

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616.03:615.2:577.1:539.1.047

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ГЕНИСТЕИН – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СУБСТАНЦИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СРЕДСТВ

© 2024 г. В. В. Тихонова¹, Т. В. Сотникова¹, Г. В. Ерлин¹,
О. Ю. Стрелова¹*, А. Н. Гребенюк¹

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: olga.strelowa@pharminnotech.com

Поступила в редакцию 24.04.2023 г.

После доработки 18.12.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Разработка лекарственных форм эффективных противолучевых средств остается актуальной задачей современной радиобиологии. Целью настоящего исследования является определение показателей качества отечественного синтетического генистеина как потенциальной активной фармацевтической субстанции для разработки противолучевых средств. Материалом исследования послужили два образца генистеина, синтезированного в НПЦ «Фармзащита» ФМБА России и в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете Минздрава России, и природный генистеин, выделенный из жмыха семян сои культурной (*Glycine max* L. Merr.). Оценку качества синтетического и природного генистеина проводили с использованием инфракрасной Фурье-спектроскопии, ядерно-магнитной резонансной ^1H и ^{13}C спектроскопии, рамановской спектроскопии. Установлено, что по изученным спектрам образцы генистеина не отличаются между собой, подтверждена структура молекулы, в них отсутствуют дополнительные сигналы. Разработана и валидирована методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде диметилформамида, которую рекомендуется включить в нормативную документацию для фармацевтической субстанции генистеина. Разработана и апробирована методика высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения генистеина для дальнейшего исследования биологически активных добавок и лекарственных препаратов на его основе.

Ключевые слова: генистеин, противолучевые средства, радиопротектор, потенциальная активная фармацевтическая субстанция, показатели качества, подлинность

DOI: 10.31857/S0869803124010038, EDN: NNSJRQ

Одним из приоритетных направлений развития современной радиобиологии и радиационной фармакологии является поиск новых противолучевых средств, обладающих защитной эффективностью при различных вариантах облучения, длительным фармакологическим действием, низкой токсичностью и хорошей переносимостью [1–3]. Учитывая, что в патогенезе лучевого поражения существенную роль играет оксидативный стресс, проявляющийся в резком усилении продукции активных кислородных метаболитов, инициации перекисного окисления липидов, с одной стороны, и снижении активности различных компонентов антиоксидантной системы – с другой, весьма перспективным выглядит использование в качестве противолучевых средств препаратов из группы

антиоксидантов [4]. Одной из наиболее интересных групп антиоксидантов являются биофлавоноиды – низкомолекулярные многоатомные фенолы растительного происхождения и в частности, генистеин (4,5,7-тригидроксизофлавоноид) [5, 6].

Генистеин является малотоксичным соединением, обладает широким спектром биологической и фармакологической активности, проявляя антиоксидантные, противовоспалительные, эстрогенные и антиэстрогенные свойства, оказывая антидиабетическое, цитостатическое и противоопухолевое действие [7–10]. Наличие у генистеина выраженных антиоксидантных и эстрогенных свойств во многом определяет и его радиозащитную эффективность, которая проявляется как при профилактическом, так

и при терапевтическом применении [11, 12]. Наряду с выраженной антиоксидантной активностью, механизм его противолучевого действия может быть связан со стимуляцией синтеза и продукции эндогенных гемопоэтических цитокинов, активацией фермента Gadd45, играющего важную роль в процессах репарации ДНК, задержкой Lin⁺ клеток в G₀/G₁-фазе клеточного цикла, что в конечном итоге позволяет защитить популяцию клеток-предшественников гемопоэза от лучевой гибели, а также ускорить восстановление числа нейтрофилов и тромбоцитов после облучения [9, 13–17]. Все это позволяет рассматривать генистеин в качестве перспективного противолучевого средства и делает актуальным разработку его лекарственной формы [3, 4].

Природным ресурсом генистеина в первую очередь является соя культурная (*Glycine max* L. Merr.), районы произрастания которой в России занимают около 2 млн га, что составляет менее 0.5% посевных площадей. Выделение генистеина из лекарственного растительного сырья представляет собой сложный, трудоемкий процесс с низким выходом целевого продукта [18]. В связи с этим для разработки лекарственных препаратов на основе этого изофлавона более перспективным является использование синтетического генистеина [19, 20].

