

Оготовева Дайаана Дмитриевна

**Физико-химические, биологические и хемометрические подходы в оценке качества
лекарственных растительных препаратов**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

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:

Плетенёва Татьяна Вадимовна, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Официальные оппоненты:

Мельникова Нина Борисовна, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической и медицинской химии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского».

Нестерова Ольга Владимировна, профессор, доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой химии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

Защита диссертации состоится «25» января 2024 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-Маклая, 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-Маклая, 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 «__» декабря 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.021
кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно документам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для лечения и профилактики ряда заболеваний могут успешно применяться растительные препараты (*WHO traditional medicine strategy: 2014–2023*, URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112501>). Несмотря на многовековую историю использования, контроль качества лекарственного растительного сырья (ЛРС), настоек и других галеновых препаратов требует дальнейшего совершенствования, что объясняется особенностями их химического состава. В нормативных документах, регламентирующих требования к контролю качества настоек («Настойки», ОФС.1.4.1.0019.15 ГФ РФ XIV), не рассматривается такой важный показатель, как «подлинность». Методики определения подлинности, представленные в фармакопейных статьях «Боярышника плодов настойка» (ФС.3.4.0001.18 ГФ РФ XIV) и «Пустырника травы настойка» (ФС.3.4.0007.18 ГФ РФ XIV), не являются селективными. Необходимые стандартные образцы (СО) для определения подлинности настоек отсутствуют или коммерчески недоступны (*Ren J. et al., 2020; Sun H. et al., 2019*). В зарубежные фармакопеи (Ph. Eur. 11.2; USP NF 2022, Issue 3) включена единственная статья – «Valerian tincture», что объясняется разработкой необходимых фитомаркёров – СО валереновой и ацетоксивалереновой кислот (*Sik B. et al., 2021*). Хроматографический анализ лекарственных растительных препаратов (ЛРП) в отсутствие фитохимических стандартов приводит к недостоверным результатам, особенно при попытке замены стандартов соединениями иных химических классов (*Muyumba N.W. et al., 2021*).

Бурное развитие компьютерных технологий способствовало использованию хемометрических методов в обработке результатов, полученных физико-химическими и биологическими методами. Перспективность такого сочетания продемонстрирована для исследований объектов медико-биологического профиля (*Pei Y.-F. et al., 2018; Perez-Rafols C. et al., 2023*) и несомненна для решения задач фармацевтического анализа. Такие подходы, как PASS Online (prediction of activity spectra for substances/прогноз биологической активности соединений) (URL: www.way2drug.com/passonline/predict.php) и количественная корреляция структура-активность/quantitative structure-activity relationship (ККСА/QSAR) успешно применяются для прогнозирования биологической активности фармацевтических ингредиентов (*Lagunin A. et al., 2000; Amić D. et al., 2007*). Особое место среди хемометрических методов обработки результатов анализа ЛРП

занимает метод главных компонент/principal component analysis (МГК/РСА), позволяющий осуществлять кластерный анализ имеющихся больших выборок.

Для дальнейшего совершенствования контроля качества ЛРП в диссертации в качестве модельных объектов были выбраны растительное сырье и настойки валерианы (*Valeriana officinalis, rhizomata cum radicibus*), пустырника (*Leonurus spp., herba*) и боярышника (*Crataegus spp., fructus*), обладающие седативным, гипотензивным и кардиотоническим действием (*Das G. et al., 2021; Fierascu R.C. et al., 2019; Verma T. et al., 2021*).

Степень разработанности темы исследования. Трудности в разработке и доступности СО стимулируют поиск возможностей сочетания аналитических методов и хемометрических подходов для решения задач фармации. Предшествующие исследования коллектива кафедры в области: хиральных переключений (*Syroeshkin A.V., Pleteneva T.V., Uspenskaya E.V. et al., 2016; 2018; 2021*); физико-химических свойств фармацевтических систем с использованием собственных инструментальных разработок (*Syroeshkin A.V., Levitskaya O.V., Koldina A.M et al., 2019; 2020*); использования референс-образцов с биологической матрицей в РФА (*Makarova M.A. et al., 2019*); лиганд-рецепторных взаимодействий на основе аррениусовской кинетики (*Сыроешкин А.В. и др., 2010; Zlatskiy I.A. et al. 2020*); ККСА-прогнозирования биологической активности субстанций с использованием оригинальных компьютерных программ (*Попов П.И., Сыроешкин А.В., Галкина Д.А. и др. 2005-2022*) – все эти разработки в значительной мере способствовали решению задач, поставленных в рамках диссертационной работы.

До настоящего времени не проводились исследования по определению подлинности ЛРП на основе хемометрической обработки спектральных данных, хиральных свойств и биологической активности настоек (биосенсор *Spirostomum ambiguum*).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим областям исследования:

3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

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.

7. Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

Объект и предмет исследования. В рамках диссертационной работы *объектами* исследования являлись готовые лекарственные формы – «Настойки» и «Лекарственное растительное сырье», реализуемые через аптеки, а также настойки, изготовленные в лабораторных условиях, а именно – настойки валерианы, пустырника и боярышника. *Предмет* диссертационного исследования – поиск дополнительных возможностей физико-химических, биологических и хеометрических методов для контроля качества ЛРП.

Цель работы: разработать новые подходы к определению подлинности и к оценке биологической активности ЛРП на основе их спектральных свойств, элементного состава, оптической активности, энергии лиганд-рецепторного взаимодействия с привлечением современных методов хеометрики.

Задачи исследования:

1. На основе хеометрического анализа (МГК) результатов электронной спектрофотометрии, ИК-спектрометрии с Фурье преобразованием (ИКФС), рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) разработать методики определения подлинности растительных препаратов – сырья и настоек валерианы, пустырника и боярышника, без использования СО.

2. Оценить эффективность извлечения эссенциальных элементов в жидкую фазу по данным элементного профиля сырья валерианы, пустырника, боярышника и сухого остатка настоек, полученных из этого сырья.

3. Исследовать возможности метода поляриметрии для определения подлинности настоек разных ботанических родов на основе проведенного поиска оптически активных соединений в ЛРС.

4. Оценить биологическую активность настоек на основе кинетики Аррениуса с использованием клеточного биосенсора *Sp. ambigua* и провести корреляцию с

результатами прогнозирования биологических свойств компонентов ЛРП методами ККСА и PASS Online.

