

На правах рукописи

Макарова Мария Павловна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО
СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
МЕТОДОМ РЕНТГЕНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

14.04.02 — фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2020

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

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор **Сыроешкин Антон Владимирович**

Официальные оппоненты:

Нестерова Ольга Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой химии Института Фармации им. А.П. Нелюбина Федерального автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Потанина Ольга Георгиевна, доктор фармацевтических наук, директор центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (научно-образовательного центра) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «19» марта 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор фармацевтических наук,
профессор

Успенская Елена Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Химические микроэлементы, как кофакторы ферментативного катализа, в определенных концентрациях являются эссенциальными, то есть строго необходимыми для физиологически полноценной жизнедеятельности (Nordberg M., Nordberg G.F., 2016). Любое отклонение содержания неорганического компонента в организме проявляется в виде многочисленных гипо- и гиперэлементозов. По данным Trace Elements Institute for UNESCO, в России наиболее часто встречаются дефициты цинка, меди и марганца. Цинк-дефицитные состояния городского населения приводят к разнообразным расстройствам, включающие нарушения функционирования иммунной системы, неврологические заболевания, сексуальные расстройства, косметические нарушения состояния кожи и волосяного покрова головы (Livingstone C., 2015).

Комплексы микроэлементов, которые содержат растения, могут быть использованы в качестве лекарственных и профилактических средств в терапии различных заболеваний. Накопление и аккумуляция многих элементов рассматривается в биогеохимии как проявление видоспецифичности растений (Добровольский В.В., 2003). В настоящей работе предложен особый подход к выращиванию лекарственных и пряно-ароматических растений, обогащенных цинком. Увеличение содержания цинка в растении по сравнению с видовой биогеохимической нормой имеет естественные ограничения, как со стороны закона Нернста, так и по причине естественной аккумулялирующей способности растения, обусловленной концентрацией свободных растворенных хелатирующих агентов и сорбцией на межфазных границах. Мы предположили, что возможно увеличить ассимиляционную емкость растения за счет изменения изотопного состава водного раствора, применяемого для полива или используемого при гидропонике, а именно использования воды, обедненной по содержанию дейтерия (Deuterium Depleted Water - DDW), которая отличается от обычной воды целым рядом физико-химических показателей, включая температуру замерзания, время спин-спиновой релаксации, коэффициент

самодиффузии (Goncharuk V.V. et al., 2011). Одно из самых интересных последствий такого изменения изотопного состава является изменение констант скоростей всасывания/выведения растворенного вещества (Syroeshkin A.V. et al. 2017). Именно этот эффект в неравновесных условиях мог бы помочь, с нашей точки зрения, «обойти» термодинамические ограничения, увеличив насыщение лекарственного растения соединениями цинка.

Микроэлементы распределены неравномерно по тканям растения и субклеточным элементам, поэтому сложно-компонентные матрицы анализируемых образцов в каждом из случаев требуют специальной пробоподготовки. В настоящей работе нам также потребовалось доработать фармакопейный метод рентгено-флуоресцентной спектрометрии в части особой длительной пробоподготовки с включением в протокол анализа QA/QC процедур с использованием международного референс-образца МАГАТЭ.

Цель работы: получение цинк-обогащенного фармацевтического продукта из растительного материала для лечения гипоземиев.

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

1. Разработать методику пробоподготовки лекарственного растительного сырья и неофициальных растений для последующего микроэлементного анализа.
2. Оптимизировать методику экспресс-определения микроэлементного состава растительного сырья на основе фармакопейного рентгено-флуоресцентного анализа (РФА).
3. Провести валидацию разработанной методики по таким показателям, как повторяемость, воспроизводимость и робастность (включая сравнение метода РФА с методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией) с учетом данных международной интеркалибрации в системе МАГАТЭ.
4. Провести анализ влияния воды, обедненной по дейтерию, на элементный профиль лекарственных и неофициальных растений.

Научная новизна работы. Показано, что обеднение водных растворов по содержанию дейтерия и изотопов ^{17}O и ^{18}O , приводят к изменению азотного и микроэлементного метаболизма растения, позволяющего довести накопление цинка вплоть до 2 мг на 1 г сухого веса.

Практическая значимость работы. Показана возможность создания металл-обогащенных растений с лекарственными свойствами на основе изотопного управления метаболизмом и предложено использовать это в будущем для коррекции массовых цинк-дефицитных состояний у городского населения. Разработана технология экспресс-контроля элементного состава растительного сырья.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная методика специальной пробоподготовки позволяет определять микроэлементы в образцах со сложной органической матрицей методом рентгено-флуоресцентной спектрометрии с использованием референс-образца.

2. Биогеохимические ограничения накопления цинка в лекарственном растении могут быть преодолены с помощью кинетического подхода, меняющего изотопный состав воды.

3. Разработанная технология создания «металл-модифицированного» растения позволяет создавать новый продукт, обладающий уже хорошо известными свойствами, но дополнительно устраняющий цинк-дефицитные состояния.

