

Гайдашев Иван Андреевич

**Разработка стандартного образца предприятия для микроэлементного анализа
лекарственного растительного сырья**

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института.

Научный руководитель:

Сыроешкин Антон Владимирович профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Официальные оппоненты:

Джавахань Марина Аркадьевна, доктор фармацевтических наук, доцент, заместитель директора по разработке и внедрению научно-образовательного института фармации им. К.М. Лакина ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» МЗ РФ.

Шорманов Владимир Камбулатович, доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Барышев Михаил Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории физико-химических исследований ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии».

Защита диссертации состоится «13» марта 2025 г. в __ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Макляя, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.021
кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лекарственное растительное сырье является природным источником, как микроэлементов, так и биологически активных органических веществ. Видоспецифическая комбинация микроэлементов, связанных в хелатные соединения или адсорбированных на биополимерах, в значительной степени определяют биологическую активность (Сидельников Н.И., 2016; Зверева В.И. и др., 2020). Лекарственное растительное сырье, которое было собрано или выращено на субстрате ненадлежащего качества, может представлять существенную опасность для здоровья человека ввиду контаминации высокотоксичными элементами. (Jyothsna S., Tefera W. et al., 2020). Поскольку производство ЛРС является крупнотоннажным, а контрольные измерения потоковыми, методика, необходимая для контроля качества должна соответствовать следующим критериям: а) экспрессность непосредственно самого измерения; б) простота пробоподготовки; в) низкие требования к квалификации операторов аппаратно-программных комплексов; г) пробоподготовка, как и сам процесс измерения не должен приводить к изменению матрицы образца и, тем более к ее разрушению, что упростит дальнейший контроль качества.

Методы, наиболее применяемые в микроэлементном анализе, можно распределить на три группы: неразрушающие (нейтрон-активационный анализ, РФА) методы с атомизацией в плазме (ICP-MS, ICP-OES), атомно абсорбционная спектроскопия с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией фона (GZ-AAS), являющийся наиболее чувствительным методом (Frimpong-Manso S. et al., 2015).

В отличие от разрушающих методов РФА может быть использован для одновременного многоэлементного потокового определения и позволяет проводить анализ образцов *in situ* (He S., Niu Y. et al., 2024). Несмотря на очевидные преимущества, главным недостатком данного метода является наличие эффекта сложной органической матрицы, представляющего собой влияние диэлектрически неоднородного органического микроокружения на интенсивность рентгеновской флуоресценции, что влияет на конечные результаты измерений содержания элементов.

Применение образцов сравнения в аналитических испытаниях является рутинной процедурой, позволяющей получать наиболее представительные данные.

Мировая практика QA/QC в микроэлементном анализе сложных матриц обычно предполагает использование референс-образца МАГАТЭ или Национального института стандартов и технологий, США. Качественная система пробоподготовки референс-образца, в особенности для образцов со сложной органической матрицей, позволяет существенно уменьшить расширенную неопределенность метода. Также, широко используется практика интеркалибраций, организованных МАГАТЭ (*Coquery M., et al., 1999*).

В настоящей работе был разработан прототип отечественного референс-образца – однородного монодисперсного лиофилизированного порошка из побегов *Kalanchoe daigermontiana*. Образец был изготовлен и охарактеризован в соответствие с международными практиками элементного анализа в качестве стандартного образца предприятия.

Степень разработанности темы исследования.

Предыдущие исследования, выполненные коллективом кафедры в области инструментальных методов элементного анализа (*Syroeshkin A.V., Chichaeva M.A., et al., 2019*); использование стандартных образцов с органической матрицей (*Makarova M.A., Syroeshkin A.V. et al., 2020*); определение показателей, свидетельствующих о жизнеспособности яиц покоя *A. salina* (*Nikolaeva Y.G., Syroeshkin A.V., et al., 2007*); внесли значительный вклад подготовку к решению задач, поставленных в рамках диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует формуле специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 5 и 6 паспорта специальности:

Пункт 5 – Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье.

Пункт 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Объект исследования. В рамках диссертационной работы объектами исследования являлись свежие, гомогенизированные, высушенные побеги *K. daigremontiana*, прототип стандартного образца, изготовленного из побегов *K. daigremontiana*, стандартный образец МАГАТЭ SRM 2976, яйца покоя *A. salina*, споры *Lycopodium sp.*, интактная и денатурированная вакцина VLP-SARS-CoV-2.

Предмет исследования.

Предмет диссертационного исследования – поиск физико-химических показателей, указывающих на стабильность образца после прохождения установленного процесса пробоподготовки. Установление новых физико-химических показателей, определяющих жизнеспособность дормантных форм.

Цель работы заключалась в разработке стандартного образца предприятия для элементного анализа лекарственного растительного сырья, включая экспресс-определение с помощью РФА.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Оптимизировать условия пробоподготовки побегов *K. daigremontiana* для получения монодисперсного однородного порошкообразного образца, пригодного для длительного хранения в стандартных лабораторных условиях, который будет прототипом стандартного образца предприятия для элементного анализа лекарственного растительного сырья.

2. Разработать методику экспресс-тестирования сухих порошкообразных образцов на предмет обнаружения жизнеспособных, дормантных форм.

3. С помощью метода РФА изучить долговременную стабильность элементного состава порошкообразного образца *K. daigremontiana*.

4. Провести межлабораторные интеркалибрации по определению элементного состава прототипа стандартного образца предприятия, изготовленного из побегов *K. daigremontiana*.

5. Провести валидацию методики изготовления стандартного образца по следующим характеристикам: специфичность, предел количественного определения, правильность, повторяемость, воспроизводимость, робастность.

Научная новизна работы. Впервые был разработан прототип референс-образца для элементного анализа сырья со сложной органической матрицей с использованием метода РФА. Впервые на основе метода интегральной спектроскопии

в миллиметровой области длин волн был разработан способ контроля жизнеспособности дормантных форм.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе обнаружено общебиологическое явление, отражающее фоновый метаболизм спящих форм, при котором конформационная подвижность внутриклеточных наночастиц (олигомерных белков и нуклеопротеидов) сопровождается радиотепловой эмиссией.