Научная новизна работы. Впервые на основе МГК осуществлен анализ спектральных данных в широком диапазоне длин волн для разработки методик идентификации растительных препаратов седативного, кардиотонического и гипотензивного действия без использования СО. Впервые предложен подход для определения степени извлечения эссенциальных макро- и микроэлементов из растительного сырья в водно-спиртовой экстрагент путем сравнительного анализа элементного профиля «ЛРС - сухой остаток настойки». Впервые предложена методика контроля качества настоек разных ботанических родов поляриметрическим методом по показателю «подлинность». Впервые стабильность настоек во времени оценена по интенсивности рассеянного света частицами дисперсной фазы и значениям электрокинетического (ζ) потенциала. Впервые для настоек методом Spirotox на основе аррениусовской кинетики определены значения энергии активации ($^{obs}E_a$) лиганд-рецепторного взаимодействия, характеризующие их биологическую активность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическое значение работы заключается в важности нового взгляда на галеновые препараты как источник хиральных соединений, которые могут проявлять как полезные свойства, так и вызывать нежелательные побочные реакции организма.

Результаты обработки спектров ЛРП выбранного фармакологического класса методом главных компонент открывают перспективы идентификации ЛРС и настоек в соответствии с их ботаническим родом, без использования СО.

Теоретические обоснования и практические результаты диссертационной работы апробированы и внедрены в практику производственной деятельности контрольно-аналитической лаборатории ООО «КоАЛ Фарманализ»: Акт внедрения прилагается.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс специальности «Фармация» - дисциплины «Общая фармацевтическая химия», «Методы фармакопейного анализа», «Специальная фармацевтическая химия».

В рамках инициативной темы № 033320-0-000 «Создание новых лекарственных веществ с помощью искусственного интеллекта», выполняемой на базе кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН создано обучающее видео по освоению МГК в программе OriginPro.

Методология и методы исследования. В диссертационном исследовании применена общенаучная методология – сравнение, сопоставление, анализ, базирующаяся на анализе литературных данных зарубежных и ведущих российских исследователей (более 200 источников), нормативной документации, включая отечественную и зарубежные фармакопеи, а также на получении результатов с использованием современных инструментальных методов – поляриметрии, DLS (dynamic light scattering/динамическое светорассеяние), LALLS (low-angle laser light scattering/малоугловое рассеяние лазерного света), РФА, электронной и колебательной спектроскопии, а также биологических испытаний на основе аррениусовской кинетики. Современные хемометрические методы (PASS Online, ККСА, МГК) позволили в рамках выбранной методологии разработать новые подходы к контролю качества лекарственных растительных препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение спектральных методов: электронной спектрофотометрии, ИКФС нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) и РФА – с последующей интерпретацией результатов МГК для идентификации настоек и ЛРС, без использования СО.
2. Необходимость использования референс-образца со сходной биологической матрицей в исследованиях методом РФА, в том числе в определении степени экстракции эссенциальных макро- и микроэлементов путем сравнения элемента ЛРС и сухих остатков настоек, изготовленных из этого сырья.
3. Методики поляриметрического определения подлинности настоек разных ботанических родов – валерианы, пустырника, боярышника.
4. Обоснование оценки биологической активности компонентов ЛРП на основе кинетики Аррениуса для лиганд-рецепторных взаимодействий методом «Spirotox» и хемометрическими методами – ККСА, PASS Online.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современного высокотехнологического оборудования для осуществления физико-химических, хемометрических и биологических подходов анализа настоек и ЛРС, а также оригинальных программных продуктов для исследования методом ККСА – «ChemicPen» (ввод и подготовка к расчету химических структурных формул), «ChemicDescriptor» (расчет топологических индексов сложных многоатомных молекул лекарственных веществ). Все результаты обработаны с

использованием программного обеспечения (ПО) соответствующего оборудования и методами статистического анализа с помощью пакета программ OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, США).

Апробация результатов исследования по диссертации проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (протокол № 0300-35-04/03 от 25.09.2023). Основные результаты исследования представлены в 5 публикациях, среди которых 3 статьи в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus), 2 статьи в изданиях перечня РUDН, а также в тезисах и устных докладах: XVII Международная (XXVI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, Россия, 17 марта 2022 г.); XII и XIII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия, 14 марта – 18 апреля 2022 г. и 1 марта – 11 апреля 2023 г.); XIII межвузовская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Научная весна 2023» (Москва, Россия, 17 мая 2023г.).

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, обработке и анализе результатов, апробации и внедрении результатов исследования в контрольно-аналитической лаборатории ООО «КоАЛ Фарманализ», подготовке публикаций в соавторстве с научным коллективом кафедры фармацевтической токсикологической химии РUDН.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, библиографический список (233 источника) и приложение (50 страниц). Результаты проиллюстрированы в 20 таблицах и 44 рисунках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 диссертации посвящена обзору литературы по теме диссертации. В ней обобщены данные по фармакологическим свойствам ЛРС валерианы, пустырника и боярышника. Охарактеризованы детали компьютерного прогнозирования активности биологически активных соединений – PASS Online, ККСА компонентов ЛРП. Характеристика МГК представлена примерами из разных областей знаний.

В **Главе 2** диссертации представлены данные о производителе, серии, сроках годности исследованных настоек и сырья валерианы, пустырника и боярышника. Кратко охарактеризовано контрольно-аналитическое оборудование: спектрофотометр (Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies, США); спектрофлуориметр (Agilent Cary Eclipse, США); ИКФС с приставкой НПВО (Agilent Cary 630, США); рентгенофлуоресцентный спектрометр (Shimadzu, EDX-7000, Япония); поляриметр с модулем Пельтье (POL-1/2, Atago, Япония); анализатор размеров частиц и измеритель ζ -потенциала (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Великобритания); измеритель размера частиц (Mastersizer 3600, Malvern, Великобритания). Дана характеристика клеточного биосенсора *Sp. ambiguus* для расчёта E_a^{obs} в соответствии с кинетикой Аррениуса. Описано ПО для прогнозирования биологической активности компонентов ЛРП (Pass Online и ККСА) и хемометрической обработки результатов МГК в программе OriginPro 2021.

Глава 3 диссертационной работы посвящена результатам исследования и их обсуждению:

1. Метод главных компонент в обработке спектральных измерений для определения подлинности растительных препаратов

Бурное развитие контрольно-аналитического оборудования способствует получению большого массива данных при измерении низких содержаний. Обработка многомерных результатов современными хемометрическими методами открывает широкие возможности в кластеризации исследуемых образцов с последующей идентификацией (*Ikhsan A.N. et al., 2021; Noviana E. et al., 2022*). МГК уменьшает размерность многомерного набора данных без потери полезной информации, проецируя их в меньший набор переменных в новых координатах, называемых главными компонентами/principal components (ГК/РС) (*Biancolillo A. et al., 2018; Bartholomew D.J. et al., 2010; Lever J. et al., 2017*).

