

В. П. Панов¹, А. В. Панов²**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ПРЕПАРАТА “ГЛЮНАТ”
МЕТОДОМ ЯМР ¹³C СПЕКТРОСКОПИИ**¹ Гематологический научный центр РАМН, Москва;² Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

Методом ЯМР ¹³C спектроскопии исследован состав образцов препарата крови “Глюнат” разных производителей, а также ряда модельных систем. Установлено, что спектры ЯМР ¹³C растворов лиофилизированных образцов препарата “Глюнат” идентичны спектру раствора глюкозы, подвергнутого автоклавированию в тех же условиях в среде гидрокарбоната натрия без добавления донорской плазмы. Обнаружена частичная конденсация молекул D-глюкопиранозы по первому и четвертому, первому и шестому углеродным атомам, их перегруппировка и фрагментация. Доля продуктов конденсации составляет около 30%. Состав препарата “Глюнат” по нормативной документации охарактеризован недостаточно, в документацию необходимо включить раздел “Сопутствующие соединения”. Необходимо выявить действующее вещество в этом препарате.

Препарат плазмы крови “Глюнат” для внутримышечного введения был разрешен к медицинскому применению в 1972 г. вначале под названием “Стерилизованная сыворотка Ф” (ВФС 42-165–72), в 1986 г. препарату было присвоено ныне действующее название (ВФС 42-165–86). Препарат применяют для усиления регенеративных процессов и стимулирования защитных сил организма, при незаживающих язвах на коже, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, пневмониях и других заболеваниях. Препарат “Глюнат” [1] представляет собой раствор глюкозы (27,3 г/л) и гидрокарбоната натрия (5,43 г/л), включающий до 25 % по массе плазму или сыворотку крови человека, подвергнутый обработке в автоклаве при температуре 122,6 °С в течение 70 мин до значения pH в интервале от 6,0 до 7,0. Охлажденный до комнатной температуры стерильный раствор под давлением фильтруют через фильтры Сальникова и Шотта и разливают в ампулы из нейтрального стекла по 5,3 мл. В настоящее время препарат по промышленным регламентам выпускают ряд станций переливания крови и предприятий бактериальных препаратов, качество препарата “Глюнат” оценивают по ВФС 42-165–86 [2]. Показателями качества препарата служат подлинность, цветность, содержание белка по Къельдалю, содержание глюкозы, пирогенность, токсичность и стерильность [3]. Содержание белка нормируют на уровне 1,5–2,0 г на 100 мл препарата, что в 3 раза ниже нормы, предусмотренной для донорской плазмы [4]. Содержание глюкозы в препарате нормируется в очень широком интервале от 10 до 20 г/л, т.е. можно предположить, что от трети до половины массы глюкозы в процессе автоклавирования в щелочной среде трансформируется в побочные продукты неизвестного происхождения и состава.

