

Методические особенности определения молекулярно-массового распределения декстранов методом гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии в нормативной документации на лекарственные средства различных групп

Р. С. Смирнов, Е. В. Иванайнен, А. И. Лутцева, О. А. Ваганова, Д. А. Орлов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 07.10.2016 г. Принята к печати 01.03.2017 г.

Резюме: Проведен анализ результатов экспертизы качества фармацевтических субстанций декстранов и лекарственных средств на их основе, выполняемой экспертным учреждением в рамках государственной регистрации, по показателю «Молекулярно-массовое распределение». Сформулированы основные рекомендации по изложению в соответствующем разделе нормативной документации методик определения молекулярно-массового распределения декстранов с использованием метода гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии с учетом особенностей исследуемых объектов и метода анализа, а также интерпретации получаемых результатов. Предложено особое внимание уделять вопросам, связанным с построением калибровочной зависимости (выбор стандартных образцов, выбор типа аппроксимации экспериментальной кривой) и проверкой ее пригодности. По результатам валидации/верификации (апробации) методик определения молекулярно-массового распределения декстранов в рамках регистрации лекарственных средств различных групп конкретизирован перечень материалов, необходимых для представления в экспертное учреждение.

Ключевые слова: декстраны; молекулярная масса; молекулярно-массовое распределение; эксклюзионная хроматография; экспертиза качества; регистрация лекарственных средств; нормативная документация.

Библиографическое описание: Смирнов РС, Иванайнен ЕВ, Лутцева АИ, Ваганова ОА, Орлов ДА. Методические особенности определения молекулярно-массового распределения декстранов методом гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии в нормативной документации на лекарственные средства различных групп. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(1): 3–8.

Молекулярная масса является одной из важнейших характеристик биополимеров полипептидной и полисахаридной природы. От ее значения зависят биологическая активность, клиническая эффективность и безопасность лекарственных средств (ЛС), поэтому к показателям, связанным с оценкой молекулярной массы и ее распределением, предъявляются жесткие требования [1].

В ЛС (фармацевтических субстанциях и лекарственных формах) полипептидной природы распределение по молекулярной массе оценивается косвенным методом, как правило, по наличию примесей с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу основного соединения, и относится к показателям, характеризующим чистоту ЛС. В лекарственных средствах полисахаридной природы, таких как гепарины, декстраны, гидроксипропилированные крахмалы, показатель «Молекулярно-массовое распределение» является неотъемлемой характеристикой подлинности и качества самого действующего вещества [1, 2].

Наиболее значимыми массовыми характеристиками полимера являются [3, 4]:

- среднечисловая молекулярная масса M_n , представляющая собой отношение массы полимера к числу молекул в данном образце;

- средневесовая молекулярная масса M_w — среднее из массовых долей молекул каждой молекулярной массы от их общей массы. Именно эта массовая характеристика определяется при оценке молеку-

лярно-массового распределения (ММР) декстранов и других полисахаридов.

Молекулярную массу и ее распределение можно определять различными методами, например, осмометрией, вискозиметрией, ультрацентрифугированием, масс-спектрометрией, светорассеянием и т.д. [1, 5, 6]. Приоритетным методом в настоящее время является гель-проникающая (эксклюзионная) хроматография в сочетании с рефрактометрическим детектированием [1, 4–6]. Принцип метода заключается в том, что молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из хроматографической колонки элюируются наиболее крупные молекулы (большей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, последними — вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры [4]. В отличие от адсорбционной хроматографии, при гель-фильтрации неподвижная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует. В качестве неподвижных фаз в гель-фильтрации используются сорбенты на основе поперечно-сшитой агарозы, декстрана, гидроксипропилированного силикагеля, полимеров, таких как полиметакрилат или стирол-дивинилбензол [3–5, 7].

К сожалению, эксклюзионную хроматографию нельзя считать абсолютно точным методом. Это обусловлено тем, что времена удерживания (или объемы элюирования) анализируемых полимеров не характеризуются прямой зависимостью от их молекулярных

масс и зависят от условий измерений (типа полимера, неподвижной и подвижной фаз и т.д.). Фактически разделение обеспечивается за счет разного гидродинамического объема молекул образца, т.е. разного размера молекул, имеющих определенную связь с массой. Поэтому необходима предварительная калибровка хроматографической системы, выполненная в условиях анализа исследуемого образца [1, 3–5].

Существует несколько способов калибровки хроматографической системы, которые зависят от природы и индекса полидисперсности (показателя, характеризующего ширину распределения по молекулярным массам и представляющего собой отношение M_w/M_n) и используемых стандартных образцов [1, 3, 4]. При этом на практике чаще применяется калибровка по узкодисперсным стандартам [5]. Такой подход применим в том случае, когда природа стандартного образца аналогична исследуемому образцу и индекс его полидисперсности не превышает 2. При данном подходе наиболее целесообразно использовать зависимость объема (или времени) удерживания от значения молекулярной массы в точке вершины пика (M_p), поскольку именно это значение можно безошибочно оценить на хроматограмме [4, 5].

Любая калибровочная зависимость описывается уравнением регрессии. В молекулярно-массовом распределении линейная зависимость времени удерживания от молекулярной массы выполняется только в узком диапазоне молекулярных масс, поэтому для описания калибровки наиболее применимо использование полиномиальной зависимости [4, 5, 8]. Отсутствие линейной зависимости и необходимость применения довольно сложного математического аппарата для обработки результатов делает методику определения ММР одной из самых сложных хроматографических методик контроля качества ЛС.