1.1. Ультрафиолетовые спектры настоек на основе ЛРС разных ботанических родов отражают суммарную оптическую плотность многочисленных компонентов, присутствующих в образцах (Рисунок 1).

По этой причине не представляется возможным выделить отдельные полосы поглощения специфических соединений. Для МГК-анализа спектральных данных составляли первичную матрицу X , включающую длины волн (λ_i , $n=181$) десяти различных настоек ($n=10$) и соответствующие им значения оптических

плотностей ($N_A=181 \times 10=1810$). Число ГК, включающих наиболее важную информацию об исследуемых объектах, оценивали по положению излома на кривой в координатах «Собственные значения/Eigenvalues – номер ГК/РС» (Timmerman M.E. et al., 2018). Излом на кривой формировался между второй и третьей ГК с собственными значениями больше единицы. В данном случае первые три ГК описывали максимальную дисперсию исходных данных: 98,7% (77,0% + 16,1% + 5,6%). Для построения графика с максимальной информацией о полученных результатах, была использована трехмерная визуализация результатов (3D график). Кластерное разделение настоек в координатах РС1-РС2-РС3 позволило обнаружить области, соответствующие каждому ботаническому роду, в форме эллипсоидов. Положения эллипсоидов на 3D-диаграмме находились друг от друга на расстояниях, не ниже допустимых значений единиц Махаланобиса ($\geq 3\sigma$) (Li Q. et al., 2020).

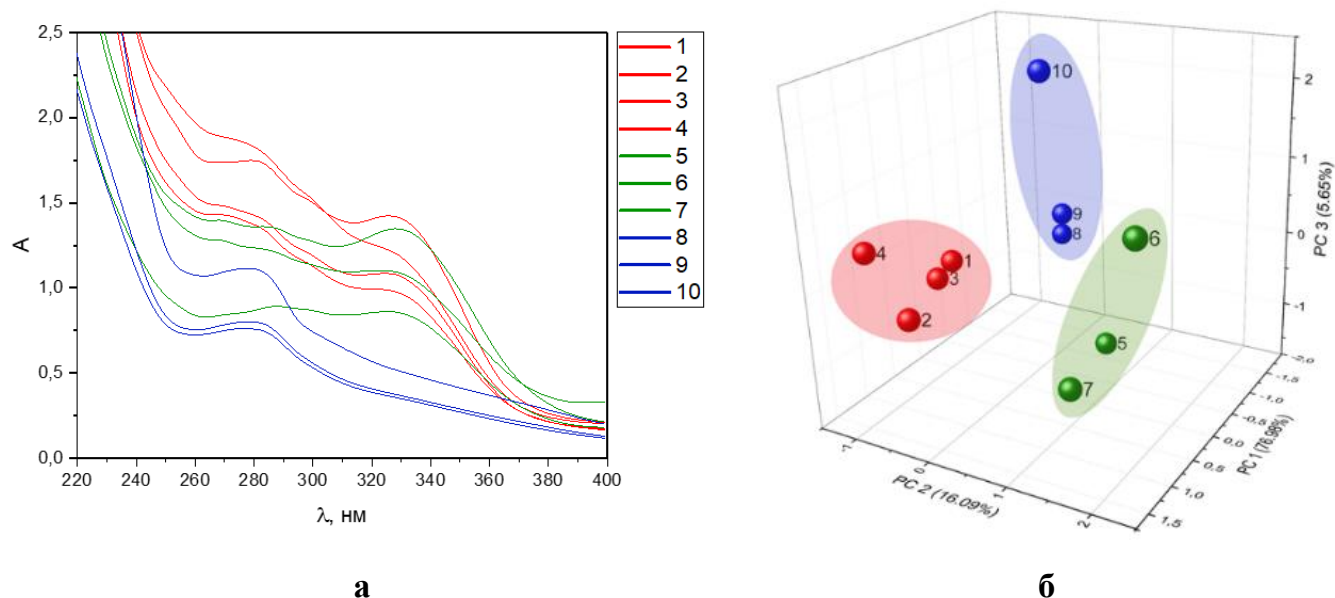


Рисунок 1. УФ-спектры поглощения настоек, спиртовое разведение 1:40 – **а** и трёхмерная визуализация в результате хемометрической обработки методом ГК – **б**. Настойки: 1-4 валерианы; 5-7 пустырника; 8-10 боярышника.

Источник: составлено автором

Хемометрический подход на основе МГК обработки спектрофотометрических результатов позволил безошибочно отличить настойки между собой без использования СО. Обязательным условием применения разработанной методики определения подлинности настойки является предварительное создание библиотеки данных с большой

выборкой образцов, которая в данных испытаниях включала 1810 значений первичной матрицы.

1.2. Спектры флуоресценции настоек. Спектры флуоресценции настоек ($n=10$), полученные при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{exc}}=330$ нм с шагом 1 нм, как и в случае с УФ-спектрами, не позволили идентифицировать настойки выбранной фармакологической группы. Первичная матрица X в МГК включала для 10 настоек 401 длину волны (λ_i) и соответствующие интенсивности флуоресценции I ($N_I= 401 \times 10 = 4010$). Обработка результатов МГК позволила в новых координатах отличить настойки, изготовленные из растений разных ботанических родов. Каждая из настоек заняла собственную область в трехмерном пространстве с координатами «PC1-PC2-PC3» с суммарной 96,8% (71,7%+19,0%+6,1%) дисперсией спектральных результатов и рекомендуемыми расстояниями Махаланобиса ($\geq 3\sigma$).

Разработанная методика позволила отличить настойки выбранного фармакологического класса между собой без применения СО.

1.3. Инфракрасные спектры ЛРС и сухих остатков настоек. В исследованных видах сырья многие компоненты относятся к одним и тем же классам органических соединений. По этой причине полученные ИК-спектры ЛРС ($n=15$) не имели существенных различий между собой по положению и отличались лишь по интенсивности полос пропускания (Рисунок 2). Исходная матрица X для обработки результатов включала 3350 значений волновых чисел (ν_i) и соответствующих им значений пропускания света ($N_T= 3350 \times 15 = 50250$). Как и в предыдущих методиках, была выбрана трехмерная модель визуализации результатов. Хемометрический подход обработки ИК-спектров ЛРС на основе МГК позволил различить сырье разных ботанических родов с суммарной 97,8% (62,8%+30,8%+4,2%) дисперсией спектральных результатов, характеризующей различие между образцами. Каждый из образцов занимал отдельную область в трехмерном пространстве на расстояниях Махаланобиса между ними $\geq 3\sigma$.

