

ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТ НАТРИЯ – ПРИМЕСИ И ПРОБЛЕМЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Е.Л. Комарова¹, С.В. Чернова², К.В. Касумова²,
М.С. Табачная², Л.В. Овсянникова², К.И. Эллер³

¹ООО «Продэкспертиза»; Россия, 117149 Москва, Симферопольский б-р, 8, оф. 1;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет);
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»;
Россия, 109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14

Контакты: Елена Леонидовна Комарова kotelia@mail.ru

В статье рассмотрены современные исследования в области химического строения хондроитина сульфата (ХС) и его фармакологической активности. Показано, что клиническая эффективность и безопасность зависит от природы и качества используемого для производства сырья, способов технологической переработки, степени очистки. Состав ХС переменный и представляет собой смесь 2 основных изомерных форм – хондроитина 4-сульфат (Х4С) и хондроитина 6-сульфат (Х6С). В тканях молодых животных преобладает Х4С, содержание которого составляет ~70 %, а содержание Х6С ~30 %. Хрящи акул и других гидробионтов имеют низкое содержание Х4С (~10 %), а Х6С – около 80 %. Сложная полимерная структура и непостоянство состава ХС осложняют задачу стандартизации препаратов на его основе. Рассмотрены примеси, встречающиеся в субстанциях. Примеси разделены на 3 группы: родственные, технологические и механические, несвойственные ХС. Проведен сравнительный анализ требований к сырью и методов анализа ХС по нормативной документации различных стран и выявлено их значительное различие. Показано, что для повышения фармакологической активности производитель лекарственных препаратов должен учитывать все параметры субстанции ХС, включая структурный состав, молекулярную массу, наличие примесей.

Ключевые слова: хондроитина сульфат, химическое строение, стандартизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-25-36

CHONDROITIN SODIUM SULFATE – IMPURITIES AND STANDARDIZATION PROBLEMS (LITERATURE REVIEW)

E.L. Komarova¹, S.V. Chernova², K.V. Kasumova², M.S. Tabachnaya², L.V. Ovsyannikova², K.I. Eller³

¹LLC “Prodeksperitiza”; of. 1, 8 Simferopolsky Blvd., 117149 Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
Build. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia;

³Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology; 2/14 Ustyinsky Proezd, 109240 Moscow, Russia

Modern research in the field of chondroitin sulfate chemical composition is considered. Clinical efficiency and safety are shown to depend on the nature and quality of the raw material used, ways of its technological processing and the degree of purification. The composition of chemical compounds (CC) variable is stated to represent the mixture of 2 main isomeric forms: chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate. In the animal tissue chondroitin 4-sulfate dominates, the content of which is 70 %; the content of chondroitin 6-sulfate is 30 %. The cartilages of sharks and other hydrobionts have got low content of chondroitin 4-sulfate (10 %) and chondroitin 6-sulfate 80 %. Complex polymeric structure and instability of CC composition make the problem of drug standardization on its basis complicated. The impurities encountered in substances are considered. The impurities are divided into several groups: related impurities, technological or mechanical ones uncharacteristic of CC. Comparative analysis of requirements for raw material from the point of view of normative documentation of different countries is carried out and their considerable difference is detected. It has been shown that for raising pharmacological activity the producer of drugs must take into account all the parameters of CC including the structural composition, molecular weight and presence of impurities.

Key words: chondroitin sulfate, chemical composition, standardization

Введение

Оценка качества биологических лекарственных препаратов (ЛП) имеет определенные сложности. Это обусловлено тем, что биологические ЛП имеют сложное высокомолекулярное строение, обладают большой вариабельностью, производство включает использование различных тканей организмов и соответственно сложный состав возможных примесей. Все это требует большого количества работ при составлении стандарта качества на готовый препарат.

Большой интерес в фармацевтической отрасли и в производстве биологически активных добавок представляют препараты группы хондропротекторов. Благодаря современным исследованиям в области химического строения и фармакологической активности хондроитина сульфата (ХС) и других гликозаминогликанов (ГАГ), объем продаж продукции этой группы растет, а сфера применения расширяется [1–4]. С ростом востребованности субстанций ХС одновременно возрастает поток сырья низкого качества. Выявлены такие проблемы, как снижение уровня очистки субстанций, увеличение содержания различных примесей, включая присутствие других ГАГ, искусственное разбавление субстанций ХС растительными полисахаридами, другими химическими соединениями и т. д. [5–8].

Цель работы – изучение проблем проверки качества субстанций ХС с учетом понимания зависимости фармакологической активности ХС от его состава.

Структура гликозаминогликанов

ХС является представителем ГАГ, роль которых в организме разнообразна: регуляция водного баланса, контроль диффузии различных соединений в межклеточном пространстве дермы, опора для клеток во время их миграции и др. [9–12].

ГАГ большей частью относятся к полисахаридам соединительной ткани животных (кожа, хрящи, роговица, суставная жидкость). Первоначально представителей этой группы соединений называли мукополисахаридами (от лат. *mucus* – слизь), так как они были обнаружены в слизистых секретах (мукоза) и придавали секретам вязкие, смазочные свойства [13–15].

ГАГ – это линейные гетерополисахариды с молярной массой не менее 4–5 тыс. г/моль, макромолекулы которых состоят из многократно повторяющихся дисахаридных звеньев (что позволяет также отнести их к биополимерам). Дисахаридные звенья ГАГ содержат остатки глюкуроновой кислоты (GlcUA) или α -L-идуроновой кислоты (IdoUA), связанные с остатком глюкозамина (GlcN) или галактозамина (GalN) (табл. 1, рис. 1) [9–16]. Полисахаридные

