видов диоскореи (ямс), якорцев, юкк, спаржи и является довольно-таки распространённым стероидным сапогенином в определённых видах растений, обнаружен в составе тканей некоторых представителей семейства бобовые.

Нами из сырья семян пажитника сеного (*Trigonella foenum-graecum* L.) был выделен и идентифицирован стероидный сапогенин диосгенин.

**Цель работы** – изучение содержания стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сеного в растительных экстрактах методом ВЭЖХ-УФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сеного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья ООО «Шалфей» (г. Иркутск).

### Основные реактивы

Ацетонитрил, ч.д.а., HPLC Gradient 99,9 % (Biochem Chemopharma, Франция).

Кислота хлористоводородная, х.ч. 37,3 % (ГОСТ 3118-77, АО «Ленреактив», Россия).

Спирт изопропиловый, х.ч., 99,9 % (ЗАО «ЭКОС-1», Россия).

Диосгенин, порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 % навеска 100 мг, серия 011118 (ООО «Фитопанацея», Россия).

### Вспомогательное оборудование

Весы аналитические электронные «Acculab ALC-210d4» (Sartorius Group, США) с диаметром весовой чаши 80 мм и максимальной нагрузкой 210 г.

Ванна ультразвуковая ВУ-09-«Я-ФП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) с объёмом рабочей ёмкости 2,7 л и резонансной частотой 40 кГц.

Шейкер лабораторный «Laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша).

Центрифуга лабораторная ОПн-8 (ОАО НК «Дастан», Россия) со скоростью 8000 об/мин.

Мельница лабораторная ЛМ-202 (ООО «ПЛАУН», Россия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 10 мкл до 100 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 0,1 мкл до 3 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Ленпипет с постоянным объемом дозирования 1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, США).

### Методика исследования абсолютной влажности сырья

Перед хроматографическими исследованиями нами проведено исследование влажности растительного сырья – семян пажитника сеного в соответствии с ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ РФ 14 издания (2018 г.), том 2, стр. 2361 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [8].

### Методика и параметры хроматографирования

**Параметры хроматографирования:** градиентный высокоэффективный жидкостный хроматограф «Стайер» (АО «Аквилон», Россия) с двумя прецизионными насосами высокого давления серии I и серии II (для градиентных систем), динамическим смесителем «MS 16», контроллером термостата колонки «TS10» и дегазатором элюента «DG 18». Детектор спектрофотометрический «UVV-104.1M» с рабочим диапазоном длин волн от 190 до 600 нм. Рабочая длина волны детектора – 205 нм. Инжектор ручного типа «Rheodyne» с объемом петли 20 мкл. Обращенно-фазовая колонка «Luna, 250 × 4,6 мм, 3 мкм», заполненная сорбентом на основе гидрофобизированного силикагеля C18 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из одного растворителя – ацетонитрил, ч.д.а. 99,9 %, HPLC Gradient (Biochem Chemopharma, Франция). Скорость подачи мобильной фазы в изократическом режиме – 0,4 мл/мин. Температура колонки – 60 °С.

Объем вводимой пробы – 20 мкл. Петлю дозатора объемом 20 мкл промывали 3-кратным объемом пробы.

**Обработка хроматограмм.** Обработку полученных хроматограмм производили в ручном режиме с использованием автоматизированной системы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсенд» (Россия).

### Методика количественного определения

*Количественное определение диосгенина в растительных экстрактах и в лекарственном растительном сырье с использованием внешнего стандарта (ESM-метод) в «ручном» режиме подсчета концентрации.*

Расчет количественного содержания диосгенина в растительных экстрактах осуществлялся методом внешнего стандарта с использованием рабочего раствора растительного государственного стандартного образца (далее – РГСО) с концентрацией 250 мкг/мл, и производился по формуле:

$$C_{\text{экстр.}} = \frac{S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P}{S_{\text{станд.}} \cdot V_{1\text{станд.}} \cdot V_{2\text{станд.}} \cdot 100\%}, \quad (1)$$

где 100 % – множитель для сокращения процентов;  $a_{\text{станд.}}$  – навеска стандарта растительного вещества для приготовления раствора РГСО (точная навеска), 20 мг;  $C_{\text{экстр.}}$  – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл;  $P$  – содержание чистого вещества в стандарте, не менее 98,5 %;  $S_{\text{иссл.}}$  – площадь пика диосгенина в растительном экстракте, mAU · с;  $S_{\text{станд.}}$  – площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина, mAU · с;  $V_{1\text{станд.}}$  – объем растворителя для приготовления стандартного раствора РГСО, 20 мл;  $V_{2\text{станд.}}$  – объем растворителя для приготовления рабочего раствора РГСО, до 10 мл;  $V_{\text{аликв.}}$  – объем аликвоты, пошедший на растворение, для приготовления рабочего раствора РГСО, например, с концентрацией 250 мкг/мл, 2,5 мл.

Расчет содержания диосгенина в сухом сырье:

$$C_{\text{иссл.}} = \frac{C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100\%}{a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100\% - W\%)}, \quad (2)$$

где 100 % – сокращение процентов по показателю «влажность сырья»;  $a$  – навеска исходного растительного сырья, 500 мг;  $a_{\text{сух.}}$  – масса сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания (точное взвешивание), мг;  $a_{\text{сух.1}}$  – навеска от сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки (точная навеска), мг;  $C_{\text{экстр.}}$  – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл;  $V$  – объем раствора в виале, 10 мл;  $C_{\text{иссл.}}$  – содержание диосгенина в сухом сырье – семенах пажитника сеного, мг/г.

*Количественное определение диосгенина в лекарственном растительном сырье с использованием градуировочных растворов в «ручном» режиме подсчета концентрации.*

Точную навеску РГСО диосгенина (порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 %) массой 20 мг растворяли в 20 мл комбинированного растворителя состава: 16 мл 99,9 % ацетонитрила, ч.д.а. (Biochem Chemopharma, Франция), 2 мл воды деионизированной, 2 мл 99,9 % изопропанола, х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия) (8:1:1 по объему). Это стандартный раствор РГСО диосгенина с концентрацией 1000 мкг/мл (1 мг/мл).

Приготовленный стандартный раствор РГСО диосгенина использовался для получения серии рабочих (градуировочных) растворов РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 мкг/мл до 1000 мкг/мл.

### Методики пробоподготовки растительного сырья

По литературным данным наиболее широко используемым растворителем для экстракции из растительного сырья стероидных сапогенинов является метанол или его комбинации с другими органическими растворителями [9]. Однако метанол ядовит и не все химические лаборатории имеют лицензию на использование метилового спирта в

своей деятельности. В ходе дальнейших изысканий оптимального органического растворителя для экстракции стероидных сапогенинов из растительного материала [10] показали наибольшую приемлемость для данной цели 50 % изопропанола в комбинации с озвучиванием в течение 10 минут. Однако подэтап кислотного гидролиза, содержащегося в экстрактах гликозида диосцина, не был указан. Кислотный гидролиз необходим для разрыва О-гликозидной связи между гликоном и агликоном (диосгенином) с целью увеличения выхода диосгенина в процессе экстракции.

Экстракция стероидного сапогенина диосгенина для целей ВЭЖХ-УФ проводилась по методике в модификации [11–12].

**Этап пробоподготовки № 1.** Отбирали по 0,5 г измельчённых семян и последовательно добавляли в колбы для экстракции 8,5 мл 50 % изопропанола, х.ч., перемешивая на лабораторном шейкере «Laboratory shaker type 358S» (Elrap, Польша) после каждого добавления в течение одного часа. Изопропанольный экстракт был подвержен гидролизу 5 % раствором кислоты хлористоводородной, ч.д.а. в 50 % изопропаноле, ч.д.а. (10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной, х.ч. и 10 мл 99,9 % изопропанола, х.ч.) в течение 4 часов на песчаной бане при температуре 70 °С при мощности 150 Вт. Суммарный объём экстракта до начала термического гидролиза составлял 28,5 мл. По мере испарения изопропанола и уменьшения объёма экстракта в процессе кислотного гидролиза на протяжении 4 часов в колбу добавляли смесь 10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной и 10 мл 99,9 % изопропанола. После проведения термического кислотного гидролиза надосадочную жидкость (изопропанольный экстракт) декантировали в фарфоровые чашки для упаривания остаточной жидкой фазы на песчаной бане до получения сухого остатка, не допуская подгорания последнего. Массу сухих остатков взвешивали на аналитических весах Acculab ALC-210d4 с точностью до четвёртого знака после запятой. В дальнейшем от каждой массы сухих остатков отбирали по 100 мг (точная навеска) сухого экстракта, помещали в виалы объёмом 10 мл.

**Этап прободготовки № 2.** В каждую виалу добавляли по 10 мл 50 % изопропанола. В дальнейшем проводили экстракцию в виалах в ванне ультразвуковой ВУ-09-«Я-ФП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) при комнатной температуре в течение 15 минут. Отбирали по 5 мл из каждой виалы надосадочной жидкости и фильтровали через фильтр с размерами пор 0,45 мкм. Отбрасывали первые 4 мл экстракта, и отбирали по 1 мл полученного фильтрата в пробирку микроцентрифужную «эппендорф» с крышкой для центрифугирования объёмом 1,5 мл. Далее центрифугировали на центрифуге ОПн-8 (ОАО НК «Дастан», Россия) в течение 20 минут при 8000 об/мин и отбирали 1000 мкл надосадочной жидкости в виалу для ВЭЖХ-УФ анализа.

### **Методика определения времени удерживания диосгенина в заданных хроматографических условиях с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл**

Для определения времени удерживания диосгенина в данной хроматографической системе ВЭЖХ-УФ производили инъекцию раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл в колонку. Объём инъекции составлял 60 мкл (3-кратное значение от объёма петли инжектора в 20 мкл). Фиксировали время появления наиболее выраженного пика в диапазоне времени от 0 до 30 минуты.

Рабочая длина волны была установлена на 205 нм для количественного анализа РГСО диосгенина при стабильности базовой линии, отсутствии пиковых помех и максимальной степени поглощения диосгенином при заданной длине волны. Был выбран изократический режим элюирования для разделения диосгенина в образцах растительных экстрактов [согласно паспорту анализа фитохимического стандарта диосгенина компании «Chromadex» (США), лот № 00004916-351].

### **Методика проведения холостого опыта с использованием только подвижной фазы в изократическом режиме**

Холостой опыт был проведён с использованием только подвижной фазы. Подвижная фаза состояла из одного компонента: ацетонитрил 99,9 %, ч.д.а. (фаза А).

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализах растительных экстрактов.

### **Методика проведения холостого опыта с использованием только комбинированного растворителя**

Холостой опыт был проведён инъекцией в хроматографическую колонку лишь комбинированного растворителя: 99,9 % ацетонитрил – вода деионизированная – 99,9 % изопропанол в соотношении 8:1:1 с использованием изократического режима элюирования.

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализах растительных экстрактов.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Нами было проанализировано растительное сырьё – семена пажитника сеного, по описанной выше методике. Предварительно была определена абсолютная влажность сырья семян пажитника сен-

ного с использованием пакета статистической программы «Stata MP15». Переменные с целью проведения анализа 6 образцов семян пажитника сеного представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Переменные для расчёта абсолютной влажности растительного сырья – семян пажитника сеного (*Trigonella foenum-graecum* L.)

**Table 1.** Variables for calculating the absolute moisture content of plant materials – seeds of hay fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Масса бюкса пустого с крышкой, доведённая до постоянного значения, г Empty weight with lid, brought to a constant value, g	Масса сырья до высушивания, г The mass of raw materials before drying, g	Масса сырья после высушивания, доведённого до постоянного значения, г The mass of raw materials after drying, brought to a constant value, g
35,9140	2,0062	1,7907
34,4972	2,0048	1,7951
44,7062	2,0080	1,7894
33,0385	2,0008	1,7812
35,5304	2,0015	1,7860
30,8405	2,0036	1,7977

Значения абсолютной влажности рассчитывали по формуле без перевода в проценты:

$$W = \frac{m - m_1}{m}$$

$$W_1 = (2,0062 - 1,7907) / 2,0062 = 0,1074.$$

$$W_2 = (2,0048 - 1,7951) / 2,0048 = 0,1046.$$

$$W_3 = (2,0080 - 1,7894) / 2,0080 = 0,1089.$$

$$W_4 = (2,0008 - 1,7812) / 2,0008 = 0,1098.$$

$$W_5 = (2,0015 - 1,7860) / 2,0015 = 0,1077.$$

$$W_6 = (2,0036 - 1,7977) / 2,0036 = 0,1028.$$

На основании детального описательного анализа переменной можно предварительно сделать вывод о том, что данные по абсолютной влажности имеют нормальное распределение.

Таким образом, метрологические характеристики по расчёту показателя абсолютной влажности сырья – семян пажитника сеного: средняя арифметическая (Mean) = 0,1069 или 10,69 % (95 % ДИ: 0,1041–0,1097). Стандартное отклонение (Std. dev.) = 0,0026606. Содержание влаги для семян пажитника сеного по Eur. Ph. Vol. 7.0 должно быть не более 12,00 %.

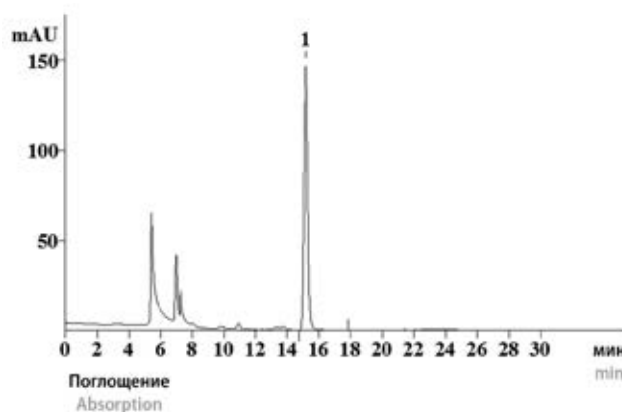
Идентификация и количественное определение стероидного сапогенина диосгенина осуществлялось методом ВЭЖХ-УФ с использованием ультрафиолетового детектора при длине волны 205 нм с использованием EMS-метода (метод внешнего стандарта) и «ручным» подсчётом содержания диосгенина в растительном сырье.

Согласно литературным данным, наибольшее количество диосцина и, следовательно, диосгенина содержится в семенах пажитника сеного. Одним из методов, позволяющих определить структуру стероидных сапонинов, является кислотный гидролиз последних с образованием агликона сапогенина. В указанном методе ВЭЖХ-УФ время выхода диосгенина составляет 15 минут. Проводили хроматографирование лишь подвижной фазы (ацетонитрил 99,9 %, х.ч.), так и комбинированного растворителя. На хроматограммах отсутствовали пики диосгенина, что позволяет избежать возникновения в дальнейшем случайных и систематических ошибок при постановке EMS-методики ВЭЖХ-УФ анализа.

С целью автоматического подсчёта концентрации диосгенина в растительных экстрактах в программе «Мультихром» использовали серию градуировочных растворов РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл в вышеуказанных хроматографических условиях.

Для идентификации диосгенина по времени выхода в указанных хроматографических условиях и определения площади пика диосгенина с целью расчёта концентрации диосгенина «ручным» способом в растительном экстракте методом внешнего стандарта с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл производили инъекцию данного раствора в инжектор.

На рисунке 1 представлена хроматограмма раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях составило 15,2 минут. В отчёте площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл составила 2396,14 mAU · с.



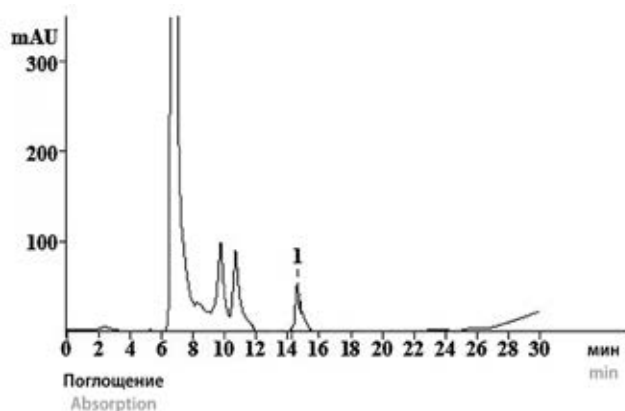
**Рисунок 1.** Хроматограмма стандартного раствора РГСО диосгенина в указанных хроматографических условиях с концентрацией 250 мкг/мл

Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 1.** Chromatogram of a standard solution of RGSO diosgenin in the indicated chromatographic conditions with a concentration of 250 µg/ml

Peak 1 – Diosgenin Peak

В результате анализа 1-го образца растительно-го экстракта семян пажитника сеного в указанных хроматографических условиях была получена хроматограмма, представленная на рисунке 2.



**Рисунок 2.** Хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного в указанных хроматографических условиях  
Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 2.** Chromatogram of a plant extract of hay fenugreek seeds under the indicated chromatographic conditions  
Peak 1 – Diosgenin Peak

На рисунке 2 представлена хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях – 15 минут. В отчёте программы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсэнд» (Россия), площадь пика диосгенина составила 833,47 mAU · с.

Расчёт концентрации диосгенина после проведения 2 этапов пробоподготовки в растительном экстракте семян пажитника сеного ESM-методом.

$$C_{\text{экстр.}} = \frac{S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P}{S_{\text{станд.}} \cdot V_{1 \text{станд.}} \cdot V_{2 \text{станд.}} \cdot 100 \%}$$

$$C_{\text{экстр.}} = (S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P) / (S_{\text{станд.}} \cdot V_{1 \text{станд.}} \times V_{2 \text{станд.}} \cdot 100 \%) = (833,47 \cdot 20 \text{ мг} \cdot 2,5 \text{ мл} \times 98,5\%) / (2396,14 \cdot 20 \text{ мл} \cdot 10 \text{ мл} \cdot 100 \%) = 0,08566 \text{ мг/мл.}$$

Для последующих 5 образцов растительных экстрактов проводились аналогичные расчёты.

Расчёт содержания диосгенина в сухом сырье:

$$C_{\text{иссл.}} = \frac{C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100 \%}{a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100 \% - W \%)}$$

$$C_{\text{иссл.}} = (C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100 \%) / (a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100 \% - W \%)) = (0,08566 \text{ мг/мл} \cdot 10 \text{ мл} \cdot 276 \text{ мг} \cdot 100\%) / (100 \text{ мг} \times 500 \text{ мг} \cdot (100 \% - 10,74 \%) = 0,005297 \text{ мг/мг}$$

или 5,297 мг/г ≈ 5,3 мг/г.

Для последующих 5 образцов растительных экстрактов проводились аналогичные хроматографические исследования в указанных идентичных хроматографических параметрах и расчёты.

Всего было проанализировано 6 образцов экстрактов семян пажитника сеного с использованием комплекса пробоподготовки. Данные отражены в таблице 2.

Для оценки усреднённого содержания в семенах пажитника сеного диосгенина с учётом влажности сырья использовали методы описательной статистики. Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосциана) в семенах пажитника сеного с учётом влажности сырья составляет ( $M \pm \sigma$ ) 5,3 ± 0,05 мг/г (95 % ДИ: 5,1–5,4 мг/г; n = 6).

**Таблица 2.** Результаты анализа методом ВЭЖХ-УФ растительных экстрактов семян пажитника сеного с использованием комплекса пробоподготовки рассчитанные ESM-методом

**Table 2.** Results of HPLC-UV analysis of plant extracts of hay fenugreek seeds after complex sample preparation, calculated by ESM method

№ образца Sample No.	Содержание диосгенина Diosgenin content				
	Масса сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, мг Dry residue weight after acid hydrolysis and evaporation, mg	Навеска сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки, мг A portion of the dry residue after acid hydrolysis and evaporation, taken for subsequent 2 <sup>nd</sup> stage sample preparation, mg	Площадь пика образца, mAU · с The peak area of the sample, mAU · s	Содержание в экстракте из семян пажитника сеного после двух этапов пробоподготовки (C <sub>экстр.</sub> ), мг/мл The content in the extract from the seeds of hay fenugreek after two stages of sample preparation (S <sub>ext.</sub> ), mg/ml	Содержание в сухом исходном сырье – семенах пажитника сеного (C <sub>иссл.</sub> ), мг/г Content in dry feedstock - seeds of hay fenugreek (S <sub>issl.</sub> ), mg/g
1	276,00	100	833,47	0,08566	5,3
2	283,50	102	800,45	0,08226	5,1
3	281,55	99,5	825,95	0,08488	5,4
4	273,45	101	830,45	0,08534	5,2
5	282,20	102	840,00	0,08633	5,4
6	275,50	100	828,25	0,08512	5,2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была оптимизирована методика экстракции диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина 5 % водным раствором кислоты хлористоводородной при нагревании в течение не менее 4 часов на песчаной бане при мощности последней в 150 Вт) из сырья семян пажитника сеного с использованием 50 % водного раствора изопропанола, х.ч. Была предложена упрощённая методика хроматографического разделения диосгенина из экстрактов семян пажитника сеного с использованием изократического режима элюирования 99,9 % ацетонитрилом, х.ч.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Michalak O., Krzeczynski P., Cieślak M., Cmoch P., Cybulski M., Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Trzaskowski B., Ostrowska K. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;198:105573. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105573.
2. Sun G. C., Jan C. R., Liang W. Z. Exploring the impact of a naturally occurring saponin diosgenin on underlying mechanisms of Ca<sup>2+</sup> movement and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Environmental toxicology*. 2020;35(3):395–403. Doi: 10.1002/tox.22876.
3. Gan Q., Wang J., Hu J., Lou G., Xiong H., Peng C., Zheng S., Huang Q. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;198:105575. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105575.
4. Kiss R., Pesti-Asbóth G., Szarvas M. M., Stündl L., Cziáky Z., Hegedűs C., Kovács D., Badale A., Máthé E., Szilvássy Z., Remenyik J. Diosgenin and its fenugreek based biological matrix affect insulin resistance and anabolic hormones in a rat based insulin resistance model. *BioMed research international*. 2019;4:7213913. Doi: 10.1155/2019/7213913.
5. Wang W., Zhao E., Jing W., Zhang J. Ultra high-performance liquid chromatography – ion trap mass spectrometry characterization of the steroidal saponins of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and its application for accelerating the isolation and structural elucidation of steroidal saponins. *Steroids*. 2015;95:51–65. Doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.023.
6. Wu F. C., Jiang J. G. Effects of diosgenin and its derivatives on atherosclerosis. *Food and function*. 2019;10(11):7022–7036. Doi: 10.1039/c9fo00749k.
7. Diab Y., Ioannou E., Emam A., Vagias C., Roussis V. Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*. 2012;77(6):686–690. Doi: 10.1016/j.steroids.2012.02.014.
8. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Volume 2. M.: *Ministerstvo Zdravoohraneniya Rossii*, 2018.
9. Stekolshchikova E., Stavrianidi A., Porotova A., Rodin I., Shpigun O. Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;132:87–92. Doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.041.
10. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova E. A., Turova P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography-mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*, 2017. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017;72:144–153. Doi: 10.3103/S0027131417030063.
11. Choi S. J., Choi J., Jeon H., Bae S. K., Ko J., Kim J., Yoon K. D. Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope plathyphylla*. *Journal of separation science*. 2015;38(1):18–24. Doi: 10.1002/jssc.201401007.
12. Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi A., Shpigun O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. Doi: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.



**АНАЛИТИКА  
ЭКСПО**



18-я Международная выставка  
лабораторного оборудования  
и химических реактивов

**22–25.09.2020**

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»

a Hyve event



[analitikaexpo.com](http://analitikaexpo.com)



Для бесплатного прохода  
на выставку зарегистрируйтесь  
на сайте указав промокод:

**pharmjournal**



Оригинальная статья/Research article

## Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebachiensis*) как возможный биомаркер фармакокинетики

В. М. Косман<sup>1\*</sup>, Н. М. Фаустова<sup>1</sup>, И. Н. Уракова<sup>1</sup>, М. Н. Карлина<sup>1</sup>, В. Г. Макаров<sup>1</sup>

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, к. 245

\*Контактное лицо: Косман Вера Михайловна. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

ORCID: В. М. Косман – <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>; Н. М. Фаустова – <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>; И. Н. Уракова – <https://orcid.org/0000-0003-0833-3371>; М. Н. Карлина – <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>; В. Г. Макаров – <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

Статья поступила: 17.04.2020. Статья принята в печать: 19.06.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Оценка фармакокинетического профиля действующих веществ является необходимым этапом разработки лекарственного препарата. Исследованный в работе экстракт представляет собой комплекс биологически активных соединений, выделенных из гонад морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* Баренцева моря, содержащий в своем составе пептидные соединения, жирные кислоты, каротиноиды и токоферолы. Выявлена ингибирующая активность экстракта гонад морских ежей в отношении фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). Традиционные подходы к изучению фармакокинетики, основанные на применении хроматографических методов, зачастую не являются эффективными для таких комплексных объектов; альтернативой могут служить методы иммуноферментного анализа.

**Цель.** Цель исследования – поиск подходов к изучению фармакокинетики экстракта гонад морских ежей на кроликах после его перорального введения в трех дозах.

**Материалы и методы.** Для характеристики химического состава образцов экстракта гонад морских ежей и определения содержания возможных целевых аналитов в биопробах использованы спектрофотометрические и хроматографические (ВЭЖХ и ТСХ) методы. Изучение фармакокинетики проводили на самцах кроликов после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей. Была установлена корреляция между его концентрацией в плазме крови и биологической активностью, в качестве маркера которой использована активность фермента ДПП-4. Активность фермента определяли хромогенным оптическим методом.

**Результаты и обсуждение.** Охарактеризованы основные группы биологически активных веществ в составе экстракта гонад морских ежей. Содержание пептидов составило 15–22 %, содержание α-токоферола – 0,05–0,15 %, суммарное содержание токоферолов – 0,23–0,38 %, содержание каротиноидов – 0,005–0,07 %, содержание суммы жирных кислот в пересчете на линоленовую кислоту – 11,03–12,74 %. В связи с низким содержанием биологически активных веществ различных классов и отсутствием доминирующих компонентов оптимальным для изучения фармакокинетики признан подход, базирующийся на корреляции между активностью специфического маркера (активности фермента ДПП-4) и концентрацией экстракта в плазме крови. Разработана методика количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по активности фермента ДПП-4. Методика валидирована по параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, диапазон линейности, точность, прецизионность. Изучена фармакокинетика экстракта гонад морских ежей в плазме крови после перорального введения кроликам в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Средняя максимальная концентрация ( $C_{max}$ ) в зависимости от дозы была 37–115 мкг/мл, площадь под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-24}$ ) – 193–594 ч · мкг/мл, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) составило 3–3,5 ч, период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) – 7,9–9,9 ч, среднее время удержания (MRT) – 11–14 ч.

**Заключение.** С помощью нетрадиционного подхода, основанного на корреляции активности специфического маркера (ДПП-4) и концентрации препарата, охарактеризована фармакокинетика экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам. Схожие подходы могут быть эффективны для многокомпонентных природных смесей, которые затруднительно или невозможно анализировать на основе традиционных хроматографических (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.) методов.

**Ключевые слова:** активность дипептидилпептидазы-4, *Strongylocentrotus droebachiensis*, экстракт гонад, фармакокинетика, кролики, плазма, линейность.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** В. М. Косман планировала исследование, выполняла экспериментальные работы методом ВЭЖХ-УФ, сбор и обработка результатов, подготовка и финализация рукописи. Н. М. Фаустова выполняла экспериментальные работы по определению активности ДПП-4, участвовала в обсуждении результатов. И. Н. Уракова выполняла экспериментальные работы методом ТСХ, участвовала в обсуждении результатов. М. Н. Карлина участвовала в обсуждении результатов и доработке текста. В. Г. Макаров критический пересмотр текста публикации.

**Для цитирования:** Косман В. М., Фаустова Н. М., Уракова И. Н., Карлина М. Н., Макаров В. Г. Ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 после перорального введения кроликам экстракта гонад морских ежей (*Strongylocentrotus droebachiensis*) как возможный биомаркер фармакокинетики. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):158–165. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165>

## Dipeptidylpeptidase IV Activity Inhibition after Oral Administration to Rabbits of *Strongylocentrotus Droebachiensis* Gonads Extract as Possible Biomarker of Pharmacokinetics

Vera M. Kosman<sup>1\*</sup>, Natal'ya M. Faustova<sup>1</sup>, Irina N. Urakova<sup>1</sup>, Marina N. Karlina<sup>1</sup>, Valerij G. Makarov<sup>1</sup>

1 – Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovskiy, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

\*Corresponding author: Vera M. Kosman. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

© Косман В. М., Фаустова Н. М., Уракова И. Н., Карлина М. Н., Макаров В. Г., 2020

© Kosman V. M., Faustova N. M., Urakova I. N., Karlina M. N., Makarov V. G., 2020

ORCID: Vera M. Kosman – <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>; Natal'ya M. Faustova – <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>; Irina N. Urakova – <https://orcid.org/0000-0003-0833-3371>; Marina N. Karlina – <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>; Valerij G. Makarov – <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

Received: 17.04.2020. Revised: 19.06.2020. Published: 28.08.2020

## Abstract

**Introduction.** The pharmacokinetic profiling of active compounds is necessary for drug development and application. Complex extract of biologically active compounds was isolated from gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. It contains fatty acids, carotenoids and tocopherols and have inhibition activity to enzyme dipeptidylpeptidase IV (DPP-4). Traditional approaches to pharmacokinetic study based on chromatographic methods are not effective for such complex mixtures because they had not enough selectivity and sensitivity. Methods of immunoassay for special enzyme, bioassay, etc. may be used as an alternative way.

**Aim.** The aim: to find approach to pharmacokinetic study of sea urchin gonads extract in rabbits after a three doses oral administration.

**Materials and methods.** Various spectroscopic and chromatographic (HPLC and TLC) methods were used for chemical characteristic of sea urchin gonads extract and different target analytes quantification in biosamples. The pharmacokinetic of sea urchin gonads extract was studied after single dose oral administration to male rabbits. The correlation between concentration of sea urchin gonads extract in the blood plasma and its biological activity marked by DPP-4 activity was established. The activity of DPP-4 was determined by the chromogenic optical method.

**Results and discussion.** Main groups of sea urchin gonads extract chemical compounds were characterized. Total peptides content was 15–22 %;  $\alpha$ -tocopherol content – 0.05–0.15 %, total tocopherols content – 0.23–0.38 %; total carotenoid content – 0.005–0.07 %; total fatty acids content calculated to linolenic acid – 11,03 to 12,74 %. After sea urchin gonads extract chemical composition results it was established that concentrations of identified individual biologically active compound are low, there is no dominant compound or group of compounds responsible for pharmacological activity of sea urchin gonads extract which may be unambiguously chosen as target analyte for its pharmacokinetic study. Approach based on correlation of special marker activity (DPP-4) and extract concentration appears to be the best for pharmacokinetic study of complex extract from green sea urchin gonads. The method for the quantitative determination of sea urchin gonads extract in the blood plasma of rabbits by its effect on DPP-4 activity was developed. The method was validated by parameters: selectivity, lower limit of quantification, linearity range, accuracy, and precision. The pharmacokinetics was linear in the dose range of 5–25 mg/kg after oral administration. The mean maximal concentration in plasma ( $C_{max}$ ) was dose dependent and it was 37,12–114,71  $\mu\text{g/mL}$  for various doses, area under the curve ( $AUC_{0-24}$ ) was 192,92–597,14  $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ , mean time to reach maximum plasma concentration ( $T_{max}$ ) was 3–3,5 h, half-life ( $T_{1/2}$ ) was 7,88–9,89 h, and the mean retention time (MRT) was 1,73–14,31.

**Conclusion.** After nontraditional approach based on correlation of special marker activity (DPP-4) and active substance concentration the plasma pharmacokinetics of sea urchin gonads extract after oral administration to the rabbits in three doses was characterized. Similar approaches may be effective for compounds and complex mixtures when it is difficult or impossible to analyze them traditionally by chromatographic (HPLC-UV/FL/MS, GC-MS, etc.) methods.

**Keywords:** dipeptidyl peptidase IV activity, *Strongylocentrotus droebachiensis*, gonads extract, pharmacokinetic, rabbits, plasma, linearity.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Vera M. Kosman investigation planning, experiments evaluation by HPLC-UV method, results proceeding and systematization, text preparing and finishing. Natal'ya M. Faustova experiments evaluation of DPP-4 activity, results interpretation. Irina N. Urakova experiments evaluation by TLC method, results interpretation. Marina V. Karlina results interpretation, text finishing. Valerij G. Makarov critical revision of publication text.

**For citation:** Kosman V. M., Faustova N. M., Urakova I. N., Karlina M. N., Makarov V. G. Dipeptidylpeptidase IV activity inhibition after oral administration to rabbits of *Strongylocentrotus droebachiensis* gonads extract as possible biomarker of pharmacokinetics. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):158–165. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-158-165>

## ВВЕДЕНИЕ

Комплекс биологически активных соединений, выделенных из гонад морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* Баренцева моря, содержит в своем составе пептидные соединения, жирные кислоты, каротиноиды и токоферолы [1]. Для экстракта гонад морских ежей установлена ингибирующая активность в отношении фермента дипептидилпептидазы 4 типа (ДПП-4). Фермент ДПП-4 отвечает за быструю инактивацию инкретиновых гормонов глюкагоноподобного пептида-1 и глюкозозависимого инсулилотропного полипептида [2].

Экстракт гонад морских ежей содержит компоненты, являющиеся эндогенными (токоферолы, каротиноиды) или быстро метаболизирующиеся в живых организмах (пептиды). Традиционные подходы к изучению фармакокинетики, основанные на применении хроматографических методов (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.), не являются эффективными для таких комплексных объектов из-за недостаточной селективности и

чувствительности. Альтернативой могут служить методы иммуноферментного анализа (ИФА) для оценки активности специфических ферментов, биохимические методы и методы, основанные на оценке специфической биологической активности. Подобные подходы были предложены, например, для качественной оценки экстракта лососевых рыб [3], количественного определения эритропоэтинов в плазме крови [4], оценки иммуногенности интерферонов [5]. Кроме того, для изучения фармакокинетики и распределения в тканях полисахарида фукоидана, являющегося неиндивидуальным, гетерогенным соединением природного происхождения, был предложен метод, основанный на корреляции концентрации фукоидана и его анти-Ха активности [6]. Также корреляция между концентрацией биологически активного гликопептида, комплексного, неиндивидуального состава, выделенного из внутренних органов морских ежей *S. droebachiensis*, и одним из биохимических параметров – активностью лактатдегидрогеназы использована для фармакокинетических исследований [7].

Таким образом, фармакокинетика комплексных лекарственных средств природного происхождения может быть основана на применении биологических маркеров (биомаркеров, суррогатных маркеров концентрации препарата) согласно рекомендациям [8–10].

**Цель данной работы** – поиск подходов к изучению фармакокинетике экстракта гонад морских ежей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стал экстракт гонад морских ежей, полученный из икры зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* по запатентованной технологии [11].

При характеристике химического состава экстракта гонад морских ежей пептиды анализировали методом Варбурга – Кристиана с использованием прямой спектрофотометрии [12], измерения были выполнены на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония). Токоферолы анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием [13, 1] с использованием жидкостного хроматографа высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) в режиме изократического элюирования метанолом, детектирование при длине волны 284 нм. Анализ каротиноидов выполнен также методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием [1] с незначительными вариациями – изократическое элюирование ацетонитрилом, детектирование при 450 нм. Программное обеспечение LabSolutions LCSolution Version 1.25 (Shimadzu, Япония) использовано для регистрации и обработки хроматограмм.