В ходе предыдущей работы проведено совершенствование методики синтеза и разработка показателей качества генистеина для аттестации стандартного образца [21–23]. Целью настоящего исследования является определение показателей качества отечественного синтетического генистеина как потенциальной активной фармацевтической субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В работе использовали два варианта синтетического генистеина: образец № 1 был предоставлен разработчиком схемы его синтеза канд. хим. наук В. Ю. Ковтуном (НПЦ «Фармзащита» ФМБА России) и образец № 2 – генистеин, синтезированный на кафедрах фармацевтической химии и химической технологии лекарственных веществ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России (СПХФУ). В качестве препарата сравнения использовали природный генистеин, выделенный из жмыха семян сои культурной (*Glycine max* L. Merr.) на кафедре фармакогнозии СПХФУ.

Описание фармацевтической субстанции синтетического генистеина выполняли в соответствии с Общей фармакопейной статьей ОФС.1.1.0001 «Общие положения» Государственной фармакопеи России XV издания [24]. Определение растворимости синтетического генистеина проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» [24] в следующих растворителях: вода очищенная, метанол, 95%-ный этанол, хлороформ, ацетонитрил и диметилсульфоксид (ДМСО). Температуру плавления определяли на малогабаритном нагревательном столе Mikro-Heiztisch «BOETIUS» с визуальным устройством РНМК 05 по стандартной методике.

Методики спектрометрии. Исследование образцов генистеина проводили методами спектрометрии. Инфракрасные спектры записывали на Фурье-спектрометре инфракрасном ФСМ 1201 (ООО «Инфраспек», Россия) в диске с калия бромидом в области частот от 4000 до 500 см⁻¹. Спектры ядерного магнитного резонанса ¹H и ¹³C образцов записывали на ЯМР-спектрометре BrukerAvance III (Bruker, Германия) в растворителе ДМСО-d₆ на частотах 400 и 100 МГц. Раман-спектры образцов генистеина записывали на аналитической системе комбинационного рассеяния света ОРТЕС-785TRS-2700 (АО «ОПТЭК», Россия) при мощности лазерного излучения, равной 100 мВт. Продолжительность воздействия лазерного излучения составляла 5, 10, 20 и 60 с. Обработка результатов осуществлялась с помощью ПО «BWSpec 4.10_4» (B&W ТЕК, США).

Газовую хромато-масс-спектрометрию (ГХ-МС) проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890A с автоинжектором 7693 и масс-селективным детектором 5975С фирмы «Hewlett Packard». Количественное определение выполняли методом неводного титрования с использованием титранта натрия гидроксид, ч.д.а. (ООО «Вектор», Россия), в качестве растворителя была использована смесь бензола, х.ч. (ГОСТ 5955-75, АО «ЭКОС-1», Россия) и метанола, х.ч. (ГОСТ 6995-77, АО «ВЕКТОН», Россия), для среды титрования был использован диметилформамид, х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия), индикатором служил тимоловый синий, ч.д.а. (ООО «АО Реахим», Россия). Количественное определение проводили на рН-метре лабораторном F-20 (METTLER TOLEDO, США) в среде диметилформамида. Все результаты были посчитаны с помощью программы EXCEL (Microsoft).

Методика количественного определения генистеина методом неводного титрования с предварительной нейтрализацией диметилформамида (ДМФА)

10 мл ДМФА вносят в мерный стакан на 50 мл, добавляют 2 капли индикатора тимолового синего и титруют 0.1 моль/л раствором гидроксида натрия до перехода окраски в синий цвет с использованием магнитной мешалки. Далее бюретку снова заполняют до нулевой отметки. Отвешивают около 0.05 г генистеина (точная навеска) и вносят мерный стакан на 50 мл, перемешивают до растворения, устанавливают электрохимическую ячейку так, чтобы электроды были полностью в растворе, ожидают, когда на приборе установится равновесие, и титруют тем же титрантом при непрерывном перемешивании. Каждый раз

при добавлении определенного объема титранта ожидали установления равновесия в ячейке для записи показаний прибора. Для расчета концентрации брали объем титранта, пошедшего только на генистеин (табл. 1).