Стандартный образец предприятия позволит обеспечить внутрилабораторный контроль качества и другие виды метрологического контроля при экспресс-анализе лекарственного растительного сырья и может лежать в основе создания стандартных образцов более высокого ранга (отраслевых, государственных и национальных эталонных мер). Разработанный метод контроля жизнеспособности дормантных форм может быть применен в фармации для экспресс-контроля жизнеспособности лиофилизированных бактериальных препаратов и поиска контаминаций в ЛРС.

Методология и методы:

Согласно федеральному закону № 184-ФЗ «О техническом регулировании» метрологическое обеспечение достоверности измерений достигается за счет стандартных образцов от уровня предприятий до общенациональных, при этом, единицы измерения восходят к первичному государственному эталону. В международной практике референс-образцы являются продуктом интернациональных сличений и интеркалибраций. Для элементного анализа ЛРС, как образца со сложной органической матрицей, использование стандартных образцов (reference samples) является ключевым условием внутрилабораторного контроля качества. В настоящей работе мы сосредоточились на разработке и изготовлении стандартного образца предприятия для обеспечения университетских учебных и научных лабораторий. В работе были применены следующие инструментальные методы: РФА (рентгенофлуоресцентный анализ), GZ-AAS (Graphite Zeeman Atomic absorption spectrometry/атомно-абсорбционная спектрометрия с Зеемановской коррекцией фона), ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry/масс спектрометрия с индуктивно связанной плазмой) LALLS (low-angle laser light scattering/малоугловое рассеяние лазерного света), ЯМР – спиновое эхо, интегральная спектрометрия в миллиметровом диапазоне длин волн.

Положения, выносимые на защиту.

1. Стандартный образец предприятия из ЛРС будет демонстрировать многомесячную устойчивость рентгеновской флуоресценции, повторяемость и воспроизводимость результатов, при условии отсутствия жизнеспособных клеток (отсутствие любой биогеохимической активности), что достигается эффективным высушиванием и однородным диспергированием.

2. Полная характеристика элементного состава возможно только при комплексировании данных по рентгеновской флуоресценции, ААС с Зеемановской коррекцией фона и ICP-MS.

3. Разработанная и валидированная методика пробоподготовки позволит проводить экспресс-анализ лекарственно-растительного сырья методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии, нивелируя матричный эффект сложной органической матрицы.

Степень достоверности полученных результатов

В данной работе применялся международный стандартный образец SRM 2976, разработанный в МАГАТЭ и аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий NIST, USA на основании результатов сличений при участии более 140 лабораторий мира. Все измерения проводились с 3-5 повторами, и с многократным анализом на воспроизводимость. Анализ прототипа референс-образца методами GZ-AAS и ICP-MS проводился в ведущих лабораториях элементного анализа, входящих в первую группу, лабораторий, проходящих интеркалибрацию в системе МАГАТЭ на протяжении 15 лет, аккредитованных на техническую компетентность в РФ и имеющих лицензии МЗ РФ.

Апробация результатов исследования по диссертации проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (25.04.2024., протокол № 0300-35-04/12). Основные результаты исследования представлены в 4 публикациях в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus – 3, CAS – 1), а также в тезисах и устных докладах: III International Conference on Modern Research in Biological, Pharmaceutical, Medical and Environmental Sciences (Indian Academicians and Researchers Association, 9 октября 2022), II International scientific conference «Catalysis for a Sustainable World» (Москва, 12-15 декабря 2023), XII всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с

международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (12; 2022; Санкт-Петербург).

Личный вклад автора состоит в проведении экспериментальных исследований, обработке результатов, анализу полученных данных и подготовке публикаций в соавторстве с научным коллективом кафедры и научными сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии. Работа выполнена с применением лабораторного оснащения кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы (181 источник) и приложения. Основная часть диссертации включает 6 таблиц и 31 рисунок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

1. Лекарственное и неофицинальное растительное сырьё: Каланхое Дегремона побеги (*Kalanchoe daigremontiana*) (ФС.2.5.0115, XV ГФ РФ), Березы листья (*Betula pendula*) (ФС.2.5.0005, XV ГФ РФ).

Прочие образцы: стандартный образец МАГАТЭ SRM 2976, яйца покоя *A. salina*, споры *Lycopodium sp.*, вакцина VLP-SARS-CoV-2.

1.1. Диспергирование образцов

Побеги были срезаны не более чем за 10 мин до начала гомогенизации. Измельчение проводилось с помощью гомогенизатора роторного типа «свободного, прямого удара» (по Румпфу), в течение 15 минут до достижения однородности.

1.2. Высушивание образцов

Далее, гомогенизированное сырьё помещалось в пластиковые, герметично закрываемые контейнеры и помещалось в лиофилизатор. Лиофильная сушка сырья проводилась на аппарате Benchtop Freeze Dryer (Labconco, Канзас, США) при -75°C до полного прекращения истечения конденсата. Потеря массы при высушивании 85 ± 2 %.

1.3. Измельчение высушенного образца

Проводилось с помощью метода прямого ножевого удара с помощью мельницы ЛМ-202 (Плаун, Москва, Россия) в течение 2 мин. Температура в камере измельчителя не превышала 30 °С.

1.4. Просеивание образцов

Просеивание материала осуществлялось с помощью нейлонового сита <63 мкм до полного отделения механических включений.

1.5. Определение дисперсного состава

В рамках испытания на однородность, с целью достижения повторяемости измерений образцов, отобранных из общей пробы, был проведен дисперсный анализ с помощью метода LALLS (малоугловое лазерное светорассеяние) Master Sizer 2000 (Malvern Panalytical, Великобритания).