Анализ липидных соединений выполнен методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silica gel 60 F<sub>254</sub>. В системе растворителей петролейный эфир/диэтиловый эфир/уксусная кислота (8/2/0,1 об/об/об) для оценки состава нейтральных липидов [14]. Нанесение образцов на пластины осуществляли с помощью аппликатора для нанесения проб Linomat V (Camag, Швейцария). Соединения липидной природы визуализировали путем дериватизации пластины 2% раствором фосфорно-молибденовой кислоты в метаноле и последующим ее нагреванием в течение 5 минут при температуре 100 °С на термостатирующей панели TLC Plate Heater 3 (Camag, Швейцария). Денситометрический анализ соединений осуществляли с помощью сканнера TLC Scanner 3 (Camag, Швейцария) при длине волны 700 нм.

Исследование фармакокинетике (эксперименты *in vivo*) проводили на самцах кроликов, полученных от КФХ «Нера» (Санкт-Петербург, Россия). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам [15, 16] и нормативным документам [правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014); Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и др.], регулирующих проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобрены на заседании биоэтической комиссии (№ 1.73/17 и 1.26/18).

Для оценки фармакокинетике экстракт гонад морских ежей вводили в виде суспензии в инертном носителе (1% растворе крахмала) однократно перорально в дозах 5, 15 и 25 мг/кг. Распределение животных по экспериментальным группам выполнено методом модифицированной блочной рандомизации [17]. Образцы крови кроликов отбирали через 0, 30 мин; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч после введения, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при –20 °С. Перед началом количественного определения образцы размораживали.

Активность фермента ДПП-4 в плазме крови определяли с помощью хромогенного субстрата глицил-L-пролин-п-нитроанилида и спектрофотометрического детектирования продукта реакции – п-нитро-анилина (рисунок 1) [18, 19].

В ходе экспериментов *in vitro* (с модельными пробами плазмы крови с добавками экстракта гонад морских ежей) выявлена способность экстракта гонад морских ежей ингибировать активность фермента ДПП-4, коррелирующая с его концентрацией в образцах и позволяющая рассчитывать содержание экстракта в пробах плазмы крови на основании изменения активности фермента ДПП-4.

К реакционной смеси, содержащей 20 мкл тестируемой пробы (калибровочного раствора, модельной смеси или образа плазмы крови, полученного от экспериментальных животных) и 40 мкл 0,1 М ТРИС-НСI буферного раствора (pH 8,0), прибавляли 40 мкл 1 ммоль/л раствора субстрата для запуска реакции. Пробы инкубировали при 37 °С 20–25 мин. Оптическую плотность (O.D.) свободного п-нитроанилина измеряли при длине волны 405 нм каждые 5 мин в течение инкубации с использованием микроплан-

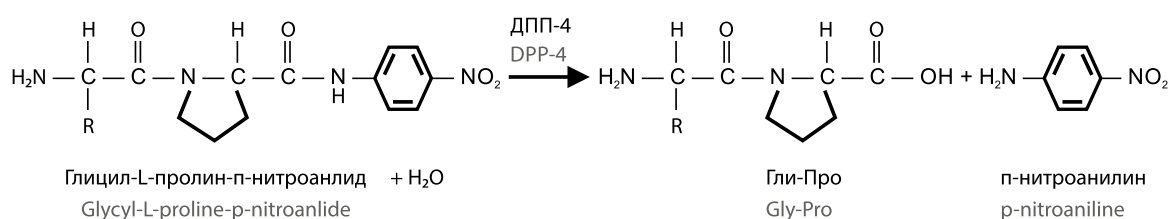


Рисунок 1. Схема ферментативной реакции

Figure 1. Scheme of enzyme reaction

шетного спектрофотометра (X-Mark; Bio-Rad, Hercules, CA, США). На основании полученных данных рассчитывали скорость реакции (O.D./мин) для каждой пробы, затем определяли значение ингибирующего действия (ИД) по отношению к модельной смеси с концентрацией экстракта гонад морских ежей 0 мкг/мл или пробе плазмы крови, взятой на нулевой точке (0 мин), далее определяли концентрацию экстракта гонад морских ежей (мкг/мл) в анализируемой пробе.

Параметры фармакокинетики рассчитаны вне-модельным методом статистических моментов [20] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel; рассчитаны средние арифметические значения ( $\bar{X}$ ), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ( $S\bar{x}$ ). Для статистической оценки различий между фармакокинетическими параметрами был применен двухвыборочный t-тест для средних (оценку проводили при уровне достоверности 95 %).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [1] показано, что экстракт гонад морских ежей содержит около 384 мг/г общих липидов, богатых миристиновой и пальмитиновой кислотами (соединения группы насыщенных жирных кислот) и эйкозапентаеновой кислотой, относящейся к ненасыщенным жирным кислотам; около 0,0026 %  $\beta$ -каротина; 0,063 % эхиненона; 0,06 % токоферола; 0,031 % фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina).

По результатам дополнительных исследований содержание пептидов составило 15–22 %. Методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в образцах экстракта гонад морских ежей идентифицировано доминирующее соединение группы токоферолов –  $\alpha$ -токоферол, а также сумма  $\beta$  +  $\gamma$ -токоферолов (соединения не делятся при хроматографировании в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ [21]), следы токотриенолов. Содержание  $\alpha$ -токоферола в различных образцах экстракта гонад морских ежей составило 0,05–0,15 %, суммарное содержание токоферолов – 0,23–0,38 %.

Каротиноиды также были обнаружены в образцах экстракта гонад морских ежей. Методом ВЭЖХ с УФ-детектированием в образцах экстракта гонад морских ежей доминирующее соединение этой группы, предположительно идентифицированное как эхиненон [1]. Это соединение согласно литературным данным является основным каротиноидом морских ежей [22]. Поскольку стандартный образец эхиненона коммерчески недоступен, количественные оценки выполнены в пересчете на родственное соединение группы каротиноидов – лютеин. Содержание каротиноидов в различных образцах экстракта гонад морских ежей составило 0,005–0,07 %.

В образцах экстракта гонад морских ежей методом ТСХ по совпадению значений  $R_f$  с таковым для линоленовой кислоты ( $R_f = 0,28$ ) идентифицированы жирные кислоты. Содержание суммы жирных кислот в пересчете на линоленовую кислоту в различных образцах составило 11,03–12,74 %.

На примере проб, полученных от животных после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей в дозе 5 мг/кг, были протестированы несколько аналитических подходов к оценке его фармакокинетики: определение концентрации экстракта гонад морских ежей по активности фермента ДПП-4 энзиматическим методом; оценка содержания токоферолов и каротиноидов методом ВЭЖХ-УФ; оценка содержания суммы жирных кислот методом ТСХ с денситометрическим детектированием; оценка уровней триглицеридов и холестерина с использованием автоматического биохимического анализатора [23]. Предварительные данные по оценке фармакокинетических параметров экстракта гонад морских ежей были получены на основании анализа по активности фермента ДПП-4, а также по результатам анализа биопроб на содержание токоферолов и жирных кислот. Однако значимый отклик измеряемого аналитического параметра во времени после введения препарата наблюдали только для данных, основанных на активности фермента ДПП-4. Изменения содержания токоферолов и жирных кислот в пробах не превышали 10–15 % от исходного базового уровня и были трудно отличимы от колебаний эндогенного уровня этих аналитов. Каротиноиды не были обнаружены в биопробах после введения экстракта гонад морских ежей; значимых изменений в уровне триглицеридов и холестерина не было выявлено.

Таким образом, показано, что концентрации индивидуальных биологически активных соединений в экстракте гонад морских ежей сравнительно низкие; не выявлено доминирующего соединения или группы веществ, с которой можно было бы однозначно связать его фармакологическую активность, и которая могла бы быть использована в качестве целевого аналита для оценки фармакокинетики экстракта. Поскольку ингибирующее действие в отношении фермента ДПП-4 может быть обусловлено несколькими группами действующих веществ, входящих в состав экстракта, наиболее корректной является оценка его фармакокинетики по суммарному отклику.

По результатам данного этапа исследования, подход, базирующийся на корреляции специфического маркера (активности фермента ДПП-4) и концентрации экстракта, был признан наиболее подходящим для изучения фармакокинетики экстракта гонад морских ежей.

Валидация методики количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по активности фермента ДПП-4 выполнена согласно рекомендациям [24–27] по параметрам селективность, нижний предел количественного определения, диапазон линейности, точность, прецизионность.

Для проверки селективности были проанализированы бланк-пробы и модельные смеси с экстрактом гонад морских ежей. Для модельных смесей экстракта гонад морских ежей с плазмой крови характер-

но дозозависимое снижение активности фермента ДПП-4, тогда как при добавлении бланка (1 % раствора полисорбата-80 в 0,1 М Трис рабочем буферном растворе с pH = 8,0) такого изменения не происходило, что подтверждало селективность методики.

Согласно рекомендациям [24, 27], концентрации экстракта гонад морских ежей, соответствующая наименьшей точке в калибровочной зависимости, была принята в качестве нижнего предела количественного определения (НПКО), который составил 1,9 мкг/мл.

Для определения содержания экстракта гонад морских ежей и построения калибровочной кривой готовили модельные смеси с использованием плазмы крови кроликов. После инкубации биоматериала с различными концентрациями экстракта гонад морских ежей была определена активность ДПП-4. Дозозависимое изменение активности ДПП-4 в плазме крови было получено для достаточно широкого диапазона концентраций: 1,9–2200 мкг/мл (рисунок 2А). Для линеаризации полученной зависимости использовали логарифмическое преобразование logit-log (рисунок 2В). На основании полученных данных, представленных на рисунке 2В, линейность методики определения концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов характерна для диапазона концентраций 1,9–710 мкг/мл.

На основании полученных данных методом наименьших квадратов выполнен расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей. Полученное уравнение регрессии (таблица 1, рисунок 2В) использовано для дальнейших расчетов.

Оценка точности и прецизионности выполнена по результатам анализа модельных проб плазмы на четырех уровнях концентраций в необходимом количестве повторностей.

Валидационные параметры методики определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови представлены в таблице 1.

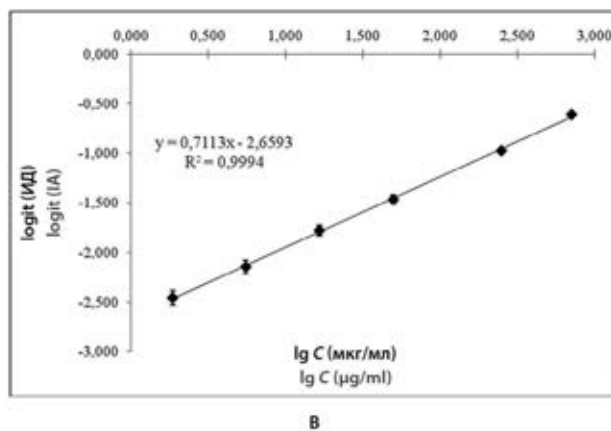
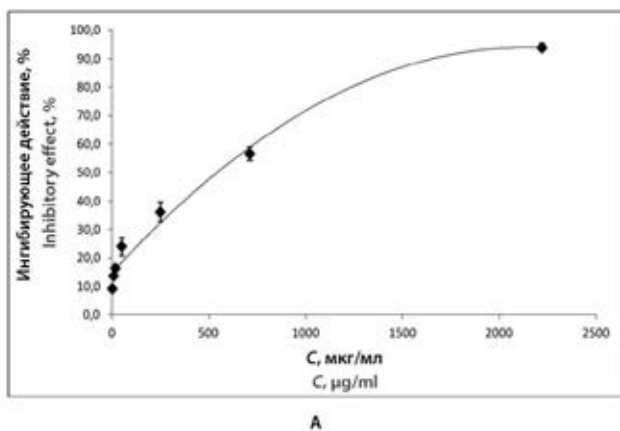
**Таблица 1. Валидационные параметры методики определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов**

**Table 1. Validation parameters of method for sea urchin gonads extract quantification on rabbit plasma**

Параметр Parameter	Значения валидационных параметров Validation Values
Калибровочный диапазон Calibration range	1,9–710 мкг/мл 1.9–710 µg/ml
Уравнение регрессии* Regression Equation*	$y = 0,7113 \cdot x - 2,6593$
НПКО LLOQ	1,9 мкг/мл 1.9 µg/ml
Коэффициент корреляции r Correlation coefficient r	0,9998
Точность, % Accuracy, %	
710 мкг/мл 710 µg/ml	6,8
248 мкг/мл 248 µg/ml	8,5
5,53 мкг/мл 5.53 µg/ml	6,6
1,9 мкг/мл 1.9 µg/ml	3,6
Внутридневная//междневная прецизионность, % Intraday//interday precision, %	
710 мкг/мл 710 µg/ml	3,5//8,6
248 мкг/мл 248 µg/ml	13,1//10,8
5,53 мкг/мл 5.53 µg/ml	4,6//8,1
1,9 мкг/мл 1.9 µg/ml	4,3//8,5

**Примечание:** \*Для плазмы крови  $y$  – параметр logit (ИД);  $x$  – логарифм концентрации экстракта гонад морских ежей (lg C), мкг/мл.

**Note:** \*For blood plasma  $y$  – parameter logit (ID);  $x$  – is the logarithm of the concentration of gonad extract of sea urchins (lg C), mcg/ml.

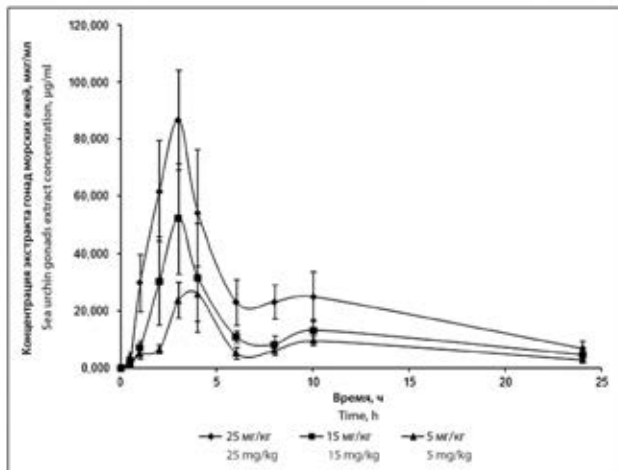


**Рисунок 2. Зависимость ингибирующего действия (ИД) экстракта гонад морских ежей на энзиматическую активность ДПП-4 от концентрации экстракта гонад морских ежей (C, мкг/мл) в плазме крови кроликов в разных координатах: C = f(ИД) (А) и logit (ИД) = f(lg C) (В)**

**Figure 2. Correlation between inhibition activity (IA) of sea urchin gonads extract to enzymatic activity of DPP-4 and sea urchin gonads extract concentration (C, µg/ml) in rabbit plasma in different coordinates: C = f(IA) (A) and logit (IA) = f(lg C) (B)**

Таким образом, по всем критериям получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности предлагаемой методики.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа биопроб, полученных после перорального введения экстракта гонад морских ежей в трех дозах (рисунок 3).



**Рисунок 3.** Кривая «концентрация-время» экстракта гонад морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения экстракта гонад морских ежей в дозах 5 мг/кг, 15 мг/кг и 25 мг/кг ( $n = 4, \bar{X} \pm S\bar{x}$ )

**Figure 3.** «Time-concentration» curve of sea urchin gonads extract in plasma after single oral application of sea urchin gonads extract substance in doses 5 mg/kg; 15 mg/kg and 25 mg/kg ( $n = 4, \bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Кинетика экстракта гонад морских ежей в плазме крови после введения исследуемого экстракта в дозах 5 мг/кг, 15 мг/кг и 25 мг/кг имела схожую форму кривой. В течение первых 2–3 часов после введения экстракта в исследованных дозах наблюдали сравнительно интенсивное увеличение концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови. Максимальную концентрацию экстракта в плазме крови наблюдали через 2–4 часа после введения, далее к 6–8 часу наблюдали достаточно резкое снижение концентрации экстракта гонад морских ежей в плазме крови с последующим незначительным подъемом к 8–10 часу эксперимента. К 24 часу эксперимента после введения экстракта в плазме крови было обнаружено около 8–11 % от максимальной концентрации экстракта гонад морских ежей.

Фармакокинетические параметры экстракта гонад морских ежей для трех исследованных доз представлены в таблице 2.

Анализ основных фармакокинетических данных экстракта гонад морских ежей показал, что значения максимальной концентрации ( $C_{max}$ ) в плазме крови и значения основного параметра, характеризующего степень биологической доступности,  $AUC_{0-24'}$  с увеличением дозы также увеличивались; различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ). На основании данных

регрессионного анализа корреляции между введенной дозой и величиной  $AUC_{0-t}$  показана линейность фармакокинетики экстракта гонад морских ежей в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) для кроликов составило 3,0–3,5 ч; период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) – 7,9–9,9 ч; значения среднего времени удержания (MRT) – 11–14 ч, значения не имели статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 2.** Фармакокинетические параметры экстракта гонад морских ежей в плазме крови после однократного перорального введения в трех различных дозах

**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of sea urchin gonads extract after single oral administration in three different doses

Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Параметр ( $\bar{X} \pm S\bar{x}, n = 4$ ) Parameter ( $\bar{X} \pm S\bar{x}, n = 4$ )				
	$C_{max}$ , мкг/мл $C_{max}$ , µg/ml	$T_{max}$ , ч $T_{max}$ , h	$AUC_{0-24'}$ , ч · мкг/мл $AUC_{0-24'}$ , h · µg/ml	MRT, ч MRT, h	$T_{1/2}$ , ч $T_{1/2}$ , h
5	37,1 ± 5,7	3,50 ± 0,3	192,3 ± 12,3	14,3 ± 2,6	9,9 ± 1,6
15	107,3 ± 12,0	3,00 ± 0,4	312,7 ± 52,1	12,7 ± 3,2	8,8 ± 2,2
25	114,7 ± 7,1	3,00 ± 0,4	594,2 ± 85,2	10,7 ± 2,3	7,9 ± 1,6

Таким образом, с помощью предложенного подхода получены приведенные выше результаты (рисунок 3, таблица 2), позволившие охарактеризовать фармакокинетику нового препарата природного происхождения и показать её линейность в изученном диапазоне доз.

В настоящее время не установлено какая группа веществ экстракта гонад морских обуславливает его энзиматическую активность в отношении ДПП-4. Доминирующими компонентами в составе экстракта являются жирные кислоты. В литературе имеются некоторые сведения о фармакокинетики жирных кислот. В большинстве случаев такие данные были получены после применения комплексных продуктов – растительных экстрактов, растительных или рыбьих масел (жиров) или различных пищевых добавок на их основе. Только параметр  $T_{max}$  может быть сопоставлен с полученными нами результатами, поскольку значения остальных фармакокинетических параметров ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ) зависят от концентраций (уровней) индивидуальных (целевых) аналитов. Авторы работы [28] изучали фармакокинетику и тканевое распределение олеиновой и линолевой кислот после перорального и ректального введения масла *Brucea javanica* крысам. Они использовали метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) для количественного анализа индивидуальных жирных кислот и сообщали, что значение  $T_{max}$  после введения эмульсии на основе масла растения *Brucea javanica* составило около 4 ч для обеих проанализированных кислот. В работе [29] представлен обзор данных по фармакокинетики и безопасности ω-3 ПНЖК. Согласно представленным данным  $T_{max}$  в ряде исследований у человека варьировал в диапазоне 4,6–11,8 ч, но необходимо подчеркнуть, что были

изучены различные аналиты и тестируемые продукты. В работе [30] представлены данные по фармакокинетике эйкозапентаеновой кислоты после многократного перорального введения высокоочищенной эйкозапентаеновой кислоты;  $T_{\max}$  общей и неэтерифицированной эйкозапентаеновой кислоты в плазме крови составило около 3–5 ч. В недавней работе по изучению фармакокинетики эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот после применения содержащих их пищевых добавок [31] также были получены значения  $T_{\max}$  5,3–6,6 ч. Полученные нами значения времени достижения максимальной концентрации экстракта гонад морских ежей сопоставимы с аналогичными данными для жирных кислот.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Охарактеризованы основные группы действующих веществ, входящих в состав экстракта, выделенного из гонад морских ежей Баренцева моря. Экстракт содержит пептиды, токоферолы, каротиноиды, жирные кислоты. Однако концентрации индивидуальных биологически активных соединений в экстракте гонад морских ежей сравнительно низкие; не выявлено доминирующего соединения или группы веществ, с которой можно было бы однозначно связать его фармакологическую активность, и которая могла бы быть использована в качестве целевого аналита для оценки фармакокинетики экстракта гонад морских ежей.

Разработана методика количественного определения экстракта гонад морских ежей в плазме крови кроликов по его влиянию на активность фермента ДПП-4 хромогенным оптическим методом. Методика валидирована в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по параметрам специфичности, линейности (в диапазоне концентрации аделандака 1,9–710 мкг/мл), точности и прецизионности. Разработанная методика применена к анализу биопроб, полученных при изучении фармакокинетики экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам.

Установлено, что фармакокинетика экстракта гонад морских ежей линейна в диапазоне доз 5–25 мг/кг. Определены значения основных фармакокинетических параметров: максимальной концентрации ( $C_{\max}$ ); площади под фармакокинетической кривой (AUC); времени достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ ); периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ); среднего времени удержания (MRT).

С помощью нетрадиционного подхода, основанного на корреляции активности специфического маркера (ДПП-4) и концентрации экстракта, охарактеризована фармакокинетика экстракта гонад морских ежей после однократного перорального введения кроликам. Схожие подходы могут быть эффективны для многокомпонентных природных смесей, которые затруднительно или невозможно анализировать на основе традиционных хроматографических (ВЭЖХ-УФ/ФЛ/МС, ГХ-МС и др.) методов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Laakso I., Sappanen-Laakso T., Makarenko I. E., Faustova N. M., Makarova M. N., Makarov V. G. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebahensis* from Barents Sea. *J. of funct. Foods*. 2015;17: 227–234.
2. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9–24.
3. Косман В. М., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Макаров В. Г. Разработка, валидация и применение методики иммуноферментного анализа для стандартизации биопрепарата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;2(11):176–182.
4. Карлина М. В., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Косман В. М., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Определение дарбэпоэтина альфа в плазме крови кроликов методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;4(17):204–210.
5. Митюшова Е. В., Фаустова Н. М., Пожарицкая О. Н., Макаров В. Г., Шиков А. Н. Разработка и валидация методики определения иммуногенности препарата интерферона альфа-2а. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;1:194–200.
6. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Faustova N. M., Obluchinskaya E. D., Kosman V. M., Vuorela H., Makarov V. G. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. *Marine Drugs*. 2018;16(4):132–142.
7. Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Faustova N. M., Kosman V. M., Razzazi-Fazeli E., Novak J. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from *Strongylocentrotus droebachiensis* after Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach. *Marine Drugs*. 2019;17:577–590.
8. Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2003.
9. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017. 8 p.
10. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016. 716 с.
11. Пожарицкая О. Н., Уракова И. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Способ комплексной переработки морских ежей. Патент RU 2 432 956 C1, приоритет от 08.07.2010, опубликовано 10.11.2011. Бюл. № 31.
12. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.Y., Jones R.M. Data for biochemical research. (third edition). *Oxford Science Publications, OUP, Oxford*, 1986. 580 p.
13. Косман В. М., Фаустова Н. М., Зенкевич И. Г., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Сравнительная характеристика состава образцов масла зародышей пшеницы различного происхождения. *Масложировая промышленность*. 2007;6:32–34.
14. Sherma J., Fried B. Thin Layer Chromatographic Analysis of biological Samples. A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005;28:2297–2314.
15. Миронов А. Н. и др., ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: *Гриф и К*, 2013. С. 6–44.
16. Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*, 2012. С. 845–855.
17. Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3<sup>rd</sup> edition). *Oxford Medical Publications*, 2000. 422 p.
18. Dipeptidyl peptidase IV. Enzymatic assay. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/dipeptidyl-peptidase-iv.html> (accessed 02.04.2020).
19. Lin Lu. I., Tsai K.-C., Chiang Y.-K. et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;43(8):1603–1611.
20. Пиотровский В. К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики. *Фармакология и токсикология*. 1986;49(5):118–127.
21. Ruperez F. J., Martin D., Herera E., Barbas C. Chromatographic analysis of tocopherol and related compounds in various matrices. *J. of Chromatogr*. 2001; 935(1-2):45–69.

22. Agatsuma Y., Sato M., Taniguchi K. Factor Causing Brown-Colored Gonads of The Sea Urchine, *Strongylocentrotus nudus*, in Northern Honshu, Japan. *Aquaculture*. 2005;249:449–458.
23. Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N. Various approaches to pharmacokinetic study of Adelandak – *Strongylocentrotus droebachiensis* gonads extract. *Abstracts book of 22-d Int. Congress «Phytopharm 2018», Horgen, Switzerland*, 2018. P. 59–60.
24. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, *Committee for medicinal products for human use (CHMP)*, 2011.
25. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994*. P. 1–5.
26. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996*. P. 1–8.
27. *Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation*. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
28. Su H., Zhang Y., Huang W., Wen L., Zhuang Z., Chen G. Pharmacokinetic and tissue distribution of oleic and linoleic acids following oral and rectal administration of *Brucea javanica* oil in rats. *Int. j. of Pharmacology*. 2016;12(5):461–482.
29. Tamaro J., Tamaro M. Pharmacokinetics and safety profile of omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: *Omega-3 Fatty Acids*. Switzerland, *Springer Publisher*, 2016. P. 541–584.
30. Braeckman R. A., Stirtan W. G., Soni P. N. Pharmacokinetics of eicosapentaenoic acid in plasma and red blood cells after multiple oral dosing with Icosapent Ethyl in healthy subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2013;3(2):101–108
31. Petyaev I. M., Chalyk N. E., Klochkov V. A., Pristensky D. V., Chernyshova M. P., Kyle N. H., Bashmakov Y. K. Pharmacokinetics and oxidation parameters in volunteers supplemented with microencapsulated docosahexaenoic acid. *Int. j. of Applied Basic Medical research*. 2018;8(3):148–154.
9. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins. EMEA/CHMP/BMWP/118264/2007 Rev.1. 2017. 8 p.
10. Rules for conducting research on biological drugs of the Eurasian Economic Union. 2016. 716 p. (In Russ.).
11. Pozharickaya O. N., Urakova I. N., Shikov A. N., Makarov V. G. Method for complex processing of sea urchins. Patent RU 2 432 956 C1, priority dated July 8, 2010, published November 10, 2011. *Buliten No. 31*. (In Russ.).
12. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. Y., Jones R. M. *Data for biochemical research*. (third edition). *Oxford Science Publications, OUP, Oxford*, 1986. 580 p.
13. Kosman V. M., Faustova N. M., Zenkevich I.G., Pozharickaya O. N., Shikov A. N., Makarov V. G. Comparative characterization of wheat germs oil samples. *Maslozhirovaya promyshlennost'*. 2007;6:32–34. (In Russ.).
14. Sherma J., Fried B. *Thin Layer Chromatographic Analysis of biological Samples. A review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005;28:2297–2314.
15. Mironov A.N. et al., editors. *Guidelines for the examination of medicines*. Volume I. Moscow, *Grif and K*, 2013. P. 6–44. (In Russ.).
16. Mironova A. N., editor. *Guidelines for preclinical studies of drugs*. Part one. Moscow, *Grif and K*, 2012. P. 845–855. (In Russ.).
17. Bland M. *An Introduction to Medical Statistics* (3<sup>rd</sup> edition). *Oxford Medical Publications*, 2000. 422 p.
18. Dipeptidyl peptidase IV. Enzymatic assay. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/dipeptidyl-peptidase-iv.html> (accessed 02.04.2020).
19. Lin Lu. I., Tsai K.-C., Chiang Y.-K. et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;43(8):1603–1611.
20. Piotrovskij V.K. Method of statistical moments and integral model-independent parameters of pharmacokinetics. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1986;49(5):118–127. (In Russ.).
21. Ruperez F. J., Martin D., Herera E., Barbas C. Chromatographic analysis of tocopherol and related compounds in various matrices. *J. of Chromatogr*. 2001; 935(1-2):45–69.
22. Agatsuma Y., Sato M., Taniguchi K. Factor Causing Brown-Colored Gonads of The Sea Urchine, *Strongylocentrotus nudus*, in Northern Honshu, Japan. *Aquaculture*. 2005;249:449–458.
23. Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N. Various approaches to pharmacokinetic study of Adelandak – *Strongylocentrotus droebachiensis* gonads extract. *Abstracts book of 22-d Int. Congress «Phytopharm 2018», Horgen, Switzerland*, 2018. P. 59–60.
24. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, *Committee for medicinal products for human use (CHMP)*, 2011.
25. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994*. P. 1–5.
26. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996*. P. 1–8.
27. *Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation*. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
28. Su H., Zhang Y., Huang W., Wen L., Zhuang Z., Chen G. Pharmacokinetic and tissue distribution of oleic and linoleic acids following oral and rectal administration of *Brucea javanica* oil in rats. *Int. j. of Pharmacology*. 2016;12(5):461–482.
29. Tamaro J., Tamaro M. Pharmacokinetics and safety profile of omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: *Omega-3 Fatty Acids*. Switzerland, *Springer Publisher*, 2016. P. 541–584.
30. Braeckman R. A., Stirtan W. G., Soni P. N. Pharmacokinetics of eicosapentaenoic acid in plasma and red blood cells after multiple oral dosing with Icosapent Ethyl in healthy subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2013;3(2):101–108
31. Petyaev I. M., Chalyk N. E., Klochkov V. A., Pristensky D. V., Chernyshova M. P., Kyle N. H., Bashmakov Y. K. Pharmacokinetics and oxidation parameters in volunteers supplemented with microencapsulated docosahexaenoic acid. *Int. j. of Applied Basic Medical research*. 2018;8(3):148–154.

## REFERENCES

1. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Laakso I., Sappanen-Laakso T., Makarenko I. E., Faustova N. M., Makarova M. N., Makarov V. G. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. *J. of Funct. Foods*. 2015;17: 227–234.
2. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9–24.
3. Kosman V. M., Faustova N. M., Pozharickaya O. N., Makarov V. G. Development, validation and application of immunoenzyme assay for the standardization of biopreparation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2015;2(11):176–182. (In Russ.).
4. Karlina M. V., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Kosman V. M., Shikov A. N., Makarov V. G. Determination of darbepoetin alfa in rabbit plasma by elisa. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016; 4(17): 204–210. (In Russ.).
5. Mityushova E. V., Faustova N. M., Pozharitskaya O. N., Makarov V. G., Shikov A. N. Development and validation of immunoassay for immunogenicity of interferon-alpha 2a drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;1:194–200. (In Russ.).
6. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Faustova N. M., Obluchinskaya E. D., Kosman V. M., Vuorela H., Makarov V. G. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats. *Marine Drugs*. 2018;16(4):132–142.
7. Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Faustova N. M., Kosman V. M., Razzazi-Fazeli E., Novak J. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from *Strongylocentrotus droebachiensis* after Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach. *Marine Drugs*. 2019;17:577–590.
8. *Guidance for Industry. Exposure-Response Relationships – Study Design, Data Analysis, and Regulatory*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2003.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-166-171>  
УДК 615.01



Оригинальная статья/Research article

## Доклиническая оценка RGD-пептида, меченного <sup>68</sup>Ga, для обнаружения очагов злокачественного ангиогенеза

О. Е. Клементьева<sup>1</sup>, А. Б. Брускин<sup>1\*</sup>, А. С. Лунёв<sup>1</sup>, М. Г. Рахимов<sup>1</sup>, К. А. Лунёва<sup>1</sup>, Г. Е. Кодина<sup>1</sup>

1 – ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

\*Контактное лицо: Брускин Александр Борисович. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: О. Е. Клементьева – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; А. Б. Брускин – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>; А. С. Лунёв – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>; М. Г. Рахимов – <https://orcid.org/0000-0002-7521-5976>; К. А. Лунёва – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>; Г. Е. Кодина – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Статья поступила: 17.06.2020. Статья принята в печать: 20.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Раннее обнаружение опухолевого роста остается одной из важнейших задач диагностической ядерной медицины. Хорошей мишенью для этой цели являются очаги роста сосудистой сети, создаваемые злокачественными новообразованиями. Молекулярные участники этого процесса являются объектом доставки радионуклидов, в том числе галлия-68, для использования в диагностике методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

**Цель.** Целью настоящего исследования является изучение в экспериментах на животных возможности использования комплексного соединения галлия-68 с пептидом, содержащим аминокислотную последовательность RGD, для визуализации опухолевых очагов с различной выраженностью неоваскуляризации.

**Материалы и методы.** В работе использовался радиофармпрепарат, представляющий собой комплексное соединение Ga-68 с пептидом NODAGA-cRGD2 (предполагаемое наименование, используемое далее по тексту, «Васкуляр, <sup>68</sup>Ga»). Исследовалась динамика распределения препарата в организме мышей с перевитыми гетеротопическими ксенографтами глиобластомы U-87 MG и аденокарциномы молочной железы Ca-755 после внутривенного введения, а также возможность визуализации опухоли.

**Результаты и обсуждение.** Динамика распределения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) «Васкуляр, <sup>68</sup>Ga» в организме лабораторных животных характерна для поведения пептидов *in vivo*: быстрый клиренс из крови, интенсивная экскреция с мочой. Накопление препарата в области опухолевого очага глиобластомы у мышей в среднем в 2 раза превышает таковое в опухолевых очагах аденокарциномы. Результаты *in vivo* ПЭТ визуализации экспериментальных опухолевых очагов хорошо коррелируют с данными радиометрии *ex vivo*.

**Заключение.** После внутривенного введения препарат активно накапливается в хорошо васкуляризованных опухолевых очагах, быстро выводится из организма животного через почки без заметного неспецифического накопления в других органах и тканях. Показана возможность визуализации экспериментальных опухолевых очагов методом ПЭТ.

**Ключевые слова:** ПЭТ, диагностика, опухоль, ангиогенез, галлий-68, Васкуляр, ксенографт, RGD.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** О. Е. Клементьева – планирование и руководство выполненными исследованиями, анализ и описание полученных результатов, А. Б. Брускин и М. Г. Рахимов выполнили радиохимический синтез и анализ препарата, А. С. Лунёв – моделирование опухолевых очагов, выполнение ПЭТ исследований, обработка полученных результатов, К. А. Лунёва – подготовка культур клеток к перевивке, исследование распределения РФЛП «Васкуляр, <sup>68</sup>Ga» в организме животных, обработка полученных результатов, Г. Е. Кодина участвовала в планировании исследования и обработке полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёв А. С., Рахимов М. Г., Лунёва К. А., Кодина Г. Е. Доклиническая оценка RGD-пептида, меченного <sup>68</sup>Ga, для обнаружения очагов злокачественного ангиогенеза. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):166–171. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-166-171>

## Preclinical Evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled RGD Peptide for Detection of Malignant Angiogenesis

Olga E. Klementyeva<sup>1</sup>, Alexander B. Bruskin<sup>1\*</sup>, Aleksandr S. Lunev<sup>1</sup>, Marat G. Rakhimov<sup>1</sup>, Kristina A. Luneva<sup>1</sup>, Galina E. Codina<sup>1</sup>

1 – State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency (SRC – FMBC), 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

\*Corresponding author: Aleksandr B. Bruskin. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: Olga E. Klementyev – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; Alexander B. Bruskin – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>; Aleksandr S. Lunev – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>; Marat G. Rakhimov – <https://orcid.org/0000-0002-7521-5976>; Kristina A. Luneva – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>; Galina E. Codina – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Received: 17.06.2020. Revised: 20.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** The early detection of tumor growth remains one of the most important tasks of diagnostic nuclear medicine. The vascular growth being created malignant neoplasms is a good target for the purpose. The molecular participants in the process are gallium-68 labeled vector to the delivery of radionuclides and positron-emission tomography (PET) imaging.

**Aim.** Possibility researching of using the complex gallium-68 labeled peptide sequence RGD for PET imaging of tumor with different grade of neovascularization.

© Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёв А. С., Рахимов М. Г., Лунёва К. А., Кодина Г. Е., 2020

© Klementyev O. E., Bruskin A. B., Lunev A. S., Rakhimov M. G., Luneva K. A., Codina G. E., 2020

**Materials and methods.** Complex compound of Ga-68 with the peptide NODAGA-cRGD2 (the proposed name used below is «Vascular, <sup>68</sup>Ga») was used for studying of the distribution in mice with transplanted heterotopic xenografts of glioblastoma U-87 MG and breast adenocarcinoma Ca-755 after intravenous injection, as well as the possibility of visualization the tumor.

**Results and discussion.** The «Vascular, <sup>68</sup>Ga» biodistribution in the mice body is usual of laboratory animals is usual of the behavior of peptides *in vivo*: rapid clearance from the blood, intense urinary excretion. The accumulation of the drug in the area of glioblastoma in mice is on average 2 times higher than that in adenocarcinoma. The results of *in vivo* PET imaging of experimental tumor lesions correlate well with *ex vivo* radiometry data.

**Conclusion.** The «Vascular, <sup>68</sup>Ga» actively accumulated in well-vascularized tumor foci after intravenous injection and rapidly excreted from the body through the kidneys without noticeable non-specific accumulation in other organs and tissues. The PET imaging possibility of experimental tumor foci was shown.

**Keywords:** PET, diagnostics, tumor, angiogenesis, gallium-68, «Vascular, <sup>68</sup>Ga», xenograft, RGD.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Olga E. Klementyev – planning and management of research, analysis and description of the results, Alexander B. Bruskin and Marat G. Rakhimov performed radiochemical synthesis and analysis of the drug, Aleksandr S. Lunev – modeling of tumor lesions, performing PET studies, processing the results, Kristina A. Luneva – preparation of cell cultures for transplantation, study of the distribution of RFLP «Vascular, <sup>68</sup>Ga» in the animal organism, processing of the results, Galina E. Kodina participated in the planning of the study and the processing of the data. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

**For citation:** Klementyev O. E., Bruskin A. B., Lunev A. S., Rakhimov M. G., Luneva K. A., Codina G. E. Preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled RGD peptide for detection of malignant angiogenesis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):166–171. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-166-171>

## ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания играют лидирующую роль в структуре смертности людей во всем мире. В борьбе с ними одной из важнейших задач является как можно более раннее выявление заболевания. Методы диагностической ядерной медицины обладают уникальными возможностями, связанными со способностью обнаруживать патологические процессы на очень ранних стадиях. Одним из процессов, делающим возможным обнаруживать опухолевый рост на ранней стадии является процесс неоангиогенеза, т. е. образование новых сосудов. При ангиогенезе эндотелиальные клетки выходят из собственного им состояния покоя и начинают делиться (скорость удвоения популяции возрастает почти в 100 раз). В норме у взрослых людей процесс неоангиогенеза наблюдается только в эндометрии в фолликулярной фазе менструального цикла, в плаценте и при заживлении ран. Доброкачественными патологическими состояниями, связанными с ангиогенезом, являются, например, атеросклероз, артрит, псориаз, ретинопатия и некоторые аутоиммунные заболевания [1–2].

Среди семейства интегринов  $\alpha\beta_3$  наиболее широко изучен на предмет его роли в ангиогенезе и метастазировании опухолей. Поскольку  $\alpha\beta_3$  является рецептором для белков внеклеточного матрикса, он представляет собой удобную мишень для целевой доставки радионуклидов. Также благоприятным фактором для дизайнера лекарственного средства является способность этого рецептора селективно связываться с соединениями, содержащими трипептидную последовательность аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) [3–4].

Среди методов визуализации в медицине по своим совокупным свойствам лидирующую позицию занимает позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). Обычно использование ПЭТ связывают с при-

менением радиофармпрепаратов, содержащих такие радионуклиды как C-11, N-13, O-15 и F-18 [5]. Их использование требует наличия циклотрона непосредственно в клиническом учреждении или на незначительном расстоянии от него. Удобной альтернативой является использование генераторных радионуклидов, которые могут обеспечить клинику радионуклидом в любое время суток и в удаленных от циклотрона территориях. Среди генераторных систем, пригодных для использования в ПЭТ, в настоящее время генератор <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga разрешен к клиническому применению в Европе и в России в составе системы медицинского назначения вместе с модулем синтеза. Материнский изотоп имеет большой период полураспада (271 день), позволяющий использовать генератор до двух лет. Короткий период полураспада дочернего радионуклида <sup>68</sup>Ga (68 мин) хорошо подходит для меченых небольших пептидных препаратов с быстрой фармакокинетикой *in vivo* [6–7]. <sup>68</sup>Ga может быть присоединен к векторной молекуле с помощью хелатирующих агентов, таких как DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота), NODAGA (1,4,7-триазациклононан-N-глутаминовая кислота-N',N''-диуксусная кислота) и других [8]. Ещё одним преимуществом генераторных радионуклидов является возможность использования наборов реагентов (лиофилизатов) для получения радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП), аналогично тому как используется основной радионуклид ядерной медицины технеций-99м.

Неинвазивная молекулярная ПЭТ визуализация очагов злокачественного неоангиогенеза с использованием радиофармпрепаратов на основе аминокислотной последовательности RGD может быть полезна для отбора пациентов, которые могут отвечать на антиангиогенные методы лечения, для контроля и оп-

тимизации хода лечения, подтверждения успешного нацеливания и оптимизации дозы.

Ранее мы изучили возможность получения некоторых меченных галлием-68 пептидов, содержащих в своем составе аминокислотную последовательность RGD [9]. В результате этих работ в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России разработан радиофармацевтический препарат «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » (предполагаемое наименование, использованное далее по тексту), содержащий комплексное соединение радионуклида  $^{68}\text{Ga}$  с NODAGA-cRGD<sub>2</sub> (NODAGA-Glu(cyclo[-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys-]<sub>2</sub>)).

**Целью настоящего исследования** является изучение в экспериментах на животных возможности использования комплексного соединения галлия-68 с пептидом, содержащим последовательность RGD, для визуализации опухолевых очагов с различной выраженностью неоваскуляризации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реагенты и реактивы

Натрия ацетат (Ph. Eur., Panreac), NODAGA-RGD<sub>2</sub> (NODAGA-Glu(cyclo[-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys-]<sub>2</sub>), ABX (Германия), лимонная кислота (ГОСТ 3652-69), раствор соляной кислоты 0,1 моль/л (из фиксанала), пластины для тонкослойной хроматографии типа ITLC-SG (Agilent Technologies, США).

### Оборудование

Генератор  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  производства ЗАО «Циклотрон» (г. Обнинск, Россия) (ТУ 95 821-06), дозкалибратор АТОМЛАВ-500 (Biodex Medical Systems, Inc., США), система водоподготовки Adrona Onsite+, сканер радиохроматограмм MiniGita (Elysia-raytest GmbH, Германия), автоматический гамма-счетчик Wizard 2480-0010 PerkinElmer, ПЭТ/КТ томограф для лабораторных животных Genisys 4.

### Методы

#### Получение препарата

Раствор  $^{68}\text{Ga}$  получали из генератора  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  производства ЗАО «Циклотрон» (г. Обнинск) путем пропускания через него раствора 0,1 М HCl со скоростью 1–5 мл/мин. Методика получения препарата из жидких реагентов описана в [9]. Для получения препарата «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » из лиофилизата во флакон с последним, содержащим 20 мкг пептида NODAGA-RGD<sub>2</sub>, добавляли 2 мл элюата генератора и реакционную смесь инкубировали 15 мин при 95 °С. Синтезы проводились как в ручном режиме, так и с использованием автоматизированного модуля синтеза производства ООО НПФ «Позитом-Про» (г. Москва). Для проведения биологических экспериментов препарат доводили до необходимой объемной активности разбавлением рассчитанным количеством стерильного изотонического раствора хлорида натрия.

### Контроль качества

После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры радиохимическую чистоту (РХЧ) получаемого препарата определяли методом быстрой тонкослойной хроматографии на пластинах ITLC-SG с двумя различными элюентами: 0,05 М водный раствор лимонной кислоты и 1 М раствор ацетата аммония в смеси метанол–вода 1:1. Распределение активности по хроматографической полоске устанавливали посредством сканера радиохроматограмм.

РХЧ рассчитывали по формуле:

$$\text{РХЧ, \%} = 100 - \text{Pr1} - \text{Pr2},$$

где Pr1 – содержание примесей в % на фронте растворителя в системе 1; Pr2 – содержание примесей в % на старте хроматограммы в системе 2.

### Лабораторные животные

Исследование проведено на самках мышей линии BALB/c Nude и C57BL/6 (средняя масса тела  $18,2 \pm 0,9$  г). Животные были получены из государственного питомника лабораторных животных «Пушино» филиала ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Животных, поступивших из питомника, включали в эксперимент после карантина с последующим ветеринарным осмотром. Все процедуры, связанные с умерщвлением животных, выполняли согласно соответствующим нормативным документам России и Европейской конвенцией по защите животных. Исследования проведены по плану доклинических исследований № 05 2015-2017.

### Математические методы исследования фармакокинетики РФЛП и статистической обработки данных

По результатам радиометрии биологических проб, полученных в динамике после внутривенного введения исследованного радиофармпрепарата, проведен расчет доли РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ », аккумулированного в органах по формуле:

$$A_k = \frac{A_{\text{пробы}}}{A_{\text{эталон}} - A_{\text{мв}}} \cdot 100,$$

где  $A_{\text{пробы}}$  – активность пробы;  $A_{\text{эталон}}$  – активность эталона. Активность эталона корректируют для каждого животного индивидуально, вычитая значение счета пробы «место введения»;  $A_{\text{мв}}$  – активность места введения.

Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием математико-статистических методов обработки данных, используемых в программе Microsoft Office Excel 2003. Для всех количественных данных проведен расчет средних арифметических величин ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего арифметического ( $m$ ), результаты представлены в

формате  $M \pm m$ . По полученным результатам динамики распределения определены коэффициенты дифференциального накопления (КДН)  $KDN_1$  – опухоль/кровь и  $KDN_2$  – опухоль/нормальная мышца, представляющие собой соотношения накопления РФЛП в 1 г соответствующих тканей.

### Моделирование патологий

Для моделирования опухолевых очагов, характеризующихся различной активностью неоангиогенеза были использованы культуры опухолевых клеток: глиобластомы U-87 MG и аденокарциномы молочной железы человека Ca-755. Культуры клеток были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Гетеротопические ксенографты глиобластомы U-87 MG и аденокарциномы молочной железы Ca-755 получали путем инокуляции опухолевого материала, взятого от животного-донора. Суспензию клеток в растворе Хэнкса (~1,5 млн на особь) вводили мышам линий BALB/c Nude и C57BL/6 подкожно под лопатку.

### Исследование фармакокинетики РФЛП «Васкуляр, $^{68}\text{Ga}$ »

Радиофармацевтический препарат «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » вводили животным внутривенно в хвостовую вену в объеме 0,1 мл, введенная активность препарата составила примерно 2,30 МБк на одно животное. Через 15, 30, 60, 90, 120 минут после инъекции РФЛП животных умерщвляли частичной декапитацией. Радиометрия проб проведена с использованием автоматического гамма-счетчика Wizard 2480 (PerkinElmer Inc., США).

### Визуализация очагов патологии методом ПЭТ

ПЭТ-визуализация патологических очагов выполнена на ПЭТ-томографе Genisys 4 PET/X-Ray для лабораторных животных. Исследования выполнены в ста-

тическом режиме  $1 \times 1$  (1 срез, 1 снимок, 10 минут). Реконструкция и последующая обработка изображений осуществлена с помощью программы VivoQuant версии 1.22 patch 2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание радиофармацевтического препарата для ПЭТ диагностики на основе RGD-пептида, меченного позитрон-излучающим радионуклидом  $^{68}\text{Ga}$  и обладающего способностью специфически связываться с опухоль-ассоциированными интегринами, открывает возможность реализовать в клинической ПЭТ-диагностике высокоспецифичный метод оценки присутствия в организме активно растущих новообразований. Структурная формула разрабатываемого препарата представлена на рисунке 1.

Данные о динамике распределения РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » в органах и тканях мышей-опухоленосителей представлены на рисунке 2, а соответствующие значения КДН представлены в таблице 1.

После введения препарат активно распределяется в организме мышей-опухоленосителей глиобластомы U-87 MG и уже в ранние сроки после введения накапливается в крови, печени, почках и кишечнике, что связано с характерными для пептидов путями выведения. Значение КДН опухолевый очаг/кровь изменяется в небольших пределах от среднего значения 1,9 в течение 120 минут. Максимальное соотношение активностей опухолевый очаг/мышца наблюдается через 30 минут после введения РФЛП. Анализ значений КДН позволяет предположить возможность контрастной визуализации очагов активного неоангиогенеза методом ПЭТ на протяжении 120 минут после введения РФЛП. Оптимальным временем ПЭТ исследования животных, судя по данным радиометрии органов, является период от 15 до 30 минуты после введения препарата. Аналогичные данные были получены в исследовании [10].

Накопление препарата в очаге аденокарциномы молочной железы меньше, чем в очаге глиобластомы почти в 2 раза. Следует отметить, что размеры

Таблица 1. Динамика значений КДН у мышей-опухоленосителей

Table 1. Tumor to tissue ratio in tumor-bearing mice

Значения КДН UDR value	Время после введения, мин Time after injection, min				
	Мыши с опухолью глиобластома U-87 MG Glioblastoma U-87-bearing mice				
	15	30	60	90	120
Опухоль/кровь Tumor/blood	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Опухоль/мышца Tumor/muscle	6,6 ± 0,3	10,6 ± 3,3	3,0 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Мыши с аденокарциномой молочной железы Ca-755 Brest adenocarcinoma Ca-755-bearing mice					
Опухоль/кровь Tumor/blood	2,2 ± 0,8	6,1 ± 0,5	1,8 ± 0,2	5,2 ± 0,2	4,6 ± 0,1
Опухоль/мышца Tumor/muscle	9,2 ± 0,2	8,4 ± 0,3	4,5 ± 0,6	9,1 ± 0,3	7,0 ± 0,1

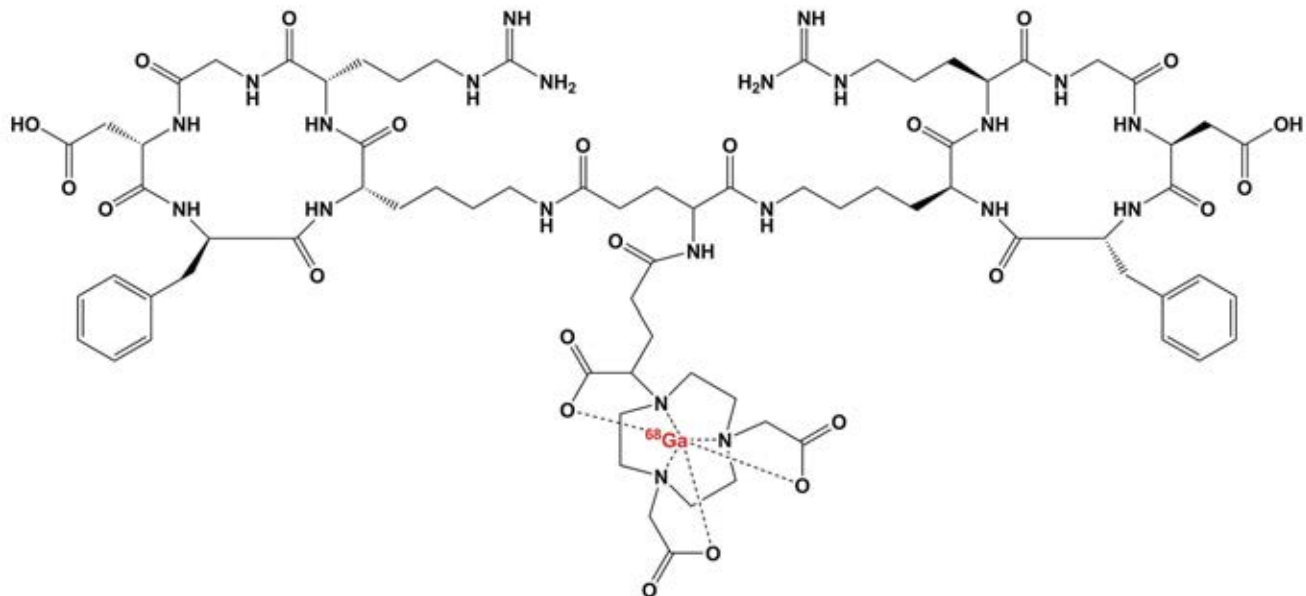


Рисунок 1. Структурная формула  $^{68}\text{Ga}$ -RGD пептида

Figure 1. The chemical structure of [ $^{68}\text{Ga}$ ]-RGD-peptide

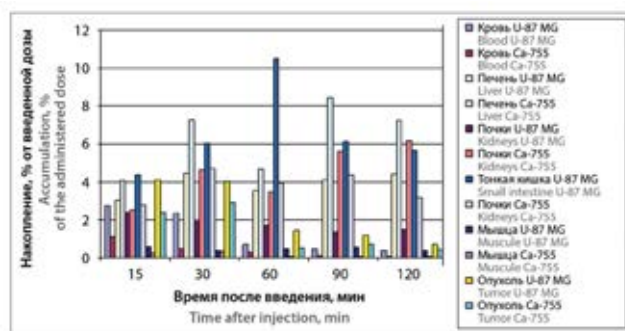


Рисунок 2. Накопление препарата в различных органах/тканях мышей после внутривенного введения РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ »

Figure 2. The accumulation of the radiopharmaceutical «Vascular,  $^{68}\text{Ga}$ » in mice after intravenous injection

опухолевых очагов были практически одинаковы, что исключает возможность слишком раннего проведения исследования или зависимости полученных результатов от размера опухоли. Однако соотношения концентраций РФЛП в опухолевом очаге и нетаргетных тканях позволяют ожидать возможность визуализации таких образований при соответствующем подборе введенной активности, протокола ПЭТ сканирования и алгоритма обработки изображений.

### Результаты ПЭТ исследования

Визуализация экспериментальных опухолевых очагов методом позитронно-эмиссионной томографии подтвердила результаты радиометрии образцов органов и тканей мышей с глиобласто-

мой U87 MG и аденокарциномой молочной железы Ca-755. Получено контрастное изображение, доказывающее гиперфиксацию препарата в патологическом очаге опухоли глиобластомы, которое позволяет визуализировать опухоль при помощи позитронно-эмиссионного томографа на протяжении как минимум 35 минут после введения РФЛП. Оценив результаты ПЭТ исследования мышей с аденокарциномой молочной железы, мы не обнаружили столь же значительного связывания РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » с опухолью, что подтверждается результатами биораспределения, полученными методом радиометрии органов и тканей.

На рисунках 3 и 4 показаны изображения всего тела мыши с ксенографтом U 87 MG и Ca-755, полученные через 15 и 35 минут после введения РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ ».

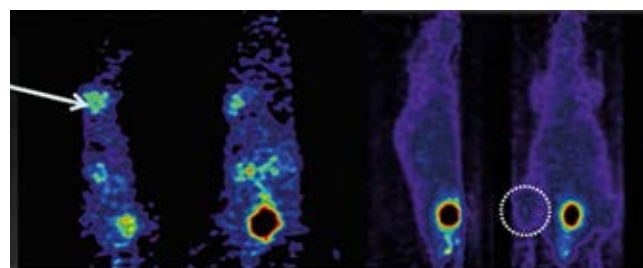
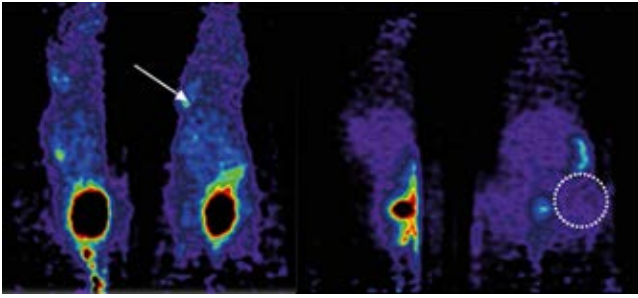


Рисунок 3. ПЭТ-изображение мыши с очагом глиобластомы U-87 MG (опухолевый очаг указан стрелкой) и аденокарциномой молочной железы Ca-755 (зона локализации опухолевого очага обозначена белой штриховой линией) через 15 мин после введения препарата

Figure 3. Small-animal PET studies of U-87 MG and Ca-755 tumor-bearing mice at 15 min post injection. Tumors are indicated by arrows (U-87 MG) and white dashed line (Ca-755)



**Рисунок 4.** ПЭТ-изображение мыши с очагом глиобластомы U-87 MG (опухолевый очаг указан стрелкой) и аденокарциномы молочной железы Ca-755 (зона локализации опухолевого очага обозначена белой штриховой линией) через 35 мин после введения препарата «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ »

**Figure 4.** PET image of a mouse with a focus of glioblastoma U-87 MG (the tumor focus is indicated by an arrow) and breast adenocarcinoma Ca-755 (the zone of localization of the tumor focus is indicated by a white dashed line) 35 minutes administration of the radiopharmaceutical «Vascular,  $^{68}\text{Ga}$ »

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамика распределения РФЛП «Васкуляр,  $^{68}\text{Ga}$ » в организме лабораторных животных характерна для поведения пептидов *in vivo*. Отмечена достоверная гиперфиксация радиофармпрепарата в очагах патологии. Накопление препарата в области опухолевого очага глиобластомы у мышей в среднем в 2 раза превышает таковое в опухолевых очагах аденокарциномы. Результаты *in vivo* ПЭТ визуализации экспериментальных опухолевых очагов хорошо коррелируют с данными радиометрии *ex vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Карамышева А. Ф. Механизмы ангиогенеза. *Биохимия*. 2008;73(7): 935–948.
2. Santulli G. Angiogenesis: Insights from a Systematic Overview. *Nova Science Publishers*, 2013. 346 p.
3. Debordeaux F., Chansel-Debordeaux L., Pinaquy J. B., Fernandez P., Schulz J. What about  $\alpha_v\beta_3$  integrins in molecular imaging in oncology? *Nucl. Med. Biol.* 2018;62–63:31–46. Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2018.04.006.
4. Chen H., Niu G., Wu H., Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Theranostics*. 2016;6(1): 78–92. Doi: 10.7150/thno.13242.
5. Рудас М. С., Насникова И. Ю., Матякин Г. Г. Позитронно-эмиссионная томография в клинической практике. Учебно-методическое пособие. М.: Центральная клиническая больница УДП РФ, 2007. 53 с.
6. Rösch F. (68)Ge/(68)Ga generators: past, present, and future. *Recent Results Cancer Res.* 2013;194:3–16. Doi: 10.1016/j.apradiso.2012.10.012.
7. Ларенков А. А., Кодина Г. Е., Брускин А. Б. Радионуклиды галлия в ядерной медицине: радиофармацевтические препараты на основе изотопа  $^{68}\text{Ga}$ . *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2011;56(5):56–73.
8. Spang P., Herrmann C., Roesch F. Bifunctional Gallium – 68 Chelators: Past, Present, and Future. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2016;46(5):373–394. Doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003.
9. Бубенчиков В. Б., Марук А. Я., Брускин А. Б., Кодина Г. Е. Исследование комплексов производных RGD-пептидов с  $^{68}\text{Ga}$ . *Радиохимия*. 2016;58(5):437–442.
10. Isal S., Pierson J., Imbert L. et al. PET imaging of  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD, as compared with  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. *EJNMMI Res.* 2018;8(1):51. Doi:10.1186/s13550-018-0405-5.

## REFERENCES

1. Karamysheva A. F. The mechanisms of angiogenesis. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(7):935–948. (In Russ.).
2. Gaetano Santulli. Angiogenesis: Insights from a Systematic Overview. *Nova Science Publishers*, 2013. 346 p.
3. Debordeaux F., Chansel-Debordeaux L., Pinaquy J. B., Fernandez P., Schulz J. What about  $\alpha_v\beta_3$  integrins in molecular imaging in oncology? *Nucl. Med. Biol.* 2018;62–63:31–46. Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2018.04.006.
4. Chen H., Niu G., Wu H., Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Theranostics*. 2016;6(1): 78–92. Doi: 10.7150/thno.13242.
5. Rudas M. S., Nasnikova I. Yu., Matyakin G. G. Positron emission tomography in clinical practice. Educational and methodological guide. Moscow: *Central'naya klinicheskaya bol'nica UDP RF*, 2007. 53 p. (In Russ.).
6. Rösch F. (68)Ge/(68)Ga generators: past, present, and future. *Recent Results Cancer Res.* 2013;194:3–16. Doi: 10.1016/j.apradiso.2012.10.012.
7. Larenkov A. A., Kodina G. E., Bruskin A. B. Gallium radionuclides in nuclear medicine: radiopharmaceuticals based on  $^{68}\text{Ga}$ . *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'*. 2011;56(5):56–73. (In Russ.).
8. Spang P., Herrmann C., Roesch F. Bifunctional Gallium – 68 Chelators: Past, Present, and Future. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2016;46(5):373–394. Doi: 10.1053/j.semnuclmed.2016.04.003.
9. Bubenshchikov V. B., Maruk A. Ya., Bruskin A. B., Kodina G. E. Research of complexes of  $^{68}\text{Ga}$  RGD-peptides derivatives. *Radiokhimiya*. 2016;58(5):437–442. (In Russ.).
10. Isal S., Pierson J., Imbert L. et al. PET imaging of  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD, as compared with  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. *EJNMMI Res.* 2018;8(1):51. Doi: 10.1186/s13550-018-0405-5.

**30 СЕНТЯБРЯ – 1 ОКТЯБРЯ**



**V ВСЕРОССИЙСКАЯ  
GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ**

# **ЕДИНЫЕ GxP ПРАВИЛА – КАЧЕСТВО ВО БЛАГО ЗДОРОВЬЯ**

## **ГЛАВНЫЕ ТЕМЫ:**

- Фармацевтическая и медицинская промышленность: уроки пандемии
- Потенциал отечественного производства АФС
- Современные тренды мирового законодательства и глобальная гармонизация
- Междисциплинарный подход для развития инновационного и экспортного потенциала фармацевтической промышленности ЕАЭС
- Непрерывное производство

**[www.gosgmp.ru](http://www.gosgmp.ru)**

**В ОНЛАЙН ФОРМАТЕ**

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-173-181>  
УДК 615.12



Обзорная статья/Review article

## Метрологические требования к измерительному оборудованию (обзор)

Н. В. Шинева<sup>1\*</sup>, М. В. Гаврилин<sup>1</sup>, Ю. А. Старчак<sup>1</sup>, С. В. Макаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Шинева Надежда Валериевна. E-mail: shinevanv@expmed.ru

ORCID: Н. В. Шинева – <https://orcid.org/0000-0003-1241-2355>; М. В. Гаврилин – <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>; Ю. А. Старчак – <https://orcid.org/0000-0002-3820-7811>; С. В. Макаров – <https://orcid.org/0000-0003-0012-2537>.

Статья поступила: 21.04.2020. Статья принята в печать: 20.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Квалификация оборудования является одним из краеугольных камней обеспечения качества лекарственных средств, которые обеспечивают постоянство метрологических характеристик. Необходимость формирования отечественных руководств к проведению процесса квалификации средств измерений и гармонизация его с европейскими и американскими требованиями, позволит повысить качество лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации, и повысит их конкурентоспособность на мировом фармацевтическом рынке.

**Текст.** Цель настоящего обзора – анализ отечественной законодательной базы, которая регламентирует постоянство метрологических характеристик средств измерений, применяемых в фармацевтической промышленности. В статье приводятся данные, характеризующие особенности подтверждения соответствия оборудования метрологическим требованиям с точки зрения различных нормативных документов, действующих на территории Российской Федерации.

**Заключение.** В статье нами продемонстрирована неоднозначность толкований отечественного законодательства и Европейских рекомендаций по качеству в сфере метрологических требований к средствам измерений. Разработка отечественного руководства, гармонизирующего метрологические требования к оборудованию, позволит сфокусироваться на результате и качестве лекарственных средств, а также устранил неоднозначность толкований отечественной законодательной базы.

**Ключевые слова:** лабораторное оборудование, аналитическое оборудование, измерительная техника, квалификация оборудования, контроль качества лекарственных средств, Государственная фармакопея, стандарты качества лекарственных средств, метрологические требования, калибровка оборудования.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Все авторы принимали непосредственное участие в подборе и анализе материалов, обсуждении текста статьи. Ю. А. Старчак и Н. В. Шинева участвовали в написании текста статьи.

**Для цитирования:** Шинева Н. В., Гаврилин М. В., Старчак Ю. А., Макаров С. В. Метрологические требования к измерительному оборудованию. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):173–181. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-173-181>

## Metrological Requirements to Measuring Equipment (Review)

Nadezhda V. Shineva<sup>1\*</sup>, Mikhail V. Gavrilin<sup>1</sup>, Yuliya A. Starchak<sup>1</sup>, Sergey V. Makarov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation), 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

\*Corresponding author: Nadezhda V. Shineva. E-mail: shinevanv@expmed.ru

ORCID: Nadezhda V. Shineva – <https://orcid.org/0000-0003-1241-2355>; Mikhail V. Gavrilin – <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>; Yuliya A. Starchak – <https://orcid.org/0000-0002-3820-7811>; Sergey V. Makarov – <https://orcid.org/0000-0003-0012-2537>.

Received: 21.04.2020. Revised: 20.08.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Qualification of equipment is one of the crucial aspects of quality assurance of medicinal products that ensures consistency of metrological characteristics. Elaboration of local guidances on qualification of measuring instruments, and harmonisation of the qualification procedure with the requirements of the European and American regulations will help to improve the quality of medicinal products manufactured in Russia and to facilitate their competitiveness on the global pharmaceutical market.

**Text.** The aim of this review is to analyse the Russian regulatory framework regarding the consistency of metrological characteristics of measuring equipment used in the pharmaceutical industry. The article contains information on the special aspects of confirmation of compliance of equipment to the metrological requirements stated in various regulatory documents in force in the Russian Federation.

**Conclusion.** The article demonstrates the ambiguity of interpretation of the Russian regulatory framework and European quality recommendations regarding metrological requirements to measuring equipment. Elaboration of the local guidance harmonizing metrological requirements to equipment will help to focus on the result and the quality of medicinal products, and to eliminate the ambiguity of interpretation of the Russian regulatory framework.

**Keywords:** laboratory equipment, analytical equipment, measuring instruments, equipment qualification, quality control of medicinal products, state pharmacopoeia, quality standards of medicinal products, metrological requirements, equipment calibration.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

© Шинева Н. В., Гаврилин М. В., Старчак Ю. А., Макаров С. В., 2020

© Shineva N. V., Gavrilin M. V., Starchak Yu. A., Makarov S. V., 2020

**Contribution of the authors.** All authors – data collection, analysis and systematisation. Yulia A. Starchak and Nadezhda V. Shineva – writing and revising the text.

**For citation:** Shineva N. V., Gavrilin M. V., Starchak Yu. A., Makarov S. V. Metrological requirements to measuring equipment. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):173–181. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-173-181>

## ВВЕДЕНИЕ

При проведении любых аналитических процедур в фармацевтическом анализе, закономерно ожидание результата, который позволяет получить обоснованное заключение о качестве лекарственного препарата. Но любой полученный результат имеет изначально неопределенные отклонения от такого же результата, полученного при предыдущем и последующем измерениях. Таким образом, при проведении аналитических процедур мы получаем неопределенный результат, т. е. интервал, в пределах которого находится реальное значение определяемой величины [1]. Делать выводы о достоверно подтвержденном качестве лекарственного препарата можно только в том случае, если полученный интервал проводимых измерений достаточно мал. Малой величины неопределенности при проведении аналитических процедур можно добиться только в том случае, если проведение измерений базируется на соблюдении требований национального или международного стандарта, в котором предусмотрены четыре важнейших процедуры: квалификация измерительного оборудования, валидация аналитических методик, проверка пригодности хроматографической системы и разработанная система стандартных образцов. Только в этом случае, при проведении измерений, лаборатория может давать однозначное заключение о качестве лекарственного средства.

Среди всех вышеперечисленных процедур, именно квалификация измерительного оборудования играет важную роль в формировании системы качества в условиях фармацевтического предприятия (рисунок 1).



Рисунок 1. Пирамида Маслоу системы менеджмента качества



Figure 1. Maslow's pyramid of quality management system

Однако на всём постсоветском пространстве для оборудования, которое в той или иной степени используется в процессе измерений, должна проводиться процедура поверки [2] и целесообразность проведения процедуры квалификации, в большинстве случаев подвергается сомнению.

## МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

В начале нашей работы следует определиться с терминами, применяемыми метрологической службой. Исторически сложилось так, что используемая терминология, регламентируется различными федеральными законами, и достаточно часто не гармонизирована друг с другом как собственно и сами процессы, которые подпадают под эти термины. На основании федеральных законов и ГОСТов [2–4], действующих в настоящий момент на территории Российской Федерации, нами был составлен следующий глоссарий:

- валидация – документально оформленные действия, дающие высокую степень уверенности в том, что методика, процесс, оборудование, материал, операция или система соответствуют заданным требованиям и их использование будет постоянно приводить к результатам, соответствующим заранее установленным критериям приемлемости [3];
- верификация – подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что установленные требования были выполнены [4];
- измерительное оборудование – средства измерений, программные средства, эталоны, справочный материал, вспомогательная аппаратура или их комбинация, необходимые для процесса измерения [4];

- калибровка средств измерений – совокупность операций, выполняемых в целях определения действительных значений метрологических характеристик средств измерений [2];
- квалификация – действия, удостоверяющие и подтверждающие документально тот факт, что оборудование или вспомогательные системы смонтированы должным образом, правильно функционируют и действительно приводят к ожидаемым результатам [3];
- метрологическое подтверждение пригодности – совокупность операций, проводимых с целью обеспечения соответствия измерительного оборудования требованиям к его предполагаемому использованию [4];
- метрологические требования – требования к влияющим на результат и показатели точности измерений характеристикам (параметрам) измерений, эталонов единиц величин, стандартных образцов, средств измерений, а также к условиям, при которых эти характеристики (параметры) должны быть обеспечены [2];
- поверка средств измерений (далее также поверка) – совокупность операций, выполняемых в целях подтверждения соответствия средств измерений метрологическим требованиям [2];
- спецификация – перечень испытаний, ссылок на аналитические методики и критериев приемлемости, представляющих собой числовые границы, интервалы или другие критерии для соответствующих испытаний. Спецификация устанавливает набор критериев, которым должен соответствовать материал, чтобы считаться приемлемым для его предполагаемого применения. Понятие «соответствие спецификации» означает, что материал, прошедший испытания согласно перечисленным аналитическим методикам, соответствует приведенным критериям приемлемости [3];
- средство измерений – техническое средство, предназначенное для измерений [2].

Следует отметить различия в понятиях «поверка средств измерений» и «квалификация оборудования». Так, согласно ФЗ № 102 от 26.06.2008 «Об обеспечении единства измерений» [2], поверкой является совокупность операций, выполняемых в целях подтверждения соответствия средств измерений метрологическим требованиям. Тогда как квалификация аналитического оборудования для фармацевтических целей – экспериментальное и документальное подтверждение пригодности используемого оборудования для его целевого назначения в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи [3, 4]. То есть процедуру поверки в обязательном порядке должно проходить любое измерительное оборудование, которое принимает участие в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, в то время как квалификация – процесс, применимый к оборудованию, задействованному в специализированных отраслях промышленности. Таким образом, оборудование,

применяемое в фармацевтической промышленности, должно подвергаться как государственной поверке, так и процедуре квалификации в соответствии с требованиями GMP [3, 5].