Методика идентификации и количественного определения генистеина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Около 0.02 г (точная навеска) генистеина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 50 мл метанола (HPLC for Gradient Analysis, CAS No 75-05-8, FisherScientific, США), доводили объем раствора до метки и перемешивали. Хроматографировали испытуемый раствор

Таблица 1. Спектральные характеристики генистеина для внесения в нормативную документацию

Table 1. Spectral characteristics of genistein for regulatory documentation

Основные характеристики	Группы
ЯМР ^1H спектр	
8.31	протон в положении 2 кольца С
6.81; 6.83	протоны в положениях 3', 5' кольца В
7.37, 7.39	протоны в положениях 2', 6' кольца В
6.23	протон в положении 6 кольца А
6.38	протон в положении 8 кольца А
12.96	-ОН группы 5 положения кольца А
10.89	-ОН 7 положения кольца А
ЯМР ^{13}C спектр	
154.46 + 154.40	СН-группа в положении 2
122.74	С в положении 3
180.68	С в положении 4
104.92	С в положении 10
162.46	С в положении 5
99.37 + 99.47	СН-группа в положении 6
164.73	С в положении 7
94.07 + 94.18	СН-группа в положении 8
158.05	С в положении 9
121.67	С в положении 1'
130.63	СН-группы в положениях 2', 6'
115.52	СН-группы в положениях 3', 5'
157.87	С в положении 4'
ИК спектр	
3412 cm^{-1}	наличие внутримолекулярной водородной связи между
«зона отпечатков пальцев» (от 1600 до 400 nm^{-1})	ОН-группой в 5 положении и С=О группой в 4 положении
1583; 1614; 810; 819; 841; 852; 1201; 1423; 1365 cm^{-1}	нии
Рамановская спектроскопия	
74.6; 95.9; 105.6; 117.1; 304.4; 378.1; 401.8; 416.4; 789.9; 886.2; 986.9; 1615.6 cm^{-1}	полосы, отвечающие за подтверждение индивидуальной молекулы

и определяли площадь пика исследуемого образца. Определение проводили в режиме изократического элюирования на высокоэффективном жидкостном хроматографе Prominence LC-20 Shimadzu (Япония), снабженном диодно-матричным детектором (УФ-детектор модель SPD-M20A). Неподвижная фаза — колонка C18 из нержавеющей стали (25.0 см × 4.6 мм), заполненная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм. Подвижная фаза — ацетонитрил (HPLC for Gradient Analysis, CAS No 75-05-8, FisherScientific, США) и 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты. Условия хроматографирования: скорость потока 0.5 мл/мин, температура термостата колонки — 40 °С, длина волны детектирования — 264 нм, объем пробы — 10 мкл, время анализа — 20 мин.

Статистическую обработку результатов экспериментов выполняли согласно Государственной Фармакопеи России XV издания с помощью пакета приложений Microsoft Office, с вычислением рекомендуемых метрологических характеристик [24]. Различия считали достоверными при $p \leq 0.1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения значений параметров качества и подтверждения структуры вещества были выбраны общеизвестные методы ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) и инфракрасной (ИК) спектроскопии. Результаты спектрального анализа генистеина (образец № 1) методами ИК-спектроскопии, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии представлены на рис. 1, 2.

Как показало исследование субстанции синтетического генистеина по показателю растворимости, он не растворим в воде, но растворим в метаноле и диметилформамиде. Поэтому для разработки несличительного метода количественного определения генистеина за основу взяли методику неводного титрования в среде ДМФА. На первом этапе разработки методики количественного определения генистеина конечная точка титрования устанавливалась с помощью индикатора тимолового синего. Однако была отмечена сложность в визуальной фиксации изменением окраски индикатора: генистеин очень слабая кислота ($\text{pK}_{\text{a}1} = 7.63$; $\text{pK}_{\text{a}2} = 9.67$; $\text{pK}_{\text{a}3} = 10.80$), резкого изменения pH в растворе при титровании не происходит, поэтому сложно установить, до какой окраски индикатора необходимо титровать. Поэтому было предложено использовать потенциометрическое определение конечной точки титрования. При проведении

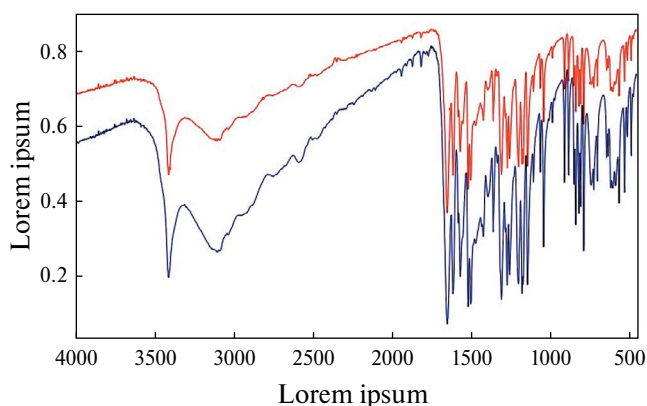


Рис. 1. ИК-спектр генистеина.
Fig. 1. IR-spectrum of genistein.

