



ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
«РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ
СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ПРИ
ЭКСПЕРТИЗЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ»

(заключительный)

Начальник лаборатории СМА
доктор химических наук Н.Е. Кузьмина



Цель: разработка методологии применения высокотехнологичных спектральных аналитических методов при осуществлении экспертизы лекарственных средств.

Основные направления исследований:

- - разработка альтернативных методик оценки показателей качества ЛС с использованием высокотехнологичных спектральных методов анализа;
- - внедрение риск-ориентированной стратегии в контроль качества ЛС на основе экспериментальных данных, полученных с помощью спектральных методов анализа.



На I этапе НИР:

- проведен сравнительный анализ материалов национальных и мировых фармакопей по использованию метода ЯМР в фармакопейном анализе;
- получены структурно интерпретированные ЯМР-спектры 62 фармацевтических субстанций из 41 фармакологической группы;
- оценена возможность применения метода БИК-спектрометрии для установления подлинности действующего вещества и его количественного содержания в лекарственных препаратах;
- спектральными методами с индуктивно связанной плазмой изучены источники контаминации ЛРС элементными примесями и степень их перехода в ЛРП для индивидуального нормирования элементных примесей в ЛРП.

На II этапе НИР

- Разработан комплексный подход к внедрению риск-ориентированной стратегии в контроль элементных примесей в ЛРП;
- методом ЯМР без использования СО подтверждена подлинность лекарственных средств, представляющих собой сложные рацематные смеси;
- получены структурно интерпретированные ЯМР-спектры 87 фармацевтических субстанций из 53 фармакологических групп.



- 1) Изучение методами спектроскопии ЯМР особенностей строения фталатов гипромелозы – компонентов кишечнорастворимых оболочек различных производителей.
- 2) Получение структурно интерпретированных ЯМР спектров соединений из «Перечня ЖНВЛП и внесение их в «Атлас спектров ЯМР лекарственных субстанций».
- 3) Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков негативного воздействия элементных примесей, поступающих в организм человека вместе с терапевтической дозой нативных продуктов на основе слоевищ ламинарии.
- 4) Разработка предложений об изменении подходов к нормированию содержания йода в слоевищах ламинарии и продуктах на их основе.
- 5) Обобщение требований отечественных и зарубежных нормативных документов к элементам с неустановленным значением предельно допустимого суточного воздействия, присутствующим или включенным в состав препаратов альбумина человека, факторов свёртывания крови и инсулина.
- 6) Разработка и усовершенствование существующих методик определения содержания цинка в инсулинах различными спектральными методами элементного анализа.



Фармакопейные требования к полимерам и сополимерам, обеспечивающим контролируемое высвобождение активного вещества в тонком кишечнике: **идентификация молекулярной массы и состава.**

- Соплимер метакриловой кислоты и этилакрилата – ММ 250 кДа, соотношение метакриловой кислоты и этилакрилата 1:1 (Ph. Eur. monograph 1128, 1129).
- Соплимер метакриловой кислоты и метилметакрилата – ММ 135 кДа, соотношение метакриловой кислоты и метилметакрилата 1:1 (Ph. Eur. monograph 1127).
- Соплимер метакриловой кислоты и метилметакрилата – ММ 135 кДа, соотношение метакриловой кислоты и метилметакрилата 1:2 (Ph. Eur. monograph 1130).
- Полимер гипромелозы – молекулярно-массовое распределение, доли метокси- и гидроксипропокси-групп (Ph. Eur. general monograph 04/2022:0348).
- Полимер гипромелозы фталат – доля фталатных групп 21 – 35% (Ph. Eur. general monograph 04/2022:0347). Молекулярная масса или молекулярно-массовое распределение не идентифицируются.

Актуально изучить влияние молекулярной массы гипромелозы фталата на растворимость этого полимера при пороговых значениях pH.