## СУЩНОСТЬ ПРОЦЕССА КВАЛИФИКАЦИИ СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЙ

Согласно требованиям надлежащей практики [3, 5], квалификация оборудования тесным образом связана с валидацией аналитических методик, так как в обязательном порядке должна предшествовать данному разделу жизненного цикла аналитического метода. Это связано в первую очередь с тем, что оборудование и есть та база проведения любого измерения, которая обеспечивает результат с контролируемой неопределенностью.

Квалификация оборудования состоит из нескольких взаимосвязанных процессов [6] и проводится под непосредственным контролем Пользователя / Заказчика оборудования, хотя Поставщик / Производитель / Контрактная организация также могут принимать непосредственное участие в процедуре квалификации.

Квалификация оборудования оказывает непосредственное (как положительное, так и отрицательное) влияние на результат измерений и на весь аналитический цикл.

Как показано на рисунке 2 [6, 7], процесс квалификации начинается с этапа I – квалификации проекта, в котором требования к оборудованию (специфика-



Рисунок 2. Схема процесса квалификации аналитического оборудования

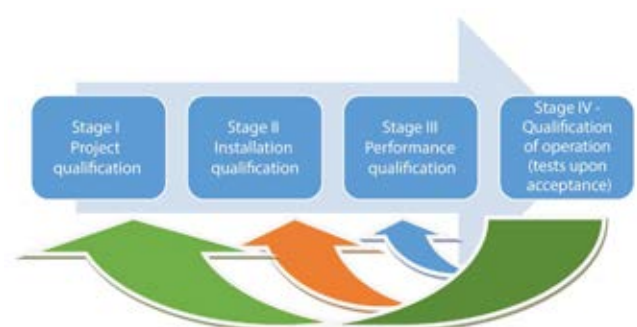


Figure 2. Diagram of the analytical equipment qualification process

ция требований пользователя) сравниваются со спецификацией изготовителя оборудования. После заказа и поставки системы Заказчику следует этап II – квалификация монтажа. Этап начинается с проверки документации поставляемых компонентов, установки всех модулей, а также обучения, предоставляемого пользователям.

Во время этапа III – квалификации функционирования, прибор тестируется в лабораторных (стандартных) условиях, в процессе тестирования должно быть подтверждено соответствие работы прибора его заявленным техническим характеристикам. На IV этапе квалификации (квалификация эксплуатации) рассматривается пригодность прибора в реальных условиях использования [6].

Следует заметить, что полный цикл квалификации, включающий в себя все 4 этапа, должен быть выполнен при каждом поступлении нового прибора в лабораторию. При повторной квалификации работающего прибора, при процедурах профилактического обслуживания этапы квалификации могут быть осуществлены выборочно. Кроме того, определенные этапы квалификации должны быть обязательно применены к оборудованию в следующих случаях:

- при изменении положения аналитического прибора в условиях одной и той же лаборатории (в случаях, если прибор состоит из отдельных блоков), т. е. в процессе текущей реквалификации – этапы III и IV;
- после ремонта прибора – этапы III и IV;
- после переноса прибора на новую площадку – этапы II–IV;
- до и после модернизации прибора – этапы I–IV.

На данном этапе следует снова обозначить принципиальные различия между проверкой аналитического оборудования и его квалификацией. Так, согласно [2], проверка должна проводиться аккредитованными лабораториями, тогда как квалификация оборудования, как уже было сказано выше, проводится силами Поставщиков и/или Заказчиков оборудования. Первичная проверка средств измерений, как и квалификация оборудования, в обязательном порядке проводится перед вводом в эксплуатацию и после ремонта оборудования. Но, если периодическая проверка проводится с постоянной периодичностью (1 раз в год в большинстве случаев), то квалификация оборудования проводится, как уже было сказано, как в плановом порядке, так и в любых случаях вмешательства в работу средств измерений.

*Квалификация оборудования* – это системный процесс, результат большого количества отдельных действий, которые предусмотрены для каждого из этапов. Предусмотренные действия обычно выполняются в той последовательности, которая указана в таблице 1 [8]. В некоторых случаях более целесообразным считается выполнение объединения отдельных действий или выполнение его на другом этапе. Рядом с такими действиями должен стоять символ (↔). Если выполнение действия перенесено на другой этап, выполнять его на том этапе, где оно было изначально указано, не нужно. Важным является тот факт,

что предусмотренное действие выполнено, момент его выполнения менее значим.

Как уже было сказано, проводимые этапы квалификации проводятся целостно и часто достаточно трудно различить переход от этапа III к этапу IV. Международные эксперты утверждают, что резкого различия между этапом III и IV не существует [8], и в связи с этим некоторые испытания при проведении квалификации являются взаимозаменяемыми. Но в любом случае проведение каждого из этих этапов является обязательным.

## КВАЛИФИКАЦИЯ И ПОВЕРКА ИЗМЕРИТЕЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ: ОБЩНОСТЬ И ОТЛИЧИЯ

В настоящее время при проведении фармацевтического анализа чаще всего используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением спектрофотометрического или диодно-матричного детекторов. В связи с этим нами проведён анализ требований ГОСТ Р 8.772-2011 [9], выдвигающий требования к процедуре поверки оборудования, и рекомендаций Quality Management (QM) Documents [10] (в части их требований к ВЭЖХ-оборудованию) с целью определения принципиальных отличий двух обязательных процедур. Полученные результаты отражены в таблице 2. Для синхронизации данных процедура поверки была разбита на четыре этапа, соответствующих этапам квалификации.

Сразу следует отметить, что как при процедуре поверки, так и при процессе квалификации используются стандартные методики и реактивы, которые предусмотрены в технической документации, прилагаемой к оборудованию или нормативных актах.

Таким образом, мы видим, что при процедурах метрологической поверки и процесса квалификации оборудования применяются два отличающихся друг от друга подхода. Тогда как при поверке проверяются документация, внешний вид и работоспособность прибора в целом, с использованием методик, предусмотренных в технической документации производителя прибора, при проведении квалификации огромное внимание уделяется соответствию задач, предусмотренных для выполнения на оборудовании, комплектности прибора, работе каждого установленного узла и показателям точности результатов испытаний на основании методик предписанных в Европейском руководстве по качеству [10].

## ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ, КАК ЧАСТЬ ПРОЦЕССА КВАЛИФИКАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ

Как часть управления рисками системы менеджмента качества, квалификация оборудования используется для определения уровня мероприятий, необ-

Таблица 1. Сроки, условия выполнения и действия, выполняемые на каждом из этапов квалификации оборудования

Table 1. Terms, conditions of execution and actions performed at each stage of equipment qualification

Этап I Квалификация проекта Stage I Project qualification	Этап II Квалификация монтажа Stage II Installation qualification	Этап III Квалификация функционирования Stage III Functioning qualification	Этап IV Квалификация эксплуатации Stage IV Operation qualification
<i>Сроки и условия выполнения Terms and conditions of execution</i>			
Перед закупкой нового оборудования Before purchasing new equipment	Монтаж каждой единицы оборудования (нового, старого или ранее установленного, но не прошедшего квалификацию) Installation of each piece of equipment (new, old or previously installed but not qualified)	После монтажа или крупного ремонта каждой единицы оборудования After installation or major repair of each piece of equipment	Периодически, с определенными интервалами времени для каждой единицы оборудования Periodically, at specific intervals for each piece of equipment
<i>Действия Actions</i>			
Подтверждение этапа I поставщика Confirmation of stage I supplier	Описание системы ↔ System Description ↔	Проверка технических характеристик Checking the technical characteristics	Профилактическое обслуживание и ремонт Preventive maintenance and repair
Подтверждение доступности надлежащего обслуживания со стороны производителя Confirmation of availability of proper service by the manufacturer	Доставка оборудования Equipment delivery		Эксплуатация, калибровка и техническое обслуживание Operation, Calibration and Maintenance
Пригодность оборудования для использования в лабораторных условиях Equipment suitability for use in laboratory conditions	Коммуникации / производственная площадка / окружающая среда Communication / production site / environment		
	Сеть и хранение данных ↔ Network and data storage ↔	Безопасное хранение, резервное копирование и архивирование данных Safe storage, backup and archiving of data	
	Сборка и монтаж Assembly and installation		
	Верификация установки ↔ Installation verification ↔	Тестирование аппаратных функций Testing hardware functions	Проверка рабочих характеристик Performance check

ходимых для демонстрации пригодности оборудования при использовании его по назначению. Например, при проведении анализа методом ВЭЖХ обязательным требованием является проверка пригодности хроматографической системы (в соответствии с требованиями ГФ XIV [11], EP [12], USP [6]), что следует рассматривать в качестве постоянного показателя производительности оборудования для его целевого использования. Таким образом, отслеживание данных пригодности хроматографической системы в контрольных результатах помогает выявить и понять потенциальные проблемы, и предпринять превентивные меры до того, как возникнет серьезная проблема.

Отдельно следует обозначить возможность использования теста пригодности хроматографической системы при проведении отдельных этапов квалификации аналитического оборудования. Ряд зарубежных авторов [13] представляют любопытную концепцию, согласно которой первоначальный этап квалифика-

ции эксплуатации проводится непосредственно после квалификации функционирования в момент приёмки и запуска оборудования в лаборатории, тогда как текущая квалификация эксплуатации проводится на основе проведённого теста проверки пригодности хроматографической системы. Несмотря на подобную практику, другие исследователи [7] проводят IV этап квалификации без дополнительной информации о данных теста проверки пригодности хроматографической системы, используя близкие к лабораторной реальности методики, которые выполняются за короткий промежуток времени.

Однако все эксперты сходятся в одном: показатели пригодности хроматографической системы полезны, и они часто предоставляют дополнительную информацию о производительности системы. Тем не менее до сих пор нет единого мнения, может ли тест проверки пригодности хроматографической системы полностью или в значительной степени заменить этап квалификации эксплуатации.

Таблица 2. Принципиальные различия в подходах к проведению процедур поверки и квалификации аналитического оборудования

Table 2. Fundamental differences in approaches to carrying out calibration procedures and qualification of analytical equipment

Наименование процесса	Период жизненного цикла оборудования	Процедура поверки	Процедура квалификации
Этап I Stage I	Заказ оборудования у Поставщика / Производителя Ordering equipment from the Supplier / Manufacturer  Поставка оборудования от Поставщика / Производителя Supply of equipment from the Supplier / Manufacturer	-	Подтверждение доступности надлежащего обслуживания со стороны производителя. Confirmation of the availability of proper service by the manufacturer. Equipment suitability for use in laboratory conditions
Этап II Stage II	Монтаж каждой единицы оборудования (нового, старого или ранее установленного, но не прошедшего квалификацию) Installation of each piece of equipment (new, old or previously installed but not qualified)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● проверка комплектности хроматографа и номеров блоков паспортным данным;</li> <li>● исправность механизмов и крепёжных деталей;</li> <li>● чёткость маркировки</li> <li>● checking the completeness of the chromatograph and block numbers with passport data;</li> <li>● serviceability of mechanisms and fasteners;</li> <li>● legibility of marking</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● монтаж оборудования;</li> <li>● проверка комплектности хроматографа и номеров блоков паспортным данным;</li> <li>● исправность механизмов и крепёжных деталей;</li> <li>● чёткость маркировки;</li> <li>● обучение пользователей</li> <li>● installation of equipment;</li> <li>● checking the completeness of the chromatograph and block numbers with passport data;</li> <li>● serviceability of mechanisms and fasteners;</li> <li>● legibility of marking;</li> <li>● user training</li> </ul>
Этап III Stage III	После монтажа или крупного ремонта каждой единицы оборудования After installation or major repair of each piece of equipment	<ul style="list-style-type: none"> <li>● внешний осмотр;</li> <li>● определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала;</li> <li>● определение дрейфа нулевого сигнала;</li> <li>● определение относительного среднего квадратичного отклонения (СКО) выходного сигнала,</li> <li>● определение относительного изменения параметров выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы хроматографа;</li> <li>● определение показателей точности результатов измерений</li> <li>● visual inspection;</li> <li>● determination of the level of fluctuation noise of the zero signal;</li> <li>● determination of zero signal drift;</li> <li>● determination of the relative standard deviation (RMS) of the output signal,</li> <li>● determination of the relative change in the parameters of the output signal for 8 hours of continuous operation of the chromatograph;</li> <li>● determination of indicators of accuracy of measurement results</li> </ul>	<p>Тестирование аппаратных функций каждого узла оборудования:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● насосная система (скорость потока, состав подвижной фазы, соотношение градиента);</li> <li>● инжектор (точность отбора пробы, точность внесения пробы);</li> <li>● автосэмплер термостатный (точность термостатирования);</li> <li>● термостат колонки (точность и постоянство термостатирования);</li> <li>● детектор (в зависимости от вида детектора: линейность, постоянство длины волны, дрейф базовой линии, отношение сигнал/шум и т. п.)</li> </ul> <p>Testing the hardware functions of each hardware node:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● pumping system (flow rate, mobile phase composition, gradient ratio);</li> <li>● injector (sampling accuracy, sampling accuracy);</li> <li>● thermostatic autosampler (temperature control accuracy);</li> <li>● column thermostat (accuracy and constancy of temperature control);</li> <li>● detector (depending on the type of detector: linearity, wavelength constancy, baseline drift, signal-to-noise ratio, etc.)</li> </ul>

Наименование процесса	Период жизненного цикла оборудования	Процедура поверки	Процедура квалификации
Этап IV Stage IV	<p>Периодически, с определенными интервалами времени для каждой единицы оборудования</p> <p>Periodically, at specific intervals for each piece of equipment</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● внешний осмотр;</li> <li>● определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала;</li> <li>● определение дрейфа нулевого сигнала;</li> <li>● определение относительного среднего квадратичного отклонения (СКО) выходного сигнала;</li> <li>● определение относительного изменения параметров выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы хроматографа</li> <li>● visual inspection;</li> <li>● determination of the level of fluctuation noise of the zero signal;</li> <li>● determination of zero signal drift;</li> <li>● determination of the relative standard deviation (RMS) of the output signal;</li> <li>● determination of the relative change in the parameters of the output signal for 8 hours of continuous operation of the chromatograph</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● показатели пригодности хроматографической системы (в соответствии с ОФС «Хроматография» или любой другой валидированный метод);</li> <li>● площадь пика соединения;</li> <li>● относительное время удерживания;</li> <li>● отношение сигнал/шум;</li> <li>● точность дозирования инжектора</li> <li>● indicators of the suitability of the chromatographic system (in accordance with the General Pharmacopoeia Monograph «Chromatography» or any other validated method);</li> <li>● junction peak area;</li> <li>● relative retention time;</li> <li>● signal-to-noise ratio;</li> <li>● injector dosing accuracy</li> </ul>

## РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПАРАМЕТРЫ РАБОТЫ ВЭЖХ, КОНТРОЛИРУЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТАПОВ III И IV КВАЛИФИКАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ

В связи с тем, что квалификация аналитического оборудования – процесс, осуществляемый непосредственно Пользователем и проводимый на системной основе, в статье мы приводим рекомендации Quality Management (QM) Documents [10]. В таблицах 3 и 4 отражены подходы Европейской фармакопеи к проведению этапов III и IV квалификации оборудования для основных узлов высокоэффективных жидкостных хроматографов, а также для некоторых наиболее часто используемых детекторов.

Как мы уже упоминали, в таблице 3 представлены рекомендуемые критерии приемлемости квалификации функционирования, которая заключается в проведении совокупности операций, подтверждающих действительные метрологические характеристики каждого узла измерительного средства. Но при обращении к глоссарию, который приведен в начале нашей статьи, мы видим, что именно эти функции присущи процессу калибровки средств измерений (согласно ФЗ от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» [2]). Таким образом, мы можем утверждать, что этап III (квалификация функционирования) фактически является процессом калибровки оборудования, что, в свою очередь, позволяет предположить о возможной взаимозаменяемости двух проводимых процедур.

Квалификацию эксплуатации, как и квалификацию функционирования, проводят согласно методикам, которые предлагаются в рекомендациях по качеству Европейской фармакопеи [10]. Однако большинство контролируемых параметров этапа IV относится к показателям пригодности хроматографической системы, что уже обсуждалось в тексте данной статьи. Таким образом, мы также приходим к выводу, что при проведении текущей квалификации эксплуатации в некоторых случаях целесообразно применять тесты пригодности хроматографической системы наряду с тестами, предлагаемыми Европейскими рекомендациями по качеству [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью использования средств измерений в фармации является получение достоверных данных о качестве лекарственного средства. Именно поэтапный процесс квалификации оборудования позволяет достичь этой цели и решить задачу получения максимально постоянных показаний с низкой величиной неопределенности.

В настоящее время в Российской Федерации используются руководства EDQM и FDA, на основании которых проводится квалификация измерительного оборудования в лабораториях. К сожалению, в нашей стране не существует авторитетного руководства или рекомендаций, которые бы учитывали современные реалии, возросшие требования к качеству лекарственных средств, а также, что немаловажно, особенности

**Таблица 3. Рекомендованные параметры работы ВЭЖХ, определяемые при проведении этапа III квалификации оборудования**  
**Table 3. Recommended HPLC performance parameters determined during stage III equipment qualification**

Инструментальный модуль Instrument module	Контролируемые параметры Controlled parameters	Рекомендуемые параметры приемлемости Recommended acceptance parameters
Насосная система Pumping system	<ul style="list-style-type: none"> <li>● точность скорости потока подвижной фазы (ВЭЖХ);</li> <li>● точность скорости потока подвижной фазы (ультра-ВЭЖХ);</li> <li>● постоянство скорости потока (ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ);</li> <li>● точность соотношения компонентов подвижной фазы;</li> <li>● пульсация градиента</li> <li>● mobile phase flow rate accuracy (HPLC);</li> <li>● mobile phase flow rate accuracy (ultra-HPLC);</li> <li>● constant flow rate (HPLC and ultra-HPLC);</li> <li>● the accuracy of the ratio of the components of the mobile phase;</li> <li>● ripple gradient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>±5,0 %</li> <li>±3,0 %</li> <li>RSD ≤ 0,5 %</li> <li>±2,0 %</li> <li>≤0,2 %</li> <li>±5,0 %</li> <li>±3,0 %</li> <li>RSD ≤ 0,5 %</li> <li>±2,0 %</li> <li>≤0,2 %</li> </ul>
Инжектор Injector	<ul style="list-style-type: none"> <li>● постоянство отбора объема пробы (ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ);</li> <li>● точность ввода объема пробы</li> <li>● consistency of sampling volume (HPLC and ultra-HPLC);</li> <li>● accuracy of sample volume injection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RSD ≤ 1,0 %</li> <li>≤0,2 %</li> <li>RSD ≤ 1,0 %</li> <li>≤0,2 %</li> </ul>
Автосэмплер термостатный Thermostatic autosampler	<ul style="list-style-type: none"> <li>● точность термостатирования</li> <li>● temperature control accuracy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>±3 °C</li> <li>±3 °C</li> </ul>
Нагрев и охлаждение колонки Column heating and cooling	<ul style="list-style-type: none"> <li>● точность термостатирования;</li> <li>● стабильность термостатирования</li> <li>● temperature control accuracy;</li> <li>● temperature control stability</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>±2 °C</li> <li>≤1 °C</li> <li>±2 °C</li> <li>≤1 °C</li> </ul>
Мультиволновой детектор Multi-wave detector	<ul style="list-style-type: none"> <li>● линейность;</li> <li>● точность длины волны;</li> <li>● дрейф</li> <li>● linearity;</li> <li>● wavelength accuracy;</li> <li>● drifting</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>r<sup>2</sup> ≥ 0.9990</li> <li>±2 нм</li> <li>+</li> <li>r<sup>2</sup> ≥ 0.9990</li> <li>±2 нм</li> <li>+</li> </ul>
Флуоресцентный детектор Fluorescent detector	<ul style="list-style-type: none"> <li>● точность длины волны (возбуждения и излучения);</li> <li>● отношение сигнал/шум</li> <li>● wavelength accuracy (excitation and emission);</li> <li>● signal to noise ratio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>±3 нм</li> <li>≥400</li> <li>±3 нм</li> <li>≥400</li> </ul>
Рефрактометрический детектор Refractometric detector	<ul style="list-style-type: none"> <li>● отношение сигнал/шум;</li> <li>● дрейф во времени;</li> <li>● линейность</li> <li>● signal-to-noise ratio;</li> <li>● drift in time;</li> <li>● linearity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>≥10</li> <li>±1,0 мВ/мин</li> <li>r<sup>2</sup> ≥ 0.999</li> <li>≥10</li> <li>±1,0 mV/min</li> <li>r<sup>2</sup> ≥ 0.999</li> </ul>

отечественной законодательной базы. В отсутствие такого отечественного руководства, квалификация средств измерений в РФ превратилась в субъективное и зачастую бесплодное занятие по составлению документов. Кроме того, большой диссонанс в рабочий процесс любого производства и любой лаборатории вносит необходимость проведения, по сути, двойного подтверждения соответствия оборудования заявленным характеристикам – проведение процедур поверки и квалификации средств измерений.

В статье нами продемонстрирована неоднозначность толкований отечественного законодательства и Европейских рекомендаций по качеству в сфере метрологических требований к средствам измерений. Разработка отечественного руководства, гармонизирующего метрологические требования к оборудованию, позволит сфокусироваться на результате и качестве лекарственных средств, а также устранил неоднозначность толкований отечественной законодательной базы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Леонтьев Д. А., Гризодуб А. И. Квалификация измерительного оборудования – метрологическая концепция. *Фармацевтическая отрасль*. 2013;4:28–31.
2. Федеральный закон от 26.06.2008 № 102-ФЗ (ред. от 13.07.2015) «Об обеспечении единства измерений». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/902107146>.
3. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/499029882>.
4. ГОСТ Р ИСО 9000-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь (утв. Приказом Росстандарта от 28.09.2015 № 1390-ст). Available at: <https://legalacts.ru/doc/gost-r-iso-9000-2015-natsionalnyi-standart-rossiiskoi/>
5. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026099>.
6. United States Pharmacopeia 41<sup>st</sup> edition. United States Pharmacopeial Convention. Доступ по подписке. Available at: <http://www.uspnf.com> (дата обращения 24.03.2020).
7. Parra M. K., Schmidta A. H. Life cycle management of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:506–517.
8. Bansal S. K., Layloff Th., Bush E. D. Qualification of Analytical Instruments for Use in the Pharmaceutical Industry: A Scientific Approach. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(1):1–8.
9. ГОСТ Р 8.772-2011. Национальный стандарт Российской Федерации. Государственная система обеспечения единства измерений. Хроматографы аналитические жидкостные лабораторные. Методика поверки. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200096424>.

Таблица 4. Рекомендованные параметры работы ВЭЖХ, определяемые при проведении этапа IV квалификации оборудования

Table 4. Recommended HPLC performance parameters determined during stage IV equipment qualification

Контролируемые параметры Controlled parameters	Рекомендуемые параметры приемлемости Recommended acceptance parameters
Показатели пригодности хроматографической системы Indicators of suitability of the chromatographic system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• в соответствии с ОФС «Хроматография» или любой другой валидированный метод</li> <li>• in accordance with the General Pharmacopoeia Monograph «Chromatography» or any other validated method</li> </ul>
<p>Постоянство определения площади пика (в количественном определении применимо к основному пику).</p> <p>Постоянство определения площади пика (родственные примеси)</p> <p>Consistency in the definition of the peak area (in quantitative definition, applies to the main peak).</p> <p>Consistency of Peak Area Determination (Related Impurities)</p>	<p>RSD ≤ 1,0 % (минимум 5 введений испытуемого или стандартного раствора) (в случае, если не предусмотрено иного метода в соответствии с требованиями фармакопеи)</p> <p>RSD ≤ 5,0 % (минимум 3 введения разведённого раствора или стандартного раствора, применяемого для количественного определения) (в случае, если не предусмотрено иного метода в соответствии с требованиями фармакопеи)</p> <p>RSD ≤ 1.0 % (minimum 5 injections of the test solution or standard solution) (if no other method is provided in accordance with the requirements of the Pharmacopoeia)</p> <p>RSD ≤ 5.0 % (minimum 3 injections of diluted solution or standard solution used for quantitation) (if no other method is provided in accordance with the requirements of the Pharmacopoeia)</p>
Относительное время удерживания (применимо к основному пику стандартного раствора) Relative retention time (applies to the main peak of the standard solution)	<p>RSD ≤ 5,0 % (минимум 5 введений испытуемого или стандартного раствора)</p> <p>RSD ≤ 5.0 % (minimum 5 injections of the test solution or standard solution)</p>
Отношение сигнал/шум (только при определении родственных примесей) Signal-to-noise ratio (only when determining related impurities)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• в соответствии с ОФС «Хроматография» или любой другой валидированный метод</li> <li>• in accordance with the General Pharmacopoeia Monograph «Chromatography» or any other validated method</li> </ul>
Точность дозирования инжектора Injector dosing accuracy	<p>≤0,2 % (количественное определение) Ниже предела обнаружения (родственные примеси)</p> <p>≤0.2 % (quantification) Below detection limit (related impurities)</p>

- OMCL Network of the Council of Europe: Quality Management Document. Council of Europe. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2011. Available at: [https://www.edqm.eu/medias/fichiers/UPDATED\\_Annex\\_1\\_Qualification\\_of\\_HPLC\\_Equipment.pdf](https://www.edqm.eu/medias/fichiers/UPDATED_Annex_1_Qualification_of_HPLC_Equipment.pdf) (дата обращения 24.03.2020).
- Государственная фармакопея Российской Федерации. МЗ РФ. XIV изд. Т. 1. Москва, 2018. 1470 с.
- European Pharmacopoeia 10<sup>th</sup> edition. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: <https://pheur.edqm.eu/home> (дата обращения 24.03.2020).
- Kaminskia L., Degenhardt M., Ermerc J. Efficient and economic HPLC performance qualification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51:557–564.
- Resolution of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 77 «On approval of the rules of good manufacturing practice of the Eurasian Economic Union». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026099>.
- United States Pharmacopoeia 41<sup>st</sup> edition. United States Pharmacopoeial Convention. Доступ по подписке. Available at: <http://www.uspnf.com> (accessed 24.03.2020).
- Parra M. K., Schmidta A. H. Life cycle management of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:506–517.
- Bansal S. K., Layloff Th., Bush E. D. Qualification of Analytical Instruments for Use in the Pharmaceutical Industry: A Scientific Approach. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(1):1–8.
- GOST R 8.772-2011. National standard of the Russian Federation. State system for ensuring the uniformity of measurements. Analytical laboratory liquid chromatography systems. Verification method. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200096424>.
- OMCL Network of the Council of Europe: Quality Management Document. Council of Europe. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2011. Available at: [https://www.edqm.eu/medias/fichiers/UPDATED\\_Annex\\_1\\_Qualification\\_of\\_HPLC\\_Equipment.pdf](https://www.edqm.eu/medias/fichiers/UPDATED_Annex_1_Qualification_of_HPLC_Equipment.pdf) (accessed 24.03.2020).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. MH RF. XIV ed. V. 1. Moscow, 2018.1470 p.
- European Pharmacopoeia 10<sup>th</sup> edition. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: <https://pheur.edqm.eu/home> (accessed 24.03.2020).
- Kaminskia L., Degenhardt M., Ermerc J. Efficient and economic HPLC performance qualification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;51:557–564.

## REFERENCES

- Leontiev D. A., Grizodub A. I. Qualification of measuring equipment – metrological concept. *Farmaceuticheskaya otrasl' = Pharmaceutical Industry Review*. 2013;4:28–31.
- Federal Law of June 26, 2008 No. 102-FZ (in force as of July 13, 2015) «On ensuring the uniformity of measurement». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/902107146>.
- Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation of June 14, 2013 No. 916 (in force as of December 18, 2015) «On approval of the rules of good manufacturing practice». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/499029882>.
- GOST R ISO 9000-2015. National standard of the Russian Federation. Quality management systems. Fundamentals and vocabulary (approved by the Order of the Federal Agency on Technical Regulating and Metrology of September 28, 2015 No. 1390-st). Available at: <https://legalacts.ru/doc/gost-r-iso-9000-2015-natsionalnyi-standart-rossiiskoi/>

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187>  
УДК 615.12



Обзорная статья/Review article

## Трансфер аналитических методик (обзор)

Ю. А. Старчак<sup>1\*</sup>, М. В. Гаврилин<sup>1</sup>, Н. В. Шинева<sup>1</sup>

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Старчак Юлия Анатольевна. E-mail: [starchakya@expmed.ru](mailto:starchakya@expmed.ru)

ORCID: Ю. А. Старчак – <https://orcid.org/0000-0002-3820-7811>; М. В. Гаврилин – <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>; Н. В. Шинева – <https://orcid.org/0000-0003-1241-2355>

Статья поступила: 21.04.2020. Статья принята в печать: 20.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Рассмотрены основные этапы процесса передачи аналитических методик на основании отечественных и зарубежных рекомендаций. Каждый из этих этапов позволяет проводить тщательную оценку аналитических методик, проверку ее текущего валидационного статуса и готовность принимающей стороны, а также имеет важное значение в достижении надежной передачи аналитических методик. Приведены примеры оформления аналитических методик подлежащих ревалидации, характеристик испытываемых образцов, стандартных образцов примесей. Описаны методики подлежащие трансферу в зависимости от лекарственной формы.

**Текст.** Цель – обзор возможных типов ТАМ, включая отмену процедуры передачи, а также обзор основных компонентов протокола передачи на основе отечественных и зарубежных литературных источников.

**Заключение.** Поскольку данные аналитических методик используются в качестве основы для принятия решений, их достоверность и воспроизводимость чрезвычайно важна. Таким образом, методика должна быть способна предоставлять данные одного и того же качества.

**Ключевые слова:** трансфер, перенос аналитических методик, Государственная фармакопея, сравнительное испытание, трансфер, протокол трансфера, отчет трансфера.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Все авторы принимали непосредственное участие в подборе и анализе материалов, обсуждении текста статьи. Ю. А. Старчак и Н. В. Шинева участвовали в написании текста статьи.

**Для цитирования:** Старчак Ю. А., Гаврилин М. В., Шинева Н. В. Трансфер аналитических методик. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):182–187. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187>

## Transfer of Analytical Procedures (Review)

Yuliya A. Starchak<sup>1\*</sup>, Mikhail V. Gavrilin<sup>1</sup>, Nadezhda V. Shineva<sup>1</sup>

1 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation), 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

\*Corresponding author: Yuliya A. Starchak. E-mail: [starchakya@expmed.ru](mailto:starchakya@expmed.ru)

ORCID: Yuliya A. Starchak – <https://orcid.org/0000-0002-3820-7811>; Mikhail V. Gavrilin – <https://orcid.org/0000-0002-2988-8627>; Nadezhda V. Shineva – <https://orcid.org/0000-0003-1241-2355>.

Received: 21.04.2020. Revised: 20.08.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** This article reviews main steps of the transfer of analytical procedures following the recommendations of the Russian and foreign regulatory bodies. Each step provides thorough evaluation of an analytical procedure, checks its current validation status and readiness of the receiving laboratory. Each step of the process is crucial for a reliable transfer. The article contains examples of formatting of analytical procedures to be revalidated, characteristics of test samples, reference standards of impurities. The authors described procedures to be transferred depending on the dosage form.

**Text.** The aim of this article is to review possible types of the transfer, including a transfer waiver, and main components of a transfer protocol following the information from the Russian and foreign literature sources.

**Conclusion.** Reliability and reproducibility of analytical method data are crucial as they form the basis for a decision-making process. Therefore a procedure should be capable of producing consistent data.

**Keywords:** transfer, transfer of analytical procedures, state pharmacopoeia, comparative study, transfer protocol, transfer report.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** All authors – data collection, analysis and systematisation. Yulia A. Starchak and Nadezhda V. Shineva – writing and revising the text.

**For citation:** Starchak Yu. A., Gavrilin M. V., Shineva N. V. Transfer of analytical procedures. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):182–187. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187>

## ВВЕДЕНИЕ

Передача (трансфер) аналитических методик (ТАМ) – документированная процедура, которая предоставляет полномочия лаборатории принимающей стороны использовать аналитические методики, разработанные в лаборатории передающей стороны, таким образом гарантируя, что принимающая сторона обладает процедурными знаниями и способностью выполнять переданные аналитические методики по назначению [1].

## ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ТРАНСФЕРУ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Перенос аналитических методик может выполняться как самостоятельное мероприятие, либо как один из этапов переноса технологий. ТАМ может быть выполнен несколькими способами. Наиболее распространенным является сравнительное испытание, проводимое на однородных партиях исходных субстанций и стандартных образцов, специально подготовленных для испытания (например, путем добавления соответствующих точных количеств известных примесей в образец). Сравнительное испытание требует анализа заранее определенного количества образцов одной партии как принимающей стороной, так и передающей [2]. Такие испытания проводятся по предварительно утвержденному протоколу сравнительных испытаний [3, 4], в который включают план-график проведения испытаний и оценку ресурсов как принимающей, так и передающей стороны. Также в протоколе сравнительных испытаний подробно приводится описание аналитических методик, образцов, предполагаемых к использованию, и заданных критериев приемлемости, в том числе допустимой вариабельности результатов испытаний.

Выполнение заданных критериев приемлемости необходимо для подтверждения, что принимающая сторона обладает требуемой для пользования методикой квалификацией [5].

Также ТАМ может быть выполнен с помощью совместной валидации или повторной валидацией (ревалидацией).

При совместной валидации передающая сторона привлекает сотрудников принимающей стороны для проведения валидации на своей территории [6]. Данная работа проводится в рамках предварительно утвержденного протокола с указанием критериев приемлемости.

Ревалидация выполняется принимающей стороной для специфических аналитических методик. В зависимости от сложности аналитической методики ревалидация может проводиться как в полном, так и частичном объеме. Аналитические методики подлежащие ревалидации необходимо включить в протокол трансфера, а результаты в отчет о передаче аналитических методик (таблицы 1 и 2).

В руководстве по надлежащей практике передачи технологии Международного общества фармацевтической инженерии (ISPE) приведены аналитические методики подлежащие трансферу в зависимости от лекарственной формы (таблица 3) [2].

ТАМ может быть неактуален при определенных обстоятельствах. В таких случаях принимающая сторона считается квалифицированной для выполнения аналитических испытаний без сравнительных испытаний.

Отказ от проведения ТАМ должен быть обоснован и документально оформлен принимающей стороной. В монографии USP описаны случаи, при которых возможно отказаться от ТАМ [7]:

- если принимающая сторона имеет опыт работы с аналитическими методиками для лекарственного средства состав которого и/или концентрация действующего вещества, аналогичны составу, и/или концентрации действующего вещества лекарственного средства, анализируемого в принимающей стороне;
- если передаваемая аналитическая методика является фармакопейной и остается неизменной. В этом случае применяется верификация. Однако когда в фармакопейной методике отсутствуют подробное описание или критические параметры, требующиеся для получения правильных результатов, трансфер для таких методик необходимо проводить;
- если аналитическая методика уже используется принимающей стороной на постоянной основе;
- если сотрудники, отвечающие за разработку аналитических методик, валидацию и повседневный контроль, перемещаются на принимающую сторону.

