

Торшин И.Ю.<sup>1</sup>, Громова О.А.<sup>1</sup>, Зайчик Б.Ц.<sup>2</sup>, Ружицкий А.О.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт фармакоинформатики, ФИЦ «Информатика и Управление» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

## КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЭКСТРАКТОВ ЖИРА РЫБ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ КРИТЕРИИ ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ СТАНДАРТИЗИРОВАННЫХ ЭКСТРАКТОВ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

<i>Актуальность</i>	Эффективность лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе омега-3 полиненасыщенных жирных кислот ( $\omega$ 3 ПНЖК) в существенной мере зависит от стандартизации содержания экстрактов по эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК), докозагексаеновой кислоте (ДГК) и другим видам жирных кислот.
<i>Материалы и методы</i>	В настоящей работе мы провели комплексное исследование состава 10 образцов $\omega$ 3 ПНЖК с хроматографическим определением более 40 метаболитов жирных кислот и других соединений. Полученные данные по составу экстрактов анализировались с использованием современных методов интеллектуального анализа данных (метод метрических спущений, многомерное шкалирование, метод принципиальных компонент с расшифровкой осей, тополого-метрический подход к распознаванию).
<i>Результаты</i>	Получены количественные маркеры, позволяющие отделять образцы на основе стандартизированных $\omega$ 3 ПНЖК (Омакор, Солгар омега-3 700, Фемибион наталкер-2, Омега-3 концентрат, Омегамама) от менее стандартизированных (Fish oil-Teva, Омегатрин, Омеганол и др.) на основе хроматографического анализа жирнокислотного состава исследованных образцов: маркер «ЭПК+ДГК», маркер « $\omega$ 6+ $\omega$ 11» и коэффициент стандартизации, оценивающий соответствие измеренных уровней $\omega$ 3 ПНЖК содержанию, заявляемому производителем.
<i>Выводы</i>	Среди изученных образцов наилучшими значениями показателей стандартизации отличался фармацевтический препарат Омакор.
<i>Ключевые слова</i>	Стандартизация омега-3 ПНЖК; нутрициальная поддержка; метрический анализ данных
<i>Для цитирования</i>	Torshin I. Yu., Gromova O. A., Zaychik B. Ts., Ruzhitsky A. O. Comprehensive study of the composition of fish fat extracts and quantitative criteria for distinguishing standardized omega-3 polyunsaturated fatty acids extracts. <i>Kardiologiya</i> . 2020;60(5):1–10. [Russian: Торшин И.Ю., Громова О.А., Зайчик Б.Ц., Ружицкий А.О. Комплексное исследование состава экстрактов жира рыб и количественные критерии для различения стандартизированных экстрактов омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. <i>Кардиология</i> . 2020;60(5):1–10]
<i>Автор для переписки</i>	Громова Ольга Алексеевна. E-mail: unesco.gromova@gmail.com

Фундаментальные основы фармакологического действия омега-3 полиненасыщенных жирных кислот ( $\omega$ 3 ПНЖК) хорошо изучены и описаны в многочисленных оригинальных исследованиях и обзорных статьях [1]. Вкратце, из таких  $\omega$ 3 ПНЖК, как эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) и докозагексаеновая кислота (ДГК), образуются важнейшие медиаторы воспаления – эйкозаноиды и докозаноиды, в том числе нейтропротектины, резолвины и маресины. Эйкозаноиды и докозаноиды, синтезируемые из ЭПК и ДГК в каскаде арахидоновой кислоты, имеют ключевое значение для осуществления физиологического окончания воспаления – так называемого. «разрешения воспаления» (англ., resolution of inflammation). Поэтому,  $\omega$ 3 ПНЖК, приготовляемые из экстрактов жира рыб, эффективны для терапии и профилактики широкого круга патологий, в том числе для профилактики и терапии ишемической болезни сердца, инсульта, а также

для нутрициальной поддержки [2]. Принимая во внимание крайне низкий уровень потребления россиянами  $\omega$ 3 ПНЖК, необходимо использование лекарственных препаратов и биологически активных добавок (БАД) на основе  $\omega$ 3 для компенсации нутрициального дефицита. Эффективность тех или иных образцов  $\omega$ 3 ПНЖК в существенной мере зависит от стандартизации содержания экстрактов по ЭПК, ДГК и другим видам ЖК. К сожалению, среди врачей все еще встречается терминологическая путаница, при которой все образцы  $\omega$ 3 ПНЖК называются с использованием такого термина 300–500-летней давности, как «рыбий жир». Данный термин весьма условен и не соответствует реалиям современной фармакологии  $\omega$ 3 ПНЖК.

Во-первых, лекарственные препараты и БАД, содержащие  $\omega$ 3 ПНЖК, могут изготавливаться вообще без использования экстрактов жира рыб (с использованием, на-

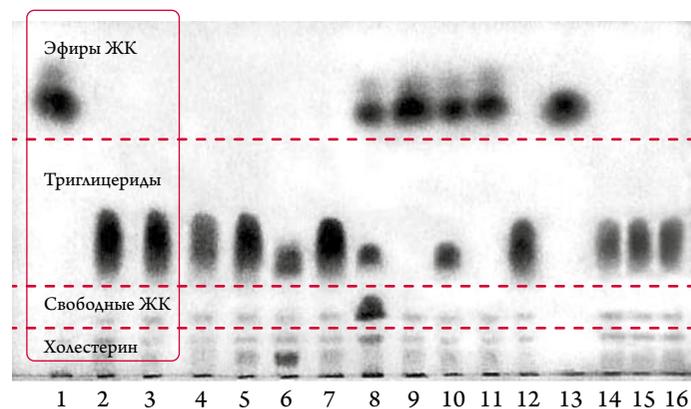
пример, экстрактов жира морских млекопитающих, экстрактов водорослей, синтетических форм  $\omega 3$  ПНЖК и др.) [1].

Во-вторых, само использование термина «жир» не совсем грамотно биохимически, так как жирами называются сложные эфиры ЖК с глицерином. При реальном приготовлении лекарственных препаратов и БАД на основе  $\omega 3$  ПНЖК из экстрактов жира рыб, зачастую, проводится частичное омыление жиров исходного экстракта с удалением глицерина и с последующей этерификацией полученной смеси ЖК метиловым, этиловым и другими короткоцепочечными одноатомными спиртами. Полученная таким образом смесь никоим образом не является «жиром» в научном значении этого слова.