титрования с контрольным опытом были получены скачки на кривых титрования, так как среда ДМФА влияет на ход титрования. Для нивелирования данных скачков предложено титровать с предварительной нейтрализацией ДМФА без контрольного опыта (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая, что выделение генистеина из лекарственного растительного сырья представляет собой сложный, трудоемкий процесс с низким выходом целевого продукта, в НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, а затем в СПХФУ был синтезирован синтетический генистеин. Однако оценка показателей качества синтетического генистеина как фармацевтической субстанции в полном объеме не исследовалась, что и послужило основанием для проведения настоящей работы.

При проведении расшифровки ИК-спектра образца № 1 генистеина (рис. 1) особое внимание стоит уделить «зоне отпечатков пальцев» (от 1600 до 400 nm^{-1}), так как здесь находятся основные полосы, необходимые для идентификации образца (табл. 1).

В результате проведения спектрального анализа методом ЯМР было установлено, что число сигналов соответствует числу типов протонов в молекуле, интегральная интенсивность прямо пропорциональна числу протонов данного типа в молекуле. Положение полос поглощения в ИК спектре соответствует заявленной структуре соединения.

Впервые получен рамановский спектр молекулы генистеина (табл. 1), позволяющий рекомендовать метод спектроскопии комбинационного

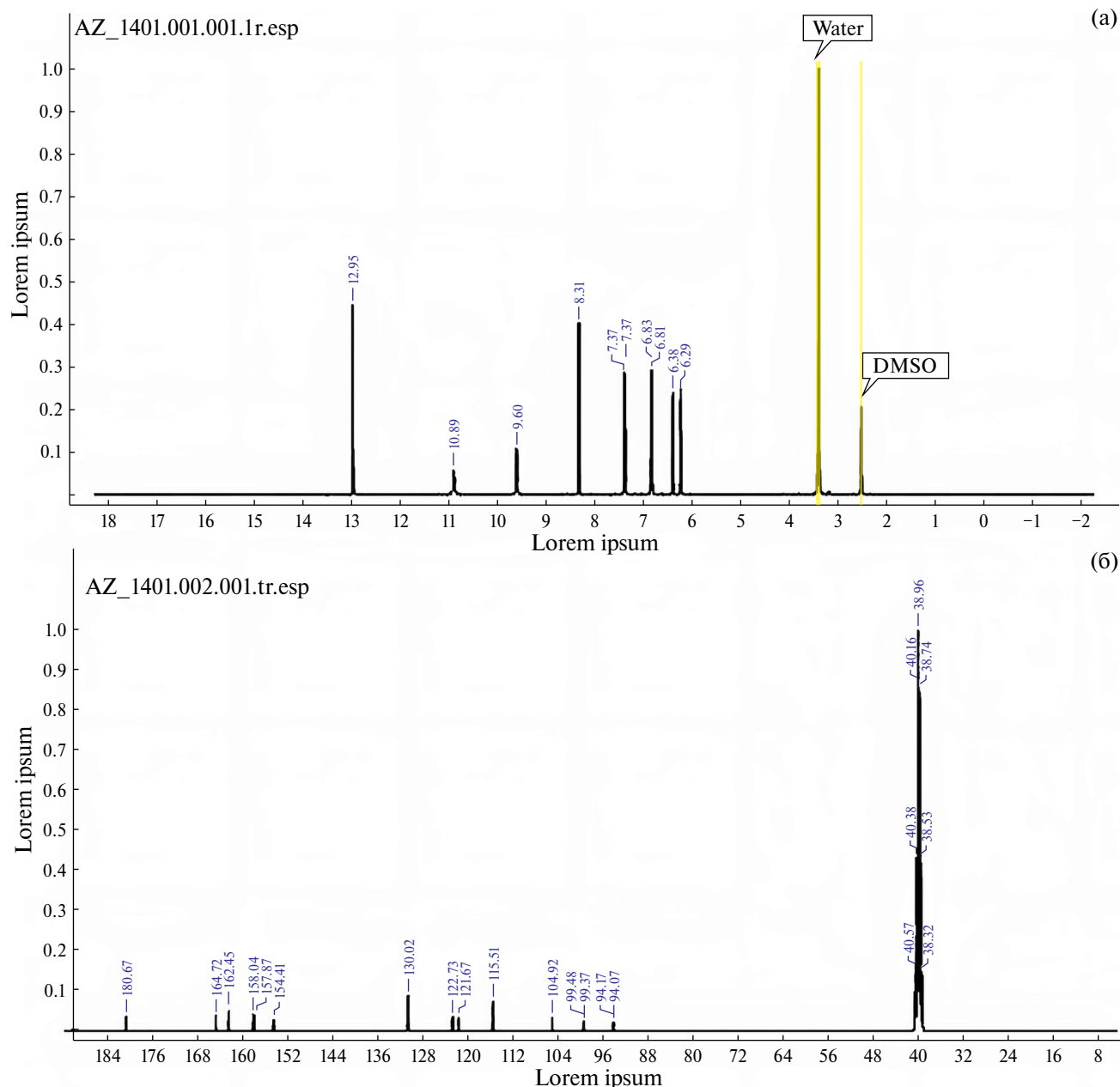


Рис. 2. ЯМР-спектр генистеина (А – H^1 , В – C^{13}).
Fig. 2. Nuclear magnetic resonance spectrum of genistein (A – H^1 , B – C^{13}).

рассеяния для идентификации молекулы как в субстанции, так и в лекарственных формах по характерным максимумам интенсивности.

Статистическая обработка полученных в методике неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования данных проведена в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [24]. После проверки

всех выборок на нормальность распределения был сделан вывод, что массив аналитических данных близок к нормальному распределению, поэтому все расчеты проводили параметрическими методами. Среднее и медиана приблизительно равны. Эксцесс по модулю меньше 1, коэффициент асимметрии по модулю меньше 0.5, что находится в пределах нормы.

Итоговые результаты статистической обработки данных, полученных по результатам

неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования, представлены в табл. 3.

По итогам проведения статистической обработки данных содержание вещества в исследуемом образце составило $98.82\% \pm 1.04$.