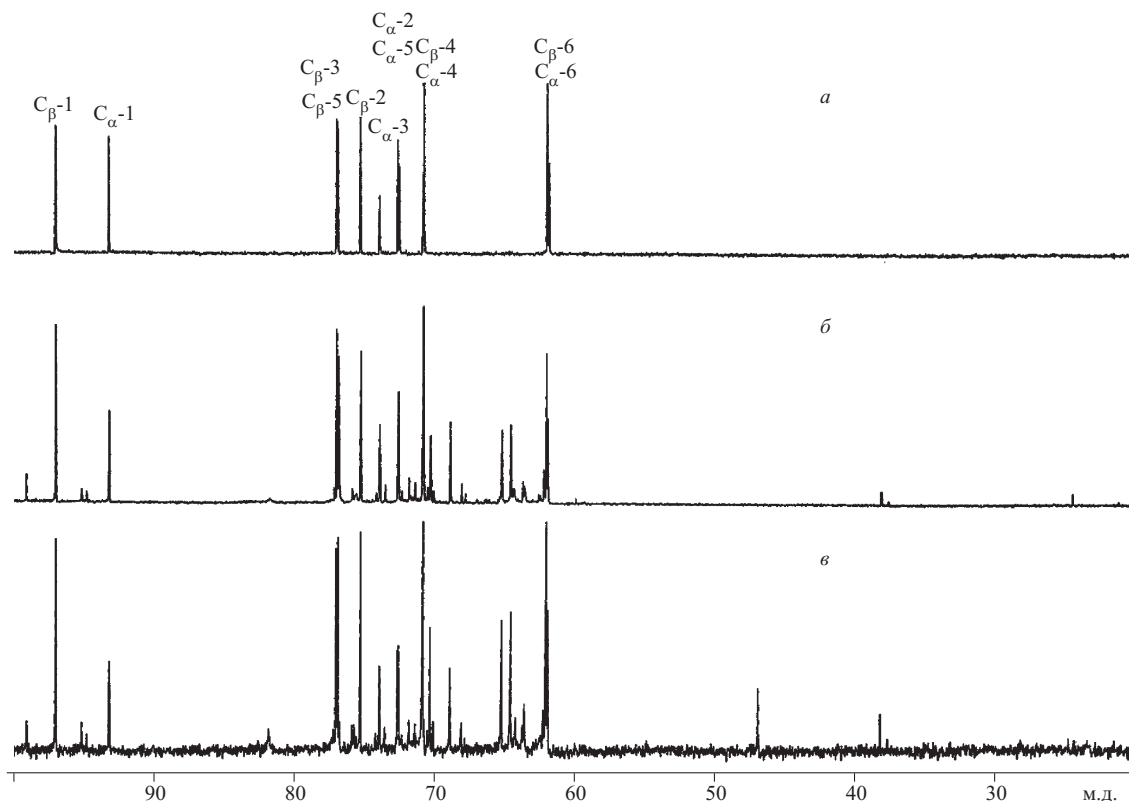
В настоящей работе методом ЯМР ¹³C-спектроскопии проведено исследование состава ряда образцов препарата крови “Глюнат” разных производителей, а также образцов глюкозы, подвергнутых автоклавированию в среде натрия гидрокарбоната в тех же условиях, что и препарат “Глюнат”, но при отсутствии плазмы.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹³C растворов указанных образцов в D₂O с концентрацией веществ 10 % (0,05 г лиофилизированного продукта в 0,45 мл D₂O) регистрировали на спектрометре высокого разрешения WP-200 (50,3 МГц) фирмы “Брукер” (Германия) с сверхпроводящим магнитом и широкополосным датчиком ¹H/¹³C в режиме полного подавления спин-спиновой взаимодвижения ядер углерода ¹³C с протонами. Значения химических сдвигов всех сигналов ядер углерода рассчитывали относительно сигнала C_β-1 D-глюкопиранозы, отнесение которого проводили на основе базы данных SDBS (№ 2023 CDS-07–025). Съемку спектров ЯМР ¹³C вели в режиме автоматической импульсной последовательности WALTZ-16 со следующими параметрами: длительность импульса (PW) = 4,1 мкс (45°), смещение частоты наблюдения (O1) = 144547,0 Гц, ширина спектра (SW) = 10000,0 Гц (200,0 м.д.), разрешение спектра (Hz/Pt) = 1,221, время накопления (AQ) = 0,82 с, число накопления (NS) = 13000. При измерении интегральных интенсивностей резонансных сигналов использовали программу обработки спектров ЯМР “Робенд” [5, 6]. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ¹³C указанных выше продуктов получен спектр раствора D-глюкопиранозы в D₂O.

Результаты и их обсуждение

На рисунке представлены характерные записи спектров ЯМР ¹³C растворов глюкозы (рисунок, а), глюкозы, подвергнутой автоклавированию в среде гидрокарбоната натрия (рисунок, б), одного из образцов лиофилизированного препарата “Глюнат” (рисунок, в) в D₂O. На спектре раствора D-глюкопиранозы (рисунок, а) указано отнесение резонансных сигналов ядер углерода согласно [7]. Спектры ЯМР ¹³C растворов лиофилизированных образцов в D₂O препарата “Глюнат” производства разных станций переливания крови и предприятий бактериальных препаратов практически идентичны. Вследствие широкого набора минорных компонентов белков плазмы, высоких значений их мо-