В-третьих, и самое главное, препараты и БАД на основе  $\omega 3$  ПНЖК, из какой бы природной субстанции они не готовились, могут проходить существенную стандартизацию по составу. Например, эфиры ЖК в составе препарата Омакор® (Abbott Laboratories LLC) содержат не менее 90%  $\omega 3$  ПНЖК (по результатам настоящего исследования, более 97%). Очевидно, что настолько стандартизированный по жирнокислотному составу экстракт, содержащий заявленные количества ЭПК и ДГК, является фармацевтическим препаратом с высокой степенью очистки, а использование термина «рыбий жир» не является корректным.

Все вышесказанное обуславливает необходимость проведения исследований химического состава различных экстрактов  $\omega 3$  ПНЖК на основе жира рыб [3, 4] и др. с целью установления реальных показателей количественного и качественного состава препаратов и БАД на основе  $\omega 3$  ПНЖК, реально используемых во врачебной практике. Например, в работе [5] было проведено качественное исследование состава образцов  $\omega 3$  ПНЖК из числа представленных на российском рынке. По данным тонкослойной хроматографии, основная часть исследованных образцов относилась к двум группам: основным компонентом образцов

Рисунок 1. Хроматографический анализ образцов  $\omega 3$  ПНЖК, адаптирован из [5]



1 – Ateroblock; 2 – Doppelherz Aktiv omega-3; 3 – NutraSource omega 3; 4 – Omeganol; 5 – «Омега-3 фортекс»; 6 – «Омега-3 форте плюс»; 7 – Tandemax; 8 – заведомые вещества (снизу вверх: холестерин, свободная ЖК, триглицериды, эфиры ЖК); 9 – «Викинг омега-3 форте»; 10 – OmegaTrin; 11 – VitrumCardio omega-3; 12 – «Океанол»; 13 – «Омакор»; 14 – рыбий жир; 15 – «Уник омега-3»; 16 – «Янтарная капля».

1, 9, 11 и 13 на рисунке 1 являются эфиры ЖК, а образцов 2–4, 12, 14 (рыбьего жира), 15 и 16 – триглицериды (рис. 1).

В настоящей работе мы представляем результаты количественного хроматографического анализа 10 образцов  $\omega 3$  ПНЖК, полученных на основе экстрактов жира рыб. Полученные данные по составу экстрактов анализировались с использованием современных методов интеллектуального анализа данных (тополого-метрический подход к распознаванию, метод метрических сгущений, многомерное шкалирование и метод принципиальных компонент с расшифровкой осей [6]).

## Материалы и методы

Образцы  $\omega 3$  ПНЖК, исследованные в настоящей работе, перечислены в таблице 1. Отметим, что все исследованные образцы изготавливались на основе жира тех или иных сортов рыбы в качестве исходного сырья.

Таблица 1. Краткая информация об исследованных образцах  $\omega 3$  ПНЖК

Препарат/БАД	Капсула, мг	Омега-3, мг	ЭПК, мг	ДГК, мг
Омега-3 Доппельгерц Актив	1186	300	144	96
Fish oil-Teva	500	165	НЗ	НЗ
Омегатрин	780	397,8	НЗ	НЗ
Омега-3 концентрат	1000	600	330	220
Омегамама	700	150	23	105
Фемибион натаалкер-2	500	200	0	200
Омеганол	500	32	НЗ	НЗ
Омакор	1000	900	460	380
Dear-Natura DHA	1200	500	60	400
Солгар омега-3700	1730	700	360	240

НЗ – неизвестно, ЭПК – эйкозапентаеновая кислота; ДГК – докозагексаеновая кислота.

Таблица 2. Соединения, найденные в исследованных образцах в результате проведения хроматографического анализа

Соединение	ПНЖК	ММ
11-эйкозеновая к-та, метиловый эфир	ω9	325
11-эйкозеновая к-та, пропиловый эфир	ω9	353
13-докозеновая к-та, метиловый эфир	ω9	353
13-докозеновая к-та, пропиловый эфир	ω9	381
13-метилтетрадекановая к-та, метиловый эфир	нас.	256
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир	ДГК	384
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, метиловый эфир	ДГК	342
5,11,14,17-эйкозатетраеновая к-та, метиловый эфир	ЭТК	318
5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая к-та, этиловый эфир	ЭПК	330
5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая к-та, метиловый эфир	ЭПК	316
5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая к-та, пропиловый эфир	ЭПК	344
6,9,12,15-гексадекатетраеновая к-та, метиловый эфир	ω3	262
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, бутиловый эфир	ω3	332
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, этиловый эфир	ω3	304
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир	ω3	290
6,9,12-гексадекатриеновая к-та, метиловый эфир	ω3	264
6-октадеценная к-та, этиловый эфир	ω11	310
6-октадеценная к-та, метиловый эфир	ω11	296
7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир	ДГК	384
7,10,13,16,19-докозопентаеновая к-та метиловый эфир	ДПК	342
7-метил-6-гексадеценная к-та	ω9	282
Линолевая к-та, этиловый эфир	ω6	308
Линолевая к-та, метиловый эфир	ω6	294
Пальмитолеиновая к-та, этиловый эфир	ω7	282
Пальмитолеиновая к-та, метиловый эфир	ω7	268
Олеиновая к-та, этиловый эфир	ω9	310
Олеиновая к-та, метиловый эфир	ω9	296
Деканоевая к-та, метиловый эфир	нас.	186
Додекановая к-та, метиловый эфир	нас.	214
Эйкозановая к-та, метиловый эфир	нас.	327
Эйкозановая к-та, пропиловый эфир	нас.	355
Маргариновая к-та, метиловый эфир	нас.	284
Маргариновая к-та, этиловый эфир	нас.	298
Пальмитиновая к-та, метиловый эфир	нас.	270
Метилникотинат	–	137
Стеариновая к-та, этиловый эфир	нас.	312
Стеариновая к-та, метиловый эфир	нас.	298
Каприловая к-та, метиловый эфир	нас.	158
Пантолактон	–	130
Пентадекановая к-та, метиловый эфир	нас.	256
Миристиновая к-та, этиловый эфир	нас.	257
Миристиновая к-та, метиловый эфир	нас.	243
Миристиновая к-та, метиловый эфир	нас.	243
12-метил-тридекановая к-та, метиловый эфир	нас.	242
12-метил-тридекановая к-та, метиловый эфир	нас.	242
Тридекановая к-та, метиловый эфир	нас.	228

ММ – молекулярная масса, г/моль, «нас.» – насыщенная жирная кислота.