1.6. Методы элементного анализа

Рентгенофлуоресцентный анализ

Измерения производились на энергодисперсионном рентгено-флуоресцентном спектрометре EDX-7000 Shimadzu (Shimadzu Corporation, Киото, Япония). Диапазон измеряемых элементов - 11Na - 92U; рентгеновский генератор – трубка с Rh-анодом, воздушное охлаждение; напряжение 4–50 кВ, ток 1–1000 мкА; облучаемая площадь – окружность диаметром 10 мм; кремниевый дрейфовый детектор (SDD), метод подсчета – цифровой счетный фильтр; содержание элементов по значению интенсивности; автоматическая смена фильтров, выделяющих длины волн соответствующих элементов; размер камеры 300 мм x 275 мм x 100 мм.

Перед проведением измерений образцы были помещены в кювету РФА закрытого типа и герметично запечатан майларовой плёнкой толщиной 6 мкм (DuPont de Nemours & Co., Вилмингтон, США). Образец в кювете устанавливали на окно прибора, площадь облучения регулировалась коллиматором и составляла 10 мм. Каждый раз измеряли тот же образец в той же кювете – для того, чтобы избежать влияния случайных факторов. Для измерения концентрации элементов были использованы следующие энергии квантов рентгеновской эмиссии: S – K α 2,308 keV; K – K α 3,313 keV; Ca – K α 3,69 keV; Mn – K α 5,9 keV; Fe – K α 6,4 keV; Cu – K α 8,04

keV; Zn – K α 8,64 keV. Время исследования – 50 секунд при каждой длине волны, спектр излучения измеряется трижды.

Методика изготовления прототипа референс-образца предполагает контроль элементного состава на каждом этапе пробоподготовки, определяя следующие образцы: край листа до гомогенизации, середина листа, гомогенизированное сырье, замороженное сырье сухое сырье после гомогенизации, измельченное сырье, просеянное, 6 разных образцов после просеивания, разделенных по методу квартования.

Атомно-абсорбционная спектроскопия с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией фона

Атомно-абсорбционная спектроскопия представляет собой разрушающий метод элементного анализа, основанный на поглощении исследуемыми элементами излучения с соответствующей их резонансному переходу длиной волны. Образцы лекарственного растения минерализовали в 10 мл царской водки в тефлоновых бомбах, на протяжении суток. Далее, инкубировали при повышенном давлении в микроволновой печи (MDS 2000, SEM Corporation, Мэтьюз, США), в режимах: 140 с при мощности 80% и 300 с при мощности 100%.

Измерения проводились на приборе фирмы Agilent, модель 240Z AA (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, США) с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией фона (*Morozova M.A. et al., 2020*).

Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой.

К образцам сырья массой 50 мг добавляли 1 мл 72%-ной HNO₃ (Merc Life Science LLC, Москва, Россия) и озоление вели в ультразвуковой ванне с термостатом при температуре 70-90°C в течение 30 мин. Далее к образцам сырья прибавляли по 0.4 мл 30%-ной перекиси водорода (Merc Life Science LLC, Москва, Россия) и выдерживали в ультразвуковой ванне при тех же условиях в течение 30 мин. Полученные растворы анализировали на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500 ce (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, США). Пробы вводили с помощью концентрического кварцевого распылителя, скорость подачи 400 мкл/мин, режим подачи – самораспыление. Применялась кварцевая распылительная камера Скотта, кварцевая горелка с системой Shield Torch (*Thabit TMAM et.al., 2020*).

1.7. Интегральная спектроскопия радиотеплового диапазона

Плотность потока радиотеплового излучения в миллиметровом диапазоне длин волн определяли с помощью прибора TES - 92 (TES Electrical Electronic Corp., Тайбэй, Тайвань) с датчиком, настроенным на анизотропное измерение вдоль оси Z. Препараты нагревались до температуры 37 °С при помощи твердотельного термостата с элементами Пельтье (Термо 24-15 Биоком, Россия). Фоновое излучение не превышало 1 $\mu\text{W}/\text{m}^2$ (Petrov G.V. et. al., 2024).

1.8 Метод ЯМР – спиновое эхо

Приборы, использовавшиеся в исследовании спин-спиновой релаксации протонов: XL-100 (Varian, Paolo Alto, California, USA), Avance 600 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). Изменение температур обеспечивалось блоком с жидким азотом. Сигнал разделялся на компоненты и для каждой компоненты изучались T_1 , T_2 . Метод ядерного магнитного резонанса дает широкий набор параметров (форма, ширина, площадь и положение резонансной линии; времена спин-решеточной T_1 и спин-спиновой релаксации T_2), в которых отражается молекулярная динамика. Установка работала на частоте 20 МГц. T_2 может быть измерено в диапазоне от 10^{-5} до 10^2 с.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Разработка стандарта для микроэлементного анализа лекарственного растительного сырья

Метод рентгенофлуоресцентной спектроскопии наиболее эффективен при анализе образцов с неорганической матрицей. Анализ материалов со сложной органической матрицей, коим является лекарственно-растительное сырье, сопряжен с трудностями, поскольку ЛРС является объектом со сложной органической матрицей. Было доказано, что для достоверного определения элементного состава методом рентгено-флуоресцентной спектроскопии необходимо использовать образец сравнения с органической матрицей идентичного тому лекарственно-растительному сырью, которое предполагается определять.

2.2. Определение дисперсного состава

По результатам проведенного дисперсного анализа методом LALLS, был установлен максимум распределения на 60 мкм. Доказательство дисперсной однородности является важным этапом при создании стандартного образца, поскольку, в случае наличия большего количества дисперсных фракций, повторяемость

измерений на РФА снизится из-за неоднородного распределения элементов по различным фракциям. В особенности, данный эффект будет проявляться при хранении образца.

2.3. Определение однородности методом квартования с использованием РФА

Достижение однородности дисперсной фракции является необходимым условием для обеспечения повторяемости результатов. Данные об однородности, полученные методом LALLS были подтверждены с помощью анализа трех независимых образцов прототипа референс-образца методом РФА (рис.1).