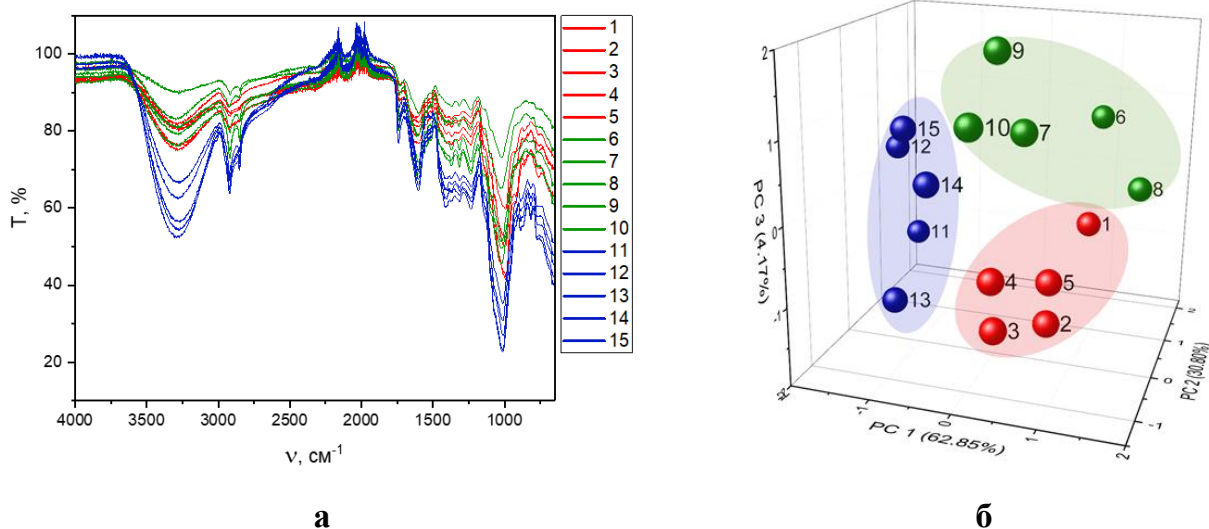


Рисунок 2. ИК-спектры гомогенизированного ЛРС – **а** и разделение ботанических родов после обработки спектральных результатов методом ГК – **б**. Сырье: 1-5 валерианы; 6-10 пустырника; 11-15 боярышника.

Источник: составлено автором

Анализ ИК-спектров методом ГК позволил идентифицировать ЛРС при условии предварительного создания библиотеки спектральных результатов, образующих основу первичной матрицы с 50250 значениями пропускания света в ИК-области.

2. Роль макро- и микроэлемента в идентификации ЛРС и настоек

Лекарственные растения содержат жизненно необходимые макро- и микроэлементы s-, p, d - классов (*Winkler A. et al., 2020*). Большинство ранее проведенных работ по изучению элементного состава ЛРС было посвящено преимущественно экологическим аспектам, т. е. определению содержания токсичных элементов (*Jurowski K. et al., 2022*).

Для определения элементного профиля настоек анализировали сухие остатки после удаления растворителя и доведения пробы до постоянной массы. В исследованиях ЛРП был использован референс-образец с аналогичной биологической матрицей, прошедший международную интеркалибровку (NIST-2976).

2.1. Метод главных компонент в обработке спектров РФА. Полученные результаты определения металлома (элемента) компонентов в ЛРС и настойках составили основу библиотеки, которая включала не менее 30000 значений интенсивностей рентгенофлуоресценции: $N_1 = N(\text{проб}) \times N(\text{элементов})$.

Излом на кривой в координатах «Собственные значения/Eigenvalues – номер ГК/РС» формировался между первой и второй ГК с собственными значениями больше единицы. На координатной плоскости «PC1-PC2» были обнаружены области, соответствующие ЛРС валерианы, пустырника и боярышника (Рисунок 3). Для оценки достоверности методики были проанализированы образцы неизвестного лекарственного сырья (слепые пробы X1-X12), которые дополнили имеющуюся библиотеку. Пробы неизвестного сырья заняли область сырья валерианы, что совпало с предположением заказчика анализа.

Несмотря на различия источников растительного сырья, обработка методом ГК результатов РФА сухих остатков настоек, изготовленных в лаборатории ($N_1=231$) и настоек заводского изготовления ($N_1=216$), привела к ожидаемому результату – настойки валерианы, пустырника и боярышника занимали отдельные области на диаграмме в координатах «PC1-PC2».

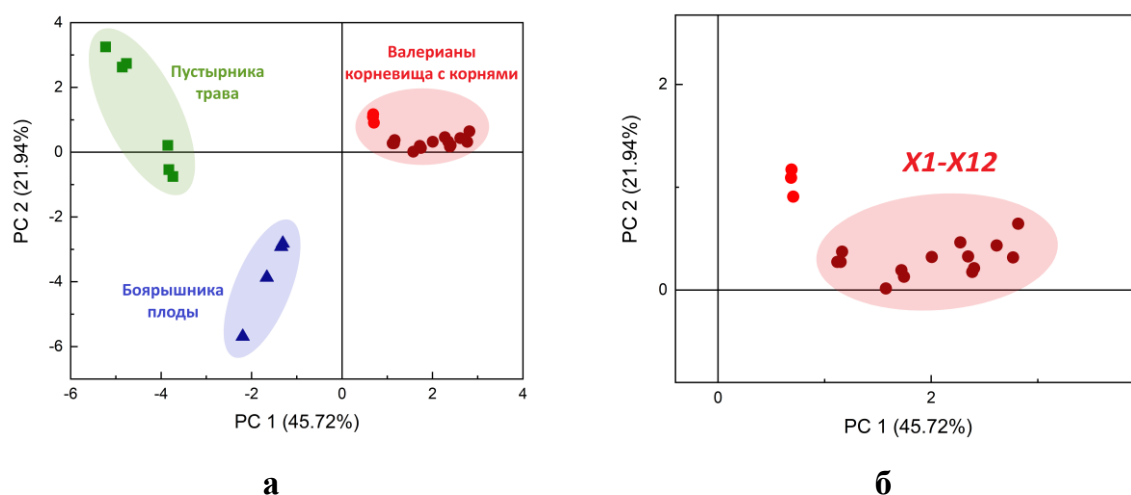


Рисунок 3. Разделение образцов ЛРС после хемометрической обработки результатов РФА методом ГК: разные виды сырья ($N_1=768$) – а и пробы X1-X12 неизвестного сырья ($N_1=912$) в четверти, соответствующей валериане, в увеличенном масштабе – б.