### Хроматографическое определение жирнокислотного состава

Образцы растворяли в гексане и подвергали солянокислому гидролизу в присутствии метанола (Methanolic-HCl (3N) Supelco) в плотно закупоренных виалах при 90°C в течение 1 часа. Полученные таким образом метиловые эфиры ЖК анализировали на хроматографе Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra при следующих условиях: газ-носитель – гелий, линейная скорость 35,6 см/сек (0,9 мл/мин), деление потока 4:1. Колонка капиллярная MDN-5 (Supelco), длина 30 метров, внутренний диаметр 0,25 мм. Параметры хроматографа: в режиме градиента температур, детектор 200°C, интерфейс 205°C, режим измерения – от 45 до 450 m/z. Качественный состав полученных смесей определялся с использованием библиотеки масс спектров NIST 11.

В результате проведения настоящей серии экспериментов каждый образец описывался вектором из 44 позиций, в каждой из которых представлена площадь пика, соответствующая тому или иному соединению. Соединения, установленные в ходе настоящего исследования, перечислены в таблице 2.

Для стандартной обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчет числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия  $\chi^2$ , Т-критерия Вилкоксона, теста Манна-Уитни и теста Стьюдента в электронных таблицах Microsoft Excel.

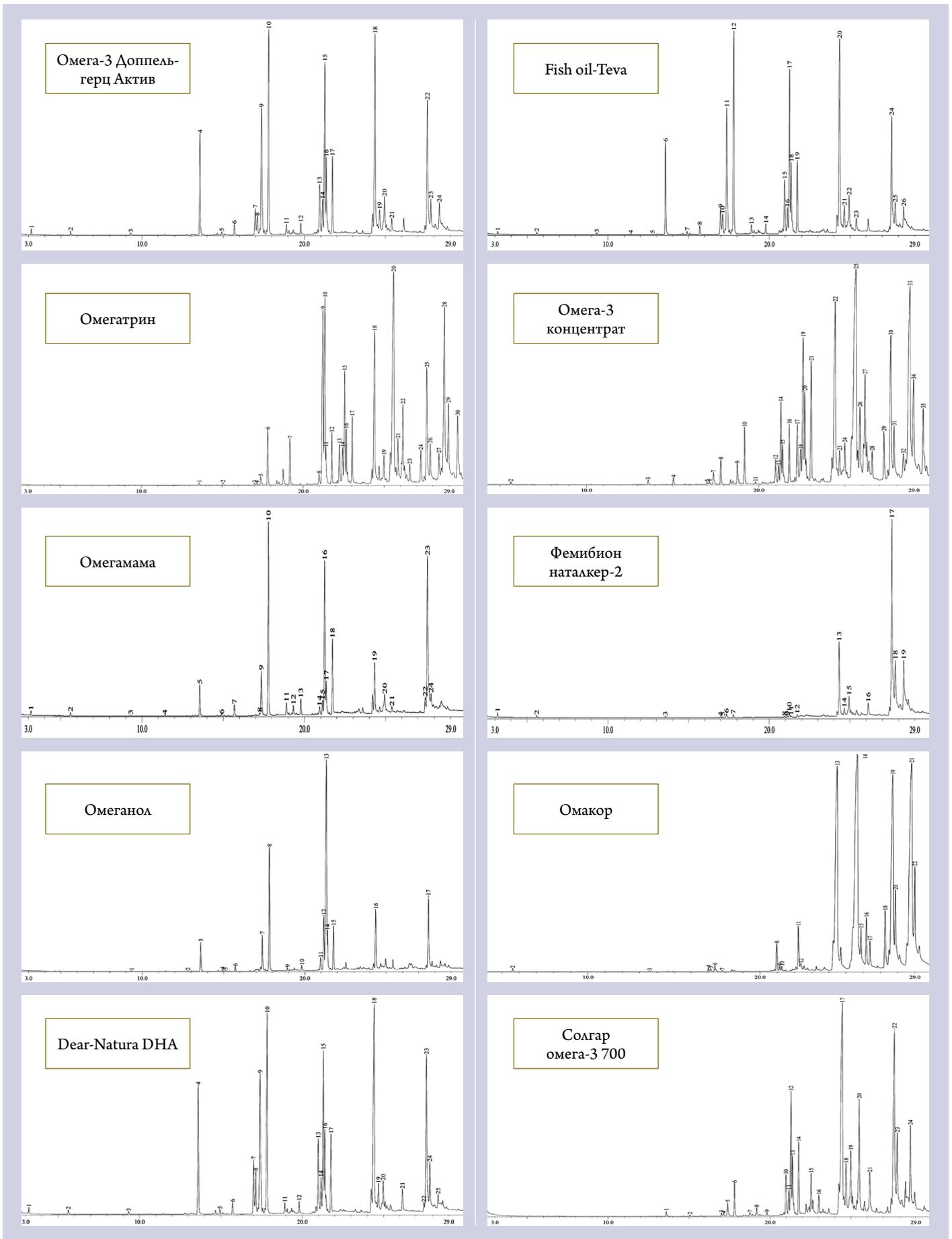
Помимо стандартных методов статистики, в ходе анализа данных скрининга были использованы новые математические подходы к интеллектуальному анализу данных, основанные на методе метрических сгущений. Использован подход, основанный на фундаментальной концепции метрики (в математике метрика – функция измерения расстояния между точками, которая удовлетворяет аксиоме треугольника). «Точками» в данном случае являются изученные параметры пациентов. Набор точек с заданной метрикой называется метрической конфигурацией. Измеряя попарные расстояния между этими точками, становится возможным установление метрических сгущений (кластеров близко лежащих точек) и затем построение метрических карт (проекций метрических конфигураций на плоскость), которые являются наглядными диаграммами, отражающими весь массив исследованных корреляций изучаемых параметров [6].

### Результаты

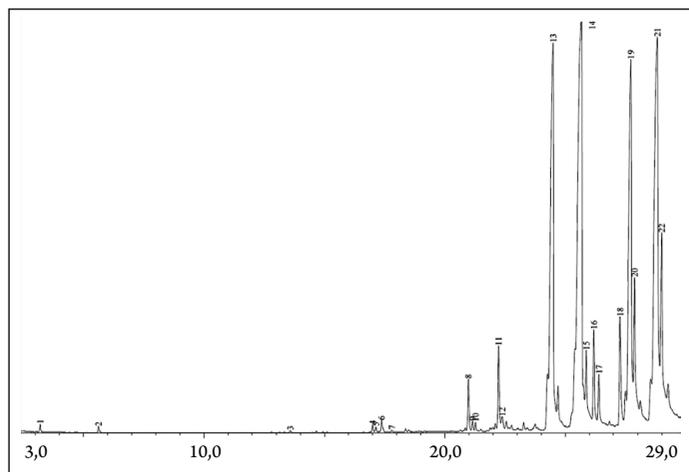
В результате экспериментов были получены хроматограммы для каждого из 10 исследованных образцов, пере-

Таблица 3. Хроматограммы исследованных соединений.