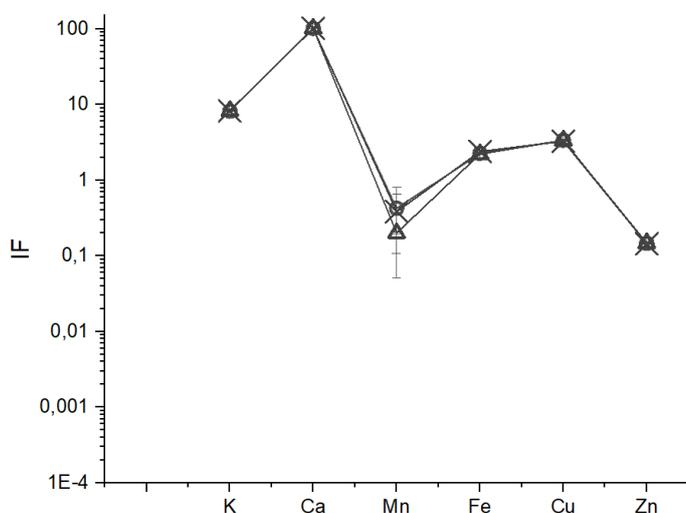


Рисунок 1. Испытания независимых образцов, разделенных по методу квартования на однородность с помощью РФА. Интенсивность флуоресценции нормирована по протоколу Shimadzu. Три независимых образца обозначены следующими символами: треугольник, кружок, крестик.

Источник: составлено автором

Традиционно, метод квартования ЛРС применяется в фармакогнозии для обеспечения максимальной однородности пробы. Результаты элементного анализа свидетельствуют о приемлемой однородности образца.

2.4. Элементный профиль *K. daigremontiana* на различных этапах пробоподготовки

Анализ методом РФА высушенного цельного сырья показал следующие средние значения по массовой концентрации элементов: S – 0,17% (RSD=0,12), K – 1,25% (RSD=0,002), Ca – 3,95% (RSD=0,006), Mn – 0,0196% (RSD=0,0078), Fe – 0,003% (RSD=0,29), Cu – 0,005% (RSD=0,02), Zn – 0,004% (RSD=0,007). Для высушенного сырья измельченного, до просеивания: S – 0,151% (RSD=0,02), K – 1,48% (RSD=0,0012%), Ca – 3,93% (RSD=0,0032), Mn – 0,0053% (RSD=0,058), Fe – 0,0308% (RSD=0,027), Cu – 0,96 (RSD=0,037), Zn – 0,007 (RSD=0,023%). После просеивания: S –

0,176% RSD=0,054), K – (1,44% RSD=0,0010), Ca – 3,97% RSD=0,003), Mn – 0,0054% (RSD=0,18), Fe – 0,032% (RSD=0,003), Zn – (0,007% RSD=0,024), Cu – 0,0104% (RSD=0,06) (рис.2).

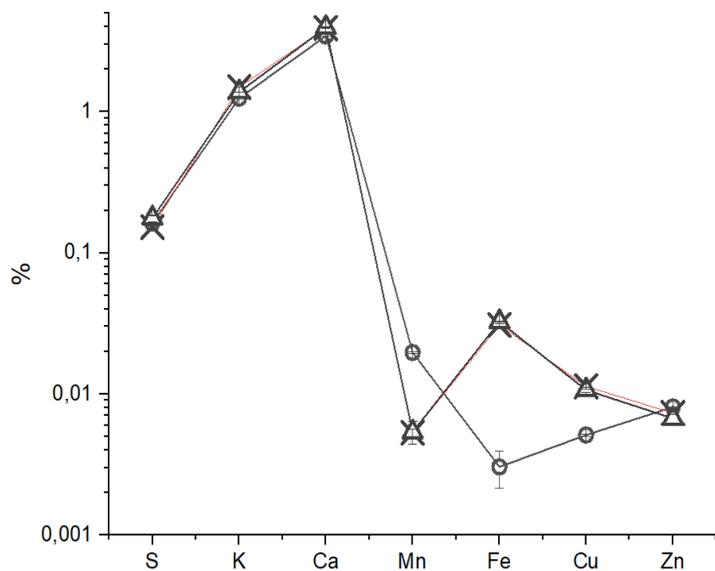


Рисунок 2. Контроль содержания микроэлементов на различных этапах пробоподготовки для выполнения микроэлементного анализа по методу РФА для образцов: цельного сухого (крестик), измельченного (кружок) и просеянного измельченного (треугольник) лекарственного растения (прототип референс-образца). Абсолютные значения погрешности указаны в тексте.

Источник: составлено автором

Отклонение содержания микроэлементов на различных этапах пробоподготовки референс-образца обусловлено неоднородным распределением элементов в сырье и постепенным увеличением однородности после измельчения и просеивания. Измельчение и просеивание гомогената образцов является стандартной практикой в пробоподготовке образцов для элементного анализа, значительно повышающей повторяемость результатов измерений (*Coquery M., et al., 1999*). Концентрация большинства элементов возросла, что обусловлено поглощением рентгеновской флуоресценции молекулами воды. Также, было обнаружено уменьшение ошибки в рамках измерения одного образца в порядке: цельное сухое>измельченное сухое, до просеивания>после просеивания.

По мере увеличения однородности сырья, было показано увеличение концентраций: K, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu и снижение концентрации S, по-видимому, обуславливающегося наличием летучих соединений серы.

2.5. Проведение внешнелабораторного сличения

Межлабораторные сличения широко применяются в контроль-аналитических лабораториях по всему миру. В частности, МАГАТЭ на постоянной основе проводит межлабораторные сличения путем рассылки лабораториям-участникам (<https://analytical-reference-materials.iaea.org/certified-reference-materials>). В настоящей работе сличения проводились с участием лабораторий, входящих в первую группу по результатам сличений, организованных МАГАТЭ.

Наименьшее отклонение результатов, полученных методом РФА от эталонного метода ICP-MS наблюдается для К (20%), Са (<1%), GZ-AAS – Fe (15%), Zn (23%). Большее отклонение содержания остальных элементов от эталонного метода GZ-AAS обуславливается более низким пределом обнаружения у методов ICP-MS и РФА и соответственно, большей ошибкой.

Воспроизводимость и робастность полученных данных строго зависит от отсутствия биогеохимической активности в стандартном образце предприятия. Мы сочли необходимым разработать экспресс-метод обнаружения живого вещества в порошкообразных субстанциях, взвесьях и суспензиях.