Источник: составлено автором

Таким образом, с помощью МГК удалось отличить ЛРС и настойки трёх ботанических родов. Идентификация ЛРП оказалась возможной без разработки и использования СО.

Разработанный и апробированный на разных растительных препаратах подход может быть рекомендован для определения подлинности сырья и настоек других фармакологических групп.

2.2. Определение степени экстракции эссенциальных макро- и микроэлементов из ЛРС в настойку. Для оценки степени извлечения/экстракции эссенциальных элементов в водно-спиртовой экстрагент были проведены исследования с «эталонными» настойками, изготовленными в лаборатории из лекарственного сырья методом мацерации. Сухие остатки настоек, доведенные до постоянной массы, были проанализированы методом РФА на содержание неорганических компонентов. В соответствии с данными референс-образца, прошедшего международную интеркалибрацию, значения интенсивностей сигналов К, Са, Р, S, Cl, Mn, Fe, Cu, Zn были пересчитаны на массы по пропорции:

$$I_{\text{реф}}/I_{\text{ЛРС}} = m_{\text{реф}}/m_{\text{ЛРС}},$$

где $I_{\text{реф}}$, $I_{\text{ЛРС}}$ и $m_{\text{реф}}$, $m_{\text{ЛРС}}$ – интенсивности сигналов и массы соответственно референс-образца и анализируемого материала. Степень извлечения элемента в экстрагент рассчитывали, как отношение количества вещества элемента (мкмоль) в сухом остатке (n_2) к количеству вещества в навеске сырья (n_1) (Таблица 1).

Таблица 1. Степень экстракции эссенциальных элементов из сырья валерианы ($\bar{m}_{\text{сырье}}=6,0006\pm 0,0001$ г) в водно-спиртовой экстрагент ($\bar{V}_{\text{настойки}}=29,00\pm 0,25$ мл; $\bar{m}_{\text{сухой остаток}}=0,6216\pm 0,0638$ г); $n=3$, $\bar{x}\pm s$.

Элемент	Количество элемента в навесках, \bar{n} , мкмоль		Степень извлечения $\bar{n}_2 / \bar{n}_1 \times 100, \%$
	Диспергированное сырье, $\bar{n}_1\pm s$	Сухой остаток, $\bar{n}_2\pm s$	
К	4574±1	612±15	13
Са	744±3	17±1	2,3
Р	653±9	76±2	12
S	305±11	17±1	5,6
Cl	137±3	36±1	26
Fe	129±1	0,41±0,20	0,3
Mn	21,0±0,1	0,31±0,02	1,5
Zn	9,1±0,1	0,88±0,17	9,7
Cu	0,49±0,02	0,06±0,01	12

Доля извлекаемого элемента из ЛРС валерианы может быть представлена рядом в соответствии со снижением степени его экстракции: Cl (26%) > K (13%) ≥ Cu (12%) = P (12%) > Zn (9,7%). Для железа, марганца и кальция степень экстракции не превышала 2,5%.

Аналогичные результаты были получены для настойки пустырника. Порядок элементов при ранжировании доли извлечения из сырья в настойку пустырника отличался от валерианы: Cl (31%) > K (11%) > Zn (9,0%) > S (7,3%) > Cu (6,0%). Степень экстракции железа, марганца и кальция из травы пустырника в настойку была еще ниже, чем для ЛС валерианы и не превышала 0,6%.

Для настоек боярышника по степени извлечения также не совпадало с валерианой и пустырником: Zn (39%) > S (34%) > P (8,3%) > Cu (7,4%) > K (4,2%). Для боярышника характерно более низкое содержание всех элементов по сравнению с валерианой и пустырником, а хлор и марганец вообще не был обнаружен в сухих остатках настоек.

Разработанная методика оценки качества настоек по элементному профилю сухого остатка с использованием референс-образца с идентичной биологической матрицей была апробирована для настоек разных производителей. Оказалось, что содержание элементов в настойках одного вида разных производителей может достигать десятикратных различий. Например, содержание калия в настойках валерианы находилось в интервале от 4,0 до 44 мг/г. Настойки, изготовленные в лаборатории из аптечного сырья, в некоторых случаях превышали верхнюю границу интервала содержаний элемента в заводских настойках.

Таким образом, накопленные результаты по определению элементного профиля ЛРП позволили сформировать библиотеку данных, которая легла в основу методики «Определение подлинности ЛРС хемометрической обработкой спектральных результатов МГК» и была внедрена в практику контрольно-аналитической лаборатории.

3. Роль хиральных компонентов настоек в определении подлинности настоек

В поисках общего характеристического показателя, который мог бы использоваться при идентификации растительных препаратов, были проанализированы литературные данные, касающиеся присутствия в настойках оптически активных соединений. Оказалось, что из 92 химических компонентов валерианы 77 (84%) являются

оптически активными. Для пустырника и боярышника доля хиральных компонентов ниже и составляет соответственно: $\frac{15}{23} \times 100\% = 65\%$ и $\frac{18}{25} \times 100\% = 72\%$.

В связи с разной долей хиральных компонентов, а также с различиями в химической структуре и числе оптически активных центров, настойки имели специфические значения суммарных углов оптического вращения α_D^{20} . Действительно, если поляриметрические измерения настоек боярышника не требовали разбавления, то для настоек валерианы было необходимо разбавление в объемном соотношении 1:40, а для настоек пустырника 1:10.

В результате исследований была сформирована библиотека значений оптических активностей настоек валерианы (n=21), пустырника (n=21), боярышника (n=14). Поскольку настойки были представлены образцами разных производителей или отдельных серий одного производителя, набор полученных результатов был обработан методами математической статистики, а именно исключением грубых промахов по Q-критерию (n<10) или сравнением $|d_i|$ со значением 3s (n≥10). Кроме того, для оценки качества настоек рассчитывали межсерийную воспроизводимость значений α° , которая зависит от природы растительного сырья и соблюдения технологического регламента. Межсерийная воспроизводимость ($\bar{\alpha}^\circ \pm \Delta\alpha^\circ$) для настоек в соответствующих разбавлениях составила: валериана ($-0,40^\circ \pm 0,15^\circ$); пустырник ($-0,62^\circ \pm 0,38^\circ$); боярышника ($-1,17^\circ \pm 0,27^\circ$).