1. Разработана методика оценки молекулярной массы гипромелозы фталата методом DOSY. Результаты измерения с помощью данной методики сопоставимы с результатами измерения фармакопейным методом гель-проникающей хроматографии.
2. Разработана методика изучения профилей растворения различных образцов гипромелозы фталата методом ^1H ЯМР и предложены количественные характеристики скорости их растворения. Показано, что скорость растворения гипромелозы фталата существенно зависит от его молекулярной массы.
3. Разработаны методики определения доли фталатных групп как весового содержания в навеске гипромелозы фталата и доли фталатных групп как степени молярного замещения полимера. С их помощью установлено, что в состав оболочек анализируемых препаратов ингибиторов протонной помпы входит гипромелозы фталат различных коммерческих марок, которые начинают растворяться при различных пороговых значениях pH.
4. Установлена регрессионная зависимость скорости растворения гипромелозы фталата от его молекулярной массы и степени молярного замещения фталатными группами. Этот результат свидетельствует о необходимости введения в перечень показателей качества субстанции гипромелозы фталата показателя «молекулярная масса».



Публикация и апробация результатов исследования (задача 1)

7

➤ Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Северинова Е.Ю., Бунятян Н.Д., Евтеев В.А. Изучение методами спектроскопии ЯМР влияния молекулярной массы гипромемозы фталата на его растворимость. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023;13(3):385–393. DOI: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-541>

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Северинова Е.Ю., Евтеев В.А., Косенко В.В. Изучение методами спектроскопии ЯМР строения гипромемозы фталата – компонента кишечнорастворимых оболочек лекарственных препаратов. журнале «Ведомости НЦ ЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». 2023; 13(4) DOI: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-548>.



➤ Разработаны методики подтверждения подлинности 91 субстанции из 47 фармакологических групп методом ЯМР без использования их СО.

Фармакологические группы объектов исследования: агонисты I1-имидазолиновых рецепторов, α - и β -адреноблокаторы, α -адреномиметики, алкилирующие средств, аминогликозиды, антагонисты рецепторов ангиотензина II (AT1-подтип), антиагреганты, антиаритмические средства, антигипоксанты и антиоксиданты, H1- и H2 антигистаминные средства, антиметаболиты, антисептики и дезинфицирующие средства, витамины и витаминopodobные средства, гипогликемические синтетические и другие средства, гормоны гипоталамуса, гипофиза, гонадотропины и их антагонисты, диуретики, дофаминомиметики, другие антибиотики, другие нейротропные средства, другие противоопухолевые средства, другие синтетические антибактериальные средства, иммунодепрессанты, ингибиторы АПФ, ингибиторы протонного насоса, корректоры нарушений мозгового кровообращения, линкозамиды, местноанестезирующее средство, нейролептики, ноотропы, НПВС – производные уксусной кислоты и родственные соединения, оксазолидиноны, пенициллины, противовирусные (за исключением ВИЧ) средства, противовирусные средства, противоопухолевые средства – ингибиторы протеинкиназ, противоопухолевые средства растительного происхождения, противорвотные средства, противоэпилептические средства, психостимуляторы, средства для лечения ВИЧ-инфекции, ферменты и антиферменты, фибраты, фторхинолоны, н-холинолитики (миорелаксанты), м-, н-холиномиметики, в т.ч. антихолинэстеразные средства, цефалоспорины, эстрогены, гестагены; их гомологи и антагонисты.

➤ Разработанные методики вошли в Атлас спектров ЯМР фармацевтических субстанций.



Показатель «Структурное описание»

2021 г. (с 20.09 по 31.12) - 31 кандидат в ФСО

2022 г. - 126 кандидатов в ФСО

2023 г. - 107 кандидатов в ФСО

Выявление с помощью Атласа спектров ЯМР несоответствия СО заявленной структуре

№	Заявленное соединение	Установленное соединение
2022 г.		
1	адеметионина 1,4-бутандисульфат (ФСО USP RS)	моксифлоксацин
2	2-амино-4-бутиролактон (СО квалификации Kaiping Genuine Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd.)	ламивудин
3	ибупрофен (СО предприятия)	индапамид
4	фенозон (кандидат в ФСО)	парацетамол
2023 г.		
5	Инозин (кандидат в ФСО)	диоксотетрагидроксотетрагидро- нафталин
6	Метамизол натрия (кандидат в ФСО)	менадиона натрия бисульфит



Публикация и апробация результатов исследования (задача 2)

10

- Моисеев С.В. «Возможности современных методов спектроскопии ЯМР при аттестации кандидатов ФСО». Доклад на II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука: вызовы и решения в 21 веке», проводимой в рамках Международного бизнес-форума в сфере фармацевтики и биотехнологий (г. Санкт-Петербург, 11-13 апреля 2023 г.).
- Атлас спектров ЯМР фармацевтических субстанций планируется включить в качестве приложения в ГФ РФ XV.