2.6 Состояние прочносвязанной воды и жизнеспособности dormantных порошкообразных форм

Как известно, состояние воды в объемной фазе, в двойном электрическом слое и прочносвязанном состоянии в кристаллогидратах и коллоидных частицах может охарактеризовано по времени спин-спиновой релаксации (T_2) методом ЯМР-спиновое эхо (Nikolaeva Y.G., Goncharuk V.V. et. al., 2007; 2011). T_2 для молекул связанной воды составляет 2 с, для слабосвязанной воды 100-200 мс, для прочносвязанной воды (не удаляемой при высушивании – 5-15 мс, для льда – 50 мкс.

В рамках определения кинетики изменения содержания при хранении в яйцах покоя *A. salina*, был применен метод ЯМР-спиновое эхо. Полученные данные иллюстрируют значительное снижение, до с 2,5 до 1 мг H₂O на 1 г биомассы (Рис. 1) при хранении в климатической камере с постоянной температурой $t=23^{\circ}\text{C}$ и влажностью 75%.

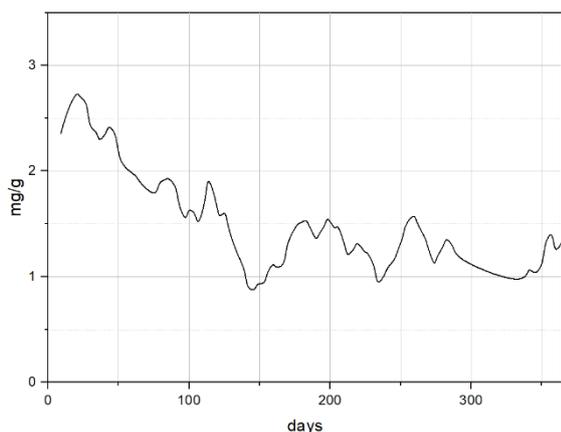


Рисунок 3. Изменение содержания слабосвязанной воды со ($T_2=220$ мс) в яйцах покоя *A. salina* по данным ЯМР-спиновое эхо. Все эксперименты проводили в климатической камере, обеспечивающей постоянство температуры 23°C и влажности 75 %

Источник: составлено автором

Такое медленное высушивание не влияет на всхожесть яиц покоя, отражая фоновый метаболизм живых яиц, застывших в стадии ранней гастрюляции. При ускоренном высушивании (9 часов при 150 °C) яйца покоя теряют всхожесть (то есть погибают), причем содержание воды падает до 0,5 мг/г. Время спин-спиновой релаксации T_2 протонов живых яиц покоя и контрольного образца мертвых яиц покоя при 20° C составило 220 и 95 мс соответственно. Таким образом, время спин-спиновой релаксации у мертвых яиц покоя достоверно уменьшается, что свидетельствует об изменении фракции подвижных протонов и подтверждается уменьшением содержания воды (Табл. 1).

Таблица 1. Время релаксации T_2 протонов и общее содержание воды в образцах живых и умерщвлённых при температуре 150°C в течение 9 часов яиц покоя *A. salina*.

Образец <i>A. salina</i>	Время T_2 релаксации; мс	Содержание воды; мг/г
Живые	220±30	3
Мертвые	95±7	0,5

Следует отметить, что дегенеративных изменений в ткани не обнаружено при гистологическом исследовании.

Ранее мы предлагали способ различения живых и мертвых яиц покоя по характеристикам элементных профилей, полученных методом GZ-AAS после мокрого озоления в тефлоновых бомбочках при облучении микроволновым излучением и

повышенным давлением, а также, методом РФА (Syroeshkin A.V. et. al. 2017). Этот метод элементного анализа, равно как и ЯМР-спиновое эхо, требует дополнительного подтверждения жизнеспособности дормантных форм, включая их способность к прорастанию. В настоящей работе был предложен новый экспресс-метод контроля жизнеспособности дормантных форм на основе детекции радиотеплового излучения.

2.7. Экспресс-определение жизнеспособности порошкообразных дормантных форм, субстанций биологического происхождения.

В недавней работе мы показали, что биологически активные наночастицы неправильной формы способны при поляризации испускать радиоизлучение в миллиметровом диапазоне. Плотность потока этого излучения зависит от температуры, особенностей строения наночастиц, их нативности, их концентрации, что позволяет применять этот метод для химико-аналитического контроля настоев лекарственных растений и вакцин (Petrov G.V. et. al. 2024).

Конформационная подвижность биополимеров живых и мертвых яиц покоя была доказана путем контроля эмиссии радиотеплового излучения дормантных форм порошкообразных яиц покоя *A. salina*, спор *Lycopodium sp.*, суспензии вакцины VLP-SARS-CoV-2 и свежие гомогенизированные побеги *K. daigremontiana*. При измерении в течение 20 минут указанные образцы показали значимое увеличение радиотеплового излучения от 7 мкВт/м² до 35 мкВт/м², при фоновых значениях <1 мкВт/м² (Рис. 4).

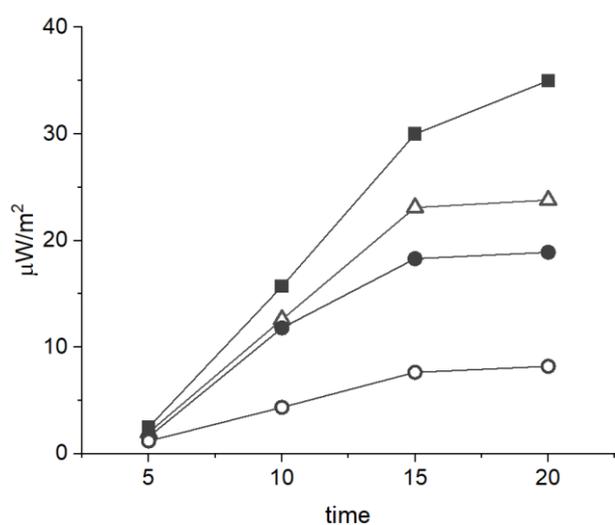


Рисунок 4. Радиотепловое излучение образцов вакцина VLP-SARS, порошкообразных спор *Lycopodium sp.*, обозначены треугольником, порошкообразных яиц покоя *A. salina*, обозначены залитым кружком и гомогенизированных листьев *K. daigremontiana*, обозначены полым кружком.