Спектры ЯМР ^{13}C растворов в D_2O : глюкозы (а), глюкозы, подвергнутой автоклавированию в слабо щелочной среде (б), лиофилизированного образца препарата “Глюонат” (в)

лекулярных масс сигналы ядер углерода белковых фракций в спектрах ЯМР ^{13}C в принятых условиях эксперимента не проявляются, наблюдаются лишь узкие сигналы низкомолекулярных биоорганических соединений. В спектре ЯМР ^{13}C раствора глюкозы в D_2O (рисунок, б), предварительно подвергнутой автоклавированию в водной среде гидрокарбоната натрия при температуре $122,6^\circ\text{C}$ в течение 70 мин до pH 7,0, дополнительно к характерным сигналам D-глюкопиранозы проявляются 3 сигнала в области резонанса аномерных ядер углерода с суммарной интенсивностью до 40 % от интенсивности сигнала $\text{C}_{\beta-1}$ и химическими сдвигами при 99,09, 95,11 и 94,74 м.д., большое число относительно интенсивных сигналов в области резонанса ядер углерода C-2 – C-6 и два слабых сигнала в сильном поле при 38,08 и 24,57 м.д. Других сигналов в указанном спектре не обнаружено.

Спектры ЯМР ^{13}C растворов лиофилизированных образцов препарата “Глюонат” в D_2O (рисунок, в) во многом идентичны спектру раствора глюкозы, предварительно подвергнутой автоклавированию в тех же условиях в среде гидрокарбоната натрия без донорской плазмы. В этих спектрах наряду с сигналами D-глюкопиранозы наблюдаются три дополнительных сигнала в области резонанса аномерных ядер углерода с химическими сдвигами при 99,09, 95,11 и 94,74 м.д., аналогичные группы сигналов в области резонанса ядер углерода C-2 – C-6, три сигнала в сильном поле при 46,78, 38,08 и 24,57 м.д. Положения и соотношения интенсивностей этих сигналов также близки к значениям, наблюдаемым в спектре модельного раствора

глюкозы. Спектры различаются лишь наличием сравнительно интенсивного дополнительного сигнала при 46,78 м.д. (с интенсивностью, вдвое большей, чем сигнал при 38,08 м.д.) в спектрах растворов лиофилизированных образцов препарата “Глюонат”. Происхождение этого сигнала требует дополнительных исследований. Других существенных различий в спектрах не выявлено. Характер спектров ЯМР ^{13}C растворов глюкозы и глюкозы с плазмой, подвергнутых нагреву при $122,6^\circ\text{C}$ в слабо щелочной среде, и прежде всего наличие большой группы сигналов разной интенсивности (4 средних и 12 слабых сигналов) в области резонанса C-4 и C-6 ядер углерода может свидетельствовать о частичной конденсации молекул D-глюкопиранозы по первому и четвертому, первому и шестому углеродным атомам или перегруппировкам и фрагментации, в частности образованию равновесной смеси D-глюкозы с D-фруктозой и D-маннозой [8, 9], а также участием последних в реакциях конденсации. Исходя из относительной интегральной интенсивности сигналов продуктов конденсации, перегруппировки и фрагментации молекул D-глюкопиранозы, их доля в смеси может составлять свыше 30 %. Сигналы продуктов возможной конденсации молекул глюкозы с белковыми молекулами донорской плазмы в спектрах ЯМР ^{13}C не проявляются из-за очевидно большого числа минорных компонентов этих продуктов, т.е. их низкой относительной концентрации, а также большой величины ширины линий ядер ^{13}C этих биополимеров. В спектрах ЯМР ^{13}C в области резонанса ядер углерода двойных связей сигналы полностью отсут-

вуют, т.е. при автоклавировании в слабо щелочной среде образование продуктов глубокого превращения D-глюкопиранозы в значительных количествах, в частности гидроксиметилфурфуолов, маловероятно. В ультрафиолетовой и видимой области спектра растворов препарата “Глюнат” наблюдается сравнительно слабое поглощение, доля поглощающих примесных соединений незначительна. По данным [8, 9], образование из D-глюкозы гидроксиметилфурфуолов обычно идет в кислой среде.