В результате исключения грубых промахов число исследуемых объектов сократилось и для полученных рядов значений α° были обозначены рекомендуемые интервалы. Для настоек валерианы в разведениях 1:40 значения углов оптического вращения находились в интервале $-0,10^\circ < \alpha^\circ < -0,89^\circ$ (n=10). Для настоек пустырника в разведениях 1:10 оптическое вращение занимало интервал $-0,10^\circ < \alpha^\circ < -2,21^\circ$ (n=13). Углы вращения плоскости поляризованного света настоек боярышника (*разведение не требовалось*) занимали интервал $-0,76^\circ < \alpha^\circ < -1,55^\circ$ (n=7).

Следует отметить, что все настойки имели левое вращение.

Согласно ОФС ГФ РФ XIV и Ph. Eur. X для валидации методики «Испытание на подлинность» единственным требованием является оценка специфичности. Для этого поляриметрическим методом были исследованы контрольные настойки, изготовленные в лаборатории методом мацерации из ЛРС, реализуемого через аптеки (Таблица 2). Кроме

того, подлинность этих настоек, как было показано выше (см. 2.1), была доказана методом РФА.

Таблица 2. Значения углов оптического вращения контрольных настоек с установленными рекомендуемыми интервалами значений ($n=3$, $\bar{\alpha} \pm s$).

Настойка, разведение	Контрольные настойки, $\bar{\alpha} \pm s$	Рекомендуемые интервалы α°
Валерианы, 1:40	$-0,23 \pm 0,03$	$-0,10^\circ < \alpha^\circ < -0,89^\circ$
Пустырника, 1:10	$-1,23 \pm 0,33$	$-0,10^\circ < \alpha^\circ < -2,21^\circ$
Боярышника, без разведения	$-1,12 \pm 0,23$	$-0,76^\circ < \alpha^\circ < -1,55^\circ$

Таким образом, настойки валерианы, пустырника и боярышника вошли в рекомендуемый диапазон значений углов оптического вращения. Из полученных результатов следует, что присутствие хиральных компонентов в настойках валерианы, пустырника и боярышника является основанием для их идентификации поляризметрическим методом.

4. Биологическая активность растительных препаратов как многокомпонентных систем

Лекарственные растения содержат многочисленные органические и неорганические соединения, суммарная биологическая активность которых проявляется в виде тех или иных терапевтических эффектов. С развитием компьютерных технологий набирает популярность направление *in silico*, компьютерное прогнозирование (моделирование) различных биологических и физико-химических свойств отдельных компонентов сложных по составу объектов, например ЛРП.

4.1. Оценка биологической активности компонентов растительных препаратов методом PASS Online. Прогноз биологической активности проводили на основе SMILES – структуры (simplified molecular input line entry system/система упрощённого представления молекул в строке ввода) каждого компонента (*Lagunin A. et al., 2000*). Для определения взаимосвязи с их гипотензивным, кардиотоническим и седативным действием использовали параметр **Pa** (probability «to be active» – вероятность

«быть активным»), который находится в диапазоне от 0,000 до 1,000 и выражается в процентах правдоподобия (*Nguyen H.D., 2023*).

Как оказалось, все рассматриваемые биологически активные соединения сырья валерианы, пустырника и боярышника обладают в совокупности широким фармакологическим спектром свойств: ингибирование различных ферментов, противоопухолевое, противоэксземное, противовоспалительное действие. Но наиболее высокие значения P_a ($>0,80$) в проявлении гипотензивных и кардиотонических свойств характерны для флавоноидов и их гликозидов, алкалоидов и карбоновых кислот. Рассмотренные соединения представляют лишь незначительную часть многообразного состава ЛРС, но именно они преобладают в лекарственных растениях и с высокой потенциальной активностью проявляют свойства, характерные для данной фармакологической группы – гипотензивные, кардиотонические, седативные.

4.2. Прогнозирование липофильности компонентов растительных препаратов методом ККСА. Поиск новых биологически активных соединений в ЛРС не теряет своей актуальности. Для характеристики фармакологических свойств впервые обнаруженных компонентов ЛРС требуется трудоемкие процедуры извлечения из сырья или химический синтез аналогов нативных компонентов. В этом случае альтернативным и незаменимым является метод количественной корреляции «структура – активность». Например, для прогнозирования липофильности ($\text{LogP} = C_{\text{октанол}}/C_{\text{вода}}$), одного из показателей биодоступности, для впервые выделенного соединения может быть использован топологический индекс Винера (W) (*Ashraf S. et al., 2022*). Например, если обнаруженным новым компонентом ЛРС является карбоновая кислота, то полученная диаграмма зависимости липофильности известных кислот от величины топологического индекса позволит оценить её липофильность. Было показано, что зависимость LogP карбоновых кислот от индекса Винера (W) характеризуется прямой пропорциональностью с высоким коэффициентом корреляции ($r=0,93$). Пользуясь полученной диаграммой, впервые обнаруженное соединение класса карбоновых кислот может быть охарактеризовано по выбранному свойству после расчета его топологического индекса. Для подтверждения этого вывода был рассчитан индекс Винера для *p*-кумаровой кислоты, присутствующей в траве пустырника ($W=84$), и для кофейной кислоты, компонента плодов боярышника ($W=102$). Найденные значения липофильности этих кислот с высокой точностью совпали с табличными данными (PubChem, DrugBank,

FoodB): кофейная кислота $\text{Log}P_x = 1,0$ ($\text{Log}P_{\text{табл}}=0,7-1,2$); p-кумаровая кислота $\text{Log}P_x = 1,3$ ($\text{Log}P_{\text{табл}}=1,0-1,5$).

Таким образом, благодаря оригинальному ПО на основе зависимостей «структура-активность», возможно прогнозирование различных свойств и активностей растительных компонентов.

4.3. Метод Spirotox-тест в определении подлинности настоек. Для исключения влияния частиц дисперсной фазы на биологический объект – инфузорию *Sp. ambiguum* исследовали стабильность настоек при разбавлении водой.