Источник: составлено автором

Биологически активные наночастицы растительного или животного происхождения, выделенные из живых тканей, сохраняют свойства живого в искусственной среде, поддерживающей их в нативном состоянии (буфер, заданная ионная сила, осмоляльность, ограниченный интервал температур). Изменение условий хранения выделенных наночастиц приводит, как известно, к их денатурации с минутной кинетикой. Мы предположили, что наночастицы живой клетки (олигомерные мембранные и поверхностные белки, нуклеопротеиды, пептиды) будут излучать только в составе живой клетки. Действительно, плотность потока радиотеплового излучения порошкообразных форм и суспензий падает у мертвых образцов в 3-10 раз (Таблица 2).

Таблица 2. Плотность потока радиотеплового излучения живых и мертвых яиц покоя *A. salina*, нативной и денатурированной вакцины VLP-SARS-CoV-2, гомогената свежеприготовленный и лиофилизированный гомогенат побегов *K. Dagermontiana*

Образец	Исходный образец, %	Обработанный образец, %
<i>A. salina</i> ¹	100	14
VLP-SARS-CoV-2 ²	100	10
Побеги <i>K. dagermontiana</i> ³	100	30

1 - 100% соответствует плотности потока излучения 19 мкВт/м² от 1.0 г препарата яиц покоя *A. salina* при 37°C.

2 - Излучение 100% соответствует плотности потока излучения 35 мкВт/м² от 0,5 мл препарата VLP-SARS-CoV-2 с концентрацией по белку 160 мкг/мл при 23°C.

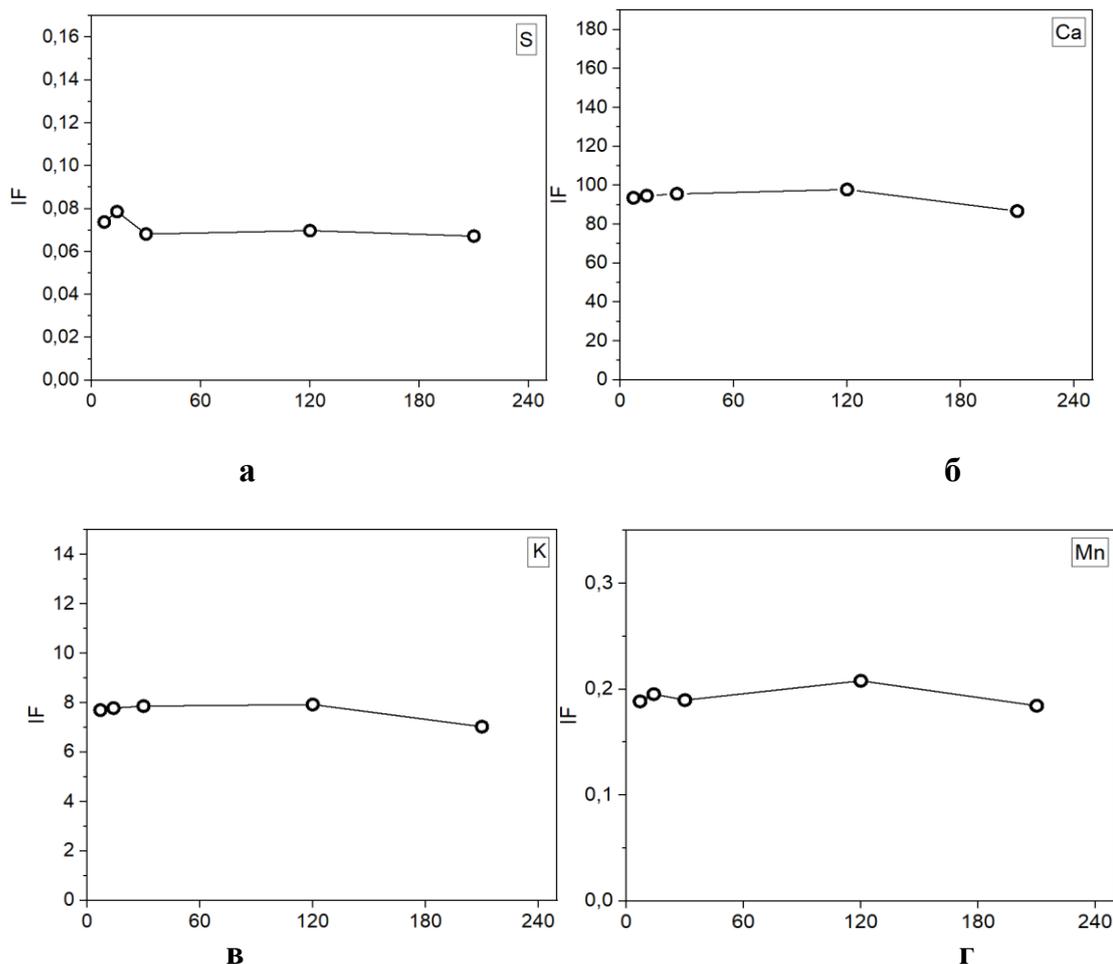
3 - Излучение 100% соответствует плотности потока излучения 7 мкВт/м² от 1.0 г свежеприготовленного гомогената.

Меньшая плотность потока для референс-образца и мертвых яиц покоя свидетельствует о прекращении конформационной активности супрамолекулярных образований органической матрицы и является еще одним доказательством существенного влияния проводимой пробоподготовки на стабильность образца. Супрамолекулярные образования-излучатели, по-видимому, распределены в клеточных структурах, обладающими поглощающей способностью, что нивелируется

при гомогенизации и выходе данных структур из клеточной матрицы. Данное явление может носить видоспецифичный характер, ввиду структурно различающихся супрамолекулярных излучателей. Существенное изменение плотности потока радиотеплового излучения у живых яиц покоя свидетельствует об изменении диэлектрической проницаемости среды, влияющей на выход рентгеновской флуоресценции, обусловленной конформационными переходами. У мертвых яиц покоя такого увеличения не наблюдалось. Данная методика позволит предотвращать риск контаминации жизнеспособными формами микроорганизмов, в том числе патогенными, при изготовлении фармацевтических субстанций на животной, бактериальной и растительной основах.