Степень достоверности полученных результатов. В исследовании использовали международный референс-образец NIST SRM 2976, изготовленный в MEL IAEA (МАГАТЭ) и аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, USA) на основании результатов интеркалибраций с участием более 140 лабораторий мира, включая нашу группу.

Все результаты представлены для 3-5 повторов с доверительной вероятностью 95 %. Каждое измерение было выполнено в полном цикле

воспроизведения всего эксперимента с 15-25 кратным повторением измерений внутри одного цикла. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программы OriginPro^{®9}, OriginLab Corporation, USA.

Апробация результатов диссертационной работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на конференциях: Четвертая научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, 2016); 16-й Международный симпозиум по микроэлементам у человека и животных (Санкт-Петербург, 26.06.2017 - 29.06.2017); 44th FEBS Congress (Краков, 6-11 июля 2019), 14th International Conference on Chemical and Process Engineering (Болонья, 26-29 мая 2019 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ: в журналах индексируемых в Scopus – 2, перечень РУДН – 2, РИНЦ – 1, а также тезисы конференций, в том числе и зарубежных - 3.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует формуле специальности 14.04.02 - «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 5 и 6 паспорта специальности:

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

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.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, обработке результатов, анализу полученных данных и подготовке публикаций в соавторстве с научным коллективом кафедры и научными сотрудниками Лаборатории прикладной гидрохимии и аналитической химии ФГУ «ГОИН», Института биоорганической химии имени

М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН. Работа выполнена с применением лабораторного оснащения кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» за счет средств программы «Топ 5-100».

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы (134 источника) и приложения. Основная часть диссертации включает 19 таблиц и 33 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Лекарственное и неофициальное растительное сырьё: укропа пахучего плоды (*fructus Anethi graveolentis L.*), цельные (ООО «ГАВРИШ», Россия); тыквы семена (*semina Cucurbitae pepo*), цельные и очищенные (ООО «ГАВРИШ», Россия); огурца посевного семена (*semina Cucumis sativaL.*), цельные; мяты полевой семена (*semina Menthae arvensis L.*), цельные («Sanrival» и «Sèmelavie», Франция); каланхоэ Дагремона семена (*semina Kalanchoës daigremontianae*), свежие и высушенные; каллизии душистой листья (*folia Callisiae fragrantis L.*), свежие и высушенные; кипрея узколистного трава (*herba Epilóbii angustifolii L.*), высушенная.

Диспергирование образцов. Микроструктурирование исследуемых веществ проводили путем измельчения в механической режущей ножевой мельнице по типу «свободного, прямого удара» (по Румпфу) в течение 10 мин в изократическом режиме.

Высушивание образцов. Высушивали листья *C. fragrans* в мягких (естественных) условиях при температуре 25 °С в течение 5-7 дней до полного высыхания взвешивание образца один раз в день до достижения постоянной массы. После полного высыхания листья легко измельчаются в порошок.

Методы элементного анализа. Содержание микроэлементов в растительных материалах определяли методом РФА, используя

энергодисперсионный рентгено-флуоресцентный спектрофотометр на базе кремниевого дрейфового детектора с термоэлектрическим охлаждением – EDX-7000 (Shimadzu, Япония). Для измерения интенсивности излучения были выбраны одинаковые настройки прибора для всех видов исследуемых образцов: закрытая кювета, майларовая плёнка, коллиматор 10 мм, время экспозиции 1000 сек, $I = 100 \mu\text{A}$, атмосфера: воздух. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа тех же материалов аккредитованным методом – атомно-абсорбционной спектрометрией (ААС): спектрометр «SpectrAA-800» (Agilent Technologies, США) с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией фона (метод GZ-AAS) после предшествующей кислотной минерализации растительного материала под действием микроволнового облучения (Табл. 1).

Таблица 1. Основные инструментальные параметры измерения, метод GZ-AAS.

Me	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Тип кюветы	Модификатор матрицы	t озоления, °C	t атомизации, °C
Al	256,8	0,5	Без платформы	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1700	2550
Ni	232,0	0,2	Без платформы	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 + \text{Pd}(\text{NO}_3)_2$	1350	2450
Cu	324,8	0,5	Без платформы	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$	1100	2400
Mn	403,1	0,2	Без платформы	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1400	2450
Fe	386,0	0,2	Без платформы	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1370	2400
Zn	307,6	1,0	С платформой	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	600	2000

Физико-химический анализ воды с различным содержанием дейтерия. В работе использовали исходные образцы воды с различным содержанием дейтерия: обедненная по дейтерию вода с $[\text{D}]/[\text{H}] = 5 \text{ ppm}$ (“Sigma-Aldrich”, США); тяжелая вода D_2O с атомной долей дейтерия не менее 99 % (“Sigma-Aldrich”, США). Использовали среды с различными концентрациями дейтерия путем разведения обедненной по дейтерию и дейтерированной вод. В качестве контроля служила деионизированная вода (MilliQ, $[\text{D}]/[\text{H}] = 140 \text{ ppm}$). Содержание дейтерия контролировали с помощью

многопроходной лазерной абсорбционной спектроскопии на изотопном анализаторе воды Isotopic Water Analyzer-912-0032 (Los Gatos Research Inc., США).