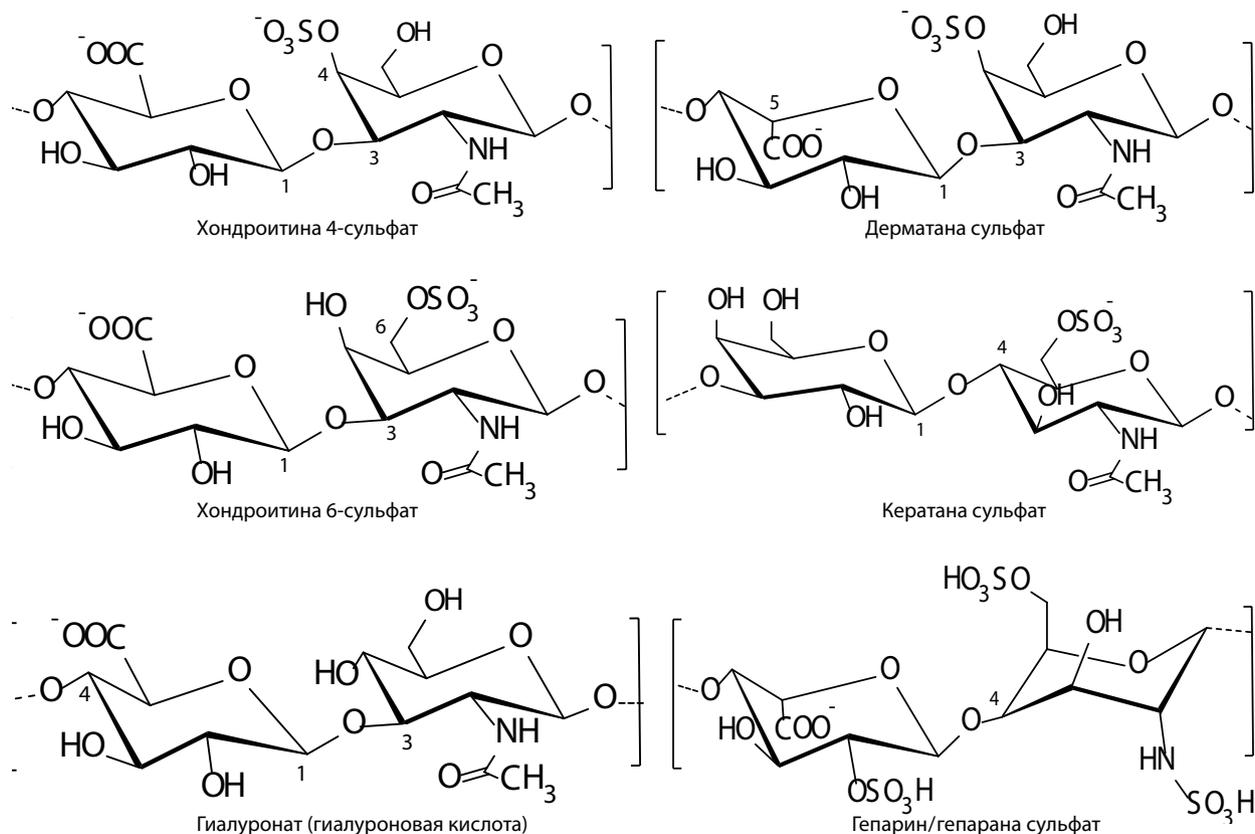


Рис. 1. Структурные формулы ГАГ

Таблица 1. Некоторые представители ГАГ

Структурная группа, наименование	Особенности дисахаридного состава ГАГ	Где содержится или был обнаружен
(I) Гиалуриновая кислота	Состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина GlcUA β 1–3GlcNAc β 1–4 Молекулярная масса (ММ) = от 5×10^3 до 20000×10^3 Да	Является главным компонентом синовиальной жидкости, отвечающим за ее вязкость, суставного хряща, в котором присутствует в виде оболочки каждой клетки (хондроцита), входит в состав кожи, где участвует в регенерации ткани [17]. Содержится в пуповине, стекловидном теле, легких, почках, головном мозге, мышечной ткани, в гребнях петуха и т. д.
(II) Кератана сульфат	Содержит N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат и D-галактозу Gal(6S) β 1–4GlcNAc(6S) β 1–3 ММ = от 4×10^3 до 20×10^3 Да	Впервые выделен из роговицы глаза, позднее найден и в других тканях, включая кости скелета. Обнаружено, что протеогликановые комплексы КС в скелете и роговице различаются структурно и имеют разный метаболизм. КС присутствует в центральной нервной системе, обнаружена его функция как регулятора регенерации нейронов. В роговице, по данным сравнительного исследования, содержится в 10 раз больше КС, чем в хряще, и в 2–4 раза больше, чем в какой-либо иной ткани [18–22]
(III) Хондроитина 4-сульфат (Х4С)	GlcUA β 1–3'GalNAc β 1–4 Сульфатная группа этерифицирована по 4-му положению – GalNAc(4S) ММ = от 5×10^3 до 100×10^3 Да	Содержится в хрящевых и костных тканях, в трахеях, сердечных перегородках, преобладает в тканях животных и человека (~70 %) [15, 16, 23–26]
(III) Хондроитина 6-сульфат (Х6С)	GlcUA β 1–3'GalNAc β 1–4 Сульфатная группа этерифицирована по 6-му положению – GalNAc(6S) ММ = от 5×10^3 до 100×10^3 Да	Содержится в хрящевых и костных тканях. Х6С преобладает в тканях гидробионтов (до 80 %), ранее его получали из хрящей (плавников) акулы [15, 16, 23–26]
(III) ХС D	Хондроитина-2,6-сульфат, «сверхсульфатированный» хондроитин по 2-му положению глюкуроновой кислоты GlcUA(2S) и по 6-му положению – GalNAc(6S)	Хрящи акулы [27]
(III) ХС E	Хондроитина-4,6-сульфат, «сверхсульфатированный» хондроитин по положениям 4 и 6 GalNAc(4S,6S)	Хрящи кальмара [28]
(III) ХС K	«Сверхсульфатированный» хондроитин GlcA-3-SO ₄ -GalNAc-4-SO ₄	Хрящи королевского краба [27]
(III) Дерматана сульфат (ДС)	Состоит из D-галактозамина и L-идуроновой или D-глюкуроновой кислот IdoUA β 1–3-GalNAc β 1–4 ММ = от 15×10^3 до 40×10^3 Да	Преобладает в тканях кожи, также встречается в сердечных клапанах, сухожилиях и стенках артерий, легких, лошадиной аорте, пуповине, коже свиньи, слизистой оболочке кишечника свиней, селезенке, межпозвоночном диске, мениске и др. [30–33]
(III) Полисульфатированный ДС	«Сверхсульфатированный» дерматан (или ХСН) IdA-, IdA-2-SO ₄ или -3-SO ₄ -GalNAc-4,6-diSO ₄	Хрящевые пластины миксин, кожа миксин [29]
(IV) Гепарин	Состоит из сульфатированных глюкозамина и уоновой кислоты IdoUA(2S) α 1–4GlcNS(6S) α 1–4 ММ = от 6×10^3 до 25×10^3 Да	Компонент внутриклеточных гранул тучных клеток, выстилающих артерии легких, печени и кожи, слизистой оболочки кишечника крупного рогатого скота и других животных – свиней, овец, кур, моллюсков [34]
(IV) Гепарана сульфат	GlcUA β 1–4GlcNAc α 1–4 ММ = от 5×10^3 до 12×10^3 Да	Базальные мембраны, компоненты клеточных поверхностей [34]

Обозначения: GlcUA = β -D-глюкуроновая кислота; GlcUA(2S) = 2-O-сульфо- β -D-глюкуроновая кислота; GlcNS(6S) = α -D-N-сульфо-глюкозамин-6-O-сульфат; IdoUA = α -L-идуронозная кислота; IdoUA(2S) = 2-O-сульфо- α -L-идуронозная кислота; Gal = β -D-галактоза; Gal(6S) = 6-O-сульфо- β -D-галактоза; GalNAc = β -D-N-ацетилгалактозамин; GalNAc(4S) = β -D-N-ацетилгалактозамин-4-O-сульфат; GalNAc(6S) = β -D-N-ацетилгалактозамин-6-O-сульфат; GalNAc(4S,6S) = β -D-N-ацетилгалактозамин-4-O-, 6-O-сульфат; GlcNAc = α -D-N-ацетилглюкозамин; GlcNS = α -D-N-сульфоглюкозамин; GlcNS(6S) = α -D-N-сульфоглюкозамин-6-O-сульфат.

цепи ГАГ соединены ковалентной связью с белками и образуют протеогликаны. Другими словами, это полимерные углевод-белковые комплексы с преимущественным содержанием углеводной части (70–80 %).