Цифры над пиками обозначают соединения, которые соответствуют данному пику



**Рисунок 2.** Расшифровка хроматограммы образца ω3 ПНЖК, на примере образца №8 (препарат Омакор)



**Таблица 4.** Информативные предикторы, на основании концентраций которых можно прогнозировать концентрации всех остальных компонентов

Рейтинг	Предиктор
100%	Эйкозановая к-та, метиловый эфир нас.
99%	4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир ДГК
80%	13-докозеновая к-та, метиловый эфир ω9
70%	6,9,12,15-гексадекатетраеновая к-та, метиловый эфир ω3
70%	5,11,14,17-эйкозатетраеновая к-та, метиловый эфир ЭТК
53%	7,10,13,16,19-докозапентаеновая к-та метиловый эфир ДПК
50%	Линолевая к-та, этиловый эфир ω6
50%	11-эйкозеновая к-та, пропиловый эфир ω9
47%	5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, метиловый эфир ЭПК
43%	6,9,12-гексадекатриеновая к-та, метиловый эфир ω3
43%	7-метил-6-гексадеценивая к-та ω9
40%	11-эйкозеновая к-та, метиловый эфир ω9
23%	4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, метиловый эфир ДГК

Рейтинг предиктора соответствует проценту молекулярных компонентов экстрактов, для прогнозирования концентраций которых данный предиктор необходим.

численных в таблице 1 (табл. 3). Каждый из пиков на хроматограмме был идентифицирован по библиотеке масс спектров NIST11; площадь пика отображает процентное содержание соответствующего соединения в исследованном образце.

#### Предварительный анализ полученных хроматограмм

Даже простой визуальный анализ полученных хроматограмм показывает, что есть группа образцов с боль-

шим количеством пиков (Fish oil-Teva, Омегатрин, Омега-3 концентрат), которые соответствуют более низкому качеству стандартизации жирнокислотного состава, и наряду с этим, представлены образцы с малым числом пиков (Омакор, Солгар и др.), что соответствует более высокому качеству стандартизации состава.

По качественному составу [наличие этиловых, пропиловых бутиловых эфиров ЖК (табл. 2)] образцы можно условно разделить на два типа: (1) «естественные» жиры, которые, судя по жирнокислотному составу, аналогичны «рыбьему жиру» (например, хроматограмма образца №2 Fish oil-Teva) и (2) «синтетические» жиры, содержащие в большом количестве не липиды, а эфиры ЖК – ведь этиловые, пропиловые и бутиловые эфиры ЖК имеют явно искусственное происхождение (например, хроматограмма образца №8 Омакор, рис. 2).

Суммарное содержание ω3 ПНЖК – 97%. Приведена расшифровка пиков с площадью более 0,5% относительного содержания жирных кислот. Пики: 8–6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир (ω3), 11–6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, этиловый эфир (ω3), 12 – Линолевая к-та, этиловый эфир (ω6), 13–5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, метиловый эфир (ω3-ЭПК), 14–5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, этиловый эфир (ω3-ЭПК), 15–6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, бутиловый эфир (ω3), 16–11-эйкозеновая к-та, пропиловый эфир (ω9), 17 – Эйкозановая к-та, пропиловый эфир (нас.), 18–5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, пропиловый эфир (ω3-ЭПК), 19–4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, метиловый эфир (ω3-ДГК), 20–7,10,13,16,19-докозапентаеновая к-та метиловый эфир (ω3-ДПК), 21–4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир (ω3-ДГК), 22–7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир (ω3-ДГК).

#### Интеллектуальный анализ данных хроматограмм

Для установления более четких количественных критериев различий в качестве экстрактов ω<sup>3</sup> ПНЖК мы применили методы интеллектуального анализа данных к собранным нами результатам хроматографического исследования состава образцов. Каждый образец был представлен концентрациями 44 веществ (табл. 2).

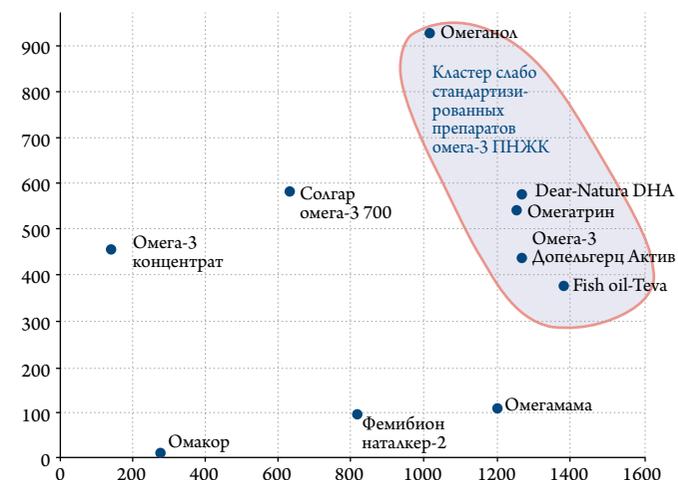
Следует отметить, что концентрации каждого из молекулярных компонентов, перечисленных в таблице 2, коррелируют друг с другом в исследованных образцах ω3 ПНЖК. Данные корреляции настолько выражены, что возможно прогнозировать концентрации любой из молекул в таблице 2 посредством тополого-метрического подхода к распознаванию при условии, если известны концентрации определенных «компонентов-предикторов» (табл. 4). Аккуратность получаемых таким образом прогнозов была достаточно высока: коэффициент

корреляции между прогнозируемыми и измеренными концентрациями составил в среднем  $r=0,77\pm 0,22$ . Отметим, что среди предикторов перечислены концентрации различных форм ДГК, ЭПК,  $\omega 6$  линолевая кислота и  $\omega 9$  ЖК. Некоторые из перечисленных предикторов оказались важны для получения информативных маркеров стандартизации экстрактов  $\omega 3$  ПНЖК (см. далее).

С использованием метрики Колмогорова-Смирнова в приложении к 44-мерным векторам мы рассчитали «расстояния» между образцами, исследовали наличие кластеров и представили полученные результаты на метрической карте (рис. 3).

В результате проведения анализа метрических сгущений мы выделили кластер образцов, которые отличаются достаточно низкой стандартизацией состава (рис. 3). Действительно, из 5 образцов, вошедших в кластер, для 3 образцов (а именно, Fish oil-Teva, Омегатрин, Омеганол) производителями не указывается даже приблизительное содержание ЭПК и ДГК. Отсутствие такой информации является косвенным свидетельством отсутствия надлежащей стандартизации состава при производстве образцов (табл. 1). Стандартизация состава разными производителями  $\omega 3$  ПНЖК проводится по-разному, поэтому точки, соответствующие остальным образцам, расположены в различных направлениях от кластера слабо стандартизированных образцов.