Метод лазерной дифракции. Гранулометрический анализ проводили методом мало углового рассеяния лазерного света (LALLS) с помощью приборов MasterSizer 3600 (производитель MALVERN Instruments, UK) и «Кластер-1» - ИДЛ-1, измеритель дисперсности лазерный производства ИКХХВ-РУДН (Syroeshkin A., 2005).

Спектроскопия НПВО в инфракрасной области с Фурье-преобразованием. Для разработки методики идентификации релиз-активных ЛП использовали ИК-Фурье спектрофотометр Agilent Cary 630 с приставкой НПВО с алмазной призмой. Спектральный диапазон – 4000...750 см⁻¹. Разрешение – менее 2 см⁻¹, правильность волнового числа 0,05 см⁻¹, воспроизводимость волнового числа – 0,005 см⁻¹. Толщина поглощающего слоя – 1,5 нм (зажимное устройство гарантирует установку оптимального и воспроизводимого давления).

Определение биологической активности ФС с помощью биосенсора *S. ambigua*. В работе использована система клеточного биосенсора *Spirostomum ambiguum*, штамм проф. Н.Б. Леонидова (ГНИИ «Биоэффект»). В цилиндрах объёмом 50 мл культивировали тест-объекты. Концентрация при комнатной температуре 20-24 °С составляла 30-50 клеток/мл. Кормление осуществляли 2 раза в неделю по 7-10 гранул дрожжей. В направлениях вертикальном и горизонтальном штамм характеризовался высокой подвижностью. Установка для биотестирования состояла из нагревающего термостата Lauda Alpha A6 (Germany), бинокюляра МБС-10 (Russia) и 5-луночного планшета с термостатируемой оболочкой. Для освещения использовали лампы (~10 Вт) дневного света. Из 5-7 повторов определения времени жизни при 5 значениях температуры определяли аррениусовскую энергию активации (E_a) клеточных переходов (Goncharuk V.V. et al., 2018). Показано, что у десятков лекарственных веществ E_a линейно коррелирует с LD₅₀ при пероральном приеме для крыс

(Syroeshkin A.V. et al, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Создание методики экспресс-анализа лекарственного растительного сырья и неофицинальных растений методом рентгенофлуоресцентной спектрометрии

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА) неорганических материалов, включая сплавы металлов, зарекомендовал себя как экспресс-метод, не требующий предварительной пробоподготовки. В то же время при элементном анализе биологических материалов применение РФА в классическом варианте затруднено из-за сложной структуры органической матрицы. Мы показали, что при определении элементов в растительных материалах методом РФА обязательными являются испытания с аттестованным референс-образцом идентичной природы и операции по пробоподготовке, включающие высушивание и диспергирование.

1.1. Скрининг микроэлементов в растительном сырье. Одним из существенных достоинств метода РФА является возможность его применения без разрушения растительного материала, например, минерализации. Процедура «мокрого» и «сухого» озоления образца, используемая в пробоподготовке к анализу методом ААС, требует дополнительных затрат реактивов, времени и увеличивает погрешность определения. Именно поэтому метод РФА целесообразно применять в скрининге макро- и микроэлементов растительных материалов. Возможности РФА в части видовой идентификации были продемонстрированы нами на различных семенах (рис.1). Во время этой работы были заново оптимизированы условия проведения РФА в части выбора плёнки для кюветы, настройки коллиматора, времени экспозиции и других параметров. Наиболее приемлемая их комбинация для максимальной чувствительности и селективности метода представлена выше в разделе «Методы».

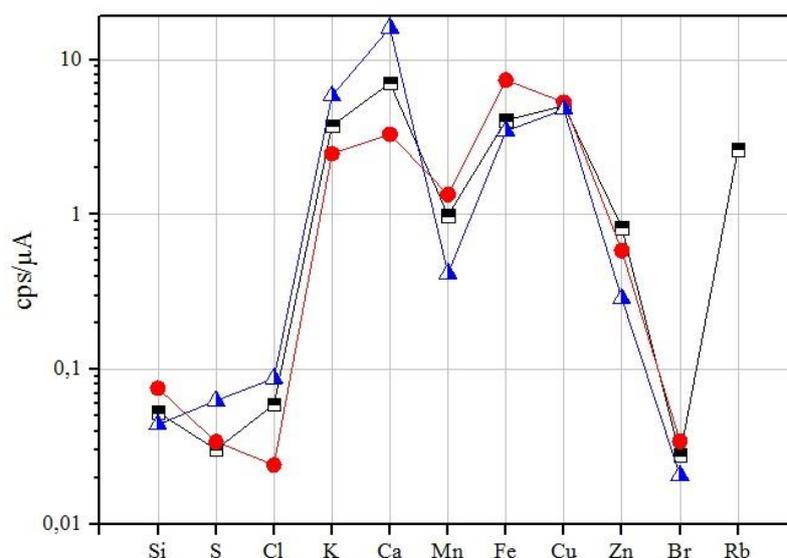


Рисунок 1. Элементный профиль семян различных растений: огурца посевного (*semina Cucumis sativa L.*) – квадрат; тыквы обыкновенной (*semina Cucurbitae pepo L.*) – круг; мяты полевой (*semina Menthae arvensis L.*) – треугольник.