4.3.1. Электрокинетический потенциал как характеристика дисперсности и стабильности водно-спиртовых извлечений из ЛРС. Увеличение угла оптического вращения настоек во времени, обнаруженное поляриметрическим методом, могло быть связано не только с хиральными превращениями, но и с нарушением гомогенности настоек. Для исключения влияния частиц дисперсной фазы на лиганд-рецепторные взаимодействия была исследована дисперсность настоек. В свежеприготовленных спиртовых разведениях размер частиц дисперсной фазы находился в микрометровом диапазоне и имел распределение, близкое к нормальному. В водных разведениях настоек размер частиц дисперсной фазы соответствовал нанометровому диапазону. Стабильность свежеприготовленных спиртовых разведений оценивали величиной ζ -потенциала, снижающегося с ростом угла оптического вращения от -14 мВ до -4 мВ. Значения электрокинетического потенциала в свежеприготовленных водных разведениях настоек находились на уровне известных граничных значений стабильности дисперсных систем в 30 мВ. Стабильные нанометровые частицы водных разбавлений не могли мешать биологическим испытаниям. Напротив, их можно рассматривать в качестве переносчиков биологически активных компонентов настоек внутрь клетки.

4.3.2. Кинетика Аррениуса в определении подлинности настоек. Присутствующие в настойках биологически активные соединения участвуют в лиганд-рецепторных взаимодействиях на клеточном уровне организма. Использование в качестве модели одноклеточного объекта – инфузории *Sp. ambiguum* позволило обобщить механизмы таких взаимодействий (Goncharuk V.V. et al., 2017). Оценку суммарной биологической активности компонентов каждой из настоек проводили по величине $^{obs}E_a$ – кажущейся энергии активации гибели клетки.

Использование аррениусовских координат « $\ln k - 1/T$ », позволило получить значения кажущихся энергий активации гибели *Sp. ambiguum* как для экстрагента, так и для настоек разных фармакологических классов в диапазоне 20-28°C с шагом в 2°C.

Настойки пустырника обладали более высокой биологической активностью, для них средние значения энергий активации имели самое низкое значение при максимальном разбавлении водой (1:10): $^{obs}E_a = (87 \pm 13)$ кДж/моль. Аналогичные разведения этанола 70% не вызывали гибель инфузорий в течение периода наблюдения (более 60 минут). Значения энергии активации для настоек валерианы $^{obs}E_a = (135 \pm 6)$ кДж/моль (разведение 1:5) свидетельствуют о их наименьшей токсичности. Промежуточное положение в этом ряду занимали настойки боярышника (1:4) $^{obs}E_a = (113 \pm 20)$ кДж/моль.

Разработанная ранее (Сыроешкин А.В. и др., 2010) и дополненная диаграмма « $^{obs}E_a$ (инфузория) – ЛД₅₀ (крысы, *per os*)» позволила прогнозировать токсичность настоек по найденным значениям энергии активации. Согласно диаграмме, настойка пустырника в разведении 1:10 превышает токсичность фенола, настойка боярышника (разведение 1:4) близка к токсичности меди сульфата, настойка валерианы (разведение 1:5) занимает промежуточное положение между трихлоруксусной кислотой и эмоксипином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработаны новые подходы в оценке качества лекарственных растительных препаратов валерианы, пустырника, боярышника физико-химическими, биологическими и хемометрическими методами. Созданы библиотеки спектральных результатов в широком диапазоне длин волн (от 0,1 нм до 15 000 нм) для определения подлинности настоек и ЛРС выбранной фармакологической группы на основе МГК без использования малодоступных и дорогостоящих стандартных образцов фитомаркёров. Впервые для ряда эссенциальных макро- и микроэлементов определена степень извлечения из диспергированного лекарственного растительного сырья в настойку (сырье → настойка → сухой остаток настойки) методом РФА с использованием референс-образца с аналогичной биологической матрицей, прошедшего международную интеркалибрацию (NIST-2976). Впервые для оценки качества настоек предложен метод поляриметрии и установлены допустимые интервалы значений углов вращения плоскости поляризованного света и кратности разведения этанолом. Это позволило идентифицировать настойки разных ботанических родов. Для сравнения биологической активности настоек и фармацевтических субстанций на основе аррениусовской кинетики

определены значения энергий активации ($^{obs}E_a$) лиганд-рецепторного взаимодействия (клеточный биосенсор *Sp. ambiguum*), которые могут быть использованы для их идентификации. Полученные результаты дополнили ранее разработанную диаграмму « $^{obs}E_a$ (инфузория) – ЛД₅₀ (крысы, *per os*)», которая позволяет прогнозировать токсичность лекарственных препаратов по экспериментальным значениям $^{obs}E_a$. Для группы карбоновых кислот, компонентов ЛРС и настоек, разработана диаграмма, позволяющая расчетным путем по величине топологического индекса Винера прогнозировать липофильность впервые открываемых соединений соответствующего класса. Методом PASS Online с использованием SMILES-структур компонентов ЛРП подтверждены высокие (>80%) степени проявления седативных, гипотензивных и кардиотонических свойств.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые подходы к контролю качества лекарственных растительных препаратов на основе их спектральных свойств в широком диапазоне длин волн, элементного состава, хиральности и биологической активности с привлечением современных методов хемометрики.

2. На основе хемометрической обработки (МГК) результатов спектрометрии в широком диапазоне длин волн (от 0,1 нм до 15 000 нм) разработаны методики определения подлинности растительных препаратов разных ботанических родов (сырья и настоек валерианы, пустырника и боярышника), без использования малодоступных и дорогостоящих стандартных образцов.

3. Сравнением результатов РФА сырья и сухих остатков настоек с использованием референс-образца с аналогичной матрицей, прошедшего международную интеркалибрацию (NIST-2976), показано, что степень извлечения эссенциальных макро- и микроэлементов (K, Ca, P, Cl, S, Fe, Zn, Cu, Mn) составляет (0,2–31) % в зависимости от элемента и ботанического рода образца.

4. Разработаны методики идентификации настоек разных ботанических родов методом поляриметрии. Установлены интервалы значений оптической активности при 20°C и кратности разведения этанолом для настоек: валерианы $-0,10^\circ < \alpha^\circ < -0,89^\circ$, 1:40; пустырника $-0,10^\circ < \alpha^\circ < -2,21^\circ$, 1:10; боярышника $-0,76^\circ < \alpha^\circ < -1,55^\circ$, без разведения.