**Рисунок 3.** Метрическая карта жирнокислотного состава исследованных образцов  $\omega 3$  ПНЖК



Оси X и Y отражают (в у. е.) некоторые «главные компоненты» состава, которые расшифровываются далее. Метрическая карта представляет собой проекцию матрицы попарных расстояний между всеми образцами на плоскость рисунка. Более близкие точки на карте соответствуют образцам, более близким по жирнокислотному составу. Методом анализа метрических сгущений установлено наличие единственного кластера, соответствующего образцам со слабой стандартизацией состава.

**Расшифровка осей метрической карты и информативные маркеры жирнокислотного состава экстрактов  $\omega 3$  ПНЖК**

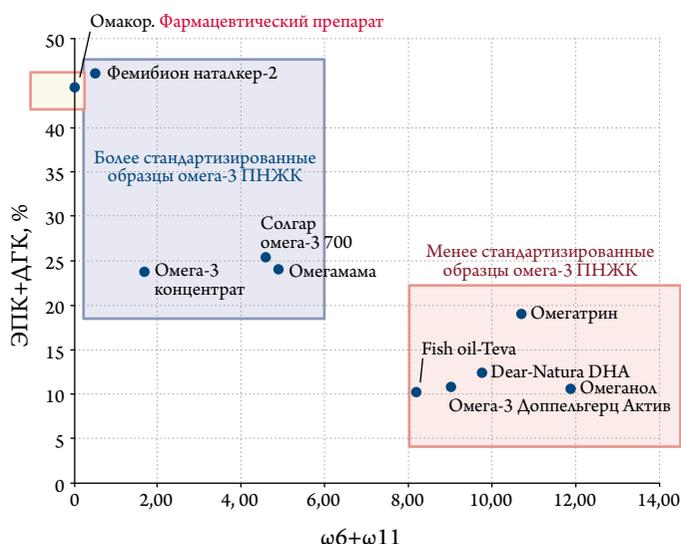
Представляет интерес рассмотрение наличия конкретных компонент жирнокислотного состава, позволяющих отличать образцы в кластере с низкой степенью

**Таблица 5.** Различия жирнокислотного состава образцов  $\omega 3$  ПНЖК (площади пиков хроматограмм, %) и маркеры, позволяющие отличать более стандартизированные образцы от менее стандартизированных (кластер)  $\omega$

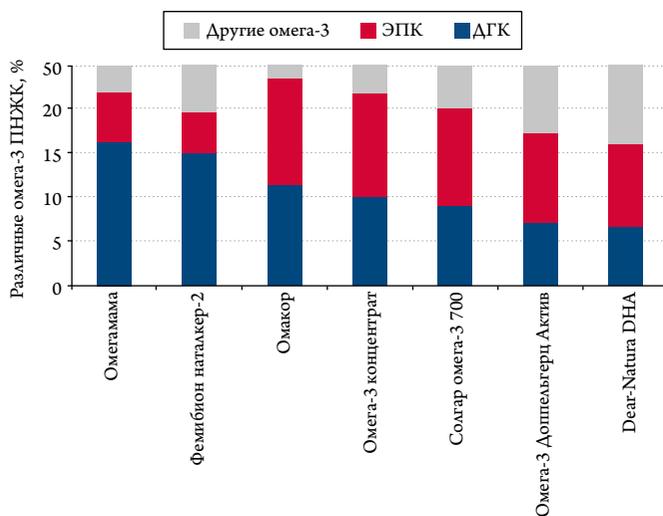
Соединение	ЖК	Стандартизированные	Менее стандартизированные	p
6-октадеценовая к-та, метиловый эфир	$\omega 11$	1,26±1,53	3,25±1,67	0,009
13-метилтетрадекановая к-та, метиловый эфир	нас.	0,02±0,04	0,11±0,10	0,013
Миристиновая к-та, метиловый эфир	нас.	0,62±1,18	3,03±2,78	0,016
Миристиновая к-та, метиловый эфир	нас.	0,62±1,18	3,03±2,78	0,016
Додекановая к-та, метиловый эфир	нас.	0,01±0,02	0,05±0,06	0,018
Пальмитолеиновая к-та, метиловый эфир	$\omega 7$	1,28±2,00	5,09±4,81	0,019
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир	$\omega 3$	0,93±0,89	2,18±1,88	0,029
Линолевая к-та, метиловый эфир	$\omega 6$	0,72±0,67	6,35±3,90	0,035
5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, пропиловый эфир	ЭПК	1,44±1,16	0,43±0,74	0,041
Пальмитиновая к-та, метиловый эфир	нас.	3,76±7,80	10,6±7,74	0,042
6,9,12,15-гексадекатетраеновая к-та, метиловый эфир	$\omega 3$	0,08±0,09	0,68±1,12	0,047
6,9,12-гексадекатриеновая к-та, метиловый эфир	$\omega 3$	0,11±0,10	0,55±0,90	0,053
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир	ДГК	12,5±12,4	3,95±6,84	0,055
Олеиновая к-та, метиловый эфир	$\omega 9$	4,43±6,12	18,8±15,6	0,057
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, метиловый эфир	ДГК	19,3±14,6	8,97±2,67	0,059
<b>Маркеры стандартизации</b>				
Маркер «ЭПК+ДГК»	-	33,3±10,3	13,3±4,92	0,0016
Маркер « $\omega 6+\omega 11$ »	-	2,06±2,20	10,2±1,89	0,0004

Маркер «ЭПК+ДГК» – сумма площадей пиков 5,8,11,14,17-ЭПК (пропиловый эфир), 4,7,10,13,16,19-ДГК (бутиловый эфир), 4,7,10,13,16,19-ДГК (метиловый эфир). Маркер « $\omega 6+\omega 11$ » – сумма площадей пиков следующих компонентов: 6-октадеценовая к-та, метиловый эфир, 6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир, линолевая к-та, метиловый эфир.

**Рисунок 4.** Диаграмма состава исследованных образцов в осях, соответствующих разработанным маркерам жирнокислотного состава – « $\omega 6 + \omega 11$ » и «ЭПК+ДГК»



**Рисунок 5.** Относительное содержание ДГК и ЭПК в исследованных образцах с более высоким качеством стандартизации



Образцы упорядочены по убыванию относительного содержания ДГК.

стандартизации состава от образцов с более высокой степенью стандартизации. Полученные при построении метрической карты «условные оси» X и Y должны соответствовать содержанию каких-то более конкретных веществ или групп веществ. Для установления конкретных показателей биохимического качества стандартизации мы сравнили содержание всех 44 веществ в кластере слабо стандартизированных образцов с содержанием этих веществ во всех остальных образцах. Установленные различия суммированы в таблице 5.