Известно 6 типов ГАГ: ХС, дерматана сульфат (ДС), кератана сульфат (КС), гепарана сульфат (ГС), гепарин и гиалуроновая кислота (ГК) (см. рис. 1).

За исключением ГК все ГАГ являются сульфатированными макромолекулами (полиэлектролитами) с различной степенью плотности заряда из-за переменного числа сульфогрупп, связанных с полисахаридной основой в разных местах. Большинство N-ацетилгалактозаминовых остатков сульфатированы в 4-м и 6-м положениях. В целом комплексы протеингликановой природы представляют собой поливалентные ионы, способные связывать катионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} .

Различие в строении всех ГАГ основано на углеводной структуре основной цепи, и они подразделяются на 4 структурные группы (табл. 2, см. рис. 1) [15, 16]:

- (I) ГК;
- (II) КС;
- (III) ХС/ДС;
- (IV) гепарин/ГС.

Таблица 2. Фармакологические свойства ГАГ

Структурная группа, наименование ГАГ	Фармакологическая группа (активность)
(III) ХС (смесь ХС А и С)	Корректор метаболизма костной и хрящевой ткани (хондропротектор), имеет противовоспалительные, гипотензивные свойства. Снижает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]
(III) ДС	Антикоагулянт, стабилизирует коллагеновые пучки, обеспечивает прозрачность роговицы. Другое название – beta-Нерагин. Увеличивает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]
(IV) Гепарин/ГС	Антикоагулянт и антитромботическое средство, создает фильтрационный барьер в почках [10] Увеличивает пролиферацию миобластов в присутствии bFGF [39]
(II) КС	Установлена активность в формировании глиальных рубцов при повреждениях мозга [18], положительная активность в поддержании прозрачности роговицы, пребиотическая активность [9, 10, 21, 22]. В последнее время фармакологическая активность КС интенсивно изучается с целью разрешения его применения в качестве лекарственной субстанции [19, 20]
(I) ГК	Структурообразующий компонент в офтальмологических препаратах и в косметике [40]

ХС в животных тканях, как правило, существует в форме протеогликанов. Его полисахаридные цепи с помощью связующих белков прочно связываются

с ГК, образуя очень большие агрегаты. Эти агрегаты можно наблюдать в электронном микроскопе. Подобные структуры придают хрящам более твердую консистенцию и вместе с тем большую упругость. Общая молекулярная масса (ММ) мономерного протеогликана составляет $(1,5-2,5) \times 10^6$ Да. Протеогликаны совместно с макромолекулами коллагена (главным образом II типа) обеспечивают уникальные свойства экстрацеллюлярного матрикса: растяжимость ткани и ее устойчивость к компрессии [9–16].

Субстанции ХС представляют собой смесь 2 основных структурных изомеров: Х4С (ХС А) и Х6С (ХС С), соотношение которых переменное и зависит от происхождения ХС. Известны и другие формы ХС, обнаруженные в основном в тканях гидробионтов, – Н, К, D, Е и др. Дисахаридные единицы ХС состоят из D-галактозамина и D-глюкуроновой кислоты (см. рис. 1, табл. 1) [2, 15, 16, 23, 24].

ДС ранее имел наименование «Хондроитина сульфат В», но был выведен из группы ХС из-за разницы в фармакологической активности (см. табл. 2). По строению ДС отличается от ХС тем, что в нем остаток глюкуроновой кислоты эпитимизован до идуроновой кислоты (см. рис. 1, табл. 1).

Фармакологическая активность гликозаминогликанов

Практически все ГАГ находят применение в медицинской практике, однако их фармакологическая активность различается и зависит от структуры полисахарида. Из всех ГАГ только ХС относится к группе корректоров метаболизма костной и хрящевой ткани, хондропротекторов и хондростимулирующих средств (см. табл. 2). Обнаружена способность ХС угнетать действие специфических ферментов, разрушающих соединительную ткань, в том числе лизосомальных ферментов, высвобождающихся в результате разрушения хондроцитов (эластаза, пептидаза, катепсин, интерлейкин-1 и др.) [35–37].

Препараты, содержащие ХС, принимают длительно, в течение нескольких месяцев, так как эффект действия хондропротекторов проявляется более медленно по сравнению с симптоматическими средствами – нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) [38]. Совместная терапия позволяет снизить время приема средств группы НПВП.

Обнаружена зависимость противовоспалительных свойств ХС от его структурного состава, который, в свою очередь, зависит от вида животного сырья, используемого для производства ХС, – бычьих хрящи, трахеи свиней, кур или ткани ската [41]. Изучение гипотензивной активности ХС произведенного из бычьих и куриных хрящей, показало, что бычий ХС обладает более быстрым, но кратковременным действием относительно куриного ХС,

гипотензивная активность куриного ХС была более выраженной [42].

Клинические исследования влияния изомеров ХС при атеросклерозе в зависимости от расположения сульфогрупп и их количества в молекуле выявили, что эффективность изомеров при пероральном приеме снижается в следующем порядке: хондроитина полисульфат > Х4С > Х6С [43].

Для изготовления пищевых добавок и ЛП используют низкомолекулярный ХС, так как было обнаружено, что низкомолекулярный ХС (средняя ММ около 16900 Да) имел лучшую биологическую доступность и был более эффективен в качестве хондропротектора. Использование высокомолекулярного ХС не давало желаемого фармакологического эффекта [44, 45].

Технология производства

Как известно, состав и качество субстанций ХС, а соответственно фармакологическая активность, клиническая эффективность и безопасность зависят от природы и качества используемого для производства сырья, способов его технологической переработки, степени очистки и др. (табл. 3) [1, 2, 45–48].

Основными источниками ХС являются хрящевые ткани крупного рогатого скота, свиней, птицы [49, 50], акулы хрящи в последнее время используются реже из-за дефицита сырья, однако отмечен рост производства ХС из тканей разнообразных гидробионтов [13, 42, 46–53] (см. табл. 1).

Технологии производства ХС представляют собой многостадийные процессы гидролиза хрящевых тканей с последующей очисткой. Классический метод производства ХС включает гидролиз животных хрящей при температуре в интервале от 35 до 95 °С,

в процессе которого тщательно контролируется рН среды и используются специальные реакторы, так как недопустим контакт реакционной смеси с металлической поверхностью. По завершении гидролиза реакционную смесь нейтрализуют, используя слабые щелочные реагенты, после чего очищают до получения субстанции, отвечающей требуемой спецификации (технического, пищевого, фармацевтического качества).

Технологии производства постоянно совершенствуются, предлагаются новые способы переработки, включающие ферментативные методы гидролиза, биотехнологические способы производства, унифицированные способы очистки или использование новых видов сырья – тканей различных животных, птиц или рыб [13, 49–54].

Проблемы стандартизации хондроитина сульфата

Потребители субстанций ХС, производители готовых ЛП, биологически активных добавок или косметики не могут непосредственно контролировать процессы изготовления субстанции. Это определяет особую актуальность и повышенное внимание к проблеме безопасности ЛП. Единственным способом контроля качества пищевых и лекарственных субстанций является проверка их соответствия нормативной документации (НД).