Исследования образцов препарата плазмы крови “Глюнат”, а также модельных ему соединений методом ЯМР ^{13}C спектроскопии показывают, что состав препарата изучен явно недостаточно. В периодической литературе и нормативной документации на препарат полностью отсутствуют сведения о сопутствующих соединениях, доля которых по оценке относительных интегральных интенсивностей резонансных сигналов D-глюкопиранозы и продуктов ее превращения составляет не менее 30 %. Не ясно, какую роль эти соединения оказывают на физиологическое действие препарата, не исследован их побочный эффект. Препарат является потенциально вирусоопасным, поэтому следует изучить влияние сопутствующих соединений на процесс вирусной инактивации препарата “Глюнат” при его автоклавировании. В ВФС на препарат “Глюнат” отсутствует оценка его вирусной безопасности. В [10, 11] сформулированы требования, предъявляемые к качеству, эффективности и безопасности препаратов крови. В соответствии с этими требованиями в фармакопейную статью на препарат “Глюнат” следует внести изменения в разделы “Состав”, “Подлинность” и “Глюкоза”, а также включить новый раздел “Сопутствующие соединения”. В разделе “Состав” следует нормировать содержание сопутствующих веществ в препарате, в раздел “Подлинность” следует внести на них

качественные реакции, в разделе “Глюкоза” содержание вещества должно быть нормировано в более узком интервале значений. Раздел “Сопутствующие соединения” должен включать методики количественного анализа каждого из этих соединений и нормы их содержания. Целесообразно использовать метод жидкостной хроматографии для разделения сопутствующих соединений с целью их идентификации и количественного определения. В противном случае следует исключить препарат “Глюнат” из государственного реестра лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Препараты крови, Инструктивно-методические материалы*, С. П. Буренков (ред.), Минздрав СССР, Москва (1976), с. 359.
2. ВФС 42-165–86 на препарат “Глюнат”.
3. *Государственная Фармакопея XI издания*. Выпуск 1 и 2.
4. В. П. Панов, А. В. Карякин, *Первый отечественный стандарт качества компонента крови “Плазма для фракционирования”*. *Новое в трансфузиологии*, Выпуск 32, 90–96 (2002).
5. В. П. Панов, В. И. Дубровин, С. В. Тарабакин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **19**(7), 879–883 (1987).
6. В. П. Панов, В. И. Дубровин, С. В. Тарабакин, *Программа “Робенд”*. *Библиотека программ МОВ “Абакус”*, Германия (1992).
7. В. П. Панов, Р. Г. Жбанков, *Внутри- и межмолекулярные взаимодействия в моно- и полисахаридах*, Наука и техника, Минск (1988), с. 359.
8. А. Ленинджер, *Биохимия*, Мир, Москва (1974), с. 262.
9. А. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers. USA, N-Y (1993), p. 298.
10. В. П. Панов, О. Н. Петрачева, Л. Н. Ермакова, *Вестник Службы крови России*, **4**, 45–47 (1998).
11. ОСТ 91500.05.0001–00 “Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения”.

Поступила 21.01.03

THE INVESTIGATION OF PREPARATION “GLUNAT” COMPOSITION BY ^{13}C NMR SPECTROSCOPY

V. P. Panov¹, A. V. Panov²

¹ State Hematology Centre Russian Academy of Medical Science

² Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

The composition of blood preparation “Glunat” samples from different producers and a number of model systems were investigated by ^{13}C NMR spectroscopy. It was established that ^{13}C NMR spectra of lyophilized samples solutions of preparation “Glunat” is identical to the spectrum of dextrose autoclaved at the same conditions with sodium hydrocarbonate without addition of donor’s plasma. It was founded C1-C4, C1-C6 types condensation of D-glucopyranose molecules, they rearrangement and fragmentation. About 30% part of the condensation products was determined. The composition of preparation – Glunat” did not characterized fully in normative documentation. It’s required to include the chapter “Accompanied compounds”. It’s necessary to determine the active substance in this preparation.