В результате проведенного анализа данных и расшифровки осей метрической карты было получено два наиболее информативных маркера жирнокислотного состава,

которые позволяют максимально эффективно отличать более стандартизированные образцы  $\omega 3$  ПНЖК от менее стандартизированных.

Маркер «ЭПК+ДГК» представляет собой сумму площадей пиков трех конкретных веществ: 5,8,11,14,17-ЭПК (пропиловый эфир), 4,7,10,13,16,19-ДГК (бутиловый эфир), 4,7,10,13,16,19-ДГК (метиловый эфир). Значения маркера «ЭПК+ДГК» были статистически значимо в 2,5 раза выше в группе более стандартизированных образцов, чем в группе менее стандартизированных ( $p=0,0016$ ).

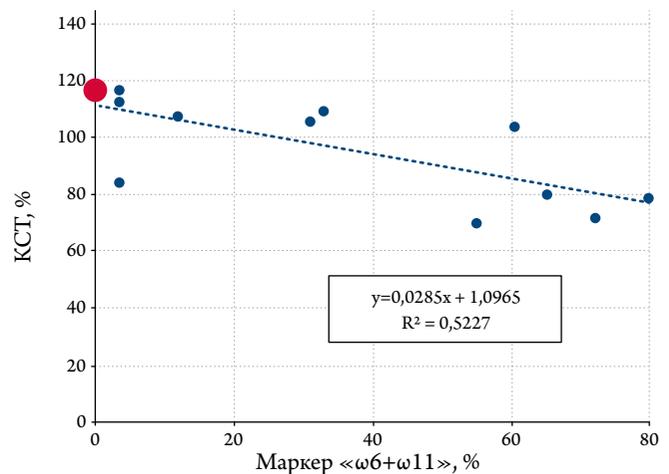
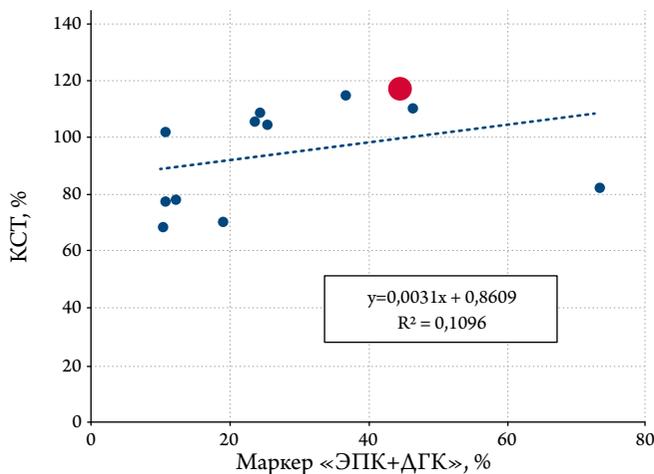
Маркер « $\omega 6 + \omega 11$ » – сумма площадей пиков следующих компонентов: 6-октадеценовая к-та, метиловый эфир, 6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир, линолевая к-та, метиловый эфир. Значения маркера « $\omega 6 + \omega 11$ » были статистически значимо в 5 раз ниже в группе более стандартизированных образцов (%), чем в группе менее стандартизированных ( $p=0,0004$ ).

Диаграмма состава исследованных образцов в осях « $\omega 6 + \omega 11$ » – «ЭПК+ДГК» представлена на рисунке 4, данные об относительном содержании ДГК и ЭПК в исследованных образцах – на рисунке 5. Очевидно, что более стандартизированные образцы лежат в области диаграммы, соответствующей значениям маркеров «ЭПК+ДГК» >23%, « $\omega 6 + \omega 11$ » <5% (рис. 4). Менее стандартизированные образцы лежат в области диаграммы, соответствующей «ЭПК+ДГК» <20%, « $\omega 6 + \omega 11$ » >8%.

Таким образом, для БАД характерны выраженные различия в значениях маркеров « $\omega 6 + \omega 11$ » и «ЭПК+ДГК», отражающие существенную «неравномерность» в составе действующего вещества. Образец № 8 (препарат Омакор) характеризуется уникальным расположением на диаграмме (рис. 4), которое фактически соответствует нулевому значению маркера « $\omega 6 + \omega 11$ ». Настоящее исследование указало и на другие особенности состава этого образца, отличающие его от исследованных образцов БАД. Во-первых, фармацевтический препарат на 97% состоит именно из  $\omega 3$  ПНЖК (табл. 6), а БАД – не более чем на 70%. Во-вторых, 91,5% жирнокислотного состава препарата соответствует  $\omega 3$  ПНЖК в виде ЭПК и ДГК, имеющих важное фармакологическое значение профилактики сердечно-сосудистой смертности [7, 8], улучшения липидного профиля, снижения воспаления [9] и др. (в монографии [7] представлены сотни соответствующих источников). В-третьих, препарат не содержит  $\omega 11$  ПНЖК, содержит крайне мало  $\omega 6$  ПНЖК (0,55%) и низкие количества  $\omega 9$  ПНЖК (1,6%). Для сравнения: БАД Фемибион содержит 20,9%  $\omega 9$  ПНЖК.

**Маркеры жирнокислотного состава и коэффициент стандартизации экстрактов  $\omega 3$  ПНЖК**

Рисунок 6. Корреляции между коэффициентом стандартизации КСТ (%) и значениями маркеров качества стандартизации («ЭПК+ДГК», « $\omega 6 + \omega 11$ »)



Красной точкой выделены данные, соответствующие составу препарата Омакор с самым высоким значением КСТ (%) = 114,2%.

В целом, полученные нами маркеры позволяют проводить своего рода «скрининговое» исследование качества стандартизации субстанций для изготовления препаратов и БАД на основе  $\omega 3$  ПНЖК. Предположим, что в результате хроматографического анализа образца получены следующие значения маркеров: «ЭПК+ДГК» = 13%, « $\omega 6 + \omega 11$ » = 9%. Очевидно, что такие значения соответствуют низкой стандартизации образца по  $\omega 3$  ПНЖК и высокому уровню примесей, характерных для так называемого «рыбьего жира». Если же образец стандартизован по  $\omega 3$  ПНЖК, то значение маркера «ЭПК+ДГК» не могут быть меньше 23%, а значение маркера « $\omega 6 + \omega 11$ » не должно быть выше 5%.