Оценка рисков негативного воздействия элементных примесей, поступающих в организм человека вместе с терапевтической дозой нативных продуктов на основе

Характерная особенность слоевищ ламинарии – высокая степень поглощения тяжелых металлов из морской воды в ходе процессов биосорбции и биоаккумуляции.

ОФС 2.3.10.0. «Примеси элементов» ФEAЭC и ОФС 1.1.0040. «Элементные примеси» ГФ РФ XV не распространяются на ЛРП.

Перечень элементов, нормируемых в слоевищах ламинарии, необходимо определять на основе оценки неканцерогенных и канцерогенных рисков.

Неканцерогенный риск – показатель ожидаемого роста заболеваний населения за счет токсических свойств примесей в исследуемых объектах.

Канцерогенный риск – вероятность развития злокачественных новообразований на протяжении всей жизни человека, обусловленная воздействием канцерогена.



- Установлено, что токсичное воздействие элементных примесей Al, iAs, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, Zn при потреблении максимальной суточной терапевтической дозы слоевищ ламинарии характеризуется как допустимое и не наносящее вред организму человека.
- Установлено, что при потреблении максимальной терапевтической дозы ЛРП «Слоевища ламинарии, морская капуста» (3г) в течение 1 месяца и более содержание неорганического мышьяка, кадмия и хрома соответствует уровню предельно допустимого канцерогенного риска ($1 \cdot 10^{-6} < CR < 1 \cdot 10^{-4}$). Это уровень содержания канцерогена, который приемлем для всех категорий населения, но требует контроля над содержанием этого элемента в анализируемом объекте.



Публикация и апробация результатов исследования (задача 3)

13

- Шукин В.М., Хорольская Е.А., Кузьмина Н.Е., Ремезова И.П. Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов, присутствующих в слоевищах ламинарии. Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023;13(3):433-441. DOI: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-534>
- Шукин В.М. «Оценка рисков негативного воздействия на организм человека неорганических форм мышьяка, содержащихся в различных видах бурых водорослей». Доклад на II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука: вызовы и решения в 21 веке», проводимой в рамках Международного бизнес-форума в сфере фармацевтики и биотехнологий (г. Санкт-Петербург, 11-13 апреля 2023 г.).



Разработка предложений об изменении подходов к нормированию содержания йода в слоевищах ламинарии и продуктах на их основе (задача 4)

Нормативный документ	Семейство	Виды	Нормируемое содержание йода
ГФ РФ XIV	Laminariaceae	Laminaria saccharina (L.) Laminaria japonica (Aresch.)	Не менее 0,1%
ЕPh 11.0	Fucaceae	Fucus vesiculosus (L.) Fucus serratus (L.) Ascophyllum nodosum (Le Jolis)	0,03-0,2%
Food chemicals codex ed. 9	Laminariaceae	Macrocystis pyrifera (L.) Laminaria digitata (Hunds.) Laminaria cloustoni (Edm.) Laminaria saccharina (L.)	0,1-0,5%

Актуально оценить возможность внедрения диапазона нормирования содержания йода 0,1 – 0,5% в ФС «Ламинарии слоевища (морская капуста)» с позиции риск-ориентированной стратегии контроля качества ЛС.



- Валидированная методика (ГОСТ EN 15111-2015 Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Метод определения йода методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой) апробирована на слоевищах ламинарии. Установлено соответствие результатов измерения содержания йода в слоевищах ламинарии методом ИСП-МС и фармакопейным методом сжигания в колбе с кислородом.
- Определено, что реальное содержание йода в слоевищах фармакопейных видов ламинарии - *Laminaria saccharina* и *Laminaria japonica* соответствует диапазону нормирования, предложенному FDA для ламинариевых водорослей (0,1 до 0,5 %).
- Установлено, что при максимальной терапевтической дозе и максимальном курсе приема ЛРП «Ламинарии слоевища. Морская капуста» риск негативного воздействия йода на организм человека характеризуется как «допустимый» при условии, что содержание йода в слоевищах ламинарии не превышает 0,5%.
- Установлено, что при максимальной терапевтической дозе и максимальном курсе приема препаратов для лечения мастопатии «Маммоклам»/«Маммолайн» при содержании йода в слоевищах ламинарии 0,5% риск негативного воздействия йода становится недопустимым. Рекомендуемая мера по обеспечению безопасности - сократить максимальную частоту приема препарата до 140 дней в году.