Отсутствие единых требований к качеству продукции и несвоевременное совершенствование НД может привести к появлению на рынке некачественных лекарственных субстанций, как это произошло с родственным ГАГ – гепарином.

В 2008 г. США предъявили претензии производителям инъекционных субстанций гепарина, так как было обнаружено загрязнение гепарина примесями

Таблица 3. Примеси, встречающиеся в субстанциях ХС

Группа примесей	Тип примесей	Примечание
1-я группа – специфические или родственные примеси (другие типы ГАГ)	1 – ДС 2 – КС (попадает при использовании других тканей животных, составляет более 15 % в субстанциях, произведенных из акульных хрящей и гидробионтов) 3 – ГС и др.	Примеси одного структурного ряда, родственные ГАГ. Для обнаружения этой группы примесей требуется использование высокотехнологичных методов анализа (электрофорез, ядерный магнитный резонанс (ЯМР), инфракрасный (ИК), энзимный методы анализа)
2-я группа – посторонние примеси технологические или механические	Протеины и др.	Низкая степень очистки сырья, производственные проблемы, большей частью могут быть стандартизованы по действующим нормативным документам
3-я группа – примеси, несвойственные сырью	1 – Другие растительные полисахариды (мальтодекстрин, каррагинаны, альгинаты и др.) 2 – Моно-, дисахариды (глюкозамин, лактоза) 3 – Неорганические соединения, соли (натрия сульфат, натрия гексаметафосфат)	Примеси, обусловленные прямой фальсификацией сырья: подмена ХС костной мукой или отходами его производства, разбавление более дешевыми субстанциями, подмена ХС сходными по химическим свойствам анионными полисахаридами. Для обнаружения ряда таких примесей требуются высокотехнологичные методы анализа

сверхсульфатированного ХС, обусловленное удешевлением технологии производства. Это привело не только к серьезным побочным реакциям при применении препарата, но и к смертельным случаям. После чего НД, стандартизирующая качество гепарина, была пересмотрена как в США, так и в других странах мира, включая РФ (Информационное письмо Руководителя Росздравнадзора № 03–578/08 от 08.09.2008), и дополнена более совершенными, в соответствии с научным и техническим прогрессом, методами контроля качества, такими как ЯМР-спектрометрия, ИК-спектрофотометрия, электрофорез [55, 56].

Этот случай заставил более внимательно относиться к стандартизации и других сложных полисахаридов, включая ХС, так как создание качественных, безопасных лекарственных средств – основная задача фармации.

Стандартизация субстанций ХС в США и странах ЕС проводится по общим фармакопейным статьям (Eur. Ph. 7, Br. Ph., USP29, «Chondroitin sulfate sodium»), на территории РФ ранее использовали общую фармакопейную статью (ФС 42-3741-99), в настоящее время ее заменили фармакопейные статьи предприятий. Между тем проблема идентификации субстанций ХС, определения его состава и примесей, остается актуальной до настоящего времени. Необходимо учитывать, что изменчивый состав субстанций ХС предполагает некоторые различия в фармакологической активности субстанций от разных производителей [5–7, 25, 26, 46–48, 55–58].

При проверке Союзом потребителей и Мэрилендским университетом в 2010 г. на территории США препаратов ХС оказалось, что только 15 % соответствовали заявленному качеству. Большинство препаратов было изготовлено из ХС низкого качества, где его содержание было значительно ниже 90 % [44]. Исследования 2006 г. рынка биологически активных добавок в Японии обнаружили большой процент несоответствий маркировки препаратов их составу, около 20 % биологически активных добавок из плавников акулы содержали ХС животного происхождения [57].

В 2014 г. американская организация органической химии (АОАС International) опубликовала информацию о том, что в субстанциях ХС были обнаружены примеси каррагинанов, альгинатов, ДС, КС, протеинов, натрия гексаметафосфата и др. [5, 6]. В исследованиях 2015 г. фармацевтических субстанций в Бразилии из 16 образцов ХС только 5 содержало более 90 % ХС, остальные 11 субстанций содержали менее 15 % ХС, оставшуюся часть составляли растительные углеводы, мальтодекстрин и лактоза [7].

На основе литературных и наших экспериментальных данных все примеси, обнаруженные в суб-

станциях ХС, можно подразделить на 3 группы (см. табл. 3).

1. Родственные примеси, или другие представители структурного ряда ГАГ (см. табл. 1, 3). Родственные примеси оказывают влияние на фармакологическую активность субстанции (см. табл. 2). Они попадают при использовании не только разрешенного для производства сырья (трахеи и хрящевые ткани), но и кожи, кишечника и других тканей животных или других видов наземных или морских животных, птиц или рыб.
2. Посторонние примеси технологические или механические. Попадают вследствие использования в производстве ХС сырья низкого качества (несвежее сырье, загрязненное кровью, протеинами, продуктами гниения и т. д.) или из-за недостаточной очистки от побочных продуктов гидролиза и др. Примеси этой группы несут риски возникновения нежелательных и аллергических реакций.
3. Примеси, несвойственные ХС. Чаще всего являются результатом фальсификации продукции с целью удешевления или увеличения объема ХС в продаже, для чего обычно используют дешевые инертные соединения [5–7]. Эта группа примесей приводит к потере фармакологической активности субстанции.

Методы стандартизации хондроитина сульфата

Для ХС важным разделом стандартизации является описание требований к исходному сырью, так как состав субстанций ХС непостоянен и во многом зависит от природы сырья.

Известно, что в тканях животных преобладает Х4С, содержание которого составляет около 70 %, а содержание Х6С составляет около 30 %. С возрастом хрящи утончаются и начинает преобладать Х6С [15, 23, 58, 59].

Хрящи акулы и других гидробионтов имеют низкое содержание Х4С (может составлять менее 10 %), при этом содержание Х6С составляет более 80 %, также присутствуют родственные ГАГ, например, содержание КС (см. табл. 1) может составлять до 16 % [18–22, 60].

Стандартизация и требования к составу сырья ХС значительно различаются в разных странах (табл. 4). Если Европейская фармакопея закладывает переменный состав субстанций ХС, разрешая производство из любых хрящевых тканей наземных или морских животных, то согласно требованиям Фармакопеи США субстанция ХС должна иметь стандартизованный состав, в котором соотношение изомерных форм Х4С должно преобладать над Х6С (NLT 1.0), а в производстве разрешено использовать суставные хрящевые ткани домашних животных (крупного рогатого скота,

свиньи и птицы) с обязательным указанием на этикетке, из какого сырья была произведена субстанция [46–48].

На территории России до 1999 г. (согласно требованиям ФС 42-3741-99) в производстве ХС было разрешено использовать только хрящевые ткани и трахеи крупного рогатого скота, выращенного в здоровых хозяйствах, что гарантировало однотипный дисахаридный состав в субстанциях ХС и воспроизводимую фармакологическую активность. В настоящее время в аптечной сети РФ встречается ХС как из наземных животных, так и из гидробионтов.