Таким образом, более стандартизированные образцы  $\omega 3$  ПНЖК характеризуются высокими значениями  $\omega 3$  ПНЖК (в виде ЭПК и ДГК) и низкими значениями  $\omega 6$  и  $\omega 11$ . Этот результат имеет важное практическое значение, так как  $\omega 6$  кислоты, к которым относится арахидоновая кислота, оказывают гиперкоагуляционный, провоспалительный, вазоконстрикторный эффекты, вызывают задержку жидкости. Соотношение  $\omega 6$ :  $\omega 3$  ПНЖК в типичной диете современного человека сильно смещено в сторону  $\omega 6$  и составляет от 10:1 до 20:1. Поэтому, максимальное снижение содержания  $\omega 6$  в образцах  $\omega 3$  ПНЖК не только является маркером стандартизации жирнокислотного состава, но и соответствует повышению фармакологической эффективности  $\omega 3$  ПНЖК [7].

В дополнение к маркерам «ЭПК+ДГК» и « $\omega 6 + \omega 11$ », позволяющим классифицировать исследуемые образцы  $\omega 3$  ПНЖК как более стандартизированные и менее стандартизированные, мы также вводим «коэффициент стандартизации» (КСТ), оценивающий соответствие реально измеренных уровней  $\omega 3$  ПНЖК содержанию  $\omega 3$

Таблица 6. Детали жирнокислотного состава образца №8 (препарат Омакор)

Жирнокислотный компонент состава	Пик, %	Вид ЖК
5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, этиловый эфир	25,47	ЭПК
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир	24,95	ДГК
5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, метиловый эфир	18,59	ЭПК
4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, метиловый эфир	17,12	ДГК
7,10,13,16,19-докозагексаеновая к-та, бутиловый эфир	2,69	ДГК
5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая к-та, пропиловый эфир	2,43	ЭПК
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, этиловый эфир	1,99	$\omega 3$
7,10,13,16,19-докозапентаеновая к-та метиловый эфир	1,87	$\omega 3$
11-эйкозеновая к-та, пропиловый эфир	1,61	$\omega 9$
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, метиловый эфир	1,06	$\omega 3$
6,9,12,15-октадекатетраеновая к-та, бутиловый эфир	0,84	$\omega 3$
Эйкозановая к-та, пропиловый эфир	0,83	нас.
Линолевая к-та, этиловый эфир	0,55	$\omega 6$

Компоненты упорядочены по убыванию значений пиков.

ПНЖК, заявляемому производителем. КСТ рассчитывается как композиция четырех компонент:

$$КСТ (\%) = 1 - \omega 3_{\text{соотв}} - ЭПК_{\text{соотв}} - ДГК_{\text{соотв}} - Ар. \omega 3_{\text{соотв}}$$

где  $\omega 3_{\text{соотв}} = \omega 3_{\text{заява}} (\%) - \omega 3_{\text{изм}} (\%)$  соответствие заявленного общего содержания  $\omega 3$  ПНЖК измеренному. Если образец содержит больше  $\omega 3$ , чем заявлено, то это увеличивает значение  $\omega 3_{\text{соотв}}$ ;

$ЭПК_{\text{соотв}} = ЭПК_{\text{заява}} (\%) - ЭПК_{\text{изм}} (\%)$ , если заявлено содержание ЭПК. Если нет, то назначается «штрафной

Таблица 7. Коэффициент стандартизации образцов  $\omega 3$  ПНЖК

Препарат/БАД	Заявлено, %			Измерено, %			КСТ (%)
	ЭПК	ДГК	Др. $\omega 3$	ЭПК	ДГК	Др. $\omega 3$	
Омакор	46,0	38,0	6,0	46,5	44,8	5,8	114,2%
Фемибион натакер-2	0	40,0	0,0	13,4	46,0	16,0	110,5%
Омегамама	4,6	21,0	4,4	7,8	22,3	4,0	108,2%
Омега-3 концентрат	33,0	22,0	5,0	32,1	26,2	8,4	106,6%
Солгар омега-3 700	32,7	21,8	9,1	31,2	25,4	12,9	104,1%
Омега-3 Доппельгерц Актив	15,2	10,1	6,3	15,5	10,8	11,5	102,1%
Dear-Natura ДНА	5,0	33,3	3,3	16,4	11,8	15,5	79,8%
Омеганол	-	-	-	0,0	10,7	1,9	77,7%
Омегатрин	-	-	-	24,7	21,7	5,7	70,4%
Fish oil-Teva	-	-	-	16,2	10,3	13,0	68,5%

Исследованные образцы упорядочены по убыванию значения КСТ (%), оценивающего соответствие измеренного жирнокислотного состава заявляемому составу. «Др.  $\omega 3$ » – разность между общим количеством  $\omega 3$  и суммой ЭПК+ДГК.

процент» (мы использовали величину в 15%, которая отражает среднее содержание ЭПК в слабо стандартизированных образцах).

$ДГК_{\text{соотв}} = ДГК_{\text{заявл}} (\%) - ДГК_{\text{изм}} (\%)$ , если заявлено содержание ДГК, в противном случае – «штрафной процент» (10%).

$Др.\omega 3_{\text{соотв}} = |Др.\omega 3_{\text{заявл}} - Др.\omega 3_{\text{изм}}|$  – абсолютное значение разности между заявленным и измеренным содержанием других  $\omega 3$  ПНЖК. Др. $\omega 3$  определяется как разница между общим содержанием  $\omega 3$  и суммарным содержанием ЭПК+ДГК.

Примеры расчета КСТ (%) приведены в таблице 7. Препарат Омакор характеризовался самым высоким значением КСТ среди исследованных образцов. Результаты оценки «качества» стандартизации посредством КСТ (%) соответствуют оценкам с использованием маркеров «ЭПК+ДГК», « $\omega 6 + \omega 11$ », так как установлены статистически значимые корреляции между коэффициентом стандартизации и значениями маркеров «ЭПК+ДГК», « $\omega 6 + \omega 11$ » (рис. 6). Тем не менее КСТ (%) предоставляет дополнительную информацию о качестве стандартизации. Например, значение КСТ (%) для «Омега-3 Доппельгерц Актив» было достаточно высоко (102,1%), так как реально измеренное содержание различных ПНЖК в соответствующем образце практически полностью соответствовало содержанию, заявляемому изготовителем (табл. 7).