## ПРОТОКОЛ И ОТЧЕТ ТРАНСФЕРА АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Стратегия передачи должна быть обобщена в протоколе ТАМ и должна включать определяющие стадии переноса, все аналитические методики, которые предназначены для передачи, а также все действия, необходимые для успешного его завершения [5]. Таким образом, протокол составляется с обязательным указанием:

- юридических адресов передающей и принимающей лаборатории;
- ответственных лиц двух сторон;
- наименования объекта подлежащего ТАМ;
- обязанностей и объем ответственности принимающей и передающей сторон;
- перечня испытаний и аналитических методик, включенные в процесс ТАМ;
- задачи и сроки проведения ТАМ;
- описания образцов лекарственного средства, сырья и материалов, оборудования предусматриваемых для испытания;

Таблица 1. Образец оформления аналитических методик подлежащих ревалидации

Table 1. Sample design of analytical methods subject to revalidation

Испытание Test	Спецификация Specification	Результат Result	Испание пройдено (да/нет) Spain passed (yes / no)
<i>Количество определение Quantity definition</i>			
Линейность (действующее вещество) Linearity (active ingredient)	Необходимо провести кривую линейной регрессии и график остатков: Коэффициент корреляции должен составлять $\geq 0,999$ . Значения остатков не должен превышать $\pm 3\%$ It is necessary to draw a linear regression curve and a plot of residuals: The correlation coefficient should be $\geq 0.999$ . Residues should not exceed $\pm 3\%$	Коэффициент корреляции составляет 0,999. Значения остатков не превышает $\pm 3\%$ The correlation coefficient is 0.999. Residue values do not exceed $\pm 3\%$	Да Yes
<i>Посторонние примеси Impurities</i>			
Подтверждение ПКО, RRF и RRT Confirmation of PKO, RRF and RRT	ПКО (S/N $\geq 10:1$ ) PKO (S/N $\geq 10:1$ )	ПКО (S/N $\geq 10:1$ ) PKO (S/N $\geq 10:1$ )	Да Yes
	Воспроизводимость при ПКО $\leq 15\%$ Reproducibility at FOC $\leq 15\%$	Воспроизводимость при ПКО $\leq 15\%$ Reproducibility at FOC $\leq 15\%$	Да Yes
	RRT (примеси A) $\approx 0,55$ RRT (impurity A) $\approx 0.55$	RRT (примеси A) = 0,54 RRT (impurity A) = 0.54	Да Yes
	RRF (примеси A) $\approx 1,0$ RRF (impurity A) $\approx 1.0$	RRF (примеси A) = 1,0 RRF (impurity A) = 1.0	Да Yes
Правильность (действующее вещество) Correctness (active ingredient)	Каждое индивидуальное значение находится в диапазоне 80–120 %. Среднее значение находится в диапазоне 90–110 %. Коэффициент вариации $\leq 10\%$ Each individual value is in the range of 80–120 %. The average is in the 90–110 % range. Coefficient of variation $\leq 10\%$	Каждое индивидуальное значение находится в диапазоне 80–120 %. Среднее значение находится в диапазоне 90–110 %. Коэффициент вариации $\leq 10\%$ Each individual value is in the range of 80–120 %. The average is in the 90–110 % range. Coefficient of variation $\leq 10\%$	Да Yes
Правильность (Примесь A) Correctness (Impurity A)	Каждое индивидуальное значение находится в диапазоне 80–120 %. Среднее значение находится в диапазоне 90–110 %. Коэффициент вариации $\leq 10\%$ Each individual value is in the range of 80–120 %. The average is in the 90–110 % range. Coefficient of variation $\leq 10\%$	Каждое индивидуальное значение находится в диапазоне 80–120 %. Среднее значение находится в диапазоне 90–110 %. Коэффициент вариации $\leq 10\%$ Each individual value is in the range of 80–120 %. The average is in the 90–110 % range. Coefficient of variation $\leq 10\%$	Да Yes

- условия проведения ТАМ;
- описание отбора, транспортировки и хранения лекарственного препарата, стандартных образцов;
- критерии приемлемости для всех испытаний, подлежащих ТАМ;
- изменения аналитических методик в рамках ТАМ;
- меры, принимаемые при получении результатов, не соответствующих заданным критериям приемлемости.
- документация, включающая предоставляемую информацию по результатам, и формы используемых отчетов.

Раздел протокола «описание образцов лекарственного средства, сырья и материалов, оборудования предусматриваемых для испытания» должен содержать наименования испытываемых образцов, стандартных образцов примесей, рабочих стандартов, а также серийные номера и их количество (таблицы 4 и 5). Также указывается оборудование, необходимое для ТАМ и его параметры (данные об изготовителе, модели, а также сроке его эксплуатации). Оборудование должно быть включено в программу технического обслуживания и калибровки, которая дает гарантию, что оно будет работать длительное время в пределах спецификации пользователя [8].

Таблица 2. Образец оформления аналитических методик подлежащих ревалидации в отчете трансфера

Table 2. Sample design of analytical methods subject to revalidation in the transfer report

Количественное определение Quantitation					
Линейность (название действующего вещества) Linearity (name of active ingredient)					
Уровень линейности (%) (теоретический) Linearity level (%) (theoretical)	Уровень линейности (%) (фактический) Linearity level (%) (actual)	Концентрация (мг/мл) Concentration (mg/ml)	Площадь пика Peak area	Вычислительная площадь Computing area	Остатки Leftovers
80 %					
90 %					
100 %					
110 %					
120 %					
		Коэффициент корреляции (r) Correlation coefficient (r)			
		Наклон Incline			
		Отсекаемый отрезок по оси Y Y-axis clipping			
		% отсекаемого отрезка по Y от 100% сигнала % of Y cutoff from 100% signal			

Образец

Таблица 3. Аналитические методики подлежащие трансферу

Table 3. Analytical methods to be transferred

Методика Methodology	АФИ AFI	Лекарственная форма Dosage form						
		Твердые Solid	Парентеральные Parenteral	Ингаляционные Inhalation	Мази/крема Ointments/creams	Суспензии/эмульсии Suspensions/emulsions	Трансдермальные Transdermal	Офтальмологические Ophthalmic
Подлинность Authenticity	+	+	+	+	+	+	+	+
Физические критерии* Physical criteria*	+	+	+	+	+	+	+	+
Растворение Dissolution		+					+	
Родственные примеси Related impurities	+	+	+	+	+	+	+	+
Однородность дозирования Dosing uniformity		+	+	+	+	+	+	+
Доставляемая доза Delivered dose				+				
Микробиологическая чистота Microbiological purity	+	+	+	+	+	+	+	+
Стерильность Sterility			+					+
Количественное определение Quantitation	+	+	+	+	+	+	+	+

**Примечание:** \*Термин «физические критерии» может применяться к различным лекарственным формам. Например, термин может означать прозрачность раствора или pH парентеральной или офтальмологической лекарственной формы, или прочность на раздавливание в таблетках. В лекарственных формах для ингаляции этот термин относится к размеру частиц.

**Note:** \*The term «physical criteria» can be applied to different dosage forms. For example, the term can mean the clarity of a solution or the pH of a parenteral or ophthalmic dosage form, or the crush strength of tablets. In dosage forms for inhalation, this term refers to particle size.

**Таблица 4.** Образец оформления характеристик испытываемых образцов

**Table 4.** A sample of the design of the characteristics of the tested samples

Номер п/п Number p/p	Образцы Samples	Номер серии Series number	Производитель Manufacturer	Производитель API API Manufacturer	Количество Amount
1					
2					
3					
4					
Подпись Signature					

**Таблица 5.** Образец оформления характеристик стандартных образцов примесей

**Table 5.** A sample of the design of the characteristics of standard samples of impurities

Номер п/п Number p/p	Примесь Impurity	Номер серии Series number	Активность (% по массе) в исходной форме Activity (% by mass) in the original form	Произведено Produced by
1				
2				
3				
4				
Подпись Signature				

В разделе протокола «условия проведения ТАМ» необходимо предусмотреть какое количество химиков-аналитиков участвует в сравнительных испытаниях (не менее двух как в передающей стороне, так и принимающей стороне), график проведения измерений, независимое приготовление реактивов и растворов, а так же количество испытаний (не менее 6), выполняемых каждым специалистом. Для разных показателей качества рекомендуется разный объем испытаний, количество испытываемых образцов и число параллельных определений, которые должны быть отражены в плане ТАМ [7].

Раздел «критерии приемлемости для всех испытаний, подлежащих ТАМ» можно оформить в виде таблицы для большей наглядности (таблицы 6 и 7).

Раздел протокола «документации» может включать формы отчетов для обеспечения согласованной записи результатов и согласованной работы между лабораториями. Данный раздел должен содержать дополнительную информацию о первичных результатах испытаний, например примерные хроматограммы и спектры, а также иметь дополнительную информацию на случай отклонения. Протокол трансфера должен объяснить, каким образом будет проис-

ходить управление любых отклонений от критериев приемлемости. Все изменения, вносимые в протокол трансфера в случае несоответствия критериям приемлемости, должны быть одобрены до начала сбора дополнительных данных.

**Таблица 6.** Критерии приемлемости для стандартного раствора и испытания пригодности

**Table 6.** Acceptance criteria for standard solution and suitability test

Испытание Test	Критерии приемлемости Eligibility criteria
Количественное определение Quantitation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. RSD для 6 введений стандартного раствора.</li> <li>2. Фактор асимметрии пика действующего вещества.</li> <li>3. Число теоретических тарелок для действующего вещества</li> </ol>
Посторонние примеси Impurities	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. RSD для 6 введений стандартного раствора.</li> <li>2. Фактор асимметрии пика действующего вещества.</li> <li>3. Число теоретических тарелок для действующего вещества.</li> <li>4. Разрешение пиков действующего вещества и примесей</li> </ol>

После завершения ТАМ принимающая сторона должна подготовить отчет с заключением о подтверждении квалификации принимающей стороны для выполнения передаваемой методики. В отчет о передаче аналитических методик должны войти следующие данные:

- результаты индивидуальных испытаний;
- данные по отдельным результатам и среднему результату;
- копии хроматограмм растворов определения предела количественного определения, стандартных и испытываемых растворов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс передачи аналитической методики необходимо разработать так, чтобы быть уверенным в том, что аналитические методики надлежащим образом переносятся на принимающую сторону.

Основной риск, затрагивающий процесс передачи аналитических методик, связан с «передачей знаний», то есть с разницей в трактовках и выполнении аналитических методик, возникающих вследствие недопонимания, недостатка ясности, неверных интерпретаций и т. д. При надлежащем подходе, основанном на анализе рисков, это должно быть принято во внимание при планировании сравнительных испытаний и критериев приемлемости.

**Таблица 7. Критерии приемлемости для испытаний подлежащих трансферу**

**Table 7. Acceptance criteria for tests to be transferred**

Испытание Test	Критерии приемлемости Eligibility criteria
Определение подлинности (ИК) Authentication (IR)	ИК-спектр испытуемого раствора должен соответствовать ИК-спектру стандартного раствора с указанием длины волны The IR spectrum of the test solution should correspond to the IR spectrum of the standard solution, indicating the wavelength
Определение подлинности (ВЭЖХ) Determination of authenticity (HPLC)	Время удерживания пика действующего вещества на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика этого же вещества на хроматограмме стандартного раствора (с указанием раздела, в котором приведено приготовление этих растворов) The retention time of the peak of the active substance on the chromatogram of the test solution should correspond to the retention time of the peak of the same substance on the chromatogram of the standard solution (indicating the section in which the preparation of these solutions is given)
Количественное определение Quantitation	В данном разделе указывается диапазон количественного содержания действующего вещества в процентах. Также здесь необходимо указать допустимую разницу между средними результатами полученными передающей и принимающей сторон, в процентах This section indicates the range of the quantitative content of the active substance in percent. Also, here you must indicate the permissible difference between the average results obtained by the transmitting and receiving sides, in percent
Посторонние примеси Impurities	Здесь указывается допустимая разница результатов, полученных передающей и принимающей сторонами: • для идентифицированных примесей (с указанием названия и процентного содержания каждой идентифицированной примеси). Результаты для неидентифицированных примесей и суммы примесей включают в отчет трансфера The allowable difference between the results obtained by the transmitting and receiving sides is indicated here: • for identified impurities (indicating the name and percentage of each identified impurity). Results for unidentified impurities and amounts of impurities are included in the transfer report

Любые, возникшие в результате испытаний, отклонения от критериев приемлемости трансфера должны быть обоснованы и документально оформлены. Аналитическая методика может считаться переданной принимающей стороне только после проведения эффективных корректирующих мероприятий для соответствия критериям приемлемости ТАМ.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph 1224. Transfer of analytical procedures. United States Pharmacopeia USP 42-NF 42. 2019. Available at: <https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/usp35/PDF/0876-0877%20%5B1224%5D%20Transfer%20of%20Analytical%20Procedures.pdf>.
2. ISPE, Good Practice Guide: Technology Transfer, Third Edition. 2003. Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/ISPE\\_Technology-transfer\\_2003.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/ISPE_Technology-transfer_2003.pdf).
3. Кулешова С. И. Перенос (трансфер) методик, параметры валидации/верификации. *Ведомости НЦЭСМП*. 2017;7(2):77–79.
4. Vial J., Jardy A., Anger P., Brun A., Menet J.-M. Methodology for transfer of LC methods based on statistical considerations. *J. Chromatogr.* 1998;A815:173–182.
5. World Health organization WHO Technical Report Series, № 961, Annex 7, 2011. WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing. Available at: [https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf?ua=1).
6. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Available at: <http://femb.ru/feml/>
7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026099>.
8. The International Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. V. 1: General notices; monographs for pharmaceutical substances (A–O). V. 2: monographs for pharmaceutical substances (P–Z); monographs for dosage forms and radiopharmaceutical preparations; methods of analysis; reagents. Geneva, World Health Organization, 2006; The International Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed., 1<sup>st</sup> supplement (2008); 2<sup>nd</sup> supplement (in preparation on CD-ROM, 2011). Available at: <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/overview/en/index.html>.

## REFERENCES

1. Monograph 1224. Transfer of analytical procedures. United States Pharmacopeia USP 42-NF 42. 2019. Available at: <https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/usp35/PDF/0876-0877%20%5B1224%5D%20Transfer%20of%20Analytical%20Procedures.pdf>.
2. ISPE, Good Practice Guide: Technology Transfer, Third Edition. 2003. Available at: [http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/ISPE\\_Technology-transfer\\_2003.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/ISPE_Technology-transfer_2003.pdf).
3. Kuleshova S. I. Transfer of methods, and parameters of validation/verification. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):77–80. (In Russ.).
4. Vial J., Jardy A., Anger P., Brun A., Menet J.-M. Methodology for transfer of LC methods based on statistical considerations. *J. Chromatogr.* 1998;A815:173–182.
5. World Health organization WHO Technical Report Series, № 961, Annex 7, 2011. WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing. Available at: [https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf?ua=1).
6. General monograph 1.1.0012.15. Validation of analytical procedures. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14<sup>th</sup> ed. Moscow, 2018. Available at: <http://femb.ru/feml/> (In Russ.).
7. Decision of council of the Eurasian Economic Union Commission No. 77 dated by 03.11.2016 «On approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Community». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026099>. (In Russ.).
8. The International Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed. V. 1: General notices; monographs for pharmaceutical substances (A–O). V. 2: monographs for pharmaceutical substances (P–Z); monographs for dosage forms and radiopharmaceutical preparations; methods of analysis; reagents. Geneva, World Health Organization, 2006; The International Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> ed., 1<sup>st</sup> supplement (2008); 2<sup>nd</sup> supplement (in preparation on CD-ROM, 2011). Available at: <http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/overview/en/index.html>.

Международная  
фармацевтическая  
выставка-форум



ТЕХНО ФАРМ  
С И Б И Р Ь

27 и 28 октября 2020 г.

**NOVOSIBIRSK**  
**EXPO CENTRE**

[www.technopharm-siberia.com](http://www.technopharm-siberia.com)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-189-202>  
УДК 661.12; 658.562; 614.35



Обзорная статья/Review article

## Анализ нового риск-ориентированного регуляторного подхода к классификации нарушений в сфере GMP (обзор)

В. Н. Шестаков<sup>1</sup>, Ю. В. Подпружников<sup>2</sup>

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6  
2 – Национальный фармацевтический университет (НФаУ), 61002, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, д. 53

\*Контактное лицо: Шестаков Владислав Николаевич. E-mail: shestakov@gilsinp.ru

ORCID: В. Н. Шестаков – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>; Ю. В. Подпружников – <https://orcid.org/0000-0001-6923-0806>.

Статья поступила: 14.05.2020. Статья принята в печать: 26.08.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Настоящая публикация посвящена анализу предложенного Организацией по сотрудничеству фармацевтических инспекций (PIC/S) нового риск-ориентированного регуляторного подхода к классификации нарушений, выявляемых в ходе инспекций фармацевтических производств, который, несомненно, является актуальным.

**Текст.** В статье дается характеристика новых определений нарушений, которые выявляются в сфере фармацевтического производства, отмечаются отличия предлагаемой градации нарушений от той, которая используется в настоящее время. Предлагаемой новацией в регуляторной деятельности является то, что критическое несоответствие может состоять из нескольких связанных с ним несоответствий, ни одно из которых самостоятельно не может быть критическим, но которые в совокупности могут представлять собой критическое нарушение или системный сбой. Излагается новый подход к классификации нарушений, который основан на оценке риска для пациента. Характеризуются основные этапы риск-ориентированного алгоритма: подробная оценка нарушения для его предварительной классификации; оценка факторов увеличения или снижения риска, независимо от начальной классификации; принятие решения об окончательной классификации с учетом факторов повышения, снижения риска или их отсутствия. Приводятся и характеризуются блок-схемы и иллюстративные примеры, на основе которых проводится предварительное присвоение выявленному нарушению того или иного уровня критичности. Рассматриваются факторы увеличения или снижения риска. В заключение эти факторы экстраполируются на категорию нарушения, т.е. могут как повысить предварительно присвоенную категорию, так и снизить ее, а могут оставить предварительную классификацию неизменной.

**Заключение.** Проанализирован предложенный Организацией по сотрудничеству фармацевтических инспекций PIC/S новый риск-ориентированный регуляторный подход к классификации нарушений требований правил надлежащей производственной практики, приведена его подробная характеристика. В основе рассматриваемого подхода лежит системное и методическое применение риск-менеджмента, нацеленное на обоснованное присвоение выявленному нарушению определенной категории критичности, что позволяет повысить объективность и прозрачность инспекционных процедур. Дальнейшая апробация регуляторами России и государств-членов ЕАЭС и возможное поэтапное внедрение указанного нового подхода является очень важным как для регуляторов, так и для производителей лекарственных средств, что особенно важно в рамках общего рынка лекарственных средств ЕАЭС.

**Ключевые слова:** надлежащая производственная практика, инспектирование производителей лекарственных средств, классификация несоответствий, риск-ориентированный регуляторный подход.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** В. Н. Шестаков провел анализ регуляторной составляющей, Ю. В. Подпружников провел анализ технической составляющей нового подхода к классификации нарушений в сфере GMP. Оба автора в равной степени участвовали в подборе и обработке материалов, написании и обсуждении статьи.

**Для цитирования:** Шестаков В. Н., Подпружников Ю. В. Анализ нового риск-ориентированного регуляторного подхода к классификации нарушений в сфере GMP. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):189–202. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-189-202>

## Evaluation of New Risk-based Regulatory Approach to Classification of GMP Deficiencies (Review)

Vladislav N. Shestakov<sup>1\*</sup>, Yuri V. Podpruzhnikov<sup>2</sup>

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

2 – National University of Pharmacy, 53, Pushkinska str., Kharkiv, 61002, Ukraine

\*Corresponding author: Vladislav N. Shestakov. E-mail: shestakov@gilsinp.ru

ORCID: Vladislav N. Shestakov – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>; Yuri V. Podpruzhnikov – <https://orcid.org/0000-0001-6923-0806>.

Received: 14.05.2020. Revised: 26.08.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** This paper is devoted to analysis of a new risk-based regulatory approach to the classification of deficiencies found by inspections of medicines manufacturers, which is undoubtedly relevant.

**Text.** The article describes the new definitions for the deficiencies found in the medicinal products manufacturing, the proposed gradation of non-conformances distinguishes from the one that is currently used. The proposed innovation in regulatory activity is that a critical deficiency can consist of several related nonconformities, none of which can be critical on their own, but which together can constitute a critical nonconformity or system failure. The proposed approach to the classification of deficiencies, which is based on a risk assessment for the patient, is described. The main stages of the risk-based algorithm are characterized: a detailed assessment of the deficiency for its preliminary classification; assessment of risk increase or decrease factors, regardless of the initial classification; making a decision on the final classification, taking into account the factors of increasing, reducing risk or their absence. Block diagrams and illustrative examples are described, on the basis of which preliminary assignment of a revealed deficiency of one or another level of criticality is carried out. The factors of increasing or decreasing risk are considered. These factors are

© Шестаков В. Н., Подпружников Ю. В., 2020

© Shestakov V. N., Podpruzhnikov Y. V., 2020

extrapolated to the category of deficiency and they can both increase the preliminary assigned category or decrease it, and can leave the preliminary classification unchanged.

**Conclusion.** A new risk-oriented regulatory approach to the classification of non-conformances with the requirements of Good Manufacturing Practice, proposed by the Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme PIC / S, is described. An analysis of this approach and its characterization are made. The new approach is based on the systematic and methodological application of risk management tools, aimed at justifiably assigning a certain criticality category to a revealed deficiency. The implementation of the new approach allows to increase the objectivity and transparency of inspection procedures. Further detailed study and possible step-by-step implementation of this new approach is very important for regulators so for medicines manufacturers.

**Keywords:** good manufacturing practice, inspection of medicines manufacturers, classification of deficiencies, risk-based regulatory approach.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Vladislav N. Shestakov analyzed the regulatory component, Yurii V. Podpruzhnikov analyzed the technical component of the new approach to the classification of deficiencies in the scope of GMP. Both authors were equally involved in the selection and processing of materials, writing and discussion of the article.

**For citation:** Shestakov V. N., Podpruzhnikov Y. V. Evaluation of new risk-based regulatory approach to classification of GMP deficiencies. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):189–202. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-189-202>

## ВВЕДЕНИЕ

Соответствие требованиям надлежащей производственной практики (GMP) обеспечивает безопасность, эффективность и качество лекарственных препаратов (ЛП) на этапе их промышленного производства, т. е. дает потребителю гарантию, что ЛП будет отвечать своему назначению, как это задекларировано и утверждено в процессе его государственной регистрации. Подтверждение соответствия производственной площадки требованиям GMP является одной из ключевых регуляторных процедур, а инспектирование – обязательным этапом оценки соответствия предприятия указанным требованиям, без чего обращение ЛП, в т. ч. их медицинское применение, не допускается. В процессе проведения инспекций производственных площадок неизбежно выявляются определенные нарушения требований GMP, т. е. несоответствия. От степени критичности выявленных нарушений и их количества зависят дальнейшие регуляторные действия, которые могут заключаться в решении о выдаче сертификата GMP (или аналогичного по сути документа) или отказе в его выдаче, распоряжении об устранении нарушений, приостановлении или аннулировании лицензии на производство, регистрационного удостоверения, изъятии отдельной или всех серий ЛП из обращения и пр. Поэтому правильная классификация тех или иных нарушений, т. е. обоснованное отнесение их к категории «критических», «существенных» или «несущественных» («прочих») является чрезвычайно важным. Согласно международной практике наличие в отчете об инспектировании хотя бы одного критического нарушения всегда влечет за собой вывод о несоответствии GMP производственного участка либо предприятия в целом [1–3]. Если инспекция не выявляет критических нарушений, очень важным становится количество и характер выявленных существенных нарушений (при их наличии). Уполномоченные регуляторные органы не-

которых стран (Канада, Украина и др.), признают предприятие не соответствующим требованиям GMP, если в ходе инспекции было выявлено более 5 или 6 существенных нарушений, такой же подход рекомендован ВОЗ [1] и по сути поддерживается со стороны PIC/S [2]. В ряде других стран, в т. ч. в России, площадка обычно признается не соответствующей требованиям GMP и при меньшем количестве существенных нарушений, хотя в зарубежной [4] и российской [5] нормативной базе точное допустимое количество таких нарушений не указано.

До настоящего времени в сфере GMP-инспектирования практически во всех странах оставались нерешенными вопросы унификации подходов к классификации тех или иных выявляемых нарушений. Поэтому вопрос выработки единых подходов к интерпретации выявляемых нарушений является очень важным для GMP-инспекций всех стран, поскольку новый риск-ориентированный подход может быть внедрен в нормативную базу в сфере GMP-инспектирования и сертификации. До последнего времени была известна лишь одна профессиональная попытка стандартизовать и унифицировать классификацию нарушений GMP. Такая попытка была предпринята GMP-инспектором Канады [3], который разработал соответствующую внутриинспекционную стандартную операционную процедуру (СОП). При всей своей полезности, этот документ не лишен недостатков. Так, он предусматривает возможность повышения уровня критичности (с существенного до критического), что увеличивает субъективность оценки. В указанной СОП приведен перечень типичных нарушений критического и существенного уровня для препаратов разной степени риска. К сожалению, этот перечень является далеко не исчерпывающим и не охватывает некоторые наиболее часто выявляемые нарушения в сфере GMP, а сам предложенный подход к классификации нарушений нуждается в значительном усовершенствовании.

Вместе с тем, указанный подход получил частичное распространение и за пределами Канады. Так, Гослекслужба Украины изменила свой порядок подтверждения соответствия условий производства препаратов требованиям GMP, введя в него приложение с классификацией типичных несоответствий, которое является переводом указанного канадского СОПа. Однако как показала практика, использование в инспекторской деятельности этого подхода не уменьшает субъективности в оценке тех или иных выявляемых нарушений. В рамках тренингов по GMP для инспекторов и аудиторов в России и Украине, которые проводили авторы настоящей публикации, слушателям предлагалось выполнить следующее практическое задание. Им предлагалось классифицировать подборку типичных нарушений, после чего их ответы сравнивались с категориями этих нарушений, которые были указаны в оригинальном документе [3]. Такое задание было предложено слушателям шести тренингов, в которых участвовали профессионалы с большим опытом работы в фармацевтическом производстве и инспектировании (аудите). Сравнение показало, что уровень совпадения присвоенной градации с классом нарушений в первоисточнике не превышал 50 %. Как правило, в ходе практических занятий как российские, так и украинские инспекторы (аудиторы) оценивали типичные несоответствия более жестко (то есть присваивали нарушениям более высокий уровень критичности), чем канадская GMP-инспекция.

Для решения задачи выработки унифицированных подходов к классификации нарушений в сфере GMP в 2013 году в рамках Организации по сотрудничеству фармацевтических инспекций (PIC/S) была создана рабочая группа. Прогрессу в работе данной группы способствовал семинар PIC/S, посвященный надлежащей практике инспектирования (Кейптаун, ЮАР, 2011) и результаты анкетирования инспекторов (как входящих в PIC/S, так и подавших заявки на вступление) по обсуждаемой тематике.

Результатом этой рабочей группы стало Руководство PI 040-1 по классификации нарушений в сфере GMP (далее – Руководство) [6], которое было опубликовано в январе 2019 года на официальном веб-сайте PIC/S. Основной целью Руководства является гармонизация и достижение и согласованности в действиях регуляторов разных стран и улучшение коммуникации между инспекторатами. По своему статусу Руководство не является обязательным к внедрению всеми регуляторами, входящими в PIC/S, или находящимися в процессе вступления в эту организацию. Вместе с тем, мы считаем, что внедрение данного подхода в практику GMP-инспектирования в России и ЕАЭС будет способствовать дальнейшему прогрессу на пути вступления в PIC/S и сближению с этой организацией.

Хотя данный документ и ориентирован прежде всего на инспекторов и инспектораты GMP, он в не меньшей степени касается фармацевтической промышленности в плане ее информирования о новых

регуляторных подходах. Кроме того, приведенные в Руководстве методологические подходы могут быть распространены на другие «надлежащие практики», т. е., с нашей точки зрения, Руководство обладает большой степенью общности в рамках глобальной фармацевтической системы качества, являющейся симбиозом всех «надлежащих практик» [7].

Настоящая публикация посвящена анализу указанного нового риск-ориентированного регуляторного подхода к классификации нарушений, выявляемых GMP-инспекциями, который, несомненно, является актуальным. Российским инспекторатом с апреля 2016 по декабрь 2019 года было проведено 1857 инспекций зарубежных производственных площадок. При этом 586 производственным площадкам было отказано в выдаче заключения о соответствии требованиям правил GMP в рамках действующего нормативно-правового поля [5]. Классификация выявленных несоответствий осуществляется в настоящее время в соответствии с международной практикой [8]. Однако апробация и рассмотрение возможности внедрения рекомендуемых риск-ориентированных подходов к классификации нарушений является для российского GMP-инспектората также очень важной. После апробации нового подхода в условиях реальных инспекций, проводимых российским инспекторатом, и при успешных результатах такой апробации, возможно дальнейшее внедрение этого подхода во внутриинспекционные процедуры (в рамках системы качества инспектората), либо в нормативную базу. Актуальность перспективы внедрения рассматриваемого подхода повышается, если учесть факт одобрения со стороны Исполнительного Комитета PIC/S предварительной заявки российских регуляторов на вступление в эту авторитетную международную организацию [9] и связанную с этим необходимость последовательной дальнейшей гармонизации с международными нормами российской нормативной базы в сфере GMP, а также нормативной базы ЕАЭС.

## НОВАЦИИ В ОПРЕДЕЛЕНИЯХ КАТЕГОРИЙ ВЫЯВЛЯЕМЫХ НАРУШЕНИЙ

Согласно принятому Руководству [6] рекомендуется все нарушения в сфере GMP подразделять на 4 категории: «критические», «существенные», «прочие» (ранее назывались «несущественными») и «комментарии». Претерпевает изменение не только количество категорий, на которые разбиваются все выявляемые нарушения, но и содержание, которое вкладывается в ту или иную категорию нарушения.

Под «критическим» нарушением (несоответствием) предлагается понимать нарушение:

- которое привело или имеет высокий риск привести к производству лекарственного средства (ЛС), опасного для жизни человека или животного, или к опасным остаточным количествам ЛС в продуктивных животных (последняя часть определения относится к ветеринарным препаратам), либо

- когда установлено, что производитель участвовал в мошенничестве, искажении или фальсификации продукции или данных, либо
- которое может состоять из нескольких связанных между собой нарушений, ни одно из которых само по себе не может быть критическим, но которые в совокупности могут представлять критическое несоответствие или системный сбой, когда риск вреда выявлен и следует его таким образом классифицировать и документировать.

Как видно из определения, в современной формулировке особое значение уделяется вопросу целостности данных, который в настоящее время является очень актуальным [10–12]. Кроме того, в рассматриваемом документе полагается, что «критическое» нарушение может состоять из нескольких связанных между собой не критических нарушений. Впервые в регуляторной практике, существующей в сфере GMP, предполагается, что такие нарушения могут в совокупности представлять собой (т. е. «объединяться») в «критическое» нарушение. Тот же подход к группированию связанных друг с другом некритических нарушений в критическое предлагается применять в случае наличия системного «сбоя», когда был выявлен риск причинения вреда пациенту.

Под «существенным» нарушением в новом Руководстве понимают нарушение, которое:

- привело или может привести к производству ЛС, не соответствующего регистрационному досье на данное ЛС, либо досье на ЛС для клинических исследований, спецификации на продукцию или фармакопейным требованиям;
- не гарантирует эффективное осуществление необходимых контрольных мероприятий в рамках GMP;
- указывает на существенное отклонение от требований лицензии на производство;
- указывает на несоответствие в осуществлении надлежащих процедур выпуска серий или неспособность уполномоченного лица (УЛ) выполнять свои должностные обязанности;
- состоит из нескольких несущественных связанных друг с другом нарушений.

Под «прочим», либо «несущественным» нарушением, как и ранее, понимается такое, которое не подпадает под две вышеуказанные категории. Кроме этого, к категории несущественного нарушение будет отнесено в случае наличия ограниченной информации, которая недостаточна для того, чтобы классифицировать нарушение как «критическое» или «существенное».

В отличие от используемой в настоящее время градации нарушений [5, 8, 13], в новом документе введена еще одна категория – «комментарий». Под «комментарием» понимают одноразовые незначительные отклонения, которые обычно формально не считают нарушениями, но в то же время комментарии привлекают внимание производителя к данной проблеме.

Как видно из приведенных выше определений, формулировки различных категорий нарушений претерпевают значительные изменения, становятся все более сложными и взаимосвязанными, поэтому риск-ориентированная методология присвоения выявленному нарушению правильной градации выдвигается на передний план для повышения объективности и прозрачности процесса инспектирования и соответствующей отчетности.

## РИСК-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ ДЕЙСТВИЙ ИНСПЕКТОРОВ ПО КЛАССИФИКАЦИИ ВЫЯВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЙ

Как было подчеркнуто выше, новым основным принципом для классификации нарушений, выявляемых в ходе GMP-инспекций, является риск-ориентированный подход [14]. Если выявленное нарушение не очевидно подпадает под вышеуказанное определение «критического», то производятся следующие последовательные этапы:

I. Подробная оценка нарушения для его предварительной классификации.

II. Оценка факторов увеличения или снижения риска независимо от начальной классификации.

III. Принятие решения об окончательной классификации с учетом факторов повышения, снижения риска или их отсутствия.

Общий риск-ориентированный алгоритм классификации нарушений представлен на рисунке 1.

В практике GMP-инспектирования нарушения критического уровня встречаются довольно редко. Например, количество критических нарушений, выявленных российским инспекторатом в 2019 году составляет всего 2% от всех обнаруженных нарушений [15]. Тем более важным нам представляется объективный подход к случаям, когда такое нарушение не является совершенно однозначным, другими словами «несомненным». В инспекторской практике зачастую встречаются ситуации, когда выявленное нарушение занимает «пограничное» положение, например, между «критическим» и «существенным», либо между «существенным» и «прочим». В этих случаях риск-ориентированный подход является той основой, которая позволит принять правильное решение, с одной стороны, не поставив здоровье пациента под угрозу, с другой, – не применить излишне жесткие меры к нарушителю, если сама категория нарушения этого не требует и риск для пациента незначителен или отсутствует вообще.