Действующая система стандартизации лекарственных субстанций и отсутствие открытого доступа к фармакопейным статьям предприятий РФ не дают возможности охарактеризовать официальный подход к стандартизации субстанций ХС. Можно предположить, что для стандартизации ХС на территории РФ используется фармакопейная статья из Европейской фармакопеи (Eur. Ph.), которая разрешает переменный полисахаридный состав субстанции ХС.

Методы анализа

Из известных нормативных показателей качества при стандартизации ХС, используемых для составления НД [46–48], показатели «Описание», «Растворимость», «рН», «Прозрачность и цветность раствора», содержание азота, серы, белка, хлоридов и сульфатов, тяжелых металлов, остаточных растворителей и др. могут характеризовать ошибки или нарушения процесса производства, включая степень очистки субстанции (определение 2-й группы примесей – технологического или механического характера) (см. табл. 3).

Более сложно при стандартизации субстанций ХС установить соотношение изомеров Х4С и Х6С, присутствие родственных ГАГ (примеси 1-й группы) или других, несвойственных сырью примесей (примеси 3-й группы). Для выявления этих групп примесей используют такие показатели, как «Подлинность», «Удельное вращение», «Вязкость», «Посторонние примеси» (см. табл. 4). Предлагается использовать электрофорез, ВЭЖХ, ИК-, ЯМР-, а в последнее время хромато-энзимный методы анализа.

Таблица 4. Требования к сырью ХС по НД различных стран

Показатель качества	Eur. Ph. 7, «Chondroitin sulfate sodium»/Br. Ph. [48]	USP29, «Chondroitin sulfate sodium» [47]	ФС 42-3741-99 и статьи РФ НД до 2002 г. «Хондроитин сульфат»
Требования к продукту	Натриевая соль природного полимера, большей частью состоящего из 2 дисахаридов: 4-сульфат и 6-сульфат. Производят из хрящевых тканей как наземных, так и морских организмов (здоровых и подходящих для потребления). Соотношение Х4С и Х6С может быть различным	Натриевая соль сульфатированных линейных ГАГ, полученных из бычьих, свиных или птичьих суставных хрящевых тканей, от здоровых домашних животных, используемых в пищу людьми. В составе субстанции должен преобладать Х4С	Кислый мукополисахарид, получаемый в виде натриевой соли из трахей крупного рогатого скота
Вязкость	Характеристическая вязкость от 0,01 до 0,15 м ³ /кг (капиллярный вискозиметр)	–	Характеристическая вязкость не менее 0,2 и не более 0,3 (капиллярный вискозиметр)
Удельное вращение	От –20 до –30° для наземных организмов (5 % раствор) От –12 до –19° для морских организмов (5 % раствор)	От –20 до –30° (3 % раствор)	От –18 до –28° (1 % раствор)
Подлинность	А. ИК-спектметрия В. Качественная реакция на натрий С. Электрофорез (в сравнении с рабочим стандартным образцом (PCO))	А. ИК-спектметрия В. Качественная реакция на натрий (предлагается ввести энзимный метод для определения дисахаридного состава: отношение -4S к -6S должно быть не менее 1,0)	– ИК-спектметрия – Цветная реакция на уруновые кислоты – Качественная реакция на натрий
Посторонние примеси	Электрофорез (в сравнении с PCO) – посторонних пятен не больше, чем в PCO (2 %)	Электрофорез (в сравнении с PCO) – содержание какой-либо посторонней примеси не более 2 %	–
Метод количественного анализа	Титрование с раствором цетилпиридиния хлорида (ЦПХ)	Титрование с раствором ЦПХ	– Спектрофотометрия при 530 нм после гидролиза с карбазолом – Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – Титрование или спектрофотометрия с ЦПХ

Определение чистоты субстанций ХС методом электрофореза используют Европейская и Американская фармакопеи, для определения состава ГАГ в субстанциях ХС по USP несколько лет назад было предложено включить хромато-энзимный метод анализа (см. табл. 4).

Растворимость и вязкость

ХС растворим в воде с набуханием, время которого может составлять от 10–15 мин до 1 ч. Скорость набухания и растворения ХС зависит от ММ полимера, вязкости, наличия в субстанции посторонних примесей, содержания влаги, условий и времени хранения субстанции.

Для растворов полимеров вязкость является функцией ММ, формы, размеров и гибкости макромолекул. Характеристическая вязкость определяет структурную характеристику полимера, для этого приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации, и ее значение выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Для определения вязкости ХС рекомендуется использовать капиллярный вискозиметр [48]. Вискозиметрический метод применяется для определения средней ММ молекулы (некоторые частные статьи на ХС декларируют ММ не более 30 000 Да, что гарантирует его биологическую доступность и эффективность в качестве хондропротектора [61]).

Оптическое вращение

Для субстанций ХС показатель оптического вращения может характеризовать не только присутствие примесей, но и полисахаридный состав [47, 48]. Известно, что ХС, произведенный из хрящей животных (с содержанием изомера Х4С около 50–70 %), имеет показатель оптического вращения $[\alpha]_{20}/D$ от $-18...-20^\circ$ до $-28...-30^\circ$ (см. табл. 4).

ХС, произведенный из акулы и других гидробионтов (с содержанием изомера Х6С до 80 % и с содержанием КС до 16 %), имеет показатель оптического вращения $[\alpha]_{20}/D$ от -12° до -19° (см. табл. 4).

Различные ГАГ могут значительно отличаться по своим оптическим характеристикам, что оказывает влияние на суммарный показатель для готовой субстанции (табл. 5).

ИК-спектроскопия

С середины прошлого века используется как один из фармакопейных методов подтверждения

подлинности ХС. Сульфогруппы, содержащиеся в структуре ХС, обнаруживают себя в виде полос поглощения при 850 см^{-1} (Х4С) или 820 см^{-1} (Х6С), метод дает возможность определения состава и происхождения ХС [26]. Однако наложение полос на практике затрудняет анализ, особенно при содержании примесей до 10–20 %. Для более достоверной идентификации сырья в фармакопейную статью Eur. Ph. от 2017 г. включено использование 2 стандартов для проведения идентификации – ХС животного происхождения и из гидробионтов.

Электрофорез

Для анализа примесей ХС используют капиллярный электрофорез и электрофорез в геле. Электрофорез обладает высокой селективностью, позволяя определить присутствие ряда примесей 3-й группы, каррагинанов, альгината пропиленгликоля и гексаметафосфата натрия, некоторых примесей 1-й группы (ДС) [6, 7, 63–65]. Метод обладает высокой чувствительностью (определение примесей до 0,1 %) и часто используется в исследовательских работах. Капиллярный электрофорез позволяет провести количественное определение содержания суммы ГАГ в субстанции ХС, при этом присутствие примесей 3-й группы не мешает определению.

Для определения посторонних примесей в фармакопейные статьи Европы и США включен электрофорез (см. табл. 4). Согласно требованиям USP37 электрофорез проводят с использованием буферного раствора ацетата бария (рН 5,0) на целлюлозно-ацетатной пленке [48].

Энзимный метод анализа

Методика основана на применении специфического фермента (хондроитиназа АС), который может избирательно гидролизовать ХС на олиго- и дисахаридные остатки, при этом другие типы ГАГ не мешают определению. Далее свободные сульфатированные и несulfатированные дисахариды можно количественно определить методом ВЭЖХ или электрофорезом. Методика позволяет по соотношению продуктов распада определить состав и происхождение ХС, обнаружить ХС в сложных смесях с каррагинанами, ДС, глюкозамином. Метод применим к сырью и готовой продукции.