### Заключение

Информацию о необходимости коррекции потребления  $\omega 3$  ПНЖК пациенты получают через средства массовой информации, в интернет-пространстве, и значительно реже от врачей, рекомендующих тот или иной препарат или БАД  $\omega 3$  ПНЖК. Поэтому окончательный выбор препарата/БАД  $\omega 3$  ПНЖК осуществляет пациент (зача-

стую, по совету фармацевта в аптеке). В действительности, эффективность препаратов или БАД на основе  $\omega 3$  ПНЖК в существенной мере зависит от стандартизации содержания экстрактов по ЭПК, ДГК и по другим видам ЖК. В настоящей работе мы провели комплексное исследование состава 10 образцов  $\omega 3$  ПНЖК с хроматографическим определением более 40 метаболитов ЖК и других соединений. Получены количественные маркеры, позволяющие отделять образцы на основе стандартизированных  $\omega 3$  ПНЖК (препарат Омакор и некоторые БАД, в том числе Фемибион натакер-2, Омега-3 концентрат и др) от менее стандартизированных образцов (Fish oil-Teva, Омегатрин, Омеганол и др.). В стандартизированных образцах значения маркера «ЭПК+ДГК» в 2,5 раза выше ( $p=0,0016$ ), а маркера « $\omega 6 + \omega 11$ » – в 5 раз ниже ( $p=0,0004$ ). Вычисления коэффициента стандартизации, оценивающего соответствие измеренных уровней омега-3 ПНЖК заявленному производителем содержанию, показали, что наилучшей стандартизацией характеризовался препарат Омакор. Отметим, что Омакор (в США – Ловаза) является единственным рецептурным лекарственным препаратом  $\omega 3$  ПНЖК, одобренным Управлением по вопросам пищи и лекарств США (FDA). Использование стандартизированных препаратов на основе  $\omega 3$  ПНЖК для вторичной профилактики инфаркта миокарда и снижения сердечно-сосудистой смертности характеризуется обширной доказательной базой [7, 8].

В заключение следует подчеркнуть, что качество фармацевтической стандартизации образцов  $\omega 3$  ПНЖК следует оценивать не только по жирнокислотному, но и по микроэлементному составу. Стандартным требованием при внесении БАД в Единый реестр свидетельств о государственной регистрации является низкое содержание отдельных токсичных элементов (свинец <1,0 мг/кг, кадмий <0,2 мг/кг, ртуть <0,3 мг/кг). Однако известно

более 10 токсических элементов, поэтому профили уровней микроэлементов в различных препаратах, включающие от 18 до 68 микроэлементов, являются информативными индикаторами степени очистки и стандартизации [10, 11], крайне полезными для сравнительного анализа фармацевтического качества лекарственных препаратов и БАД [12].

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-07-00929.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

**Статья поступила 19.02.20**

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Limanova O.A., Gromova O.A., Torshin I.Yu., Volkov A.Yu., Galustyan A.N., Grishina T.R. et al. Low consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of various diseases in women of reproductive age. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2017;25(9):33–45. [Russian: Лиманова О.А., Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Галустян А.Н., Гришина Т.Р. и др. Низкое потребление омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и риск различных заболеваний у женщин репродуктивного возраста. *РМЖ. Мать и дитя*. 2017;25(9):33–45]
2. Mareev V. Yu. Expert Council report “Importance of using omega-3 polyunsaturated fatty acid ethyl ethers ( $\omega$ -3 PUFA 90 %, g/g) after myocardial infarction with concomitant cardiac abnormalities”. *Russian Heart Journal*. 2016;15(4):301–4. [Russian: Мареєв В. Ю. Отчет о работе Совета экспертов «Актуальность применения этиловых эфиров омега-3 полиненасыщенных жирных кислот ( $\omega$ -3 ПНЖК, 90 %, 1 г) у постинфарктных пациентов с сопутствующей кардиологической патологией». *Сердце: журнал для практикующих врачей*. 2016;15(4):301–4]. DOI: 10.18087/rhj.2016.4.2260
3. Mason RP, Sherratt SCR. Omega-3 fatty acid fish oil dietary supplements contain saturated fats and oxidized lipids that may interfere with their intended biological benefits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;483(1):425–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.127
4. Kutzner L, Ostermann AI, Konrad T, Riegel D, Hellhake S, Schuchardt JP et al. Lipid Class Specific Quantitative Analysis of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Food Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(1):139–47. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b03745
5. Vaskovskiy V.E., Gorbach T.A., Esipov A.V., Svetashev V.I., Yatskova M.A. Preparations of omega-3 fatty acids and their use in medicine. *Pacific Medical Journal*. 2010;2(40):15–9. [Russian: Васковский В.Е., Горбач Т.А., Есипов А.В., Светашев В.И., Яцкова М.А. Препараты омега-3 жирных кислот и их применение в медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010;2(40):15–9]
6. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 2: Metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2017;27(2):184–99. DOI: 10.1134/S1054661817020110
7. Gromova O.A., Torshin I.Yu. Micronutrients and reproductive health. *Guide*. -М.: GEOTAR-Media;2019. - 672 p. [Russian: Громова О.А., Торшин И.Ю. Микронутриенты и репродуктивное здоровье. *Руководство*. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 672с.]. ISBN 978-5-9704-5149-6
8. Torshin I.Yu., Gromova O.A., Kobalava Zh.D. Concerning the “repression” of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids by adepts of evidence-based medicine. *FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomic and Pharmacoepidemiology*. 2019;12(2):91–114. [Russian: Торшин И.Ю., Громова О.А., Кобалава Ж.Д. О репрессиях  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот адептами доказательной медицины. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология*. 2019;12(2): 91–114]. DOI: 10.17749/2070-4909.2019.12.2.91-114
9. Natto ZS, Yaghmoor W, Alshaeri HK, Van Dyke TE. Omega-3 Fatty Acids Effects on Inflammatory Biomarkers and Lipid Profiles among Diabetic and Cardiovascular Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):18867. DOI: 10.1038/s41598-019-54535-x
10. Microelement composition of pharmaceutical preparations. Av. at: <http://trace-elements.ru/мэ-фармпр/>. [Russian: Микроэлементный состав фармацевтических препаратов. Доступно на: <http://trace-elements.ru/мэ-фармпр/>]
11. Unified Register of state registration certificates. Dietary Supplement “Triple omega-3 Capsules 950 mg of EPA and DHA” (RU.77.99.11.0 03.E.001525.04.19). Av. at: <https://clck.ru/HgTAr>. 2020. [Russian: Единый Реестр свидетельств о государственной регистрации. Биологически активная добавка к пище ‘Капсулы Тройная Омега-3 950 мг ЭПК и ДГК’ (RU.77.99.11.003.E.001525.04.19). Доступно на: <https://clck.ru/HgTAr>. 2020]
12. Torshin I.Yu., Gromova O.A., Toguzov R.T., Volkov A.Yu. The elemental composition of the natural neuroprotective agents. *Medical and pharmacy news*. 2010;316:23. [Russian: Торшин И.Ю., Громова О.А., Тогузов Р.Т., Волков А.Ю. Элементный состав нейтропротекторов природного происхождения. *новости медицины и фармации*. 2010;316:23]