Также была проведена валидация данной методики по параметрам: правильность, прецизионность, повторяемость и линейность в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» [24]. Результаты валидации данной методики представлены в табл. 4.

Правильность обычно выражается количественно через «смещение» (bias). Установлено, что относительное смещение около 1%. Данное отклонение незначительно, следовательно, методика правильна.

Согласно установленным требованиям, критерием оценки повторяемости и прецизионности методики является коэффициент вариации, который не должен превышать 2.0%, для линейности критерием приемлемости является коэффициент корреляции не менее 0.99. Все полученные нами в ходе исследования образцов генистеина данные соответствуют критериям приемлемости [24].

При проведении ВЭЖХ была определена линейность методики на пяти модельных растворах разной концентрации генистеина, построен график линейной зависимости. Значение коэффициента корреляции составляет 0.9981, что отвечает условию критерия приемлемости (не менее 0.99) [24]. На рис. 3 показана хроматограмма генистеина (0.0805 мг/мл), время удерживания составило около 5,7 мин.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были определены показатели качества отечественного синтетического генистеина как потенциальной активной фармацевтической субстанции, разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА и методика ВЭЖХ количественного определения генистеина. Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о соответствии синтетического генистеина требованиям к лекарственным средствам по качеству и перспективности дальнейшего изучения фармакокинетических показателей генистеина. Представляется перспективной разработка лекарственного средства на его основе, однако его плохая растворимость является препятствием для создания классических лекарственных форм.

Таблица 2. Результаты неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования

Table 2. Results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration

Номер образца	1	2	3	4	5	6	7	8
C, %	97.2	97.82	97.88	98.27	98.66	99.29	100.28	100.76

Таблица 3. Статистическая обработка данных результатов неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования

Table 3. Statistical processing of data from the results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of final point of titration

Метрологические характеристики							
$\bar{X}$	$\bar{X}_P$	f (n-1)	S	S ²	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	ε, %	RSD, %
98.82	95%	7	1.25	1.56	1.04	1.06	1.26

Таблица 4. Валидационные параметры количественного определения генистеина

Критерий оценки	Правильность	Прецизионность	Повторяемость	Линейность
Относительное смещение, %	Не более 1 %			
RSD, %		0.98 %	1.03 %	
Коэффициент корреляции				0.9998