2.8 Испытания на стабильность стандартного образца.

В настоящей работе устойчивость была доказана путем измерения в течение 210 дней. По результатам тестирования, образец показал высокую стабильность. Наибольшее изменение содержания элементов было не более 15 % (Рис. 5-8).



Источник: составлено автором

Рисунок 5-8. Кинетика изменения содержания микроэлементов в СОП (стандартный образец предприятия; IF – интенсивность флуоресценции): а – S, б – Ca, в – K, г – Mn.

3. Валидация методики определения элементного состава стандартного образца предприятия

3.1 Основные этапы пробоподготовки СОП.

Методика включает в себя:

1) Проведение пробоподготовки, включающую в себя:

А) Срезание побегов *K. daigremontiana*. (не более чем за 10 минут до начала гомогенизации)

Б) Гомогенизацию с помощью гомогенизатора роторного типа прямым ножевым ударом в течение 15 минут.

В) Лиофильная сушка сырья при -75°C до полного прекращения конденсации.

Г) Просеивание сырья с помощью нейлонового сита с диаметром ячеек <63 мкм.

Д) Разделение просеянного сырья на 6 независимых образцов методом квартования.

3.2 Валидационные испытания

1) **Специфичность** была доказана путем измерения рентгеновской флуоресценции элементов с соответствующими длинами волн эмиссии, которые содержатся в образце *K. daigremontiana*, прошедшим пробоподготовку. Таким образом, эмиссия на характеристической энергии кванта для каждого элемента обуславливает специфичность данной методики. Были применены следующие энергии квантов возбуждающего рентгеновского излучения: S – K α 2,308 keV; K – K α 3,313 keV; Ca – K α 3,69 keV; Mn – K α 5,9 keV; Fe – K α 6,4 keV; Cu – K α 8,04 keV; Zn – K α 8,64 keV. Время исследования – 50 секунд при каждой длине волны, спектр излучения измеряется трижды.

2) С помощью данной методики были получены представительные данные, свидетельствующие о наличии определенных элементов в образце. В качестве доказательства по показателю "**Подлинность**", элементный состав, полученный методом XRF, сравнивался с классическим методом GZ-AAS.

3) **Повторяемость** доказана путем выполнения измерения образцов в трех повторах в рамках определения однородности 6 независимых образцов. Относительное

стандартное отклонение не превышало 5% для всех элементов в 6 образцах, кроме S. Относительное стандартное отклонение для 18 повторов (6 образцов по 3 повтора) составило: для К – 0,41%; Са – 0,25%; Мп – 13,7%; Fe – 4,3%; Zn – 1,8%, Cu – 4,0 %.

4) **Внутрилабораторная прецизионность** была доказана путем проведения измерения с разностью в 6 месяцев. Данная характеристика показывает устойчивость к легко контролируемым условиям, таким как день измерения, температура, и может быть доказана измерением интенсивности рентгеновской флуоресценции как на малом временном промежутке, так и на большом. Наибольшее различие в интенсивностях характеристической рентгеновской флуоресценции наблюдается для элемента S, что в сочетании с существенным стандартным отклонением не позволяет провести валидацию по данному элементу. Существенного отклонения по остальным элементам не отмечалось.

5) **Воспроизводимость** была доказана в рамках проведения межлабораторных сличений, организованных в соответствии с рекомендациями МАГАТЭ. Сличения проводились в трех независимых лабораториях методами ICP-MS, GZ-AAS, РФА. По данным межлабораторной интеркалибрации по определению элементного состава СОП наименьшие отличия данных экспресс-метода РФА от методов с прободготовкой путем мокрого озоления: РФА/ICP-MS для К – 20%, для Са – <1%; РФА/GZ-AAS для Fe – 15%, для Zn – 23%.

б) **Робастность** (устойчивость). Крайне важным фактором в устойчивости референс образца, в особенности органического, является режим хранения, который не будет допускать изменения органической матрицы и соответственно, интенсивности сигнала рентгеновской флуоресценции. В случае стабилизированного с помощью определенной прободготовки образца, возможно хранение при более высокой температуре. В настоящей работе устойчивость была доказана путем измерения в течение 210 дней. По результатам тестирования, образец показал высокую стабильность. Наибольшее изменение содержания элементов было не более 15 %.

На основании валидационных испытаний и межлабораторных сличений был подготовлен стандарт предприятия № СОП 001-2024 РУДН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработана методика пробоподготовки стандартного образца предприятия для микроэлементного анализа сырья со сложной органической матрицей *K. daigremontiana* семейства Толстянковые. Показано, что используемая процедура пробоподготовки стабилизирует органическую матрицу, блокирует биогеохимическую активность растительного сырья, что позволяет использовать СОП на протяжении долгого времени (>1 года), а также, применять данную методику пробоподготовки для всех образцов, представляющих собой сложную органическую матрицу. Методика элементного экспресс-анализа СОП была валидирована на основании следующих характеристик: специфичности, повторяемости, воспроизводимости, робастности. Разработанная методика позволяет проводить неразрушающий экспресс-контроль элементного состава в органических образцах методом РФА и осуществлять дальнейшую наработку стандартных образцов на основе биологических материалов с целью расширения области применения данного метода. Разработанный СОП охарактеризован с применением трех методов элементного анализа (ICP-MS, GZ-AAS и РФА) и используется в аналитических кафедральных лабораториях РУДН (введён в эксплуатацию) в установленном порядке.