1.2. Влияние высушивания растительного сырья на результаты элементного анализа методом РФА. Были исследованы элементные профили листьев свежей и высушенной каллизии душистой (рис.2).

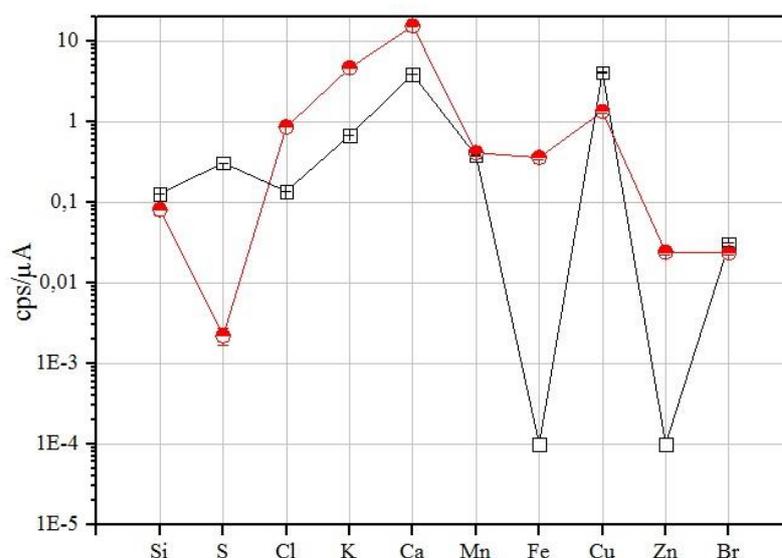


Рисунок 2. Микроэлементные профили свежих и высушенных листьев каллизии душистой (*folia Callisiae fragrantis L.*): свежее сырье – квадрат; высушенное сырье – круг.

Полученный результат позволяет разделить элементы на три группы. Первая группа – это сера и медь: для них характерно снижение интенсивности флуоресценции в пробе после высушивания. Для серы возможен переход в газовую фазу летучих соединений, включая меркаптаны. Вторая группа – это кремний, марганец и бром – характеризуется отсутствием влияния высушивания на результат анализа. Интенсивность флуоресценции на длинах волн, характерных для хлора, калия и кальция изменяется в пределах одного порядка. Третья группа – это железо и цинк. Обнаруженное увеличение их содержания на несколько порядков при высушивании растения можно объяснить двояко. Координационные хелатные соединения с центральными атомами Fe (II) и Zn (II), расположенные в различных органеллах растения, при потере влаги в процессе высушивания сырья концентрируются и становятся проницаемыми для рентгеновских лучей. Кроме того, наблюдаемая антибатная картина «увеличения-уменьшения» содержания элементов в целом может отражать процесс трансмутации элементов в живом веществе (Вернандский В.И.).

1.3. Влияние диспергирования растительного материала на результаты определения микроэлементов методом РФА. Влияние степени измельченности растительного материала на результаты элементного анализа продемонстрировано на рис. 3 для цельных, резаных и гомогенизированных семян каланхоэ.

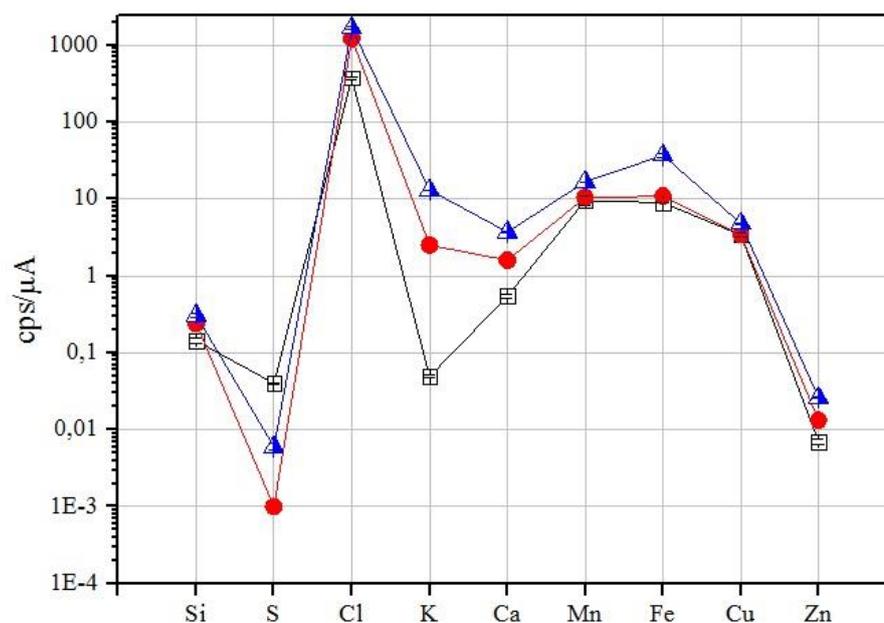


Рисунок 3. Микроэлементные профили семян каланхоэ Дагремона (*semina Kalanchoës daigremontianae*) цельных – квадрат; резаных – круг; гомогенизированных – треугольник.