- Шукин В.М., Хорольская Е.А., Кузьмина Н.Е., Ремезова И.П., Косенко В.В. Особенности элементного состава ламинарии слоевищ (*Laminariae thalli*) различного происхождения (обзор). Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023. - Т.13(2). - С. 155-172. DOI: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-527>.
- Shchukin V., Khorolskaya E., Kuz'mina N. Risk assessment of the negative impact on human health of elemental contaminants in brown algae (*laminariaceae*) and products based on them. Reliability: Theory & Applications, 18 (SI 5 (75)), 663-669. DOI: <https://doi.org/10.24412/1932-2321-2023-575-663-669>.
- Шукин В.М., Хорольская Е.А., Кузьмина Н.Е., Ремезова И.П., Изменение подходов к нормированию содержания йода в слоевищах ламинарии и продуктах на их основе. Фармация и фармакология (прошла стадию рецензирования).
- Шукин В.М. Оценка рисков негативного воздействия на здоровье человека элементных контаминантов в бурых водорослях семейства Ламинариевые и продуктах на их основе. Доклад на V Евразийской конференции «Инновации в минимизации природных и техногенных рисков» (Баку, 17-19 октября 2023 г.).



Формирование элементов с неустановленным значением PDE в препаратах альбумина человека, факторов свёртывания крови и инсулина (задача 5)

Референтная доза (RfD) – мера допустимого суточного воздействия химического вещества в течение всей жизни, которое не приводит к возникновению неприемлемого риска для здоровья чувствительных групп населения

Предельно допустимое суточное воздействие (PDE) – доза химического вещества, которая не вызовет негативных последствий, если человек подвергается воздействию этой дозы ежедневно в течение всей жизни.

ОФС 1.1.0040 «Элементные примеси» ГФ РФ XV: «При оценке риска элементных примесей, для которых PDE не установлен, но которые могут содержаться и/или **преднамеренно включаться в лекарственный препарат**, необходимо руководствоваться требованиями относительно допустимого содержания таких элементов и соответствующими методами их определения, указанными в соответствующих нормативных документах».

Актуально на основе обобщения требований нормативных документов производителей препаратов альбумина человека, факторов свёртывания крови и инсулина к допустимому содержанию элементов с неустановленными значениями PDE оценить неканцерогенные риски их негативного воздействия на организм человека.



- В результате обобщения требований НД отечественных и зарубежных производителей препаратов альбумина человека, факторов свёртывания крови и инсулина были уточнены присутствующие в их составе в качестве примесей или вспомогательных веществ элементы с неустановленными значениями PDE. Это K, Na, Al (препараты альбумина человека), Ca, Na, Al (препараты факторов свёртывания крови человека), Zn (инсулины).
- Элемент Al обладает сходной с тяжёлыми металлами биохимической моделью токсичности и относится к категории токсичных в рамках классификации элементов на эссенциальные, условно эссенциальные, условно токсичные и токсичные. Примесь данного элемента подлежит обязательному нормированию при использовании его в технологическом процессе.
- Элементы K, Na, Zn являются вспомогательными веществами и отклонение их содержания от нормы вызывает риск ухудшения качества препаратов.
- Для Al и Zn с известными значениями RfD рассчитаны коэффициенты опасности.
- Установлено, что воздействие Al и Zn на здоровье человека при условии, что их содержание в препаратах альбумина, свертывания крови и инсулина не превышает установленные в НД производителей нормы, характеризуется как допустимое и не создает риска развития неканцерогенных эффектов.
- Показано, что использование фармакопейного метода атомно-эмиссионной спектроскопии для определения Al в альбуминах ведет к риску получения ложно-отрицательных результатов.



➤ Хорольская Е.А., Жигилей Е.С., Швецова Ю.Н., Кузьмина Н.Е. Риск-ориентированный подход к оценке содержания элементов с неустановленным значением предельно допустимого суточного воздействия в препаратах биологического происхождения. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств (статья на стадии рецензирования).