ВЫВОДЫ

1. Создан прототип стандартного образца предприятия (СОП) на основе побегов *K. daigremontiana* в виде лиофилизированного порошка для внутрилабораторного контроля качества элементного анализа образцов со сложной органической матрицей - лекарственного растительного сырья. Элементный состав СОП по данным РФА: К (14290 ± 60 мкг/г); Са (39830 ± 100 мкг/г); Мп (48 ± 7); Fe (320 ± 14 мкг/г); Zn (74 ± 1 мкг/г); Cu (105 ± 4 мкг/г).

2. Создана методика экспресс-тестирования сухих порошкообразных образцов на предмет обнаружения жизнеспособных, дормантных форм на основе радиотеплового излучения бионаночастиц в миллиметровом диапазоне длин волн. Показано, что доля биогеохимически активной биомассы в СОП – менее 0,1 %.

3. Показано, что СОП представляет собою монодисперсный однородный порошок со средним размером частиц – 60 мкм) пригодный для длительного хранения в стандартных лабораторных условиях: по данным метода РФА элементный состав СОП стабилен (изменения – менее 0,2 %) в течение 210 дней.

4. По данным межлабораторной интеркалибрации по определению элементного состава СОП наименьшие отличия данных экспресс-метода РФА от методов с прободготовкой путем мокрого озоления: РФА/ICP-MS для К – 20%, для Са – <1%; РФА/GZ-AAS для Fe – 15%, для Zn – 23%.

5. Проведена валидация экспресс-метода определения элементного состава СОП экспресс-методом РФА по следующим характеристикам: специфичность, воспроизводимость, робастность; повторяемость: относительная погрешность для К – 0,4%; для Са – 0,25%; для Мп – 14%; для Fe – 4%; для Zn – 1,8%, для Cu – 4,0 %.

Основное содержание диссертации указано в следующих работах:

Статьи в журналах, индексируемых в Scopus, CAS

1. **Gaidashev I. A.** Development of a reference sample for rapid analysis of an elemental composition of medicinal plant raw materials / **I. A. Gaidashev**, A. V. Syroeshkin // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2024. – Т. 16. – № 2. DOI: 10.22159/ijap.2024v16i2.49870.

2. **Gaidashev I.A.** Development of a technique for determining the viability of dormant organisms in powdered substances / **I.A. Gaidashev**, Y.G. Nikolaeva, A.V. Syroeshkin // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2024. – Т. 14. – №. 3. – С. 60-65. DOI: 10.22270/jddt.v14i3.6467.

3. Syroeshkin, A.V. Radiothermal Emission of Nanoparticles with a Complex Shape as a Tool for the Quality Control of Pharmaceuticals Containing Biologically Active Nanoparticles / A.V. Syroeshkin, G.V. Petrov, V.V. Taranov, T.V. Pleteneva, A.M. Koldina, **I.A. Gaydashev**, E.S. Kolyabina, D.A. Galkina, E.V. Sorokina, E.V. Uspenskaya, I.V. Kazimova, M.A. Morozova, V.V. Lebedeva, S.A. Cherepushkin, I.V. Tarabrina, S.A. Syroeshkin, A.V. Tertyshnikov, T.V. Grebennikova // Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15. – № 3. – С. 966. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030966.

4. Petrov, G.V. Physical and chemical characteristics of aqueous colloidal infusions of medicinal plants containing humic acids / G.V. Petrov, **I.A. Gaidashev**, A.V. Syroeshkin // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2023. – Т. 16. – №. 1. – С. 76-82. DOI: 10.22159/ijap.2024v16i1.49339.

Статьи в сборниках конференций

5. **Gaidashev I. A.** Express quality control of products after aerosol cameras of the fluidized bed by radiation of nanoparticles / G.V. Petrov, **I.A. Gaidashev**, V.V. Taranov, A.V. Syroeshkin // Int. J. of Adv. and Innov. Res. – 2022. – V. 9. – N 3. – P. 137-140. (дата публикации 09.09.22).

6. **Гайдашев И.А.** Разработка прототипа референс-образца для экспресс-анализа элементного состава лекарственного растительного сырья / **Гайдашев И.А.** // «Молодая фармация – потенциал будущего», XII всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием (2022; Санкт-Петербург). Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего», 14 марта – 18 апреля 2022г. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ. – 2022. – С. 110-114.

Гайдашев Иван Андреевич

(Российская Федерация)

**РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ ДЛЯ
МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО
СЫРЬЯ**

Диссертационная работа посвящена разработке методики пробоподготовки сырья со сложной органической матрицей, проведению межлабораторных сличений и валидации данной методики. Межлабораторные сличения, в ходе которых применялись эталонные разрушающие методы были проведены в соответствии с международными практиками МАГАТЭ. Разработана методика определения жизнеспособности дормантных форм благодаря новому методу спектроскопии в миллиметровом диапазоне, обоснована пробоподготовка сырья со сложной органической матрицей, обеспечивающая стабильность биологического образца. Методика элементного экспресс-анализа СОП была валидирована на основании следующих характеристик: специфичности, повторяемости, воспроизводимости, робастности. Разработанный СОП охарактеризован с применением трех методов элементного анализа (ICP-MS, GZ-AAS и РФА) и используется в аналитических кафедральных лабораториях РУДН (введён в эксплуатацию) в установленном порядке.

Gaidashev Ivan Andreevich

(Russian Federation)

**DEVELOPMENT OF THE REFERENCE SAMPLE OF THE ENTERPRISE FOR THE
ELEMENTAL ANALYSIS OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS**

The dissertation work is devoted to the development of the technique for sample preparation of raw materials with a complex organic matrix, conducting interlaboratory comparisons and validation of this technique. Interlaboratory comparisons, during which reference destructive methods were used, were carried out in accordance with international IAEA practices. The technique for determining the viability of dormant forms has been developed with the new method of spectroscopy in the millimeter range, and the sample preparation of raw materials with a complex organic matrix, ensuring the stability of a biological sample, has been substantiated. The method of elemental express analysis of the reference sample was validated based on the following characteristics: specificity, repeatability, reproducibility, robustness. The reference sample has been characterized using three methods of elemental analysis (ICP-MS, GZ-AAS and RFA) and uses in analytical laboratories of RUDN in accordance with the established procedure.