Как следует из полученных результатов, гомогенизированная проба показывает более высокие значения интенсивности флуоресценции. Особенно ярко это проявляется для калия, кальция и железа. Используя метод РФА для определения этих элементов в растительном сырье, пробу, необходимо гомогенизировать до стандартных значений (при применении ножевой мельницы – это монодисперсный порошок с монодисперсным распределением в диапазоне размеров от 30 мкм до 80 мкм) с использованием методов лазерного гранулометрического анализа. В диссертации приведена глава и имеется специальная публикация, в которой отражено как диспергирование, с точки зрения механохимической активации, влияет на результаты химического анализа моно- и многокомпонентных лекарственных и вспомогательных средств (Syroeshkin A. at all, 2019).

2. Метрологическое обеспечение (сличения, интеркалибрации, использование референс-образца МАГАТЭ)

2.1. Интеркалибрации и анализ референс-образца. В соответствии с международной программой QA/QC для обеспечения метрологической достоверности результатов анализа растительных материалов предшествовало исследование референс-образца с известным содержанием микроэлементов. Референс-образец представляет собой высокодисперсный порошок биологического материала, гомогенизированный и высушенный методом лиофильной сушки (Coquery M., 2001, 51 p.). Результаты измерений представлены в табл. 2.

2.2 Сравнение результатов анализа методами РФА и ААС при определении цинка в различных растительных материалах. На основании результатов, полученных для референс-образца (Табл.2), было определено содержание цинка в плодах и семенах четырёх растений двумя методами (Табл. 3).

Таблица 2. Элементный профиль международного стандартного образца NIST SRM 2976: $m = 1,2074$ г; кювета открытая, полипропилен, воздух, коллиматор — 10 мм.

Элемент	Интенсивность, cps/ μ A	Содержание, мкг/г $\bar{X} \pm S_r$
Cl	$6,34 \pm 0,09$	57000 ± 5000
K	$3,31 \pm 0,02$	9700 ± 500
Ca	$10,26 \pm 0,03$	7600 ± 300
S	$0,66 \pm 0,02$	$0,109 \pm 0,008$
Br	$3,78 \pm 0,04$	329 ± 15
Fe	$2,80 \pm 0,03$	$171,0 \pm 4,9$
Zn	$0,67 \pm 0,01$	$137,0 \pm 13,0$
Cu	$3,32 \pm 0,28$	$4,02 \pm 0,33$
Mn	$0,40 \pm 0,01$	33 ± 2
Se	$0,023 \pm 0,002$	$1,80 \pm 0,15$
Sr	$4,32 \pm 0,39$	93 ± 2

Полученные результаты соответствовали представленному протоколу для референс-образца.

Таблица 3. Содержание цинка ($\bar{X} \pm S_r$) в плодах и семенах различных растений, $n = 3$, $P = 0,95$.

Вид растения	Содержание цинка, мкг/г	
	Метод РФА	Метод ААС
Плоды укропа кустистого (semina <i>Anethi graveolens</i>)	68 ± 0,6	74 ± 15
Семена тыквы обыкновенной очищенные (semina <i>Cucurbitae pepo</i>)	160 ± 0,8	101 ± 20
Кожура семян тыквы обыкновенной (semina <i>Cucurbitae pepo</i>)	60 ± 0,4	50 ± 10
Семена мяты полевой (semina <i>Menthae arvensis L.</i>)	62 ± 0,1	67 ± 13
Семена мяты полевой (semina <i>Menthae arvensis L.</i>)	57 ± 0,6	63 ± 13

Выполнена валидация методики по показателю «Робастность». Сравнение результатов, полученных двумя методами, свидетельствует об их высокой сходимости. Разработанная методика экспресс-анализа была успешно применена нами и для решения смежных задач к основной теме диссертации – анализа проб со сложной органической матрицей высокой стоимости и общественной значимости (образцы космической пыли, полученные нашей группой с борта Международной космической станции (МКС) в рамках гособоронзаказа РУДН). Также мы применили разработанный метод для исследования конформационных переходов в водно-лактозных комплексах (Syroeshkin, A., 2019).

3. Элементный профиль лекарственного растительного сырья и неофицинальных растений

Накопление элементов в растениях происходит неоднородно на субклеточном и тканевом уровне из-за связывания с теми или иными лигандами, присутствующими в различных органеллах и клеточных различий.

Для демонстрации различий элементных профилей в качестве модели были выбраны отдельные части листа каллизии душистой (рис. 4).