С нашей точки зрения, алгоритм принятия решений о классификации нарушений, основанный на оценке рисков, является очень полезным как для регуляторов, так и для промышленности. Сначала выполняется этап I алгоритма, который заключается в

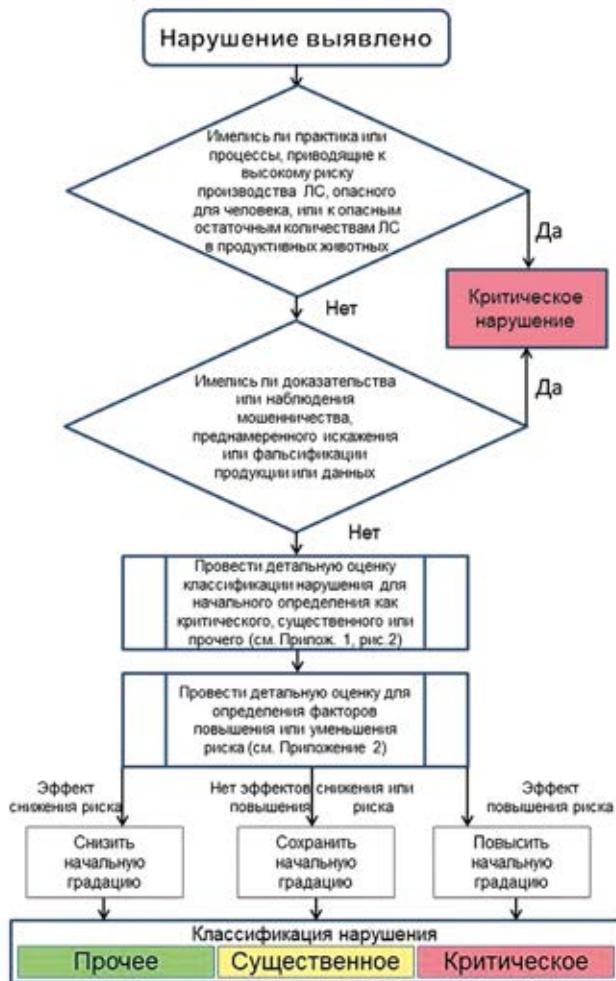


Рисунок 1. Общая схема риск-ориентированного алгоритма классификации нарушений

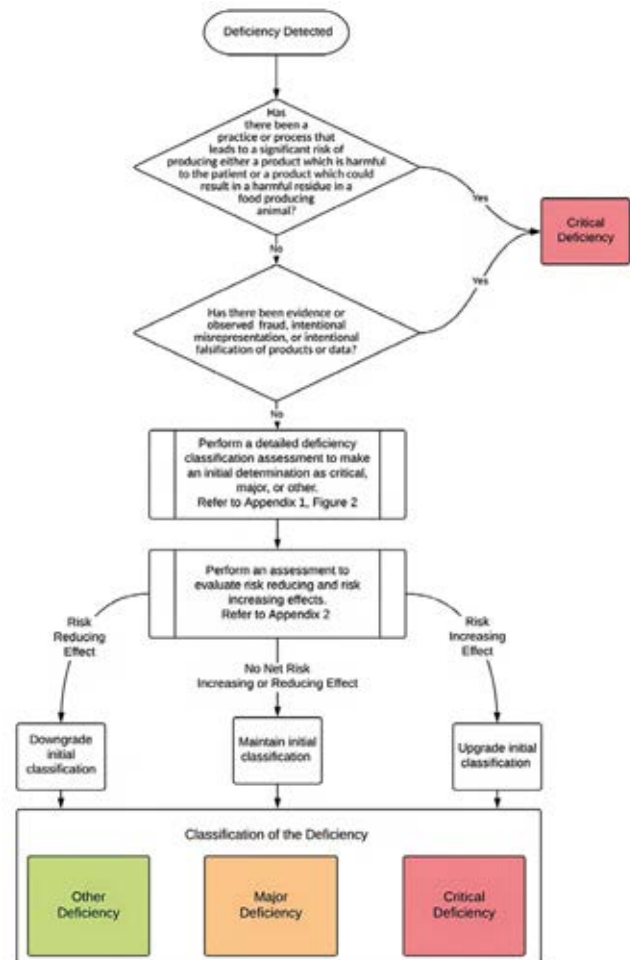


Figure 1. General diagram of the risk-oriented deficiencies classification algorithm

подробной оценке нарушения для его предварительной классификации (он изложен в Приложении 1 Руководства [6]). Этап I приведен в Руководстве в виде блок-схем, в которые включены отдельные блоки типичных нарушений требований GMP. На рисунках 2 и 3 представлены, соответственно, шаг 1 и 2 этапа I алгоритма для предварительной классификации нарушения как «критического». Как видно из рисунков, на первом этапе, когда проводится предварительная оценка выявленного нарушения как возможного «критического», должны быть рассмотрены следующие факторы риска для здоровья пациента, связанного с

- контаминацией и перекрестной контаминацией;
- оборудованием;
- персоналом;
- системой качества;
- целостностью данных;
- процессом производства стерильных ЛС.

Для каждого из вышеперечисленных факторов риска приводятся пояснительные примечания и иллюстративные примеры нарушений, которые дают

инспекторам методическую помощь в отношении предварительного отнесения нарушения к категории «критического». Факторы риска рассматриваются поочередно, т. е. последовательно, как это отражено в блок-схемах на рисунках 2 и 3.

Если риск представляет собой критический уровень, нарушение предварительно классифицируется как «критическое», если же нет, нарушение подвергается дальнейшей подробной оценке на предмет его предварительной классификации как «существенного». Подробно предлагаемые шаги такой оценки представлены на рисунках 4 и 5 (соответственно, шаг 3 и 4 алгоритма).

Факторы риска в отношении «существенного» нарушения рассматриваются так же последовательно, что отражено в блок-схемах. Оцениваемые факторы риска, включенные в блок-схемы, взяты из приведенного выше определения «существенного» нарушения, проиллюстрированы примерами, которые могут использоваться для предварительного отнесения нарушения к данной категории.

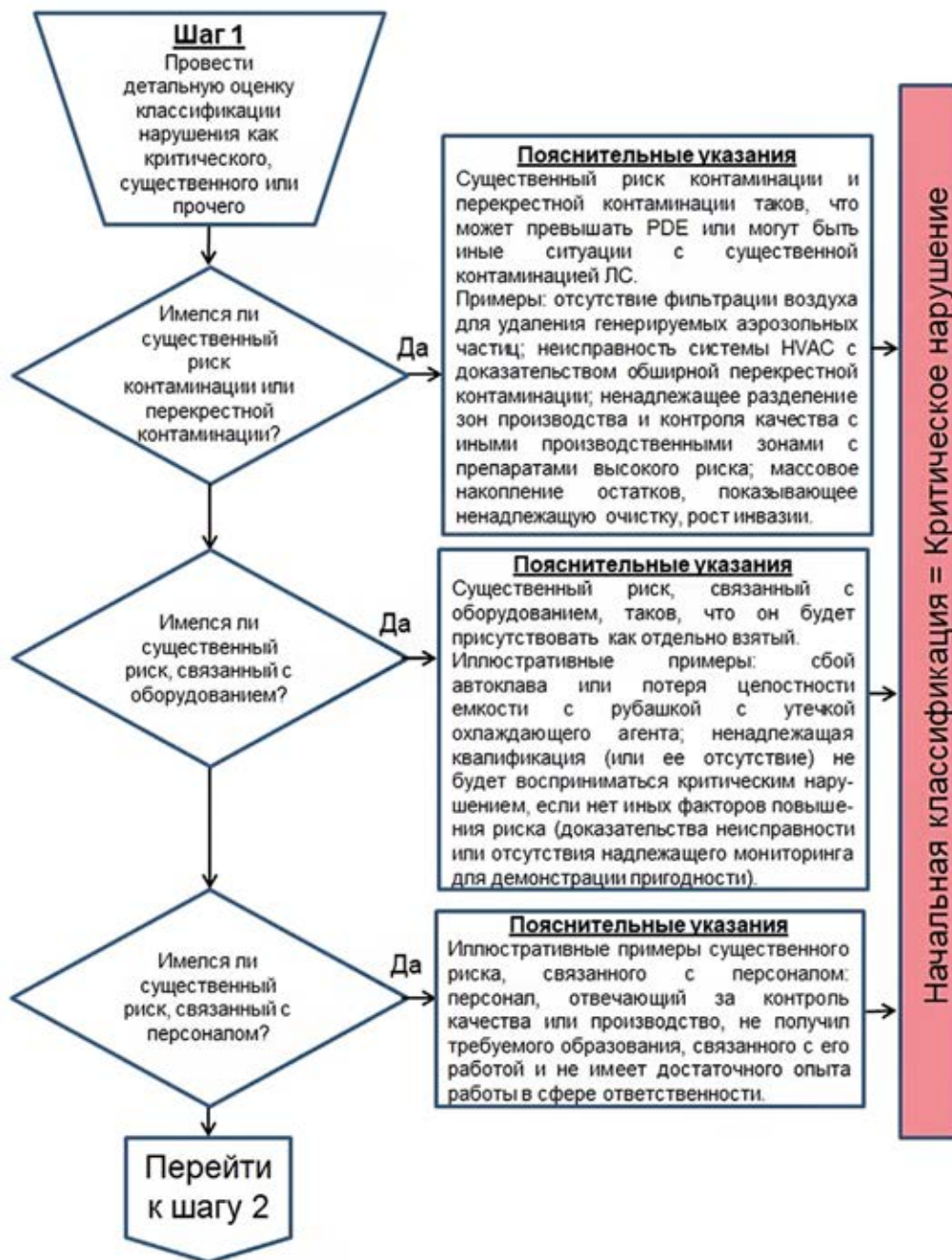


Рисунок 2. Шаг 1 предварительной оценки нарушения как «критического»

В случае, если выявленное нарушение не подпадает под факторы риска, используемые на шагах 1–4 алгоритма, оно классифицируется предварительно как «прочее».

После подробной предварительной оценки выявленного нарушения реализуется этап II алгоритма (он изложен в Приложении 2 Руководства [6], в котором описаны факторы увеличения или снижения риска). На этом этапе анализируются факторы повышения или снижения риска выявленного нарушения. Эти факторы интерполируются на категорию нарушения, т. е. могут как повысить предварительно присвоенную на этапе I категорию, так и понизить ее, а могут оста-

вить предварительную классификацию неизменной. К факторам повышения риска относятся:

- повторяющиеся или периодические нарушения (в т. ч. необоснованно «затянутая» реализация плана корректирующих и предупреждающих мероприятий – CAPA);
- группирование или комбинация нарушений;
- риск продукта (препараты высокого риска – те, которые являются наиболее уязвимыми к контаминации в ходе технологического процесса);
- неспособность производителя определить и принять нужные меры для снижения риска пациента в

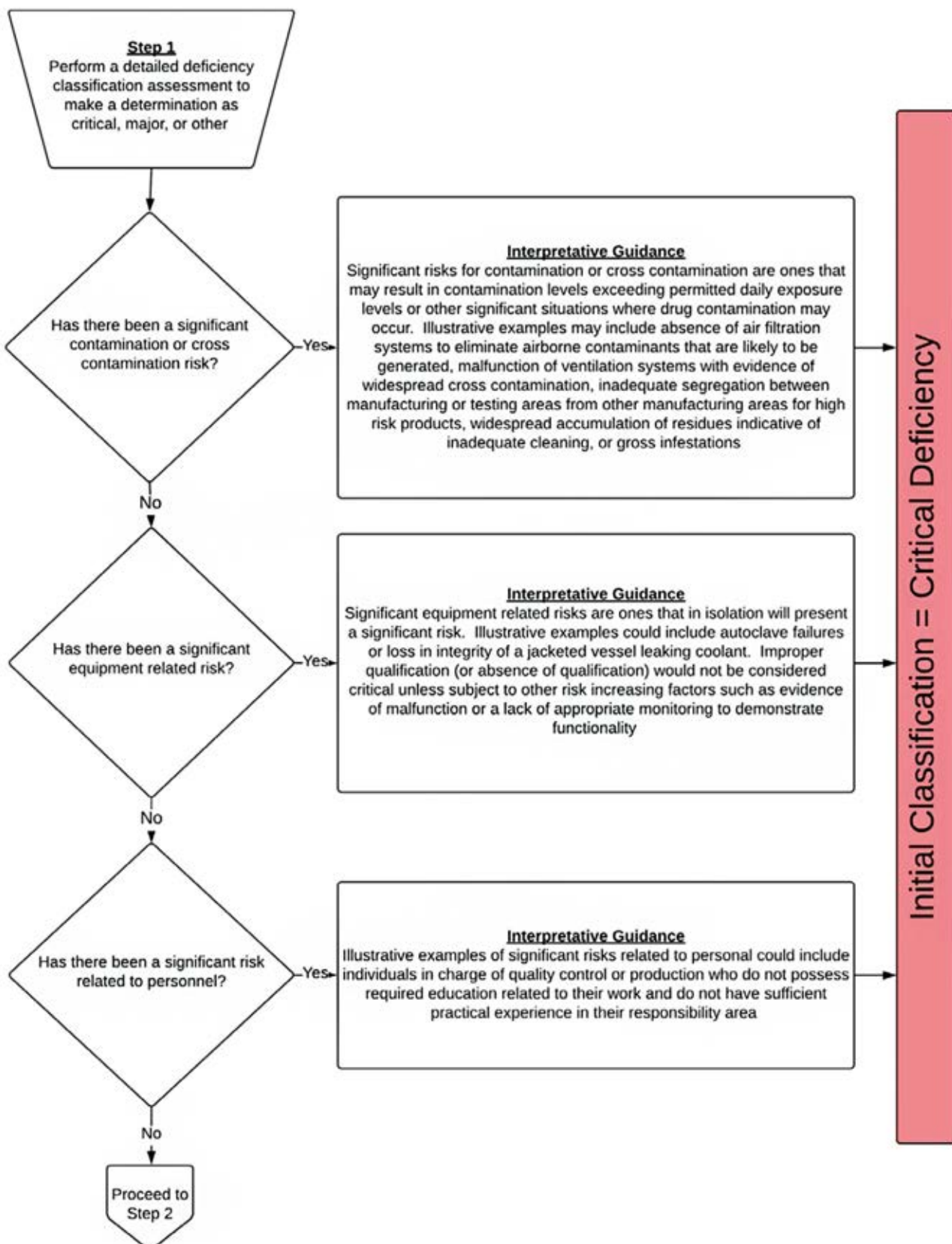


Figure 2. Step 1 of the initial classification of the deficiency as «critical»

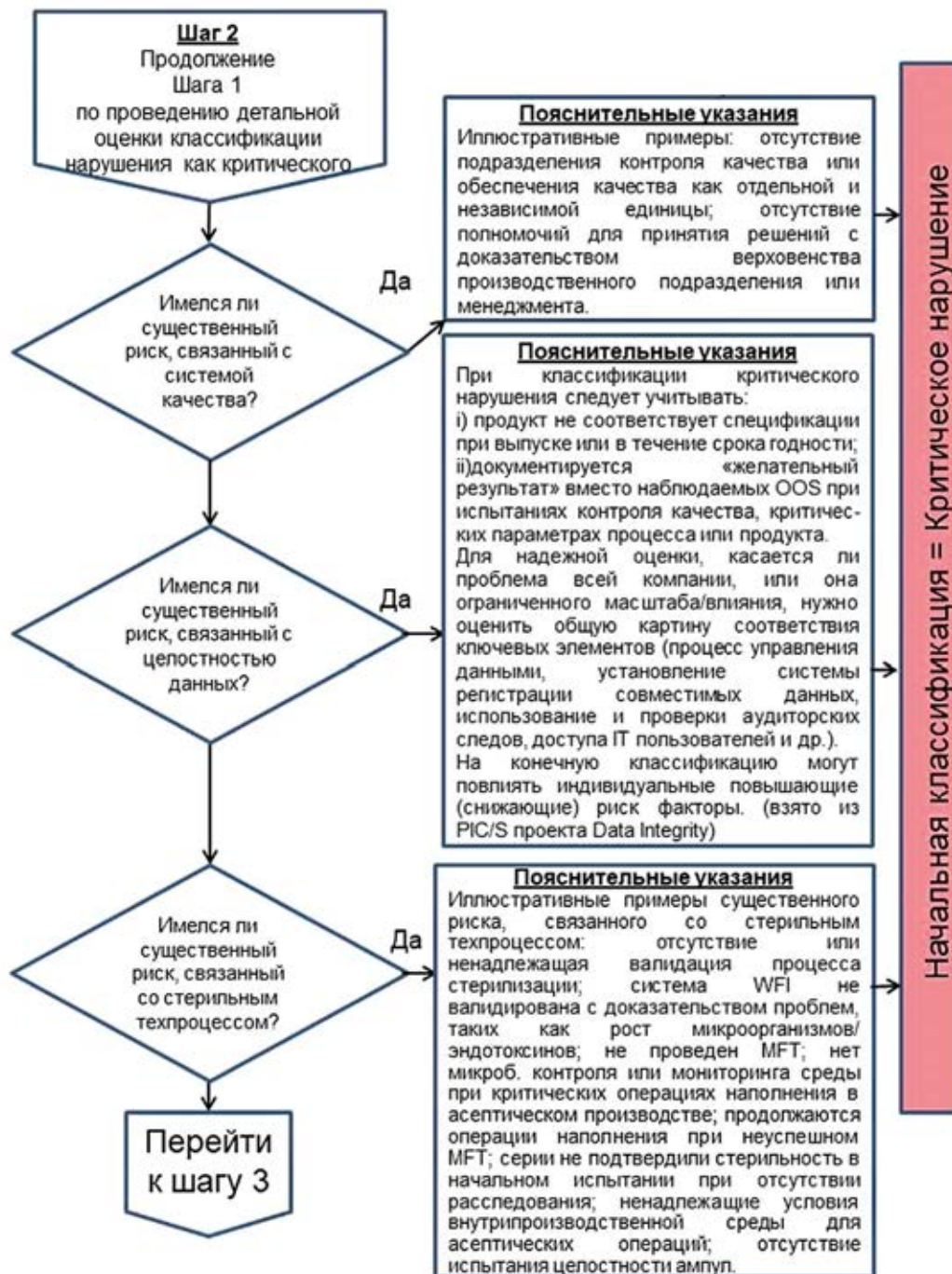


Рисунок 3. Шаг 2 предварительной оценки нарушения как «критического»

отношении ЛС, находящегося в обращении; а также проведение последующего производства ненадлежащим образом или посредством ненадлежащего процесса.

К факторам, снижающим риск, т. е. к тем, которые могут снизить категорию критичности выявленного нарушения, относятся:

- минимизация риска продукта (препараты низкого риска – это те, для которых контаминация в ходе процесса производства является маловероятной);
- минимизация риска причинения вреда пациенту;
- другие факторы сокращения риска (если установлена альтернативная, т. е. «дублирующая» система, которая может снизить риски, связанные с нарушением);
- действия, предпринятые производителем, например, план CAPA по снижению риска нарушения.

При наличии ряда факторов, повышающих и снижающих риск, их следует учитывать одновременно, а затем уже окончательно давать общую оценку риска для понижения или повышения предварительно определенной категории нарушения.

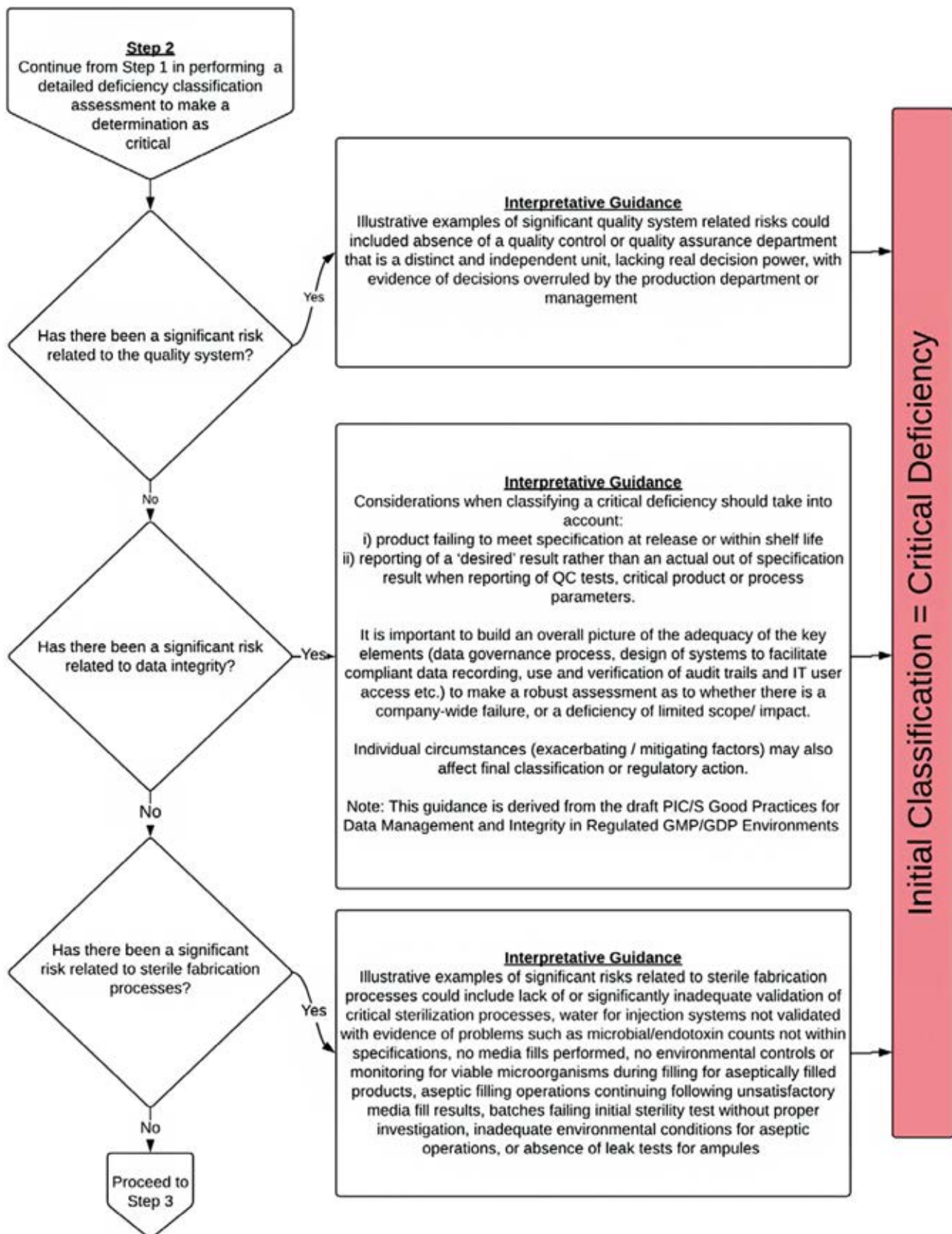


Figure 3. Step 2 of the preliminary classification of the deficiency as «critical»

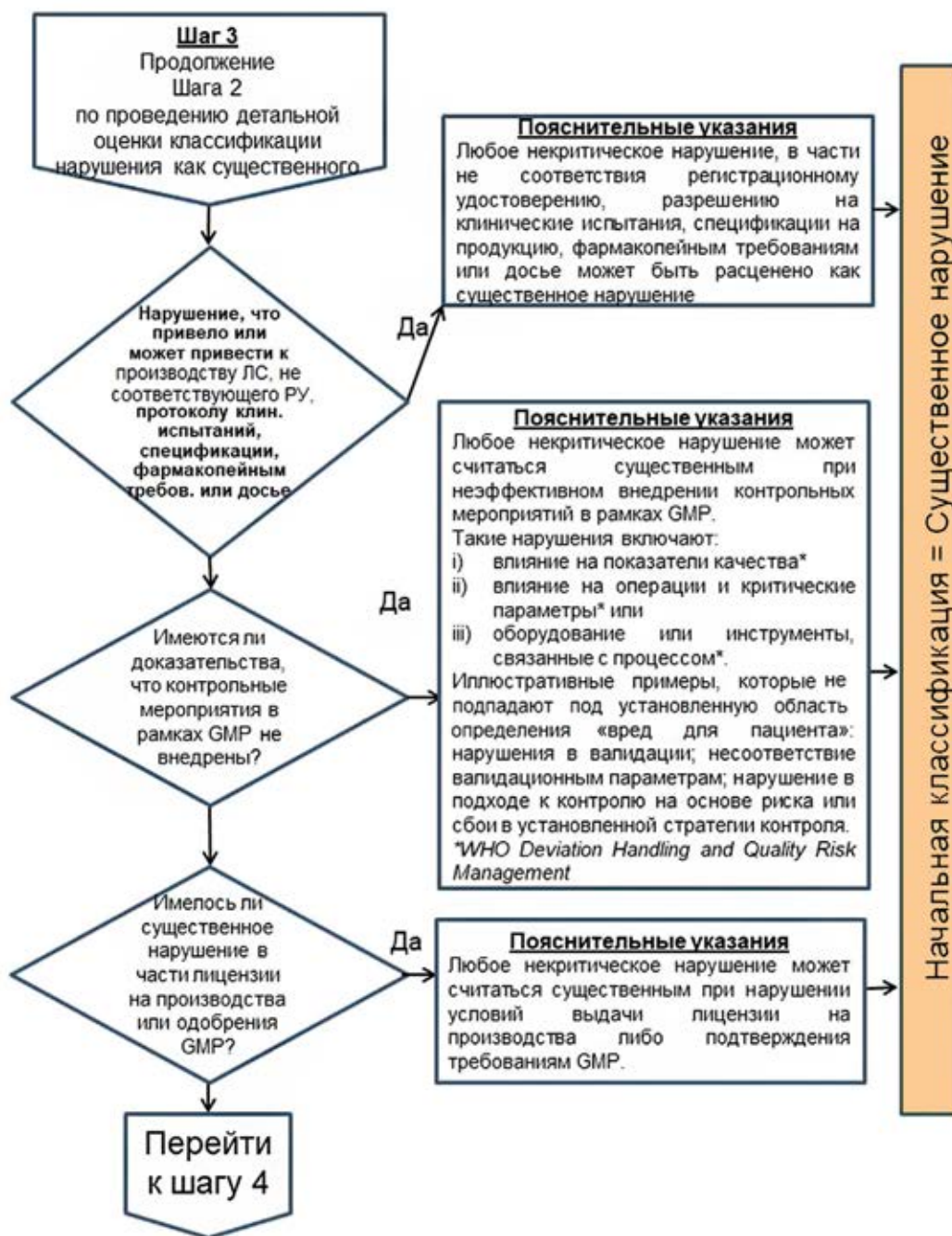


Рисунок 4. Шаг 3 предварительной оценки нарушения как «существенного»

В [6] приведены примеры критических и существенных нарушений в отсутствии факторов снижения риска. Эти примеры можно рассматривать как иллюстрацию применения изложенных выше подходов к классификации нарушений в сфере GMP. Хотя Руководство [6] и не позиционируется как обязательное для внедрения и использования, оно безусловно является полезным, поэтому представляется целесообразным рассмотреть возможность внедрения изложенных подходов в практику GMP-инспектирования, которое проводят регуляторы Российской Федерации и государств-членов ЕАЭС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализирован предложенный PIC/S новый риск-ориентированный регуляторный подход к классификации нарушений в сфере GMP, подробно охарактеризованы его основные этапы.

Показано, что в основе нового подхода лежит системное и методическое использование принципов риск-менеджмента, что охватывает как обоснованное присвоение выявленному нарушению определенной категории критичности, так и возможные последующие регуляторные действия. Применение предлагаемого подхода позволит повысить объективность и

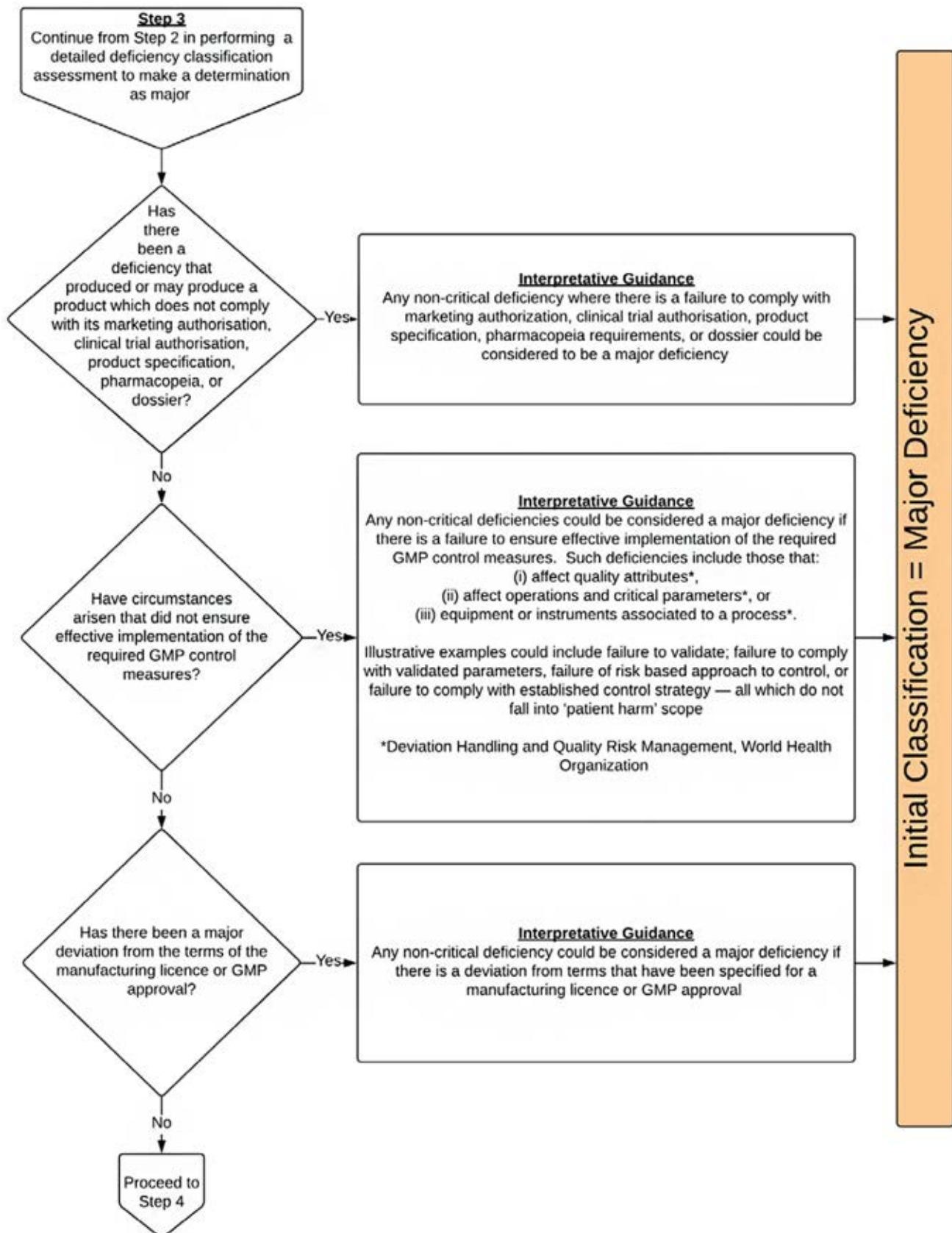
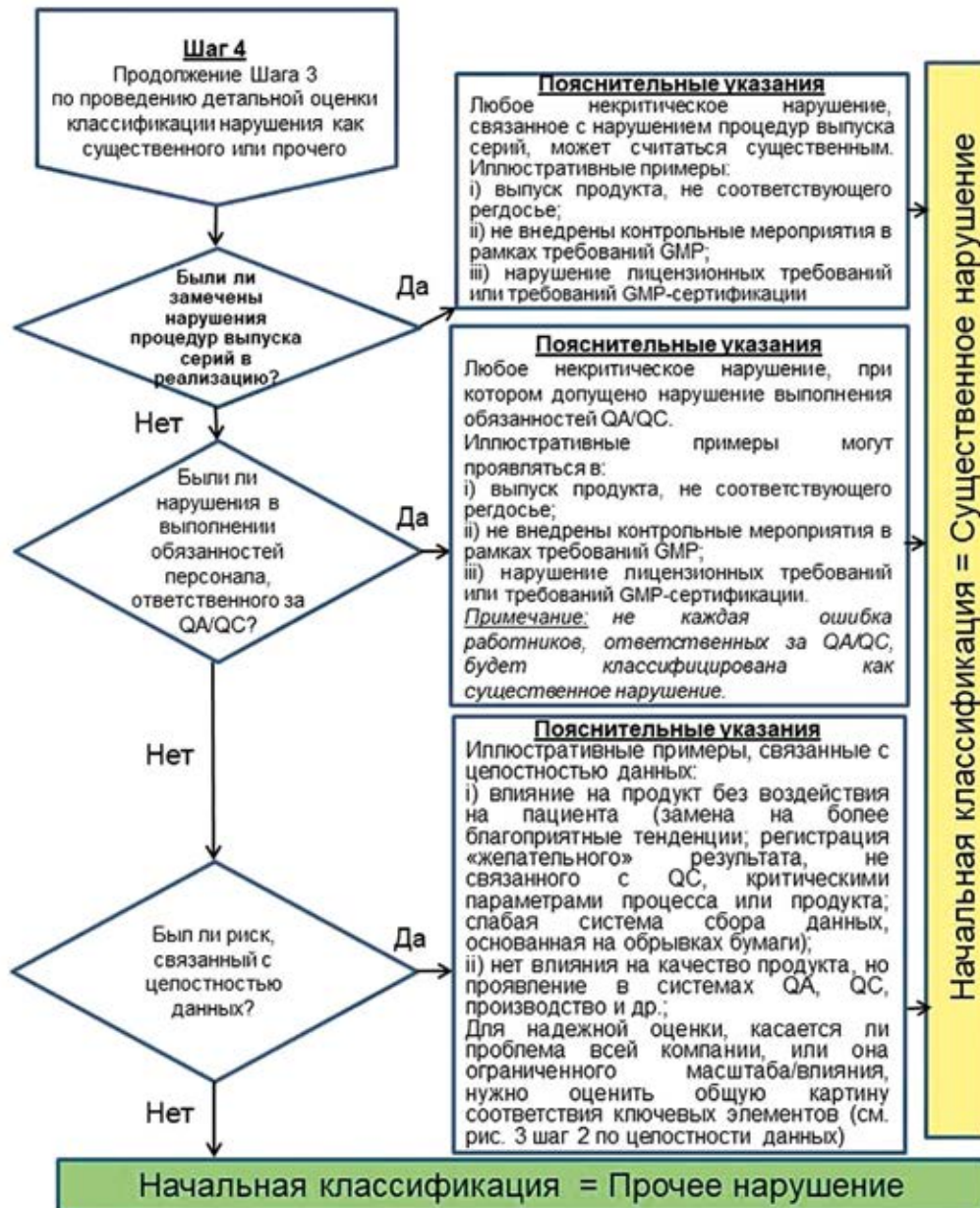


Figure 4. Step 3 of the preliminary classification of the deficiency as «major»



Примечание: классификация «Прочее» для целостности данных может быть при отсутствии влияния на продукт, либо при возможности нарушения целостности или прослеживаемости данных в отдельной области, либо в некоторых сферах в приемлемой альтернативной системе

Рисунок 5. Шаг 4 предварительной оценки нарушения как «существенного»

прозрачность инспекционных процедур и их документального оформления.

Дальнейшая апробация регуляторами России и государств-членов ЕАЭС и возможное поэтапное внедрение указанного нового подхода является очень важным как для регуляторов, так и для производителей лекарственных средств, что особенно важно в рамках общего рынка лекарственных средств ЕАЭС.