Ферменты, которые используются для деградации ГАГ, принадлежат к семейству полисахаридных

Таблица 5. Оптическое вращение некоторых типов ГАГ

Показатель качества	Х4С	Х6С	ДС	Гепарин/ГС
Оптическое вращение, $[\alpha]_{20}/D$	От -20° до -30° [62]	От -10° до -15° [62] От -13° до -18° [10]	От -40° до -70° [62] От -60° до -70° [10]	От $+40^\circ$ до $+60^\circ$ [62] От $+38^\circ$ до $+78^\circ$ [10]

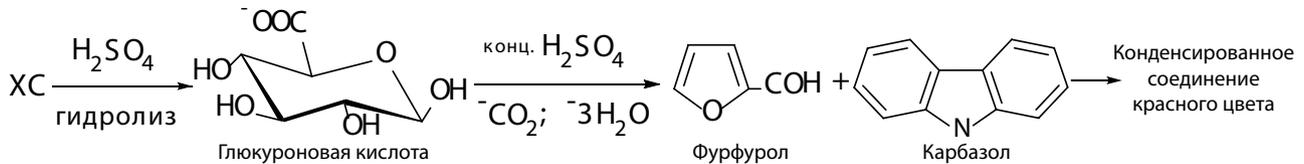


Рис. 2. Цветная реакция с карбазолом



Рис. 3. Реакция с цетилпиридиния хлоридом (ЦПХ)

лиаз, воздействующих на β (1 \rightarrow 4) гликозидную связь между остатками гексозамина и уроновых кислот. Ненасыщенные уроновые кислоты имеют высокий показатель поглощения в ультрафиолетовом свете при 232 нм ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), и эта длина волны используется для количественной оценки продуктов ферментного гидролиза [63–66].

ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектроскопию используют в исследовательских работах для установления структуры ХС и обнаружения различных примесей. Метод позволил определить присутствие ДС и сверхсульфатированного ХС в субстанциях гепарина. Идентификацию проводили по расположению сигнала протона N-ацетильной группы полисахаридов в области около 1,9–2,5 м. д., которые характеризуют присутствие в сырье контаминантных примесей [6, 31].

Метод ЯМР использовали для определения содержания примеси КС (см. табл. 1) в субстанциях ХС, произведенных из морских животных. При анализе субстанций ХС, произведенных из различных гидробионтов и из хрящей крупного рогатого скота, было обнаружено от 0 до 19 % КС, другая группа исследователей обнаружила до 50 % КС при исследовании субстанций и препаратов ХС [19, 60].

Количественные методы определения

В НД для количественного определения ХС чаще используются химические методы анализа (см. табл. 4): карбазольный метод и реакция с цетилпиридиния хлоридом (ЦПХ).

Карбазольный метод (рис. 2, см. табл. 4, ФС 42-3741-99) включает гидролиз ХС с концентрированной серной кислотой до моносахаров (глюкуроновой кислоты и N-ацетилгалактозамина), далее цветную реакцию остатков глюкуроновой кислоты с карбазолом в присутствии бората с образованием комплекса

красного цвета. Метод не селективен и дает положительный результат с любым ГАГ, а также рядом неорганических солей.

Метод осаждения с ЦПХ используется в фармакопейных статьях разных стран мира (рис. 3, см. табл. 4) [47, 48]. Метод основан на способности ХС осаждаться в растворе ЦПХ. Метод не селективен, определению мешают другие типы полианионов.

ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ чаще используют в исследовательских работах и для количественного анализа ГАГ [30, 66]. Индивидуальное определение родственных ГАГ этим методом затруднительно, для разделения ГАГ предлагались разнообразные варианты проведения анализа – специализированные колонки для определения сахаров, ионообменные полимерные колонки SAX, которые позволили провести определение примесей ДС и сверхсульфатированного ХС в субстанциях гепарина, определить присутствие КС, а также возможное присутствие ДС. Используются различные методы детекции, включая применение детектора светорассеяния (90 LT-ELSD), который позволял провести определение примеси глюкозамина в субстанциях ХС. Предлагалось использовать эксклюзионную жидкостную хроматографию (ситовая хроматография), где разделение основано на ММ.

Метод ВЭЖХ позволяет провести количественный анализ ХС (суммарное содержание родственных ГАГ) в сравнении с внешним стандартом, при этом примеси 2-й и 3-й групп не мешают определению. Метод был включен в ряд частных статей для количественного анализа ХС (см. табл. 4; РФ НД 42-12563-02 ХС, Новая Зеландия).

Заключение

Анализ НД на препараты ХС показывает необходимость разработки государственного, общепринятого подхода к стандартизации ЛП по аналогии с ФС

других стран и указания на этикетке, из какого сырья была произведена субстанция. Производитель ЛП ХС для подтверждения его фармакологической активности должен контролировать все те аспекты