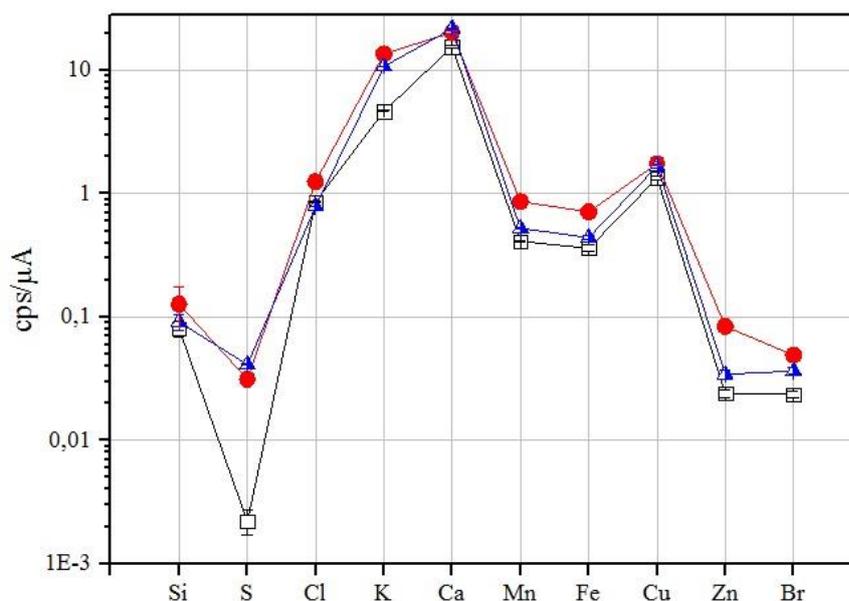


Рисунок 4. Элементный профиль типированных на 3 части высушенных листьев каллизии душистой (*folia Callisiae fragrantis L.*): нижняя часть листа – квадрат; средняя часть – круг; верхняя часть – треугольник.

Из полученных результатов следует, что разные части одного и того же растения отличаются друг от друга элементными профилями. Наибольшее накопление элементов характерно для средней части листа.

Неофициальное растения каллизия душистая содержит набор биологически-активных веществ с антиоксидантными свойствами и активностью в отношении опухолевых клеток (Оленников Д.Н., 2008, Ибрагимов Т.А. и др., 2008, 2011). Указанными авторами и их коллективами проведено тщательное фармакогностическое и фитохимическое исследование побегов каллизии душистой. Это растение применяют в качестве адаптогена и антигипоксического средства (Радаева Д.Б., 2207, 2009), при дерматозах (Белова-Рахимова Л.В., 2009), в качестве стресс-протективного и иммуномодулирующего средства (Шантанова Л.Н. и др., 2009). Каллизия душистая активно используется в парафармацевтических препаратах (например, крем "Эсобел"). Сотрудниками пятигорской фармацевтической академии был подготовлен проект фармакопейной статьи "Каллизии душистой

побеги свежие» (Ибрагимов Т.А., 2011). Для нашей работы каллизия душистая была важна как модельный объект обогащения микроэлементами (Simek J. et al, 2018) с быстрым набором биомассы побега, как в грунте, так и при гидропонике.

4. Технология создания цинк-обогащенного растительного сырья – «металл-модифицированных» растений на основе изотопного управления метаболизмом микроэлементов

Технология получения цинк-обогащенных лекарственных и пряно-ароматических/пищевых растений состоит из следующих ключевых элементов, включающих:

- 1) изотопное управление развитием растения, включая модификацию его элементного профиля;
- 2) новые лазерные методы сквозного контроля качества водных растворов для полива лекарственных растений;
- 3) новый комплекс методов сквозного контроля обогащения растительного сырья микроэлементом, описанный в настоящей работе;
- 4) онлайн-контроль биотоксичности растительного сырья и препаратов, изготавливаемых из него.

Первая часть технологии – подбор препаратов воды, обедненных по содержанию дейтерия и изотопов кислорода ^{17}O и ^{18}O (DDW). Выбор степени обеднения воды определяется эффективностью ее влияния на метаболизм, технологической доступностью препарата DDW и экономическими соображениями. Препараты DDW должны удовлетворять также целому ряду требований по электропроводности, содержанию примесных элементов, содержанию частиц дисперсной фазы и примесному растворенному органическому углероду.

Вторая часть технологии – приготовление раствора соли цинка с хелатирующим агентом. Критически важно для эффективного обогащения растения и отсутствия подавления роста определить концентрации комплекса ионов цинка с органическим лигандом, концентрации свободных ионов цинка

(аквакомплексов), с учетом константы (констант) диссоциации хелатного комплекса. Здесь необходимо сочетать расчетные и экспериментальные методы при определении условий комплексообразования, при оценке эффективности усвоения цинка и при оценке отсутствия токсичности раствора для растения. В настоящей работе мы использовали глицинат цинка.