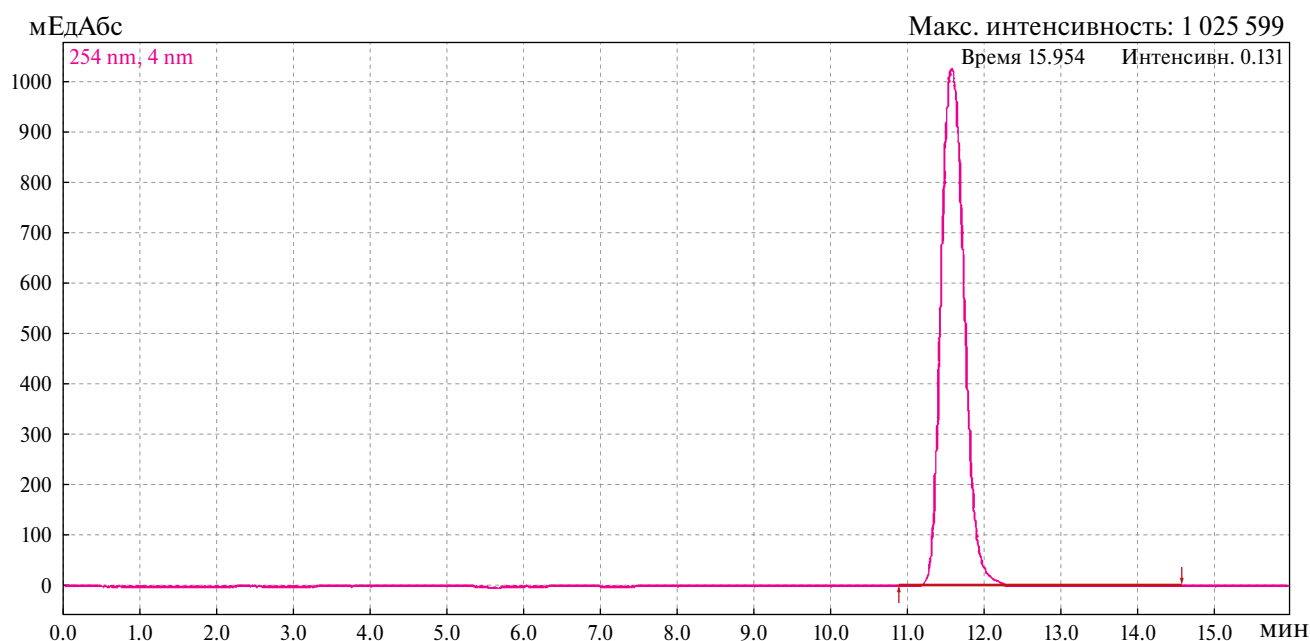


Рис. 3. Хромограмма генистеина (ВЭЖХ, раствор с концентрацией 0.0805 мг/мл).
Fig. 3. Chromatogram of genistein (HPLC, 0.0805 mg/ml solution).

Для преодоления этого препятствия предлагается разработать лекарственную форму генистеина с применением технологии трехмерной печати методом FDM (fused deposition modeling).

ВЫВОДЫ

1. Определены значения параметров качества генистеина для внесения в нормативную документацию на потенциальную активную фармацевтическую субстанцию. Установлено, что спектральные характеристики (ИК, ЯМР ^1H и ^{13}C , Раман-спектр) изучаемых образцов генистеина не отличаются между собой, подтверждена структура молекулы, в них отсутствуют дополнительные сигналы. Установленные спектральные характеристики следует включить в нормативную документацию.

2. Разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА. Валидационная оценка полученных результатов показала, что методика является правильной (RSD, % = 1.25), сходимость (RSD, % = 1.21) и внутрилабораторная прецизионность (в первый день RSD, % = 1.21, во второй день RSD, % = 1.41) соответствуют критериям приемлемости. Разработанную методику рекомендуется включить в нормативную документацию.

3. Разработана методика ВЭЖХ идентификации и количественного определения генистеина для дальнейшей разработки лекарственных препаратов на его основе.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Тихонова Виктория Владленовна (Viktoria Vladlenovna Tikhonova) – viktoriya.tikhonova@pharminnotech.com, ORCID 0000-0002-1184-6453

Сотникова Татьяна Васильевна (Tatyana Vasilievna Sotnikova) – tatyana.sotnikova@spcpcu.ru, <https://orcid.org/0009-0004-8991-7866>

Ерлин Глеб Владимирович (Gleb Vladimirovich Erlin) – gleb.erlin@spcpcu.ru, ORCID 0009-0006-2202-7919

Стрелова Ольга Юрьевна (Olga Yuryevna Strelova) – olga.strelova@pharminnotech.com, ORCID 0000-0001-6737-1023

Гребенюк Александр Николаевич (Alexander Nikolaevich Grebenyuk) – grebenyuk_an@mail.ru, ORCID 0000-0002-9381-194X

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiss J.F., Landauer M.R. History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009;85(7): 539–573.
DOI: 10.1080/09553000902985144.