качества ЛП, которые влияют или могут повлиять на показатели его безопасности и эффективности, включая структурный состав, ММ, наличие возможных примесей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Volpi N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(10):1271–80. DOI: 10.1211/jpp/61.10.0002. PMID: 19814858.
- Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules* 2015;20(3):4277–89. DOI: 10.3390/molecules20034277. PMID: 25756648.
- Шавловская О.А. Обзор зарубежной литературы по применению хондроитина сульфата. *Русский медицинский журнал* 2012;20(34):1678–82. [Shavlovskaya O.A. Foreign literature survey on chondroitin sulfate use. *Russky meditsinsky zhurnal = Russian Medical Journal* 2012;20(34):1678–82. (In Russ.)].
- Хубиева А.Ю. Фармакокинетические исследования различных лекарственных форм хондроитина сульфата. Дис. ... канд. фарм. наук. М., 2007. [Hubieva A.Yu. Pharmacokinetic studies of different medical forms of chondroitin sulfate. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Moscow, 2007. (In Russ.)].
- Working Group on Chondroitin Sulfate. AOAC Mid-Year Meeting March 21, 2014. Maryland, USA.
- Weiguo Z., Giancaspro G., Adams K.M. et al. Electrophoretic separation of alginic sodium diester and sodium hexametaphosphate in chondroitin sulfate that interfere with the cetylpyridinium chloride titration. *J AOAC Int* 2014;97(6):1503–13. DOI: 10.5740/jaoacint.14-167. PMID: 25372663.
- da Cunha A.L., de Oliveira L.G., Maia L.F. et al. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. *Carbohydr Polym* 2015;134:300–8. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.006. PMID: 26428128.
- Васильев А.Н., Реутская Л.А., Байдулаева Ш.А. и др. Качество лекарственных препаратов. Суть вопроса и зарубежный опыт. *Ремедиум* 2014;(10):14–27. [Vasiliev A.N., Reutskaya L.A., Baidulaeva Sh.A. et al. Quality of medicinal products. The crux of the problem and foreign experience. *Remedium* 2014;(10):14–27. (In Russ.)]. DOI: 10.21518/1561-5936-2014-10-14-24.
- Стейси М., Баркер С. Углеводы живых тканей. Пер. с англ. М., 1965. [Stacey M., Barker S. Carbohydrates of living tissues. Transl. from Engl. M., 1965. (In Russ.)].
- The carbohydrates: chemistry and biochemistry. 2nd edn. Vol. IIB. Ed. by W.W. Pigman, D. Horton. Academic Press, 1970. 452 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-556352-9.X5001-X.
- Textbook of biochemistry with clinical correlations (6th edn.). Ed. by T.M. Devlin. Hoboken, New Jersey: Wiley-Liss, 2006. 1208 p. DOI: 10.1002/bmb.2006.49403403236.
- Северин Е.С. Биохимия. М.: Гэотар-Мед, 2003. 779 с. [Severin E.S. Biochemistry. Moscow: Geotar-Med, 2003. 779 p. (In Russ.)].
- Meyer K., Linker A., Davidson E.A., Weissmann B. The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J Biol Chem* 1953;205(2):611–6. PMID: 13129238.
- Касавина Б.С., Кольчинский Т.А., Зенкевич Г.Д. Мукополисахариды костной и хрящевой ткани в норме и патологии. *Успехи современной биологии* 1970;69(3):353–63. [Kasavina B.S., Kolchinskiy T.A., Zenkevich G.D. The mucopolysaccharides of bone and cartilage tissue normal and pathological. *Uspekhi sovremennoy biologii = Successes of Modern Biology* 1970;69(3):353–63. (In Russ.)].
- Lindahl U., Couchman J., Kimata K., Esko J.D. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: *Essentials of glycobiology*. 3rd edn. Ed. by A. Varki et al. Cold Spring Harbor Press, 2015–2017. DOI: 10.1101/glycobiology.3e.017.
- Понеделькина И.Ю., Лукина Е.С., Одинокоев В.Н. Кислые гликозаминогликаны и их химическая модификация. *Биоорганическая химия* 2008;34(1):5–28. [Ponedelkina I.Yu., Lukina E.S., Odinokov V.N. Acid glycosaminoglycans and their chemical modification. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry* 2008;34(1):5–28. (In Russ.)].
- Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. М.: Практическая медицина, 2012. 224 с. [Khabarov V.N., Boykov P.Ya., Selyanin M.A. Hyaluronic acid: getting, properties, use in biology and medicine. Moscow: Practical Medicine, 2012. 224 p. (In Russ.)].
- Funderburgh J.L. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 2000;10(10):951–8. PMID: 11030741.
- Restaino O.F., Finamore R., Diana P. et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. *Anal Chimica Acta* 2017;958:59–70. DOI: 10.1016/j.aca.2016.12.005. PMID: 28110685.
- Uchimura K. Keratan sulfate: biosynthesis, structures, and biological functions. *Methods Mol Biol* 2015;1229:389–400. DOI: 10.1007/978-1-4939-1714-3_30. PMID: 25325967.
- Shang Q., Li Q., Zhang M. et al. Dietary keratan sulfate from shark cartilage modulates gut microbiota and increases the abundance of *Lactobacillus* spp. *Mar Drugs* 2016;14(12):224. DOI: 10.3390/md14120224. PMID: 27941632.
- Greiling H. Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans. *EXS* 1994;70:101–22. PMID: 8298243.
- Rodén L., Armand G. Structure of the chondroitin 4-sulfate-protein linkage region. Isolation and characterization of the disaccharide 3-O-beta-D-glucuronosyl-D-galactose. *J Biol Chem* 1966;241(1):65–70. PMID: 4285135.
- Lamari F.N., Karamanos N.K. Structure of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol* 2006;53:33–48. DOI: 10.1016/S1054-3589(05)53003-5. PMID: 17239761.
- Шкарина Т.Н., Лутцева А.И., Ковалева С.В. и др. Лекарственные средства, содержащие хондроитин сульфат. *Фармация* 2007;(3):42–8. [Shkarina T.N., Lutzeva A.I., Kovaleva S.V. et al.