Разработка и усовершенствование существующих методик определения содержания цинка в инсулинах различными спектральными методами элементного анализа (задача 6)

20

Актуальность исследования:

- дефектура сверхчистых реактивов категории «для элементного анализа» и необходимость очистки реактивов с уровнем содержания примесей ppm до уровня ppb;
- необходимость разработки альтернативных методик с использованием высокотехнологичных инструментальных методов, обеспечивающих экспрессность и селективность элементного анализа при проведении экспертизы качества ЛС в РФ.



- Модифицирована и валидирована методика определения цинка в инсулине методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией. Модификация заключалась в замене соляной кислоты (плохо очищается от примесей и является прекурсором наркотических веществ) на азотную кислоту (хорошо очищается от примесей и не является прекурсором наркотических веществ).
- Разработана и валидирована методика определения содержания Zn в инсулине методом ИСП-МС, который характеризуется максимальными чувствительностью, широтой динамического диапазона и наиболее низкой границей определяемых концентраций по сравнению с другими фармакопейными методами элементного анализа.
- Валидационные параметры этих методик удовлетворяют фармакопейным требованиям к валидации аналитических методик с использованием спектральных методов элементного анализа.



- Ерина А.А., Шукин В.М., Хорольская Е.А., Кузьмина Н.Е. Модификация методики определения содержания цинка в инсулинах методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023;13(3):403-410. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-403-410> ;
- Швецова Ю.Н., Ерина А.А., Хорольская Е.А., Жигилей Е.С., Кузьмина Н.Е. Определение содержания цинка в инсулинах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023;13(3):394-402. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-394-402>.



Наукометрический показатель	Запланировано	Выполнено
Публикации в научных журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science	7	11
Публикации в научных журналах, входящих в РИНЦ	9	26
Доклады на международных научных (научно-практических) конференциях в России и за рубежом	3	5
Заявки на регистрацию объектов интеллектуальной собственности	3	2 патента; 1 заявка
Диссертации	1	2



Выполнение План-графика НИР по научно-технической продукции за 2021 – 2023 гг.

24

Запланированная НТП	Результат
Усовершенствованная методика селективного определения органических и неорганических форм As в ЛРП	Разработанная и запатентованная методика количественного определения органических и неорганических форм мышьяка в слоевищах ламинарии и продуктах их переработки методами твердофазной экстракции и ИСП-МС
Разработанная методика определения содержания цинка в инсулинах спектральным методом с индуктивно связанной плазмой	Разработанная и валидированная методика определения содержания цинка в инсулинах методом ИСП-МС
Не запланировано	Модифицированная и валидированная методика определения цинка в инсулине методом ААС
Не запланировано	Разработанная и валидированная методика определения в семенах тыквы содержания V, Cd, С, As, Ni, Hg, Pb, Cr методом ИСП-МС
Методические рекомендации и обучающая лекция по разработке и валидации методик определения ТМ и As в ЛРС и ЛРП спектральными методами с ИСП-МС	Методические рекомендации утверждены и введены в действие приказом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 397 от 19.11.2021г. Обучающая лекция утверждена генеральным директором ФГБУ «НЦЭСМП» 24.11.2021 г.



Выполнение План-графика НИР по научно-технической продукции за 2021 – 2023 гг.

25

Запланированная НТП	Результат
Разработанные методики оценки показателей качества ЛС методами ЯМР	<ul style="list-style-type: none">➤ Разработанная, валидированная и запатентованная методика идентификации и количественного определения примеси А в габапентине методом ^1H ЯМР➤ Разработанная и запатентованная методика идентификации и определения диастереомерного состава в лекарственных формах будесонида.➤ Разработанная методика по идентификации и определению количественного содержания гентамицинов, входящих в состав фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат».➤ Разработанная методика оценки молекулярной массы гипромеллозы фталата методом DOSY.➤ Разработанная методика определения методом ^{13}C ЯМР весового содержания фталатных групп в гипромеллозы фталате.➤ Разработанная методика определения методом ^{13}C ЯМР степени молярного замещения фталатными группами в гипромеллозы фталате .➤ Разработанные методики подтверждения подлинности действующих веществ 240 фармацевтических субстанций из «Перечня ЖНВЛП» 89 фармакологических групп.
Атлас спектров ЯМР фарм. субстанций	Подготовлен к включению в качестве приложения к ГФ РФ XV.



Благодарю
За внимание!