2. Singh V.K., Newman V.L., Romaine P.L. et al. Radiation countermeasure agents: an update (2011–2014). *Exp. Opin. Ther. Pat.* 2014;24(11): 1229–1255. DOI: 10.1517/13543776.2014.964684.
3. Гребенюк А.Н., Гладких В.Д. Современное состояние и перспективы разработки лекарственных средств для профилактики и ранней терапии радиационных поражений. *Радиац. биология. Радиоэкология*. 2019;59(2):132–149. [Grebnyuk A.N., Gladkikh V.D. Modern Condition and Prospects for Development of Medicines for Prevention and Early Treatment of Radiation Injuries. *Radiats. Biol. Radioecol. = Radiation Biology. Radioecology*. 2019;59(2):132–149. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0869803119020085.
4. Weiss J.F., Landauer M.R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology*. 2003;189(1–2):1–20. DOI:10.1016/S0300-483X(03)00149-5.
5. Han R.-M., Tian Y.-X., Liu Y. et al. Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:3780–3785. DOI:10.1021/jf803850p.
6. Азарова О.В., Галактионова Л.П. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия // *Химия растительного сырья*. 2012. № 4. С. 61–78. [Azarova O.V., Galaktionova L.P. Flavonoids: anti-inflammatory mechanism. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of Plant Raw Materials*. 2012(4): 61–78. (In Russ.)]
7. Тарумов Р.А., Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Ковтун В.Ю. Биологические свойства фитоэстрогена генистеина. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2014(2): 55–68. [Tarumov R.A., Grebnyuk A.N., Basharin V.A., Kovtun V.Yu. Biological properties of the phytoestrogen genistein. *Medsina ekstremal'nykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*. 2014(2):55–68. (In Russ.)]
8. Ganai A.A., Farooqi H. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed. Pharmacother.* 2015;76:30–38. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.10.026.
9. Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Тарумов Р.А. и др. Оценка антиоксидантных свойств отечественного синтетического генистеина на моделях in vitro и in vivo. *Вестн. Рос. воен.-мед. академии*. 2013(2):83–87. [Grebnyuk A.N., Basharin V.A., Tarumov R.A. et al. Estimation of antioxidant properties of domestic synthetic genistein in the models in vitro and in vivo. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2013(2): 83–87. (In Russ.)]
10. Garbiec E., Cielecka-Piontek J., Kowalówka M. et al. Genistein – opportunities related to an interesting molecule of natural origin. *Molecules*. 2022;27(3):1–22. DOI: 10.3390/molecules27030815.
11. Davis T.A., Clarke T.K., Mog S.R., Landauer M.R. Subcutaneous administration of genistein prior to lethal irradiation supports multilineage, hematopoietic progenitor cell recovery and survival. *Int. J. Radiat. Biol.* 2007;83(3): 141–151. DOI: 10.1080/09553000601132642.
12. Landauer M.R., Srinivasan V., Seed T.M. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury. *J. Appl. Toxicol.* 2003;23(6):379–385. DOI: 10.1002/jat.904.
13. Zhou Y., Mi M.T. Genistein stimulates hematopoiesis and increases survival in irradiated mice. *J. Radiat. Res.* 2005(4)425–433. DOI: 10.1269/jrr.46.425.
14. Davis T.A., Mungunsukh O., Zins S. et al. Genistein induces radioprotection by hematopoietic stem cell quiescence. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84(9):713–726. DOI: 10.1080/09553000802317778.
15. Grace M.B., Blakely W.F., Landauer M.R. Genistein-induced alterations of radiation-responsive gene expression. *Radiat. Meas.* 2007;42(Is. 6–7):1152–1157.
16. Гребенюк А.Н., Тарумов Р.А., Башарин В.А. и др. Экспериментальная оценка влияния синтетического генистеина на гематологические показатели и цитокиновый статус облученных крыс. *Радиац. биология. Радиоэкология*. 2015; 55(2):160–168. [Grebnyuk A.N., Tarumov R.A., Basharin V.A. et al. Experimental Evaluation of Radioprotective Efficacy of Synthetic Genistein on Criteria of Glutathione System and Lipid Peroxidation in Erythrocytes of Peripheral Blood in Irradiated Rats. *Radiats. Biol. Radioecol. = Radiation Biology. Radioecology*. 2015;55(2):160–168. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0869803114060058.
17. Гребенюк А.Н., Тарумов Р.А., Башарин В.А., Ковтун В.Ю. Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности синтетического генистеина по показателям системы глутатиона и перекисного окисления липидов в эритроцитах периферической крови облученных крыс. *Радиац. биология. Радиоэкология*. 2015;55(5):501–506. [Grebnyuk A.N., Tarumov R.A., Basharin V.A., Kovtun V.Yu. Experimental Evaluation of Radioprotective Efficacy of Synthetic Genistein on Criteria of Glutathione System and Lipid Peroxidation in Erythrocytes of Peripheral Blood in Irradiated Rats. *Radiats. Biol. Radioecol. = Radiation Biology. Radioecology*. 2015;55(5):501–506. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0869803115050069.
18. Weber J.M., Constantinou A., Hessler P.E. A process of preparing genistein: Pat. WO 97/06273 C12P 17/06 A1. FERMALOGIC, INC, Chicago (US). Appl. № PCT/US96/12563. Filed 1996, Aug.7. Pub. Date 1997, Feb.20.
19. Чикунов И.Е. Генистеин: отчет о научно-исследовательской работе. Химки: НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, 2012. 22 с. [Chikunov I.E. Genistein Research Report. Himki: FMBA NPC «Farmzashhita»; 2012. 22 p. (In Russ.)].
20. Нгуен Х.К., Чупин В.В., Прохоров Д.И. и др. Создание и изучение наночастиц на основе смеси тритерпеноидов бересты и радиозащитного вещества генистеина. *Докл. Академии наук*.