- Kovaleva S.V. et al. Drugs possessing chondroitin sulfate. *Farmatsiya = Farmacia* 2007;(3):42–8. (In Russ.).
26. Шкарина Т.Н. Анализ и стандартизация хондроитина сульфата натрия. Дис. ... канд. фарм. наук. М., 2009. [Shkarina T.N. Analysis and standardization of sodium sulfate chondroitin. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Moscow, 2009. (In Russ.).]
 27. Seno N., Murakami K. Structure of disulfated disaccharides from chondroitin polysulfates, chondroitin sulfate D and K. *Carbohydr Res* 1982;103:190–4. DOI: 10.1016/S0008-6215(82)80024-4.
 28. Takagaki K., Munakata H., Kakizaki I. et al. Domain structure of chondroitin sulfate E octasaccharides binding to type V collagen. *J Biol Chem* 2002;277(11):8882–9. DOI: 10.1074/jbc.M106479200. PMID: 11751896.
 29. Ueoka C., Nadanaka S., Seno N. et al. Structural determination of novel tetra- and hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate H (oversulfated dermatan sulfate) of hagfish notochord. *Glycoconj J* 1999;16(6):291–305. PMID: 10579698.
 30. Kavitha G., Nadamuni G., Venkatesan C.S. et al. A pH-gradient hplc method for determination of trace levels of over sulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate in heparin sodium. *IJPSR* 2014;5(11):4916–24. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(11).4916-24.
 31. Huckerby T.N., Nieduszynski I., Giannopoulos M. et al. Characterization of oligosaccharides from the chondroitin dermatan sulfates 1H-NMR and 13C-NMR studies of reduced trisaccharides and hexasaccharides. *FEBS J* 2005;272(24):6276–86. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05009.x. PMID: 16336265.
 32. Fransson L.A., Rodén L. Structure of dermatan sulfate. II. Characterization of products obtained by hyaluronidase digestion of dermatan sulfate. *J Biol Chem* 1967;242(18):4170–5. PMID: 4228842.
 33. *Biology of brain dysfunction. Vol. I.* Ed. by G.E. Gaull. New York/London: Plenum Press, 1973. 403 p. DOI:10.1007/978-1-4684-2667-0.
 34. Shriver Z., Capila I., Venkataraman G., Sasisekharan R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(207):159–76. DOI: 10.1007/978-3-642-23056-1_8. PMID: 22566225.
 35. Новиков В.Е. Хондропротекторы. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2010;8(4):41–7. [Novikov V.E. Chondroprotectors. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy* 2010;8(4):41–7. (In Russ.).]
 36. Lemaire P.A., Huang L., Zhuo Ya et al. Chondroitin sulfate promotes activation of cathepsin K. *J Biol Chem* 2014;289(31):21562–72. DOI: 10.1074/jbc.M114.559898. PMID: 24958728.
 37. Damlar I., Esen E., Tatli U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20(3):e278–83. PMID: 25662545.
 38. Лазебник Л.Б., Дроздов В.Н. Эффективность хондроитин сульфата при лечении гонартроза и коксартроза у больных пожилого возраста. *Терапевтический архив* 2005;(8):64–9. [Lazebnik L.B., Drozdov V.N. The effectiveness of chondroitin sulfate in treating gonarthrosis and coxarthrosis of elderly patients. *Terapevtichesky arkhiv = Therapeutic Archive* 2005;(8):64–9. (In Russ.).]
 39. Ермакова И.И. Протеогликаны культуры миобластов L6J1: характеристика и влияние на адгезию, пролиферацию и дифференцировку миобластов. Дис. ... канд. фарм. наук. Санкт-Петербург, 2008. [Ermakova I.I. L6J1 Myoblast culture proteoglycans: characteristics and effects on adhesion, proliferation and differentiation of myoblasts. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. St. Petersburg, 2008. (In Russ.).]
 40. Сигаева Н.Н., Колесов С.В., Назаров П.В., Вильданова Р.Р. Химическая модификация гиалуриновой кислоты и ее применение в медицине. *Вестник Башкирского университета* 2012;17(3):1221–2. [Sigaeva N.N., Kolesov S.V., Nazarov P.V., Vildanova R.R. Chemical Modification of hyaluronic acid and its use in medicine. *Vestnik Bashkirskego universiteta = Bulletin of Bashkir University* 2012;17(3):1221–2. (In Russ.).]
 41. da Cunha A.L., Aguiar J.A.K., Correa da Silva F.S., Michelacci Y.M. Do chondroitin sulfates with different structures have different activities on chondrocytes and macrophages? *Int J Biol Macromol* 2017;103:1019–31. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.123. PMID: 28536017.
 42. Liu S., Shen J.R., Yu R.M. Extraction and antihypertensive activity analysis of chondroitin sulfate from different animals. *Zhong Yao Cai* 2010;33(2):180–3. PMID: 20575407.
 43. Nakazawa K., Murata K. Comparative study of the effects of chondroitin sulfate isomers on atherosclerotic subjects. *Z Alternersforsch* 1979;34(2):153–9. PMID: 395771.
 44. Adebawale A.O., Cox D.S., Liang Z., Eddington N.D. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. *J Am Nutr Assoc* 2000;(3):37–44.
 45. Toida T., Sakai S., Akiyama H., Linhardt R.J. Immunological activity of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol* 2006;53:403–15. DOI: 10.1016/S1054-3589(05)53019-9. PMID: 17239777.
 46. Volpi N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. *J Pharm Sci* 2007;96(12):3168–80. DOI: 10.1002/jps.20997. PMID: 17630645.
 47. Chondroitin sulfate sodium. U.S. Pharmacopeia Monograph, USP 32–NF27:980.
 48. Chondroitin sulfate sodium. European Pharmacopeia Monographs, EP 7,0: 1681–1683.
 49. Shin S.C., You S.J., An B.K., Kang C.W. Study on extraction of mucopolysaccharide-protein containing chondroitin sulfate from chicken keel cartilage. *Asian-Australas J Anim Sci* 2006;19(4):601–4. DOI: 10.5713/ajas.2006.601.
 50. Srichamroen A., Nakano T., Pietrasik Z. et al. Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *Food Sci Technol* 2013;50(2):607–12. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.07.039.
 51. Maccari F., Galeotti F., Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes. *Carbohydr Polym* 2015;129:143–7. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.059. PMID: 26050899.
 52. Порцель М.Н. Разработка технологии получения хондроитин сульфата из гидробионтов Баренцева моря и изучение его физико-химических свойств. Дис. ... канд. фарм. наук. Мурманск, 2011. [Portsel M.N. Technology development of obtaining chondroitin sulfate from hydrobionts of the Barents sea and the study of its physical-chemical properties. Thesis ... of candidate of pharmaceutical sciences. Murmansk, 2011. (In Russ.).]
 53. Кучина Ю.А., Новиков В.Ю., Деркач С.Р. и др. Свойства хондроитина сульфата из морских гидробионтов. X Всероссийская научная конференция и школа молодых ученых

- «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017): тезисы докладов. Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 2017. С. 61–2. [Kuchina Yu.A., Novikov V.Yu., Derkach S.R. et al. Properties of chondroitin sulfate from marine hydrobionts. X All-Russian Scientific Conference and School of Young Scientists “Chemistry and Technology of Plant Substances” (Kazan, 2017): Abstracts. Kazan: IOFH them. A.E. Arbuzov KazSC RAS, 2017. Pp. 61–2. (In Russ.)].
54. Nakano T., Ikawa N., Ozimek L. An economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage. *Canadian Agricultural Engineering* 2000;42(4):205–8.
55. Письмо № ОЗИ-578/08 от 08.09.2008 г. О контроле качества посторонних примесей в препаратах гепарина. Минздравсоцразвития РФ, Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. [Letter No. OZI-578/08 from 8.09.2008. On quality control of extraneous impurities in heparin drugs. Ministry of Health and Social Development of Russia, The Federal service for supervision in the health and social development sphere. (In Russ.)].
56. Chess E.K., Bairstow S., Donovan S. et al. Case study: contamination of heparin with oversulfated chondroitin sulfate. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(207):99–125. DOI: 10.1007/978-3-642-23056-1_6. PMID: 22566223.
57. Sakai S., Otake E., Toida T., Goda Y. Identification of the origin of chondroitin sulfate in “health foods”. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007;55(2):299–303. PMID: 17268105.
58. Bertolotto A., Palmucci L., Mongini T. et al. Chondroitin, chondroitin 6-sulphate, chondroitin 4-sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci* 1987;81(2–3):247–59. PMID: 3694231.
59. Worrall J.G., Wilkinson L.S., Bayliss M.T., Edwards J.C. Zonal distribution of chondroitin-4-sulphate/dermatan sulphate and chondroitin-6-sulphate in normal and diseased human synovium. *Ann Rheum Dis* 1994;53(1):35–8. PMID: 8311553.
60. Pomin V.H., Piquet A.A., Pereira M.S., Mourão P.A. Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration. *Carbohydr Polym* 2012;90(2):839–46. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.06.009. PMID: 22840010.
61. Adebawale A.O., Du J., Liang Z. et al. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos* 2002;23(6):217–25. DOI: 10.1002/bdd.315. PMID: 12214321.
62. Concise polymeric materials encyclopedia. Ed. by J.C. Salamone. CRC Press, Technology & Engineering, 1998. 1760 p.
63. Ucakturk E., Cai C., Li L. et al. Capillary electrophoresis for total glycosaminoglycan analysis. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(19):4617–26. DOI: 10.1007/s00216-014-7859-8. PMID: 24817364.
64. Vaclavikova E., Kvasnicka F. Quality control of chondroitin sulphate used in dietary supplements. *Czech J Food Sci* 2015;33:165–73. DOI: 10.17221/326/2014-CJFS.
65. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2nd edn. Ed. by P. Camilleri. CRC Press, 1997. 576 p.
66. Ji D., Roman M., Zhou J., Hildreth J. Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection after enzymatic hydrolysis: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 2007;90(3):659–69. PMID: 17580617.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.Л. Комарова/E.L. Komarova: <https://orcid.org/0000-0002-1204-8234>

С.В. Чернова/S.V. Chernova: <https://orcid.org/0000-0001-5181-4547>

Л.В. Овсянникова/L.V. Ovsyannikova: <https://orcid.org/0000-0002-0566-3079>

К.И. Эллер/K.I. Eller: <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.