Третья часть технологии включает выбор пищевого/лекарственного растения, подбор длительности инкубации с хелатным соединением цинка в DDW, выбор условий экспозиции (полив или гидропоника). Ключевым моментом для успешной реализации технологии является контроль качества DDW, финального цинк-содержащего раствора, биогеохимический контроль лекарственного растительного сырья на всех этапах обогащения цинком и последующей подготовки для пользователя. Выбор лекарственного растения критически важен и с точки зрения биодоступности цинка, экстрагируемого из обогащенного растения, либо при предварительной водной экстракции высушенного растительного сырья, либо при употреблении готовой лекарственной формы (таблетки, пастилки и т. п.).

Требования к препаратам воды с разным соотношением [D]/[H], используемым для получения цинк-модифицированных растений: вода с пониженным содержанием дейтерия (DDW); система очистки – низкотемпературная вакуумная ректификация изотопного состава по водороду; согласно результатам масс-спектрометрии, содержание дейтерия [D]/[H] ~ 4ppm; 2) деионизированная высокоомная вода (18 МОм·см при 25 °С) природного изотопного состава ([D]/[H] = 140 ppm) - BD, полученная путем очистки апирогенной дистиллированной воды в системе Milli-Q (Millipore, Великобритания); 3) тяжелая вода 99,9 % D₂O. Качество вод должно соответствовать фармакопейным требованиям.

Требования к **растворам глицината цинка** [*бис(глицинато-N,O)цинк*] – приготовление на указанных препаратах воды - 20 mM глицин и 1 mM ZnSO₄, pH = 6,8.

В качестве примера рассмотрим результаты обогащения каллизии душистой эссенциальным элементом – цинком. Выбрав препарат воды с оптимальным соотношением изотопологов водорода, обеспечивающим необходимые изотопный кинетический эффект, оценивали его гранулометрические характеристики методом малоуглового рассеяния лазерного света (LALLS) и/или разработанным нами счетчиком для измерения диаметра частиц (Particle sizer). Препарат воды и раствор глицината цинка характеризовали методом биотестирования – Spirotox. На первом этапе анализировали листья растения, побеги которого находились в бидистиллированной воде, не содержащей цинк. Отобранные для анализа листья подвергали мягкой сушке и гомогенизировали. Содержание эссенциального элемента в пробах гомогенизата (методы GZ-AAS и РФА с использованием референс-образца МАГАТЭ) не превышало 0,02 мкг/г. Затем побеги каллизии душистой инкубировали в растворах глицината цинка – *бис(глициinato-N,O)цинка* – в бидистиллированной воде и в воде, обедненной по дейтерию. Через двенадцать суток было обнаружено, что содержание цинка в листьях растения возросло на порядок в воде с природным соотношением изотопов ($[D]/[H] = 142$ ppm) и на два порядка в «лёгкой» воде ($[D]/[H] = 12$ ppm). При этом коэффициенты накопления цинка в листьях растения для двух типов вод составили ($\bar{x} \pm s_r$): (40 ± 10) и (160 ± 10) , соответственно, с учетом неравномерного распределения по листовой пластинке (Табл. 4).

$$K = \frac{[Zn]^*_{\text{п.ин.}}}{[Zn]_{\text{до ин.}}},$$

где $[Zn]^*$ п.ин. – массовая концентрация после инкубации глицинатом цинка; $[Zn]$ до.ин. – массовая концентрация до инкубации глицинатом цинка; $[Zn]$ – общая аналитическая концентрация элемента; $[Zn]^*$ – соответствует абсолютному содержанию элемента – 2 мг на 1 г сухого веса (массовая концентрация Zn для сухой биомассы). Измерения проводились для нижней части листовой пластинки.

Таблица 4. Коэффициент накопления цинка в листьях каллизии душистой после 12-суточной инкубации корней в растворах глицината цинка в бидистиллированной воде (BD, [D]/[H] = 142 ppm) и в воде, обеднённой по дейтерию (DDW, [D]/[H] = 12 ppm).

Элемент	Коэффициент накопления (K)	
	BD	DDW
Zn	40 ± 10	160 ± 10
Mn	1 ± 0,3	0,7 ± 0,2

Приведенные для сравнения результаты определения марганца, не образующего хелатный комплекс, свидетельствуют о постоянстве его содержания в тестируемом растении, независимо от изотопного состава воды.

Таким образом, изменение изотопного состава воды привело к получению модифицированного растения, аккумулирующего эссенциальный элемент. Полученный цинк-обогащенный растительный материал можно рассматривать как аналог синтетических препаратов цинка.

ВЫВОДЫ

1. На примере определения микроэлементного профиля в листьях каллизии душистой создана методика пробоподготовки, включающая высушивание материала до постоянного веса и диспергирование с контролем гранулометрического состава.

2. Создана методика экспресс-определения элементного состава растительного сырья с использованием рентгено-флуоресцентного спектрометра Shimadzu EDX-7000 на основе сравнения с данными ААС с электротермической атомизацией и применением международного референс-образца.

3. Разработана технология изотопного управления развитием растения, включая модификацию его элементного профиля, с использованием препаратов воды, обедненных по тяжелым изотопам.