## ЛИТЕРАТУРА

- Guidance on Good Manufacturing Practices: inspection report. WHO Technical Report Series, No. 996, Annex 4, 2016. Available at: <http://www.who.int>. (accessed 27.04.2020).
- PI 037-1. A recommended model for risk-based inspection planning in the GMP environment. 2 Appendices. PIC/S Recommendation 1 January 2012. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
- Risk Classification of Good Manufacturing Practices (GMP) Observations GUI-0023 Health Canada. Health Products and Food Branch Inspectorate. Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/> (accessed 27.04.2020).
- EMA/572454/2014 Rev.17. GMP Inspection Report – Union Format. P.175-178. Available at: <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 27.04.2020).
- Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 4 февраля 2016 г. № 261 «Об утверждении форм заявления о выдаче заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей произ-

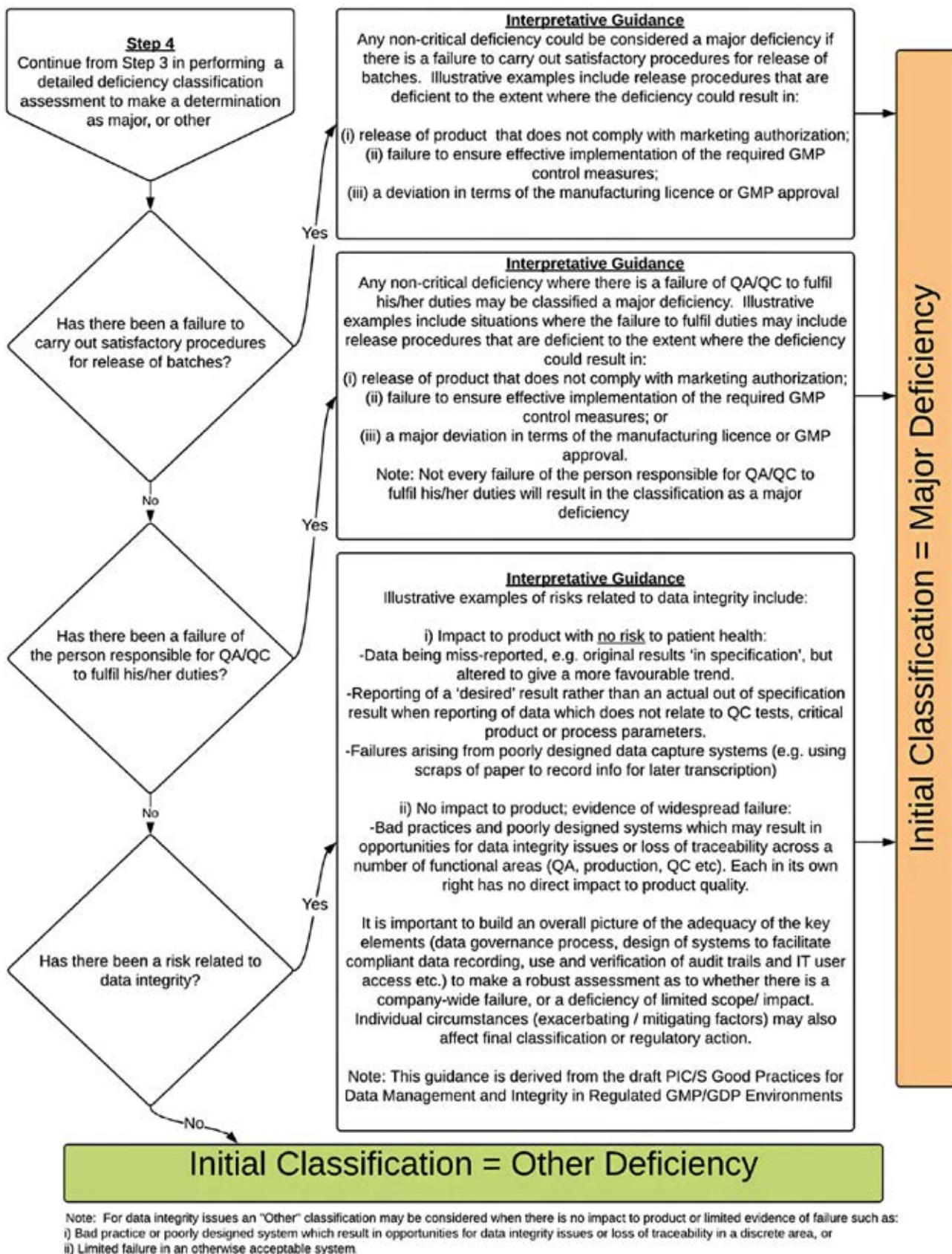


Figure 5. Step 4 of the preliminary classification of the deficiency as «major»

- водственной практики, инспекционного отчета по результатам инспектирования производителя и иностранного производителя лекарственных средств для медицинского применения на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики и заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 9 марта 2016 г. Регистрационный № 41341). Консультант Плюс. Available at: <http://www.consultant.ru/> (дата обращения 27.04.2020).
- PI 040-1. PIC/S guidance on classification of GMP deficiencies. 3 Appendices. 1 January 2019. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Подпруджников Ю. В., Немченко А. С., Андрюкова Л. Н., Гумениук Н. И. Система качества и надлежащие практики в фармацевции. Киев: *Наш формат*, 2017. 652 с.
  - PI 013-3. Standard operating procedure PIC/S Inspection Report format. Annex 1. PIC/S 25 September 2007. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Press release: PIC/S Meetings in Toyama. Japan. December 2019. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Guidance on good data and record management practices WHO TRS 996. Annex 5, 2016. Available at: <http://www.who.int> (accessed 27.04.2020).
  - «GXP» Data Integrity Guidance and Definitions. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), March 2018. Available at: <https://www.gov.uk/government/publications/guidance-on-gxp-data-integrity> (accessed 27.04.2020).
  - PI 041-1(Draft 3). Good practices for data management and integrity in regulated GMP/GDP environments, 30 November 2018. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 83 «Об утверждении Правил проведения фармацевтических инспекций». Available at: <http://www.eurasiancommission.org/> (дата обращения 27.04.2020).
  - ICH harmonised tripartite guideline. Q9: Quality risk management. Available at: <http://www.ich.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Шестаков В. Н., Гуляев И. В. Несоответствия требованиям GMP, выявленные «ГИЛС и НП» за 2017–2019 годы. Available at: <https://gmpnews.ru/2020/04/nesootvetstviya-trebovaniyam-gmp-vyavlennye-gils-i-np-za-2017-2019-gody/> (дата обращения 27.04.2020).
  - Registration No. 41341). Consultant Plus. Available at: <http://www.consultant.ru/> (дата accessed 27.04.2020). (In Russ.).
  - PI 040-1. PIC/S guidance on classification of GMP deficiencies. 3 Appendices. 1 January 2019. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Pidpruzhnykov Y. V., Nemchenko A. S., Andrukova L. N., Gumenuk N. I. Quality system and good practices in pharmacy. Kyiv: *Nash Format*, 2017. 652 p. (In Russ.).
  - PI 013-3. Standard operating procedure PIC/S Inspection Report format. Annex 1. PIC/S 25 September 2007. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Press release: PIC/S Meetings in Toyama. Japan. December 2019. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Guidance on good data and record management practices WHO TRS 996. Annex 5, 2016. Available at: <http://www.who.int> (accessed 27.04.2020).
  - «GXP» Data Integrity Guidance and Definitions. Medicines & Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), March 2018. Available at: <https://www.gov.uk/government/publications/guidance-on-gxp-data-integrity> (accessed 27.04.2020).
  - PI 041-1(Draft 3). Good practices for data management and integrity in regulated GMP/GDP environments, 30 November 2018. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016. № 83 «On approval of the Rules for the conduct of pharmaceutical inspections». Available at: <http://www.eurasiancommission.org/> (accessed 27.04.2020). (In Russ.).
  - ICH harmonised tripartite guideline. Q9: Quality risk management. Available at: <http://www.ich.org/> (accessed 27.04.2020).
  - Shestakov V. N., Guliaev I. V. Non-compliances with GMP requirements identified by GILS and NP for 2017–2019 Available at: <https://gmpnews.ru/2020/04/nesootvetstviya-trebovaniyam-gmp-vyavlennye-gils-i-np-za-2017-2019-gody/> (accessed 27.04.2020). (In Russ.).

## REFERENCES

- Guidance on Good Manufacturing Practices: inspection report. WHO Technical Report Series, No. 996, Annex 4, 2016. Available at: <http://www.who.int>. (accessed 27.04.2020).
- PI 037-1. A recommended model for risk-based inspection planning in the GMP environment. 2 Appendices. PIC/S Recommendation 1 January 2012. Available at: <http://www.picscheme.org/> (accessed 27.04.2020).
- Risk Classification of Good Manufacturing Practices (GMP) Observations GUI-0023 Health Canada. Health Products and Food Branch Inspectorate. Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/> (accessed 27.04.2020).
- EMA/572454/2014 Rev.17. GMP Inspection Report – Union Format. P.175-178. Available at: <http://www.ema.europa.eu/> (accessed 27.04.2020).
- Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation of February 4, 2016 No. 261 «On approval of application forms for issuing a conclusion on the conformity of the manufacturer (foreign manufacturer) of medicinal products for medical use with the requirements of the rules of good manufacturing practice, an inspection report on the results of inspection of the manufacturer and the foreign manufacturer of medicinal products for medical use for compliance with the requirements of the rules of good manufacturing practice and a conclusion on conformity of the manufacturer (foreign manufacturer) of medicinal products for medical use with the requirements of the rules of good manufacturing practice» (Registered in the Ministry of Justice on March 9, 2016.

## Больше не значит лучше – вопросы комбинированных отравлений

Контактное лицо: Белова Мария Владимировна. E-mail: maniaabel@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Настоящая публикация представляет собой материалы традиционной научной конференции студентов старших курсов Института фармации Сеченовского университета и факультета фундаментальной медицины МГУ им. Н. В. Ломоносова, проходящей под общим девизом «Drug – лекарство или...? Сложности перевода». В этом году конференция была посвящена вопросам полипрагмазии и комбинированных отравлений.

В современном мире отмечается стремительный рост создания и внедрения в практическое здравоохранение большого количества лекарственных препаратов. Стремление повысить эффективность терапии, максимально купировать проявления патологии или улучшить качество жизни больного приводит к назначению большого количества лекарственных средств (ЛС) — полипрагмазии, часто без учета их взаимодействий. Это приводит к нежелательным побочным реакциям и, в ряде случаев, к отравлениям. Также во всем мире наблюдается тенденция к сочетанному употреблению наркотических средств и лекарств с рекреационными целями. Подобные тенденции ставят вопросы рациональной фармакотерапии, а также эффективной диагностики и лечения указанных отравлений. В прозвучавших докладах рассмотрены теоретические и практические аспекты комбинированных отравлений.

Обсуждение и медицинская оценка этих вопросов, безусловно, вызовет интерес достаточно широкой аудитории.

**Ключевые слова:** полипрагмазия, лекарственные взаимодействия, комбинированные отравления, «аптечная наркомания», химико-токсикологическая диагностика.

## More Doesn't Mean Better – Questions of Combined Poisoning Issues

Corresponding author: Maria V. Belova. E-mail: maniaabel@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** This material presents a few the most interesting reports discussed at the senior students' traditional scientific conference of the Institute of Pharmacy of Sechenov University and Lomonosov' Moscow State University, «Drug – medicine or ...? Difficulties in translation». This year's conference was devoted to the issues of polypharmacy and combined poisoning.

In the modern world, there is a rapid growth in the creation and implementation of a huge number of drugs in practical healthcare. The desire to increase the effectiveness of therapy, to stop the manifestations of pathology as much as possible or to improve the patient's quality of life leads to prescription of a large number of drugs – polypharmacy (PP), often without taking into account its interactions. This leads to undesirable side reactions and sometimes to poisoning. There is also a worldwide trend towards the combined use of narcotic drugs and drugs for recreational purposes. Such trends raise questions of rational pharmacotherapy, as well as effective diagnosis and treatment of these poisonings. The present reports consider the theoretical and practical aspects of combined poisoning. Discussion and medical assessment of these issues will increase the interest of a wide audience.

**Keywords:** polypharmacy, drug interactions, combined poisoning, «pharmacy drug addiction», chemical and toxicological diagnostics.

## ПОЛИПРАГМАЗИЯ – СЕРЬЕЗНАЯ ПРОБЛЕМА СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ

**М. В. Белова<sup>1</sup>, В. Н. Кузина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## POLYPHARMACY IS A SERIOUS PROBLEM OF MODERN MEDICINE

**Maria V. Belova<sup>1</sup>, Vera N. Kuzina<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Полипрагмазия* (от греч. poly – много + pragma – предмет, вещь) (П) – одновременное (нередко необоснованное) назначение большого количества лекарственных средств (ЛС) или лечебных процедур, в объеме большем, чем требует клиническая ситуация.

П является серьезной проблемой здравоохранения, поскольку клинически проявляется снижением эффективности фармакотерапии и развитием нежела-

тельных побочных реакций (НПР), а также значительным увеличением расходов в здравоохранении.

В последнее время наблюдается тенденция к росту числа пациентов с П. Так, в Шотландии пациентам в возрасте 18 лет и старше одновременно назначается 4–9 ЛС в 16,9 % случаев, 10 и более ЛС – в 4,6 % случаев [1]. В публикации [2] также отмечен рост П за период 1995–2010 гг.: назначение 5 и более ЛС увеличилось с 11,4 % (1995 г.) до 20,8 % (2010 г.), а назначение 10 и более ЛС – соответственно с 1,7 % до 5,8 %.

Основные факторы риска возникновения полипрагмазии:

- 1) социодемографические факторы: старение населения. Известно, что пожилые люди составляют 13 % населения, при этом потребляют 1/3 всех ЛС;
- 2) мультиморбидность: (множественность заболеваний у одного пациента, например, гипертония, анемия, астма, стенокардия, артрит, сахарный диабет и др.) – особенно у пациентов пожилого и старческого возраста. В то же время, многие из этих болезней помолодели. Взаимовлияние заболеваний изменяет классическую клиническую картину, увеличивает число осложнений и их тяжесть, ухудшает качество жизни и жизненный прогноз [3]. Это требует

постоянного мониторинга и частого посещения врача, и приема ЛС разных фармакологических групп.

- Эффективность политерапии снижается при игнорировании известных лекарственных взаимодействий. Так, в 20–30 % случаев пациенты с артериальной гипертензией принимают одновременно с гипотензивными препаратами еще и НПВП, которые не только снижают антигипертензивный эффект бета-блокаторов, ингибиторов АПФ, но и являются небезопасными для сердечно-сосудистой системы [3, 4].
- 3) клинические рекомендации, руководства профессиональных медицинских обществ и стандарты лечения, содержащие в некоторых случаях рекомендации по применению комплексной терапии более чем 5 ЛС только по одному показанию, эффективность которых соответствует высоким уровням доказательности;
  - 4) доступность здравоохранения, в частности, коммерческого здравоохранения. При этом могут возникать проблемы преемственности и согласованности при применении ЛС;
  - 5) создание ЛС эффективных, высокоспецифичных, с довольно узким интервалом терапевтического действия, расширение их ассортимента. Отмечается сенсбилизация населения к биологическим и химическим веществам;
  - 6) фармакомания (лекарственная зависимость) и склонность к самолечению, то есть прием ЛС, иногда бесконтрольный и бессистемный.

При одновременном приеме нескольких ЛС неизбежно возникает их взаимодействие между собой. Это является самым сильным фактором риска развития НПР. Вынужденная П увеличивает риск развития НПР препаратов у пожилых больных в 5–7 раз по сравнению с более молодыми пациентами. Так, при использовании 5 и менее ЛС частота НПР не превышает 5 %, а при применении 6 и более ЛС она резко увеличивается до 25 % [5]. В экономически развитых странах НПР возникают у 10–20% госпитализированных больных (при этом в развивающихся странах данный показатель 30–40 %). На фоне развития НПР ежегодно в мире госпитализируется от 3,5 до 8,8 млн пациентов. В настоящее время НПР занимают 4–6-е место среди причин смерти пациентов после сердечно-сосудистых заболеваний, онкопатологии, травм и несчастных случаев [5, 6].

По данным НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, за 2014–2018 гг. наблюдается рост доли острых отравлений при приеме нескольких ЛС с 17,9 % до 36,5 % от всех лекарственных отравлений. Также многократно увеличилась доля отравлений смесями наркотических, психоактивных и лекарственных средств, принятыми с целью опьянения [7].

Все выше сказанное подтверждает актуальность обсуждения вопросов, связанных с комбинированным или сочетанным приемом ЛС и других биологически активных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Astrand B. Avoiding drug-drug interactions. *Chemotherapy*. 2009;55(4):215–220. Doi: <https://doi.org/10.1159/000218100>.
2. Onder G., Petrovic M., Tangiisuran B., Meinardi M., Markitonenboom W., Somers A., Rajkumar C., Bernabei R., Van der Cammen T. Development and validation of a score to assess risk of adverse drug reactions among in-hospital patients 65 years or older. *Archives of Internal Medicine*. 2010;170(13):1142–1148. Doi: <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.186>.
3. Верткин А. Л. Коморбидный пациент. Руководство для практических врачей. М.: Эксмо, 2015. 150 с.
4. Walckiers D., Van der Heyden J., Tafforeau J. Factors associated with excessive polypharmacy in older people. *Archives of Public Health*. 2015;73:50. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13690-015-0095-7>.
5. Астахова А. В., Лепехин В. К. Неблагоприятные побочные реакции и контроль безопасности лекарственных средств. М.: КогитоЦентр, 2004. 200 с.
6. Юргеля Н. В., Кукес В. Г., ред. Профилактика неблагоприятных побочных реакций. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 450 с.
7. Белова М. В., Ключев Е. А., Ключев А. Е., Тюрин И. А., Поцхверия М. М. Химико-токсикологическая диагностика острых отравлений наркотическими и психоактивными веществами на современном этапе. Материалы V Конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019): сборник тезисов. М.: ИПО «У Никитских ворот», 2019. 267 с.

## REFERENCES

1. Astrand B. Avoiding drug-drug interactions. *Chemotherapy*. 2009;55(4):215–220. Doi: <https://doi.org/10.1159/000218100>.
2. Onder G., Petrovic M., Tangiisuran B., Meinardi M., Markitonenboom W., Somers A., Rajkumar C., Bernabei R., Van der Cammen T. Development and validation of a score to assess risk of adverse drug reactions among in-hospital patients 65 years or older. *Archives of Internal Medicine*. 2010;170(13):1142–1148. Doi: <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.186>.
3. Vertkin A. L. Comorbid patient. Manual for practitioners. M.: Eksmo, 2015. 150 p. (In Russ.).
4. Walckiers D., Van der Heyden J., Tafforeau J. Factors associated with excessive polypharmacy in older people. *Archives of Public Health*. 2015;73:50. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13690-015-0095-7>.
5. Astahova A. V., Lepahin V. K. Adverse adverse reactions and drug safety monitoring. M.: KogitoCentr, 2004. 200 p. (In Russ.).
6. Yurgel' N. V., Kukes V. G., ed. Prevention of adverse reactions. M.: GEOTAR-Media, 2009. 450 p. (In Russ.).
7. Belova M. V., Klyuyev E. A., Klyuyev A. E., Tyurin I. A., Potshveria M. M. Chemical and Toxicological diagnostics of acute poisoning with narcotic and psychoactive substances at the present stage. In: Materials of the V Congress of laboratory medicine (RCLM 2019). M.: U Nikitskyh vorot, 2019. 267 p. (In Russ.).

## ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИЕМЕ

**М. К. Григорьева<sup>1</sup>, М. В. Белова<sup>1</sup>, В. В. Смирнов<sup>1</sup>**

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## BASICS OF DRUG INTERACTIONS WHILE TAKING THEM TOGETHER

**Marina K. Grigoreva<sup>1</sup>, Maria V. Belova<sup>1</sup>,  
Valery V. Smirnov<sup>1</sup>**

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Взаимодействие лекарственных веществ (ЛВ) в организме может происходить при одномоментном или последовательном их введении. В случае фар-

макологического взаимодействия, оно может иметь место даже после выведения одного из ЛВ из организма. Фармакологическое действие по характеру и интенсивности развивающихся эффектов классифицируется на: 1) простую сумму; 2) потенцирование; 3) антагонизм [1].

В ряде случаев может происходить изменение (извращение) фармакологического действия. Частым нежелательным эффектом фармакологического взаимодействия является повышение токсичности ЛВ [2, 3]. В основе взаимодействия могут лежать как фармакокинетические, так и фармакодинамические факторы.

### **Фармакокинетические механизмы взаимодействия ЛВ**

Обычно концентрация ЛВ в тканях пропорциональна содержанию их в крови и определяется соотношением скоростей абсорбции и экскреции. В этой связи, эффект ЛВ может измениться, если при их взаимодействии изменится:

- их абсорбция, вследствие модификации проницаемости биологических барьеров, изменения ионизации веществ, изменения микрофлоры кишечника (увеличение концентрации дигоксина в крови при совместном применении с эритромицином), моторики ЖКТ (увеличение времени прохождения ЛС по ЖКТ под действием наркотических анальгетиков, блокаторов H1-рецепторов) или гемодинамики в органе [1, 4, 5], а также в результате химического или физико-химического взаимодействия ЛВ между собой (фармацевтическая несовместимость) [1, 3, 5];
- связь с транспортными белками плазмы крови, из-за ее конкурентного характера. Это приводит к повышению свободной фракции ЛВ с меньшим афинитетом, и, соответственно, возможному усилению токсического действия последнего. Примером служит вытеснение дикумарола из связи с белками крови фенилбутазоном. Возможна и конкуренция за связь с рецепторами органа-мишени (вытеснение дигоксина из его мест связывания в миокарде хинидином) [1, 3];
- скорость и характер элиминации. Это может повлиять на эффективность ЛВ путем влияния на биотрансформацию (БТ) и экскрецию (индукция микросомальных ферментов, изменение pH среды, конкуренция за системы переносчиков в почках, стимуляция диуреза) одного или более ЛВ. (нефротоксичные аминогликозиды приводят к накоплению в организме дигоксина) [1].

Следует отдельно остановиться на последнем пункте, так как процессы БТ играют особо важную роль. ЛВ могут влиять как на собственный метаболизм, так и на метаболизм совместно принятых с ними веществ. Выделяют ЛВ индукторы, повышающие активность ферментов, и ингибиторы, угнетающие ее. При этом, известно, что одно и то же ЛВ в зависимости от условий и концентраций может выступать и как индуктор, и как ингибитор БТ других ЛВ. Индукция предполагает синтез дополнительного количества

того или иного фермента в органах и тканях. Этот процесс реализуется на уровне транскрипции генетической информации [1, 4, 6].

Многочисленные индукторы можно отнести к одному из двух классов по их влиянию на гладкий эндоплазматический ретикулум гепатоцитов (ГЭРГ). Представителями первого класса являются барбитураты, которые вызывают выраженную пролиферацию ГЭРГ и увеличение активности цитохрома P450 (CYP). В результате возрастает эффективность таких процессов, как деметилирование (диазепам), гидроксирование (барбитураты), эпексидирование (карбамазепин). Ко второму классу индукторов относятся в основном полициклические углеводороды: 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-p-диоксин, бенз(а)пирен и т.д. Индукция, вызываемая ими, не сопровождается пролиферацией ГЭРГ, но при этом существенно возрастает активность CYP450, УДФГ-трансферазы, гидроксилазы [1, 6].

Некоторые вещества способны угнетать активность ферментов, катализирующих БТ ЛВ, то есть выступать в качестве ингибиторов [1, 3, 6]. К группе ингибиторов относятся:

- конкурентные ингибиторы ферментов (например: флумазенил – ингибитор БТ бензодиазепинов) и неконкурентные (метирапон – ингибитор многих монооксигеназных реакций);
- необратимые ковалентные ингибиторы – вещества, образующиеся в процессе БТ при участии данного фермента и одновременно являющиеся его ингибиторами. Например: ингибиторами CYP450 являются дигидропиридины [4];
- реакционноспособные промежуточные метаболиты, ингибирующие активность ферментов нескольких типов в месте их образования (метаболиты четыреххлористого углерода, дихлорэтана и т. д.) [2, 4];
- ингибиторы синтеза кофакторов и простетических групп ферментов. Например: препараты кобальта блокируют синтез гема, являющегося простетической группой CYP450 зависимых оксидаз [4].

Если в процессе метаболизма ЛВ в организме образуются мало- или нетоксичные продукты, то его угнетение приведет к повышению токсичности, за счет повышения концентрации нативного ксенобиотика. Если происходит биоактивация, то есть образование активных метаболитов из неактивных ЛВ (пролекарств), то при ингибировании ферментов токсичность вещества понижается, однако так же понижается и его эффективность.

*Фармакодинамические механизмы взаимодействия ксенобиотиков* – это изменение фармакологических эффектов одного ЛВ под действием другого, не сопровождающееся изменением его концентрации в крови и связи с молекулами-мишенями. Проявляется их антагонизмом или синергизмом [1].

- Антагонизм – взаимодействие ЛВ, угнетающее или устраняющее часть или все фармакологические эффекты одного или нескольких ЛВ. Например: НПВС ослабляют гипотензивный эффект большинства ги-

потензивных ЛВ. Механизм этого феномена состоит в угнетении синтеза вазодилатирующих простагландинов в почках при приёме НПВС [1, 5].

- Синергизм – однонаправленное действие ЛС, обеспечивающее более сильный фармакологический эффект, чем действие каждого ЛВ в отдельности. Например:  $\beta$ -адреноблокатор пропранолол и блокатор медленных кальциевых каналов верапамил снижают частоту сердечных сокращений и сократимость миокарда, угнетают атриовентрикулярную проводимость и др. Совместное применение данных ЛС усиливает эти фармакологические эффекты [1, 5].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кукеса В. Г., Сычева Д. А., ред. Клиническая фармакология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 1024 с.
2. Мехтиев С. Н., Зиновьева Е. Н., Мехтиева О. А. Лекарственные поражения печени при многокомпонентной терапии коморбидных состояний. *Вестник КазНМУ*. 2019;(1):63–66.
3. Лужникова Е. А. Медицинская токсикология. Национальное руководство М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 928 с.
4. Куценко С. А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант Россия, 2002. 720 с.
5. Белоусова Ю. Б., Леоновой М. В., ред. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии: руководство для практикующих врачей. М.: Бионика, 2002. 368 с.
6. Кукес В. Г., Грачев С. В., Сычев Д. А., Раменская Г. В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 304 с.

## REFERENCES

1. Kukes V. G., Sychev D. A., ed. Clinical pharmacology: textbook. 5th edition. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 1024 p. (In Russ.).
2. Mehtiyev S. N., Zinovieva E. N., Mehtiyeva O. A. Drug-induced liver disease in multicomponent therapy of comorbid conditions. *Vestnik KazNMU = Bulletin of KazNMU*. 2019;(1):63–66. (In Russ.).
3. Luzhnikov E. A., ed. Medical toxicology. National guide. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 928 p. (In Russ.).
4. Kutsenko S. A. Fundamentals of toxicology. St. Petersburg: Folio Russia, 2002. 720 p. (In Russ.).
5. Belousov Yu. B., Leonova M. V., ed. Fundamentals of clinical pharmacology and rational pharmacotherapy: guide for doctors. Moscow: Bionica, 2002. 368 p. (In Russ.).
6. Kukes V. G., Grachev S. V., Sychev D. A., Ramenskaya G. V. The metabolism of drugs. Scientific foundations of personalized medicine: arms for doctors. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 304 p. (In Russ.).

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ЭТАНОЛОМ

**С. М. Мехведь<sup>1</sup>, Д. В. Чугаев<sup>1</sup>, М. В. Белова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## ETHANOL-DRUG INTERACTIONS

**Sergei M. Mehved<sup>1</sup>, Dmitriy V. Chugaev<sup>1</sup>,  
Maria V. Belova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Одним из частых и достаточно опасных сочетаний является прием лекарственных средств (ЛС) совмест- н с этанолом (Э).

По данным НИИ СП им. Склифосовского до трети отравлений ЛС и 47,7 % – наркотическими и психоак- тивными веществами происходит на фоне алкоголь- ного опьянения [1]. Такие отравления характеризуют- ся более тяжелым клиническим течением.

Э может вступать как в фармакокинетическое, так и в фармакодинамическое взаимодействие с ЛС.

*Фармакокинетическое взаимодействие* ЛС с Э происходит, в основном, в процессе биотрансформа- ции. Метаболизм Э осуществляется тремя путями. Основ- ной путь (до 80 % принятого Э) – окисление алко- гольдегидрогеназой (АДГ) до ацетальдегида (АцА) и далее ацетальдегиддегидрогеназой (АльдГ). Второй – НАДФ-Н-зависимый путь окисления (10–15 % Э) про- ходит в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов при участии цитохрома Р-450 (СYP450). Третий путь окисления Э до АцА (до 5 %) происходит с участием каталазы и перекиси водорода [2].

При взаимодействии Э и ЛС может происходить усиление или снижение метаболизма обоих веществ за счет конкуренции за АДГ, АльДГ, СYP-450. Это мо- жет менять метаболизм как Э, так и ЛС, включая анти- биотики, антигистаминные препараты, барбитураты, бензодиазепины, блокаторы H<sub>2</sub>-рецепторов, миоре- лаксанты, анальгетики и др. [1, 3]. Ингибиторы АДГ, ка- ковыми являются, в том числе, некоторые ЛС, вызывают накопления в микросомах СYP-450, что повышает долю окисления Э микросомальной этанолюксилю- щей системой (МЭОС).

Некоторые ЛС ингибируют АльДГ, приводя к на- коплению АцА, что проявляется бурными вегетатив- ными реакциями (покраснение кожи, чувство жара, озноб, затруднение дыхания, шум в голове, тахикар- дия, тошнота, др.), и чувством страха. К таким ЛС отно- сятся: метронидазол, хлорамфеникол, фуразолидон, цефалоспорины (цефамандол, цефоперазон), проти- вогрибковые лекарственные препараты – произво- дные имидазола (клотримазол, кетоконазол и др.). На этом эффекте основано использование дисульфирама для лечения алкоголизма (сенсibiliзирующая тера- пия) [2, 3].

Влияние Э на биотрансформацию ЛС неодно- значно и может зависеть от частоты приема. При од- нократном приёме Э в больших дозах неспецифиче- ски ингибируются изоферменты СYP-450. Например, метаболизм непрямого антикоагулянта варфарина угнетается за счёт ингибирования изофермента СYP- 450 2C9. Это приводит к повышению концентрации варфарина в плазме крови, усилению антикоагулян- ного эффекта, увеличивается риск геморрагических осложнений [2].

Длительное применение Э вызывает индукцию изоферментов СYP-450. При этом могут индуциро- ваться все изоферменты СYP-450, но наиболее силь- но – СYP-450 2E1. Так гепатотоксическое действие парацетамола усиливается при хроническом упо- треблении Э. Это объясняют тем, что Э индуцирует изофермент СYP-450 2E1, увеличивает долю окисли-

тельного пути метаболизма парацетамола до гепатотоксичного метаболита N-ацетилбензохинонимина. Хроническое употребление Э за счёт индукции изофермента CYP-450 2C9 приводит к снижению равновесной концентрации варфарина, что уменьшает выраженность антикоагулянтного эффекта и требует коррекции дозы этого ЛС. Аналогично изменяется фармакокинетика и других ЛС (андрогены, анаболические стероиды, фенитоин и др.) [2, 3].

Примечательно, что необходимая для ингибирования метаболизма ЛС доза Э при его однократном приёме индивидуальна и варьирует в широких пределах. Это же относится к дозам и срокам хронического употребления Э, необходимым для индукции изоферментов CYP450.

Наибольшее клиническое значение имеет *непрямое фармакодинамическое взаимодействие* Э и ЛС, оказывающее влияние на ЦНС, сердечно-сосудистую систему, систему гемостаза.

Влияние взаимодействия Э с ЛС на ЦНС проявляется потенцированием подавляющего эффекта, вплоть до полного угнетения сознания и дыхания [1, 4]. Так проявляется совместное с Э действие наркотических анальгетиков, трициклических антидепрессантов, барбитуратов, бензодиазепинов, блокаторов H1-рецепторов гистамина (обладающих седативным эффектом), гризеофульвина, кетотифена, метоклопрамида, антипсихотических и противосудорожных ЛС [2–6]. Это приводит, с одной стороны, к патологическому опьянению, а с другой стороны – усиливает проявления побочных эффектов ЛС.

Опиаты/опиоиды и Э относятся к одной группе наркотических веществ, они синхронно оказывают специфическое действие на опиоидные рецепторы, усиливая эффекты друг друга, в частности, угнетение сознания и дыхания. Одновременно многократно увеличивается кардио- и гепато-токсичность такого взаимодействия [6, 7].

Прием гипотензивных и антиаритмических ЛС, таких как клонидин, нифедипин, β-адреноблокаторы, нитраты, др., совместно с Э приводит к потенцированию гипотензивного эффекта, вплоть до коллапса. Особенно опасно (из-за возможности развития коллапса и летального исхода) взаимодействие Э с клонидином [1].

В результате взаимодействия Э с ЛС может нарушаться функция системы гемостаза. Например, при совместном приеме ацетилсалициловой кислоты, тиклопидина и клопидогрела могут возникать геморрагические осложнения за счет потенцирования антиагрегантного эффекта [1, 3].

Э вызывает изменение уровня глюкозы в крови (сначала его повышение, а затем снижение). Поэтому при одновременном приеме Э с дизопирамидом и некоторыми другими гипогликемическими средствами увеличивается риск возникновения гипогликемии. Это вдвойне опасно для больных сахарным диабетом, которые имеют повышенную чувствительность к гипо-

гликемии. Такой эффект Э особенно сильно выражен у пьющих систематически и при этом принимающих мало пищи [8].

С особенностями метаболизма Э связаны его разносторонние эффекты при совместном приеме с другими биологически активными соединениями. Угнетение аэробного пути окисления энергетических субстратов, нарушение баланса нейромедиаторов в ЦНС, конкурентное блокирование биотрансформации ЛС – факторы, определяющие тяжесть комбинированных отравлений с участием Э. Это приводит к разнообразным, как правило, отрицательным последствиям, которые не всегда можно точно предугадать.

## ЛИТЕРАТУРА

- Надеждин А. В., Тетенова Е. Ю., Петухов А. Е. Изучение употребления алкоголя и других психоактивных веществ среди госпитализированных соматических больных. *Вопросы наркологии*. 2017;156(8):133–134.
- Кукес В. Г., Грачев С. В., Сычев Д. А., Раменская Г. В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 304 с.
- Алкоголь и лекарства: совместимость, взаимоисключающее действие, влияние на организм при приеме и возможные последствия. Available at: <http://fb.ru/article/394270/2018> (дата обращения 23.06.2020 г.).
- Иванова Е. И., Иващенко Д. В., Савченко Л. М., Брюн Е. А., Сычев Д. А. Неблагоприятные побочные реакции на приеме бензидиазепиновых транквилизаторов, в частности при лечении синдрома отмены алкоголя. *Врач*. 2017;9:9-13. Doi: <https://doi.org/10.14341/wjpm9262>.
- Щелчкова Н. А., Ларченко А. В., Разгулин С. А., Мудрова С. А., Суворов М. А., Кудрявцев С. А., Лямкин М. В., Кауров Я. В. Патологические механизмы парадоксального эффекта острого отравления синтетическими психоактивными веществами в сочетании с этанолом. *Современные технологии в медицине*. 2018;10(3):168–174. Doi: <http://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.21>.
- Шигеев С. В., Жук Ю. М. Алкоголь – фактор развития смертельного отравления опиатами. *Проблемы экспертизы в медицине*. 2005;5(3):30–33.
- Новоселов В. П., Савченко С. В., Братова Н. П., Кузнецов Е. В., Титаренко Б. Ф., Старостин С. А. Оценка состояния миокарда и ультраструктуры его микрососудов при хронической интоксикации опиатами и этанолом. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2011;(3):67–70.
- Остроумова О. Д., Акимова Е. С., Кочетков А. И., Переверзев А. П. Лекарственно-индуцированные гипогликемии: фокус на препараты, не относящиеся к группе сахароснижающих лекарственных средств. *CONSILIUM MEDICUM*. 2019;2(4):56–59. Doi:10.26442/20751753.2019.4.190196.

## REFERENCES

- Nadezhdin A. V., Tetenova E. Yu., Petuhov A. E. Studying the use of alcohol and other psychoactive substances among hospitalized somatic patients. *Voprosy narkologii = Questions of narcology*. 2017;156(8):133–134. (In Russ.).
- Kukes V. G., Grachev S. V., Sychev D. A., Ramenskaya G. V. The metabolism of drugs. Scientific foundations of personalized medicine: arms for doctors. M.: GEOTAR-Media, 2008. 304 p. (In Russ.).
- Alcohol and drugs: compatibility, mutually exclusive effect, effect on the body when taken and possible consequences. Available at: <http://fb.ru/article/394270/2018> (accessed 23.06.2020). (In Russ.).
- Ivanova E. I., Ivashchenko D. V., Savchenko L. M., Brun E. A., Sychev D. A. Adverse side effects when taking benzidiazepine tranquilizers, in particular in the treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Vratch = Doctor*. 2017;9:9–13. Doi: <https://doi.org/10.14341/wjpm9262>. (In Russ.).

5. Shchelchkova N. A., Larchenko A. V., Razgulin S. A., Mudrova S. A., Suvorov M. A., Kudryavtsev S. A., Lyamkin M. V., Kaurov Ya. V. Pathophysiological mechanisms of the paradoxical effect of acute poisoning with synthetic psychoactive substances in combination with ethanol. *Sovremennye tehnologii v medicine – Modern technologies in medicine*. 2018;10(3):168–174. Doi: <http://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.21>. (In Russ.).
6. Sigaev S. V., Zhuk Y. M. Alcohol is a factor in the development of fatal poisoning by opiates. *Problemy ekspertizy v medicine = Problems of expertise in medicine*. 2005;5(3):30–33. (In Russ.).
7. Novoselov V. P., Savchenko S. V., Bgatova N. P., Kuznetsov E. V., Titarenko B. F., Starostin S. A. Assessment of the state of the myocardium and the ultrastructure of its microvessels in chronic intoxication with opiates and ethanol. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2011;(3):67–70. (In Russ.).
8. Ostroumova O. D., Akimov E. S., Kochetkov A. I., Pereverzev A. P. Drug-induced hypoglycemia: focus on drugs that do not belong to the group of hypoglycemic drugs. *CONSILIUM MEDICUM*. 2019;2(4):56–59. Doi: [10.26442/20751753.2019.4.190196](https://doi.org/10.26442/20751753.2019.4.190196) (In Russ.).

## СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В УПОТРЕБЛЕНИИ НАРКОТИЧЕСКИХ И ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Г. В. Трусов<sup>1</sup>, М. В. Белова<sup>1</sup>, В. М. Печенников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## CURRENT TENDENCIES IN DRUGS AND PSYCHOACTIVE SUBSTANCES USE

German V. Trusov<sup>1</sup>, Maria V. Belova<sup>1</sup>,  
Valery M. Pechennikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

**Введение.** Употребление и зависимость от психоактивных веществ (ПАВ) является огромной медико-социальной и экономической проблемой для нашей страны. Наблюдаемые в последние два десятилетия изменения социально-экономических условий труда и быта способствовали активному росту наркопотребления в России.

За период с 1995 по 2015 годы количество пациентов с синдромом зависимости от наркотиков, зарегистрированных наркологическими учреждениями России, увеличилось в 4 раза – с 70 594 до 311 785 человек. По оценке различных ведомств, число употребляющих ПАВ значительно выше и составляет от 1,5 до 2,2 млн человек.

Анализ частоты острых отравлений наркотическими и ПАВ по данным НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, выявил, что за 2005–2018 годы доля таких отравлений в структуре острых экзотоксикозов выросла в 6 раз с 3,6 % в 2005 до 24,6 % в 2015 г.; в 2018 она составила 21,7 % [1]. Эта ситуация объясняется широким распространением новых ПАВ – синтетических каннабиноидов (СК) и синтетических психостимуляторов – СПС. На российском чёрном рынке они появились в 2005 г. и распространялись, главным образом, через Интернет, а также путем

свободной продажи в табачных киосках, как легальные продукты – под видом смеси натуральных растительных компонентов. К настоящему времени произошло снижение доли моно-отравлений СК и рост приема СПС, при этом часто представители этих групп обнаруживаются совместно с несколькими наркотическими и ПАВ, а также с алкоголем [2].

Анализ статистических данных выявил, что среди наркопотребителей значительную долю составляют лица с отравлениями несколькими видами наркотических и/или лекарственных веществ. Это сочетания как наркотиков однонаправленного действия – например, опиатов с метадонном, так и разнонаправленного, например, метадон и СПС или галлюциногены. У значительной части пациентов выявлялось 4-5 и более наркотических и ПАВ одновременно [1, 3].

Рост незаконного оборота синтетических наркотиков в мире обусловлен несколькими факторами.

1. Социально-экономические условия. Наличие налаженной наркоиндустрии в условиях осложнившихся проблем доставки «традиционных» наркотиков вызвало потребность в замене их на местах синтетическими. При этом взаимозаменяемость и разнообразие исходных компонентов и используемых химических веществ обеспечивают доступность и относительно низкие издержки производства синтетических наркотиков. В отличие от героина или кокаина их производство не привязано к конкретной сельскохозяйственной (климатической) зоне, подпольные лаборатории можно организовать в любой точке мира, где есть возможность выводить необходимые химические вещества из законного оборота. Их низкая стоимость, по сравнению с натуральными, является одним из важнейших факторов привлекательности, причём как для продавцов, так и для покупателей [4].
2. Культурный фактор. Современное молодое поколение пытается найти свойственный лишь их субкультуре наркотик, который отличал бы употребляющих его людей от наркоманов другого «профиля» [3, 5].
3. Медицинский фактор. В росте спроса на синтетические наркотики не последнюю роль играет медиализация общества, в результате чего употребление таблетированных форм, например, «экстази» или амфетаминов, не вызывает у людей опасений. В целом они воспринимаются как менее вредные для здоровья.
4. Использование Интернета. В Европе синтетические наркотики всё чаще стали распространяться через Интернет, что затрудняет работу правоохранительных органов, ведущих борьбу с наркоторговлей [6]. Согласно данным УПН ООН (Управление Организации Объединённых Наций по преступности и наркотикам), для начала употребления наркотических веществ самыми опасными периодами являются ранний (12–14) и поздний (14–17) подростковый возраст, а впоследствии уровень употребления достигает пика между 18–25 годами [6].

Подростков, употребляющих наркотики, можно отнести к двум абсолютно противоположным группам: детям и подросткам из благополучных семей, употребляющим так называемые «клубные наркотики» ради развлечения, и детям и подросткам из неблагополучных семей, чтобы «убежать» от проблем.

В старших возрастных группах чаще встречаются люди с проблемами в плане физического и психического здоровья, и это может представлять трудности при подборе методов лечения [3, 6].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белова М. В., Ключев Е. А., Ключев А. Е., Поцхверия М. М. Химико-токсикологическая диагностика острых отравлений наркотическими и психоактивными веществами на современном этапе. *Московская медицина*. 2019;34(6):22–23.
2. Рохлина М. Л. Сочетанное употребление наркотиков и других психоактивных веществ. Полизависимость. *Вопросы наркологии*. 2014;(2):127–140.
3. Бурцев А. А., Егоров В. Ф., Ненастьева А. Ю., Смирнов А. В., Петухов А. Е. Показатели выявления психоактивных веществ в Москве в 2014–2018 гг. *Наркология*. 2019;18(12):33–44.
4. Синтетические наркотики. Available at: <https://sairon.ru/narkotik/sinteticheskie-narkotiki> (дата обращения 15.06.2020).
5. Дорожный А., Хачатурянц А. Исследование о том, на чем сидит Россия. Available at: <https://www.proekt.media/research/narkotiki-v-darknete/#klad> (дата обращения 16.06.2020).
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available at: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6b2ec5f1-8b2c-11e9-9369-01aa75ed71a1/> (дата обращения 22.06.2020).

## REFERENCES

1. Belova M. V., Klyuyev E. A., Klyuyev A. E., Potshveria M. M. Chemical and toxicological diagnostics of acute poisoning with narcotic and psychoactive substances at the present stage. *Moskovskaya medicina = Moscow medicine*. 2019;34(6):22–23. (In Russ.).
2. Rokhlina M. L. Combined use of drugs and other psychoactive substances. Polydependency. *Voprosy narcologii = Questions of narcology*. 2014;(2):127–140. (In Russ.).
3. Burcev A. A., Egorov V. F., Nenast'eva A. Yu., Smirnov A. V., Petuhov A. E. Indicators of detection of psychoactive substances in Moscow in 2014–2018. *Narkologiya = Narcology*. 2019;18(12):33–44. (In Russ.).
4. Synthetic drugs. Available at: <https://sairon.ru/narkotik/sinteticheskie-narkotiki> (accessed 15.06.2020). (In Russ.).
5. Dorozhnyy A. Khachataryants A. Research what drugs Russia is taking. Available at: <https://www.proekt.media/research/narkotiki-v-darknete/#klad> (accessed 16.06.2020). (In Russ.).
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg. Available at: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/6b2ec5f1-8b2c-11e9-9369-01aa75ed71a1/> (accessed 22.06.2020).

## ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КОМБИНИРОВАННЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ, ПСИХОАКТИВНЫМИ И НАРКОТИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

**Ю. В. Жаров<sup>1</sup>, М. В. Белова<sup>1</sup>, Г. М. Родионова<sup>1</sup>**

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL DIAGNOSTICS OF COMBINED POISONING WITH MEDICINAL, PSYCHOACTIVE AND NARCOTIC SUBSTANCES

**Yuri V. Zharov<sup>1</sup>, Maria V. Belova<sup>1</sup>,  
Galina M. Rodionova**

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Отравления несколькими лекарственными (ЛВ), наркотическими и психоактивными веществами (НиПАВ) представляют серьезную проблему для современной медицины с точки зрения диагностики. При комбинировании нескольких веществ и/или на фоне алкогольного опьянения клиническая картина может меняться, что не позволяет поставить точный диагноз только по клиническим симптомам и требует химико-токсикологического лабораторного подтверждения [1, 2].

Оперативный и объективный химико-токсикологический анализ (ХТА) современных ЛВ, НиПАВ, особенно при их совместном приеме, также представляет непростую задачу [3]. Для большинства этих веществ не существует доступных простых методов скринингового предварительного анализа. Многие из них в организме подвергаются интенсивному метаболизму, поэтому через довольно короткое время нативные соединения практически не обнаруживаются. Быстрота появления и смены НиПАВ на рынке потребителей часто не позволяет оперативно исследовать биотрансформацию, получить основные аналитические характеристики их метаболитов [1].

Задача систематического ХТА – поиск априори неизвестных ЛВ и НиПАВ в биосредах пациента. Общий подход состоит в выборе метода выделения самих анализируемых веществ или их метаболитов из биологического объекта и, по возможности, одновременное обнаружение их приемлемыми аналитическими методами. Для ХТА в области острых отравлений также важна максимальная быстрота получения результата. В связи с юридической значимостью установления факта потребления НиПАВ дополнительно выдвигается требование надежности и достоверности результата.

На предварительном этапе ХТА принято использовать иммунные тест-системы (ИТ) и тонкослойную хроматографию (ТСХ), однако результаты этих методов не всегда репрезентативны [2, 3, 4]. Это связано с быстрой сменой НиПАВ, отсутствием стандартов, методик и наборов реагентов на новые соединения, а также недостаточной чувствительностью ТСХ для обнаружения малых количеств веществ в биосредах. Кроме того, при острых отравлениях зачастую возникают ложно-положительные реакции из-за высоких концентраций посторонних соединений. Синтетические каннабиноиды не реагируют с ИТ на классические каннабиноиды и «первые» представители этих соединений. Все это приводит к тому, что на предваритель-

ном этапе ХТА до 67,4 % случаев могут быть получены ложные или неполные результаты [2, 3].

При комбинации нескольких ЛВ, НиПАВ необходимо и единственно верно сразу использовать подтверждающие аналитические методы – такие как газовая (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией (МС) или тандемной МС с целью однозначного определения токсиканта, его метаболитов и их концентрации [5, 6]. В современной научной и практической литературе предложено несколько вариантов такого систематического анализа [1–3, 7, 8]. Чаще всего они подразумевают сочетание ГХ и ВЭЖХ, а для пробоподготовки использование сорбции или жидкостной экстракции, кислотного и щелочного гидролиза, дериватизации. Это позволяет обнаруживать вещества, достаточно различающиеся по своим физико-химическим свойствам, как кислотного, так и основного характера.

**Заключение.** Таким образом, на современном этапе в связи с ростом полипрагмазии, изменением структуры острых отравлений в сторону комбинирования ЛВ, НиПАВ и алкоголя для правильной химико-токсикологической лабораторной диагностики необходимо использование высокочувствительных аналитических методов экспертного уровня, таких как ГХ и ВЭЖХ с МС. ХТА следует направить на обнаружение как исходных веществ, так и их метаболитов, в связи с чем важным является создание и пополнение баз данных (масс-спектров), характеризующих современные ЛВ, НиПАВ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мелентьев А. Б., Катаев С. С., Дворская О. Н. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах. М.: *Перо*, 2016. 326 с.
2. Белова М. В., Ключев Е. А., Ключев А. Е., Поцхверия М. М. Химико-токсикологическая диагностика острых отравлений наркотическими и психоактивными веществами на современном этапе. *Московская медицина*. 2019;34(6):22–23.
3. Лисовик Ж. А., Белова М. В., Ильашенко К. К., Петров С. И., Лужников Е. А. Методы химико-токсикологического анализа в диагностике сочетанных отравлений психотропными препаратами. *Токсикологический вестник*. 2008;(5):2–6.
4. Beck O., Rosberg L., Al-Saffar's Y., Ville T., Karlsson L., Hansson T., Helander A. Detectability of new psychoactive substances, «legal highs», in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse. *Drug testing and analysis*. 2014;6(5):492–499. Doi: <https://doi.org/10.1002/dta.1641>.
5. Grapp M., Sauer Ch., Vidal Ch., Mueller D. GC–MS analysis of the designer drug  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone and its metabolites in urine and blood in an acute poisoning case. *Forensic science international*. 2016;259:e14–e19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.12.020>.
6. Гудилин Д. Ю. Химико-токсикологический анализ: оборудование, методы, средства автоматизации. *Лаборатория и производство*. 2019;1(5):50–57. Doi: <https://doi.org/10.32757/2619-0923.2019.1.5.50.57>.
7. Temerdashev A. Z., Grigor'ev A. M., Rybal'chenko I. V. Evolution of new narcotic substances and methods of their determination. *J. Anal. Chem.* 2014;69(9):899–926. Doi: <https://doi.org/10.1134/s1061934814090111>.
8. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignano E., Romolo F.S., Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, «spice» and stimulants in oral fluid. *J. Chromatogr.* 2012;1258:37–42. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.098>.

## REFERENCES

1. Melentyev A. B., Kataev S. S., Dvorskaya O. N. Designer drugs. Metabolism and approaches to analysis in biological environments. M.: *Pero*, 2016: 326 p. (In Russ.).
2. Belova M. V., Klyuyev E. A., Klyuyev A. E., Potshveria M. M. Chemical and toxicological diagnostics of acute poisoning with narcotic and psychoactive substances at the present stage. *Moskovskaya medicina = Moscow medicine*. 2019;34(6):22–23. (In Russ.).
3. Lisovik Zh. A., Belova M. V., Ilyashenko K. K., Petrov S. I., Luzhnikov E. A. Methods of chemical and toxicological analysis in the diagnosis of combined poisoning with psychotropic drugs. *Toksikologicheskij vestnik = Toxicological Bulletin*. 2008;(5):2–6. (In Russ.).
4. Beck O., Rosberg L., Al-Saffar's Y., Ville T., Karlsson L., Hansson T., Helander A. Detectability of new psychoactive substances, «legal highs», in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse. *Drug testing and analysis*. 2014;6(5):492–499. Doi: <https://doi.org/10.1002/dta.1641>.
5. Grapp M., Sauer Ch., Vidal Ch., Mueller D. GC–MS analysis of the designer drug  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone and its metabolites in urine and blood in an acute poisoning case. *Forensic science international*. 2016;259:e14–e19. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.12.020>.
6. Gudilin D. Yu. Chemical and Toxicological analysis: equipment, methods, automation tools. *Laboratoriya i proizvodstvo = Laboratory and production*. 2019;1(5):50–57. Doi: <https://doi.org/10.32757/2619-0923.2019.1.5.50.57>. (In Russ.).
7. Temerdashev A. Z., Grigor'ev A. M., Rybal'chenko I. V. Evolution of new narcotic substances and methods of their determination. *J. Anal. Chem.* 2014;69(9):899–926. Doi: <https://doi.org/10.1134/s1061934814090111>.
8. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignano E., Romolo F.S., Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, «spice» and stimulants in oral fluid. *J. Chromatogr.* 2012;1258:37–42. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.098>.

## СОЧЕТАННОЕ УПОТРЕБЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С НЕМЕДИЦИНСКИМИ ЦЕЛЯМИ И НАРКОТИКОВ

**Т. Ю. Заседателева<sup>1</sup>, А. Е. Петухов<sup>2</sup>,  
О. И. Передеряев<sup>2</sup>**

1 – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1  
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## COMBINED USE OF MEDICINES FOR NON-MEDICAL PURPOSES AND DRUGS (REVIEW)

**Tatyana Y. Zasedateleva<sup>1</sup>, Alexei E. Petukhov<sup>2</sup>,  
Oleg I. Perederyaev<sup>2</sup>**

1 – M. V. Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia  
2 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

**Введение.** Использование различных лекарственных средств (ЛС) с немедицинскими целями – относительно новое, но уже широко распространенное явление. В течение 2016–2019 гг. в Москве отмечается существенный рост случаев немедицинского потребления психоактивных лекарств, не контроли-

руемых согласно Постановлению Правительства РФ № 681 – прегабалин, тропикамид (ТР), трамадол, баклофен, феназепам, и др. Чаще всего такой прием регистрируется среди водителей транспортных средств, которым согласно приказу Минздрава № 933н в этом случае не может быть вынесено заключение о состоянии опьянения. Например, в 2019 г. в Москве было обнаружено 344 случая злоупотребления баклофеном, 1254 – прегабалином/габапентином (Г), 893 – трамадолом, 901 – ТР, 980 – феназепамом, 365 – фенибутом, 47 – дицикловерином.

Сочетанный прием ЛС и наркотических средств (Н) может быть использован больными для усиления и пролонгирования действия Н с целью достижения желаемой эйфории. Однако при сочетании употреблении наблюдается увеличение токсичности, частоты и тяжести передозировок, смертности, ускорение темпов формирования зависимости [1].

### Тропикамид и амфетамины

Изначально наркоманы использовали ТР, чтобы скрыть сужение зрачков глаз, которое является характерным признаком употребления большинства Н на основе опия. Однако, со временем было обнаружено, что ТР усиливает действие Н на организм человека. Более того, оказалось, что употребление ТР и само по себе вызывало у наркозависимых людей наркотическое опьянение.

Механизм потенцирования заключается в следующем: D<sub>1</sub>- и M<sub>4</sub>-рецепторы оказывают противоположное действие на протеинкиназу А (ПКА), благодаря чему регулируется ПКА-катализируемое фосфорилирование субъединицы GluA1 рецепторов α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA-рецепторов) в сайте серин-845 (S845) в стриатонигральных нейронах. Отмечают, что фосфорилирование GluA1 в этих сайтах изменяет физиологические свойства и экспрессию AMPA-рецепторов, участвующих в проведении возбуждающих сигналов [2].

Через D<sub>1</sub>-рецепторы ПКА активируется, через M<sub>4</sub>-рецепторы – инактивируется. В связи с тем, что амфетамин способствует накоплению дофамина в синапсах, в результате чего учащается активация D<sub>1</sub>-рецепторов, а ТР непосредственно блокирует M<sub>4</sub>-рецепторы, действие этих двух веществ становится односторонним и усиливает активацию ПКА [2].

Было показано, что при блокаде M<sub>4</sub>-рецепторов значительно увеличивается как базальное, так и дофамин-стимулированное фосфорилирование GluA1 в S845, снижается экспрессия и активность AMPA-рецепторов [2].

### Габапентин и опиаты

Механизм потенцирования заключается в способности Г усиливать анальгетический эффект опиатов. Опиаты вызывают анальгезию частично путем ингиби-

рования входа в клетки Ca<sup>2+</sup> и облегчения выхода K<sup>+</sup>. В свою очередь, Г уменьшает вход Ca<sup>2+</sup> благодаря антагонизму с потенциал-зависимыми Ca<sup>2+</sup>-каналами, в результате чего уменьшается возбуждающее действие глутамата и аспартата на N-метил-D-аспартат-рецепторы (NMDA-рецепторы) [3].

Кроме того, при сочетании употреблении с морфином отмечают увеличение концентрации Г в плазме крови и уменьшение его почечного клиренса [3]. Также Г ослабляет хроническую толерантность к морфину. Было показано, что после 7 дней интратекальных инъекций (дважды в день) морфина увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, фактора некроза опухоли-альфа (TNF-α), при этом снижается уровень противовоспалительного IL-10 в спинном мозге крысы. Эти изменения сводятся к минимуму при сочетании употреблении с Г [4].

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rohlina M. L. Combined use of drugs and other psychoactive substances. Polydependence. *Voprosy narkologii = Questions of narcology*. 2014;2:127-140. (In Russ.).
2. L-M. Mao, N. He, D-Z. Jin, J.Q. Wang, Regulation of Phosphorylation of AMPA Glutamate Receptors by Muscarinic M4 Receptors in the Striatum *in vivo*. *Neuroscience*. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.063>.
3. Peckham A. M., Fairman K. A., Sclar D. A. All-Cause and Drug-Related Medical Events Associated with Overuse of Gabapentin and/or Opioid Medications: A Retrospective Cohort Analysis of a Commercially Insured US Population. *Drug Safety*. 2018;41(2),213–228. Doi: 10.1007/s40264-017-0595-1.
4. Bao Yu-H, Zhou K. H., Chen R., Xu H., Zeng L., Zhang X, Jiang V., Du D. Gabapentin attenuates morphine tolerance through interleukin-10. *NeuroReport*. 2014;25:71–76. Doi: 10.1097/WNR.0b013e328363fde8.

### ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В НЕМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

**Е. С. Войнова<sup>1</sup>, А. Е. Петухов<sup>2</sup>, С. А. Чугаев<sup>2</sup>**

1 – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ имени М.В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1  
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

### LEGISLATIVE ASPECTS OF RESTRICTIONS ON THE USE OF DRUGS FOR NON-MEDICAL PURPOSES

**Elizaveta S. Voinova<sup>1</sup>, Alexey E. Petukhov<sup>2</sup>,  
Sergey A. Tchugaev<sup>2</sup>**

1 – M. V. Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia  
2 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

**Введение.** Проблема широкого применения «аптечных наркотиков» крайне актуальна на сегодняшний день в связи с их относительной доступностью, низкой стоимостью, а также ограничением доступа к нелегальным уличным наркотикам. Согласно статис-

тике последних лет в Москве наблюдается значительный рост употребления различных психоактивных и других веществ в немедицинских целях. По сравнению с 2014 в 2019 году употребление выросло более чем в 4,5 раза. Одной из важнейших проблем широкого применения лекарственных средств (ЛС) в немедицинских целях является высокая токсичность препаратов, которая в большинстве случаев обусловлена многократным превышением терапевтической дозы, посредством чего достигается мощный наркотический эффект. Более того, препараты используются в различных комбинациях, что только усугубляет негативное воздействие на организм человека.

### Пути получения ЛС

Можно выделить три основных пути получения ЛС потребителями:

1. **Законный рынок.** Человек, имеющий рецепт, может беспрепятственно получить препарат.
2. **Утечки с законного рынка.** Некоторые аптеки, особенно несетевые и круглосуточные, продают препараты без рецепта.
3. **Синтез в подпольных лабораториях.**

«Лидерами» немедицинского применения в течение последних нескольких лет являются прегабалин, феназепам, тропикамид, трамадол и баклофен. В отдельных субъектах Российской Федерации употребление этих веществ превышает потребление даже наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ).

### Эффективность мер по ограничению употребления ЛС

В отношении таких препаратов, как прегабалин, трамадол и тропикамид, была предпринята мера по включению в Список сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации [1]. Другим изменением, касающимся целого ряда веществ, был перевод препаратов приказом Минздрава России № 183н на предметно-количественный учет в аптечных учреждениях [2]. К сожалению, практически сохранившийся уровень потребления говорит о низкой эффективности подобных ограничений. Гораздо более позитивным опытом можно считать включение ЛС в Список III постановления Правительства РФ № 681, благодаря которому из незаконного оборота полностью исчезли такие препараты, как тианептин, налбуфин и буторфанол [3].

### Проблема медицинского освидетельствования

Согласно п. 15 приказа МЗ РФ № 933 заключение о наличии состояния опьянения водителей транспортных средств выносится только при обнаружении в биопробе НС или ПВ [4]. Однако, большое количество веществ, применяемых в немедицинских целях и приводящих к состоянию опьянения, не входят в указанный перечень. Именно поэтому в ряде случаев бывает

невозможно вынести заключение об опьянении при его явном наличии.

Правила проведения химико-токсикологического исследования (ХТИ) (приказ № 933 п. 3) регламентируют, что в обязательном порядке ХТИ проводится лишь на небольшой список соединений, который, в связи с широким применением ЛС в немедицинских целях, требует дополнения. Также согласно п. 10, при отрицательных результатах предварительного этапа образцы на подтверждающий анализ не отправляются [4]. Большинство ЛС на предварительном этапе не обнаруживаются, что снова препятствует вынесению заключения об опьянении.

Тем не менее, в проблеме медицинского освидетельствования в последнее время произошли и позитивные изменения. Так, в приказе № 581н, регулирующем порядок медицинского освидетельствования учащихся, с 1 сентября 2020 года в силу вступает поправка, позволяющая отправлять биопробы на подтверждающий анализ вне зависимости от результатов предварительного, если психиатр-нарколог выявил не менее трех клинических признаков употребления НС и ПВ [5].

### Проблема аптечных организаций

Прибыль от незаконной реализации ЛС значительно превышает размер штрафов, налагаемых за подобные действия, поэтому некоторые аптеки, особенно несетевые, умышленно нарушают требования законодательства РФ. До недавнего времени данной проблеме не уделялось должного внимания, однако, в начале 2020 года в Правительстве РФ был внесен к рассмотрению законопроект, значительно ужесточающий ответственность аптечных организаций за незаконный оборот ЛС.

Реализация поддельных рецептов – еще одна ситуация, в которой возможен незаконный отпуск. В данном случае проблема аптек заключается в халатности и невнимательности работников при изучении рецепта, а также в несвоевременном информировании об изменениях в бланках и порядке выписывания препаратов.

### Заключение

1. Позитивный опыт включения некоторых веществ в список III приказа № 681 важно применить и в отношении других ЛС.
2. Необходимо уточнить порядок медицинского освидетельствования по ряду приказов, как это сделано в поправках к приказу № 581н.
3. Предлагаемый законопроект, касающийся ужесточения ответственности аптек за незаконную реализацию, может стать хорошей мерой по сдерживанию утечки препаратов с законного рынка.
4. Повышение уровня осведомленности врачей и провизоров о любых изменениях в формах рецептурных бланков и правилах отпуска ЛС – главный путь своевременного выявления попыток реализации поддельных рецептов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Правительства РФ от 29 декабря 2007 г. № 964 «Об утверждении списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации». Available at: <https://base.garant.ru/12158202/> (дата обращения 25.07.2020).
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 22 апреля 2014 г. № 183н «Об утверждении перечня лекарственных средств для медицинского применения, подлежащих предметно-количественному учету». Available at: <https://base.garant.ru/70705334/> (дата обращения 25.07.2020).
3. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации». Available at: <https://base.garant.ru/12112176/> (дата обращения 25.07.2020).
4. Приказ Минздрава России от 18.12.2015 № 933н (ред. от 25.03.2019) «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)». Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71250220/> (дата обращения 25.07.2020 г.).
5. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 октября 2014 г. № 581н «О Порядке проведения профилактических медицинских осмотров обучающихся в общеобразовательных организациях и профессиональных образовательных организациях, а также образовательных организациях высшего образования в целях раннего выявления незаконного потребления наркотических средств и психотропных веществ». Available at: <https://base.garant.ru/70832674/> (дата обращения 25.07.2020).

## REFERENCES

1. Decree of the Government of the Russian Federation from December 29, 2007 No. 964 «On approval of lists of potent and toxic substances for the purposes of Article 234 and other articles of the Criminal Code of the Russian Federation, as well as large size of potent substances for the purposes of Article 234 of the Criminal Code of the Russian Federation». Available at: <https://base.garant.ru/12158202/> (accessed 25.07.2020). (In Russ.).
2. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from April 22, 2014 No.183n «On approval of the list of medicines for medical use subject to quantitative accounting». Available at: <https://base.garant.ru/70705334/> (accessed 25.07.2020). (In Russ.).
3. Decree of the Government of the Russian Federation from June 30, 1998 No. 681 «On approval of the list of narcotic drugs, psychotropic substances and their precursors, subject to control in the Russian Federation». Available at: <https://base.garant.ru/12112176/> (accessed 25.07.2020). (In Russ.).
4. Order of the Ministry of Health of Russia dated 12/18/2015 No. 933n (as amended on 03/25/2019) «On the procedure for conducting a medical examination for the state of intoxication (alcoholic, narcotic or other toxic)». Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71250220/> (accessed 25.07.2020). (In Russ.).
5. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from October 6, 2014 No. 581n «On the Procedure for conducting preventive medical examinations of students in general educational institutions and professional educational organizations, as well as educational institutions of higher education for the purpose of early detection of illegal consumption of narcotic drugs and psychotropic substances». Available at: <https://base.garant.ru/70832674/> (accessed 25.07.2020). (In Russ.).



## УНИКАЛЬНЫЕ ПЕРЛАМУТРОВЫЕ ПИГМЕНТЫ CANDURIN® ОТ КОМПАНИИ «МЕРК»

### Минеральные пигменты Candurin®:

- Созданы на основе пищевых красителей диоксида титана и/или оксида железа, осажденных на инертный носитель алюмосиликат калия (натуральная слюда)
- Производятся по стандартам GMP и одобрены FDA
- Разрешены к применению в пищевой и фармацевтической промышленности
- Зарегистрированы в России как комплексная пищевая добавка
- Одинаково подходят для капсул и таблеток
- Обеспечивают уникальный перламутровый блеск
- Придают узнаваемость препарату
- Повышают устойчивость препарата к подделкам

ООО «ТД «ХИММЕД» — официальный дистрибьютор компании «Мерк» по блоку «Performance Materials»

Москва, 115230, Каширское шоссе, дом 3, корпус 2, строение 4/9,

Деловой Квартал «Сириус Парк»

+7 (495) 640 4192, (499) 682 6555

develop@chimmed.ru

www.chimmed.ru



## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «**Разработка и регистрация лекарственных средств**», должно соответствовать науке:

- 02.00.00 – химические науки;
- 03.02.00 – общая биология;
- 03.03.00 – физиология;
- 14.04.00 – фармацевтические науки.

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборки и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

### УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате \*.pdf или \*.jpg).

### ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае не-

соответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.  
Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

### ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

### ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (\*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

**Перечень документов**, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

#### 1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

#### 2. РУКОПИСЬ

##### РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией

##### Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.  
Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Цель** (цель работы в сжатой форме).

**Материалы и методы** (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

**Результаты** (основные результаты исследования).

**Заключение** (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

**Введение** (введение работы в сжатой форме).

**Текст** (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

**Заключение** (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtrkb73ae013ofk4g8nrv1>)

**Ключевые слова:** (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

#### АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

##### Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

##### Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

##### Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

##### Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

#### ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

##### Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

##### Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств ([grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru)). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения

на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: Синдрол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9%, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например:  $M$  – выборочное среднее;  $m$  – ошибка среднего;  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение;  $p$  – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа  $M \pm m$ , указать объем выборки  $n$ . Если используются статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариативности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости  $p$  для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами, и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

#### **Результаты и обсуждение**

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

#### **Заключение**

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

#### **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

##### *Конфликт интересов*

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

##### *Источник финансирования*

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

##### *Соответствие принципам этики*

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

##### *Благодарности*

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

#### **ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ**

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

**Не следует ссылаться:** на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

**Следует избегать** ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных, должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

**Недопустимо самоцитирование**, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (in Russ.). Приводится английское название журнала (название сверяется с официальным сайтом издания) через тире после транслитерации названия и оформляется курсивом.

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт [translit.ru](http://translit.ru). В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.
5. В конце описания в круглых скобках указывается (in Russ.).

*Образец оформления списка литературы*

#### **Литература/References**

1. Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб. НИПНИ им. В.М. Бехтерева, 2015:272 [Nasyrova R.F., Ivanov M.V., Neznanov N.G. Introduction to psychopharmacogenetics. St.-Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V.M. Bekhtereva, 2015:272 (in Russ.)].
2. Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013; 15 (1):20–23 [Kolesnik A.P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer] *Onkologija – Oncology*. 2013; 15(1): 20–23 (in Russ.)].
3. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008; 7 (1): 58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.
4. Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt E. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

**В библиографическом описании** каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства, либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

**Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций**

#### **Монографии**

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

#### **Образец оформления**

*Для русскоязычных источников*

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009:328 [Sokolova G. N., Potapova V. B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009:328 (in Russ.)].

*Для англоязычных источников*

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press, 2005: 194.

*Статья из журнала*

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название ста-

тьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

#### **Образец оформления**

*Для русскоязычных источников*

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014; 13 (3): 53–57 [Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014; 13 (3): 53–57 (in Russ.)].

*Для англоязычных источников*

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L. B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006; 113 (4): 306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

**Варианты библиографического описания материалов конференций:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

**Варианты библиографического описания патентов:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

**Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>  
**DOI**

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

#### **ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ**

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

#### **Таблицы**

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ \*. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

#### **Рисунки**

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате \*.tif, \*.jpg, \*.cdr, \*.ai с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



## XXII ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ В СФЕРЕ ОБРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

# ФармМедОбращение 2020

Включено в План научно-практических мероприятий  
Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2020 год  
(Приказ № 109 от 20 февраля 2020 г.)

## ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

### Пленарное заседание

### Секционные заседания

- Фармаконадзор и государственный контроль проведения клинических исследований в Российской Федерации
- Изменения в системе государственного контроля качества лекарственных средств
- Внедрение системы мониторинга движения лекарственных препаратов для медицинского применения
- Вопросы регистрации медицинских изделий в рамках ЕАЭС. Основные ошибки при подготовке комплектов документов
- Регуляторы медицинских изделий: обмен опытом
- Маркировка медицинских изделий
- Экспорт медицинских изделий
- Новые аспекты регистрации лекарственных средств
- Ценообразование на фармацевтическом рынке и государственные закупки лекарств в 2020 году

### Панельная дискуссия

- Развитие российской фармацевтики

### Круглые столы

- Вопросы разработки и производства стандартных образцов на лекарственные препараты
- Вопросы проведения клинических исследований лекарственных препаратов в условиях новой эпидемиологической обстановки

Дополнительная информация на сайте [www.phmo.ru](http://www.phmo.ru)  
и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: [fru@fru.ru](mailto:fru@fru.ru)

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право  
вносить изменения в программу и состав докладчиков

pharmtech  
& ingredients



a Hyve event

Международная  
выставка оборудования,  
сырья и технологий  
для фармацевтического  
производства

10-13  
НОЯБРЯ  
2020

Россия, Москва  
МВЦ «Крокус Экспо»


Получите  
бесплатный билет  
на сайте  
по промо-коду:

pha20T



pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85  
pharmtech@hyve.group



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутagenность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

## МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

[WWW.OLPHARM.RU](http://WWW.OLPHARM.RU)

### Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



### Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21 ФЛ10  
от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09  
от 30.04.2009 на выполнение работ с  
микроорганизмами 3-4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»  
117105, Г. МОСКВА,  
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А  
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36  
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

Москва, 25 ноября 2020  
Moscow, 25 November 2020



**RUDN**  
university

**5100**

The III International scientific conference  
«PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT»

III Международная научно-практическая конференция  
«ГАРМОНИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ»

[pharmdevelopment.rudn.ru](http://pharmdevelopment.rudn.ru)



[PharmDevelopment@pfur.ru](mailto:PharmDevelopment@pfur.ru)

## посвящена памяти профессора В.В.Чистякова

Конференция при участии ведущих отечественных и зарубежных ученых в области фармацевтической разработки, аналитики и контроля качества продукции фармацевтической и пищевой промышленности, а также при участии профильных министерств и ведомств РФ

### КЛЮЧЕВЫЕ ТЕМЫ:

- Интеграция образования, бизнеса и науки: новые научно-образовательные практики и перспективные модели;
- Международная практика фармацевтической разработки;
- Взаимодействие и гармонизация надлежащих практик;
- Фармакогнозия и метаболомика растений в разработке лекарственных средств природного происхождения;
- Роль доклинических и клинических исследований в процессе фармацевтической разработки;
- Современная аналитика в научных исследованиях и оценке соответствия в фармацевтической и пищевой областях.

### ПРИГЛАШАЕМ ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ

Участие бесплатное

Регистрация и подробная информация на сайте: [www.pharmdevelopment.rudn.ru](http://www.pharmdevelopment.rudn.ru)

+7 (499) 739 58 34

[PharmDevelopment@pfur.ru](mailto:PharmDevelopment@pfur.ru)