5. Найденные экспериментально значения энергии активации ($^{obs}E_a$) лиганд-рецепторного взаимодействия (биосенсор *Sp. ambiguum*) позволили ранжировать

настойки по их биологической активности: валериана (135 ± 6 кДж/моль, 1:5) < боярышник (113 ± 20 кДж/моль, 1:4) < пустырник (87 ± 13 кДж/моль, 1:10) и могут быть использованы для их идентификации. Продемонстрирована возможность использования топологического индекса Винера (W) для прогнозирования липофильности (LogP) компонентов растительного сырья (модель – карбоновые кислоты). Через SMILES – структуры компонентов настоек (n=140) методом PASS Online подтверждены высокие (>80%) степени проявления седативных, гипотензивных и кардиотонических свойств препаратов исследованного фармакологического класса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$ d_i $ – случайное отклонение i-ой варианты от среднего	ГК/РС – главная компонента/principal component
DLS – dynamic light scattering, динамическое светорассеяние	ГФ РФ – государственная фармакопея Российской Федерации
LALLS – low-angle laser light scattering, малоугловое рассеяние лазерного света	ИКФС НПВО – инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье преобразованием
LogP – логарифм отношения концентраций исследуемой субстанции в октаноле и в воде ($C_{\text{октаноле}}/C_{\text{вода}}$)	ККСА/QSAR – количественная корреляция структура-активность/quantitative structure – activity relationship
$^{obs}E_a$ – наблюдаемая энергия активации	ЛД₅₀ – полуметальная доза
Pa – probability «to be active», вероятность «быть активным»	ЛП – лекарственный препарат
PASS – prediction of activity spectra for substances, метод прогнозирования биологической активности соединений	ЛРП – лекарственный растительный препарат
Ph. Eur. – European Pharmacopoeia / фармакопея Евросоюза	ЛРС – лекарственное растительное сырье
s – стандартное отклонение	МГК/РСА – метод главных компонент/principal component analysis
SMILES – simplified molecular input line entry system/система упрощенного представления молекул в строке ввода	ОФС – общая фармакопейная статья
USP NF – United States Pharmacopoeia and National formulary/ Фармакопея США и Национальный формуляр	РФА – рентгенофлуоресцентный анализ
W – топологический индекс Винера	СО – стандартный образец
	УФ – ультрафиолетовая (спектрофотометрия)
	ФС – фармакопейная статья

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**Международные базы цитирования:**

1. Syroeshkin, A.V. Polarimetry and dynamic light scattering in quality control of cardiotonic and hypotensive tinctures / A.V. Syroeshkin, **D.D. Ogotoeva**, D.A. Galkina, E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – N 6. – P. 114-119. DOI: 10.22159/ijap.2022v14i6.45907.
2. Syroeshkin, A.V. Comparison of biopharmaceutical parameters of cannabinoids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs by QSAR method / A.V. Syroeshkin, D.A. Galkina, **D.D. Ogotoeva**, O.V. Levitskaya, M.A. Morozova, T.V. Pleteneva // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2022. – V 15. – N 1. – P. 269-273. DOI: 10.22159/ijap.2023v15i1.45990.
3. Pleteneva, T.V. Arrhenius kinetics in the evaluation of the biological activity of pharmaceutical tinctures / T.V. Pleteneva, D.A. Galkina, O.A. Fatkulina, **D.D. Ogotoeva**, O.V. Levitskaya, E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. – N 4. – P. 277–281. DOI: 10.22159/ijap.2023v15i4.48058.

Перечень РУДН:

4. Сыроешкин, А.В. Поляриметрия и динамическое светорассеяние в контроле качества настоек / А.В. Сыроешкин, **Д.Д. Оготоева**, Д.А. Галкина, М.А. Джавахян, Т.Е. Елизарова, Е.В. Успенская, Т.В. Плетенева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25. – N 9. – С. 3-9. DOI: 10.29296/25877313-2022-09-01.
5. **Оготоева, Д.Д.** Эссенциальные элементы в лекарственном растительном сырье и настойках – сравнительный анализ / **Д.Д. Оготоева**, И.А. Нагорнов, О.В. Левицкая, Т.В. Максимова, Е. В. Успенская, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2023. – N3. – С. 77-84.

Оготовева Дайаана Дмитриевна

(Российская Федерация)

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХЕМОМЕТРИЧЕСКИЕ
ПОДХОДЫ В ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

Диссертационная работа посвящена разработке методик оценки качества лекарственного растительного сырья и настоек валерианы, пустырника, боярышника физико-химическими, биологическими и хемометрическими методами. Созданы библиотеки спектральных результатов большой выборки в широком диапазоне длин волн (УФ-спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, ИК-Фурье спектрометрия НПВО, рентгенофлуоресцентная спектрометрия) для последующей хемометрической обработки методом главных компонент и определения подлинности без использования малодоступных и дорогостоящих стандартных образцов фитомаркёров. На примере препаратов выбранного фармакологического класса, содержащих оптически активные компоненты, продемонстрирована возможность их идентификации методом поляриметрии. Методом Аррениусовской кинетики (Spirotox-тест) проведена сравнительная оценка биологической активности настоек и фармацевтических субстанций (диаграмма $^{obs}E_a - LD_{50}$). Расчетами количественной корреляции «структура-свойство» (ККСА, топологический индекс Винера) показана возможность прогнозирования липофильности отдельных компонентов настоек, что особенно важно для впервые изолированных субстанций и соответствия классификации в PASS-анализе.

Ogotoeva Daiaana Dmitrievna

(Russian Federation)

**PHYSICO-CHEMICAL, BIOLOGICAL AND CHEMOMETRIC APPROACHES TO
ASSESSING THE QUALITY OF HERBAL MEDICINE**

The dissertation work is devoted to the development of methods for assessing the quality of medicinal plant materials and tinctures of valerian, motherwort, hawthorn by physicochemical, biological and chemometric methods. Libraries of spectral results of a large sample in a wide range of wavelengths (UV spectrophotometry, spectrofluorimetry, ATR-FTIR spectrometry, X-ray fluorescence spectrometry) for subsequent chemometric processing by principal component analysis and authenticity determination without the use of poorly available and expensive standard samples of phytomarkers were created. On the example of preparations of the selected pharmacological class containing optically active components, the possibility of their identification by polarimetry was demonstrated. A comparative assessment of biological activity of tinctures and pharmaceutical substances was carried out by the Arrhenius kinetics method (Spirotox-test) (the diagram $^{obs}E_a - LD_{50}$). The calculations of quantitative structure-activity relationship (QSAR, Wiener's topological index) showed the possibility of predicting the lipophilicity of individual components of tinctures, which is especially important for first isolated substances and compliance with the classification in PASS-analysis.