4. Создано «металл-модифицированное» растительное сырье с лекарственными свойствами (*Callisiae fragrantis* L.), содержащее 2 мг цинка на 1 г сухой массы.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Костыгина, М.Н. Определение цинка в траве кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium* L.) / Костыгина М.Н., **Гришина М.П.**, Максимова Т.В. // Сборник трудов четвертой научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века», М.: ВИЛАР, 2016. - С. 251 – 255.

2. **Grishina, M.P.** X-ray fluorescence determination of zinc / **M.P. Grishina**, A.V. Syroeshkin, T.V. Maximova, M.N. Kostygina, T.V. Pleteneva // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – V. 41, S1. – 2017. – P. 16.

3. Syroeshkin, A.V. Trace elements in marine aerosols / A.V. Syroeshkin, V.V. Goncharuk, M.A. Chichaeva, I.S. Matveeva, **M.P. Grishina**, T.V. Maximova, T.V. Pleteneva // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2017. – V.41, S1. – 2017. – P.17.

4. **Макарова, М.П.** Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофициальных растениях / **М.П. Макарова**, А.В. Сыроешкин, Т.В. Максимова, И.С. Матвеева, Т.В. Плетенёва // Разработка и регистрация лекарственных средств – 2019. – Т. 8 №2. – С. 10-14. DOI:10.33380/2305-2066-2019-8-2-93-97

5. Syroeshkin, A. Mechanochemical activation of pharmaceutical substances as a factor for modification of their physical, chemical and biological properties / A. Syroeshkin, E. Uspenskaya, T. Pleteneva, M. Morozova, T. Maksimova, A. Koldina, **M. Makarova**, O. Levitskaya, I. Zlatskiy // International Journal of Applied

Pharmaceutics – 2019. – V. 11 (3). – P. 118-123.
<https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i3.32413>

6. **Makarova, M.** D/H modification of plant peptides and microelements metabolome / **M. Makarova**, A. Syroeshkin, T. Maksimova, T. Pleteneva, I. Zlatkiy, N. Antipova, A. Skripnikov, M. Dzhavakhyan // FEBS Open Bio. – 2019. – V. 9. – P. 287-288. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

7. Сыроешкин, А.В. Создание цинк-обогащенных лекарственных и пищевых растений / А.В. Сыроешкин, **М.П. Макарова**, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т. 22. – №5. – С. 47-52.

8. Syroeshkin, Anton. Deuterium Depleted Water as an Adjuvant in Treatment of Cancer / Anton Syroeshkin, Olga Levitskaya, Elena Uspenskaya, Tatiana Pleteneva, **Maria Makarova**, Daria Romaykina, Daria Ermakova // Systematic Reviews in Pharmacy – 2019. – V. 10 (1). – P. 112-117. DOI: 10.5530/srp.2019.119

* Гришина - девичья фамилия Макаровой

Макарова Мария Павловна
(Российская Федерация)

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ МЕТОДОМ РЕНТГЕНО-
ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

В работе проанализированы элементные профили (в режиме интеркалибрации метода атомно-абсорбционной спектроскопии с графитовой атомизацией и зеемановской коррекцией фона при микроволновом озолении и метода рентгено-флуоресцентной спектроскопии (РФС) *in situ*) растительного сырья официальных и потенциальных лекарственных растений. Показано, что при условии использования референс-образцов МАГАТЭ со сложной органической матрицей возможно достоверное экспресс-определение микроэлементов в растительном материале с помощью РФА. В работе показано на примере результатов международных интеркалибраций в системе МАГАТЭ,

что для обеспечения внешнего лабораторного качества (QA/QC) элементного анализа строго необходимо использование референс-образца. На результат определения критически влияет и диспергирование, и высушивание растительного материала, что объясняется крайней неоднородностью распределения микроэлементов в субмикронном и субмиллиметровом диапазоне размеров. Стандартизация пробоподготовки позволяет достичь 10 % погрешности по типу А при определении цинка и марганца. С помощью экспресс-анализа показан пример мониторинга изотоп-зависимой ($[D]/[H]$) технологии создания цинк-обогащенных лекарственных растений.

Makarova Maria Pavlovna

(Russian Federation)

**DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR THE TRACE ELEMENTS
DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS AND PLANT MATERIALS
VIA X-RAY FLUORESCENCE ANALYSIS**

In the thesis the elemental profiles (in the intercalibration mode of Graphite Zeeman atomic absorption spectrometry with microwave digestion and the X-ray fluorescence spectrometry method *in situ*) of officinal and potential medicinal plants were analyzed. It was shown the IAEA reference samples with a complex organic matrix are used, reliable express determination of trace elements in plant material using X-ray fluorescence spectrometry method is possible. The work shows the example of the results of international intercomparison and that the use of a reference sample is strongly necessary to ensure the external QA/QC procedures of elemental analysis. The dispersing and drying of the plant material are crucial for the elements' analysis, which is explained by the extreme heterogeneity of the distribution of trace elements in the submicron and submillimeter range of sizes. Standardization of sample preparation allows us to achieve 10% bias in type A when determining zinc and manganese. Using express analysis, an example of monitoring isotope-dependent ($[D]/[H]$) technology for creating zinc-rich medicinal plants is shown.