- 2015;464(6):750–752. [Nguyen H.Q., Chupin V.V., Prokhorov D.I. et al. Creation and study of triterpenoid nanoparticles and radioprotective substance genistein. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015;464:338–340. doi: 10.1134/S160767291505018X]. DOI: 10.7868/S0869565215300258.
21. Стрелова О.Ю., Волкова К.В., Гребенюк А.Н., Теслов Л.С. Оценка показателей качества перспективной фармацевтической субстанции на основе синтетического генистеина. *Бутлеровские сообщения*. 2016;48(12):94–101. [Strelova O.Yu., Volkova K.V., Grebenyuk A.N., Teslov L.S. Evaluation of quality indicators of promising pharmaceutical substance based on synthetic genistein. *Butlerovskie soobshheniya (Butlerov communications)*. 2016;48(12):94–101. (In Russ.)]
22. Жигалина А.А., Дударев В.Г., Тихонова В.В., Стрелова О.Ю. Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):20–31. [Zhigalina A.A., Dudarev V.G., Tikhonova V.V., Strelova O.Yu. Development of genistein synthesis for use as a certified reference material. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):20–31. (In Russ.)]. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-20-31](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31).
23. Жигалина А.А., Стрелова О.Ю., Гребенюк А.Н. Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):202–208. [Zhigalina A.A., Strelova O.Yu., Grebenyuk A.N. Development of a method for the quantitative determination of genistein for certification of a standard sample. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(4):202–208. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-202-208>.
24. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. М.: ФЭМБ, 2023. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV edition. M.: FEMB, 2018. (In Russ.)]

Synthetic Genistein is a Potential Active Pharmaceutical Substance for the Development of Radiation Countermeasure Agents

© 2024 г. V. V. Tikhonova¹, T. V. Sotnikova¹, G. V. Erlin¹,
O. Yu. Strelova^{1, *}, A. N. Grebenyuk¹

¹St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

*e-mail: olga.strelova@pharminnotech.com

The development of dosage forms of effective radiation countermeasure agents remains an urgent task of modern radiobiology. The purpose of this study is to determine the quality indicators of domestic synthetic genistein as a potential active pharmaceutical substance for the development of radiation countermeasure agents. The material of the study was two samples of genistein synthesized at the SPC “Farmzashchita” of the FMBA of Russia and at the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia, and natural genistein isolated from soybean seed cake (*Glycine max L. Merr.*). The quality of synthetic and natural genistein was evaluated using infrared Fourier spectroscopy, nuclear magnetic resonance ^1H and ^{13}C spectroscopy, and Raman spectroscopy. It was established that according to the studied spectra, the genistein samples do not differ from each other, the structure of the molecule is confirmed, there are no additional signals in them. The method of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of titration in dimethylformamide medium, which is recommended to be included in the regulatory documentation for genistein drug substance, has been developed and validated. The method of high-performance liquid chromatography of quantitative determination of genistein for further study of biologically active additives and medicinal products based on it has been developed and tested.

Keywords: genistein, radiation countermeasure agents, radioprotector, potential active pharmaceutical substance, quality indicators, authenticity