К сожалению, в настоящее время в русскоязычной литературе, в том числе в Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания, отсутствуют какие-либо указания и требования, касающиеся методик определения ММР методом эксклюзионной хроматографии. Изложение таких методик в нормативной документации (НД) в целом мало отличается от других хроматографических методик, однако имеет свою специфику и нюансы, которым заявитель при разработке и валидации методики определения ММР, а также при включении соответствующего раздела в НД, зачастую не уделяет должного внимания. Пояснение этих нюансов, а также формулирование основных рекомендаций и требований к изложению методик определения ММР в НД, таким образом, являются актуальными задачами.

Целью настоящей работы является формулирование общих рекомендаций и требований к изложению раздела «Молекулярно-массовое распределение» в НД, а также подробное рассмотрение особенностей, характерных для определения ММР декстранов, базирующееся на многолетнем опыте экспертизы качества фармацевтических субстанций декстранов и ЛС на их основе в экспертном учреждении. Декстраны по сравнению, например, с гидроксипропилахридами являются одними из наиболее простых объектов для расчета ММР, так как представляют собой гомогенный полисахарид с невысокой степенью ветвления [2, 8]. Методики определения ММР, которые в настоящее время, как правило, включаются в НД на отечественные и зарубежные ЛС на основе декстранов, являются в той или иной степени вариациями

монографии Европейской фармакопеи (ЕФ) 2.2.39 «Молекулярно-массовое распределение декстранов» (Molecular mass distribution index trans) [9]. Нормы по этому показателю для декстранов и препаратов на их основе в НД совпадают с нормами, приведенными в ЕФ. Тем не менее, раздел «Молекулярно-массовое распределение» в нормативной документации вызывает наибольшее количество вопросов при воспроизведении методик испытаний в процессе экспертизы качества.

Раздел «Молекулярно-массовое распределение» должен содержать следующие основные пункты:

- описание используемого хроматографического оборудования с указанием типа детектора и используемого программного обеспечения;
- коммерческое наименование колонки или колонок с указанием их размеров и каталожных номеров. При одновременном использовании нескольких хроматографических колонок следует указывать последовательность, в которой они должны быть соединены. Возможность использования аналогичных колонок должна быть подтверждена валидационными данными;
- состав и методику приготовления подвижной фазы;
- условия хроматографирования, включающие скорость подвижной фазы, температуру колонки, объем вводимой пробы. Данные параметры в НД должны быть указаны в виде конкретных значений, подтвержденных данными по валидации/верификации методики. Не допускается их указание в виде ориентировочных интервалов, как, например, это предусмотрено в монографии ЕФ 2.2.39 в качестве рекомендуемых параметров;
- описание и массовые характеристики используемых стандартных образцов (с указанием их каталожных номеров и производителя);
- методики приготовления растворов стандартных и испытуемых образцов;
- параметры пригодности хроматографической системы;
- описание процедуры построения калибровочной зависимости с указанием массовой характеристики стандартного образца, по которой производится калибровка, и типа используемой аппроксимации полученной эмпирической зависимости;
- параметры пригодности калибровки;
- краткое описание процедуры расчета молекулярно-массового распределения в испытуемом образце.

Остановимся более детально на отдельных пунктах раздела.

Следует отметить, что в отличие от традиционных методик, в основе которых лежит метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, необходимо обязательно указывать наименование и версию программного обеспечения (ПО), используемого для расчета ММР. В зависимости от производителя, ПО имеет разные подходы и набор опций для построения и оптимизации калибровки, что сказывается на возможности адекватного воспроизведения методики при контроле.

При выборе колонок важными критериями являются тип сорбента и диапазон эксклюзии. Исходя из опыта экспертов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, для анализа декстранов, с точки зрения точностных характеристик получаемых градуировочных зависимостей, лучше подходят колонки с сорбентами

на полимерной основе, хотя в литературе описан положительный опыт использования сорбентов на основе гидроксированного силикагеля [10, 11].

Колонки подбираются таким образом, чтобы определяемая масса гарантированно попадала в диапазон эксклюзии колонки (желательно определенный по декстрану), который обычно указан в технической документации производителя. В любом случае, пригодность колонки можно оценить только на практике. Примером неудачного выбора колонки, которая в теории по всем параметрам должна подходить для определения ММР декстранов, и, более того, указана в Knowledge Database Европейской фармакопеи к соответствующей монографии [12], является колонка Superose 6 (производитель «GE Healthcare») с сорбентом на основе поперечно-сшитой агарозы [4]. На хроматограммах калибровочных стандартов декстранов с высокой массой (150–270 кДа), полученных на этой колонке, наблюдался дополнительный пик неизвестной природы, мешающий определению. Подобный эффект нельзя назвать случайным, так как он регулярно наблюдается на колонках указанной марки разных производственных серий.

При выборе стандартных образцов основное внимание необходимо обращать на их количество и набор молекулярных масс, которые должны перекрывать весь диапазон определяемых масс декстрана, включая низко- и высокомолекулярные фракции. Расширение калибровочного диапазона сверх необходимого, особенно в большую сторону, обычно снижает точность калибровки и анализа в целом. В то же время, чем больше стандартных образцов участвует в построении калибровки в заданном диапазоне, тем она точнее, тем больше степеней свободы имеется для последующей ее оптимизации. На сегодняшний день на рынке имеется достаточное количество хорошо охарактеризованных калибровочных стандартов декстранов. Так, ЕФ предлагает 5 стандартных образцов в диапазоне от 4 до 250 кДа [13]. Этот диапазон достаточен для оценки ММР как декстрана 40, так и декстрана 60. В то же время компания «Pharmacosmos», один из ведущих производителей стандартных образцов декстранов, выпускает 10 стандартов, 7 из которых (от 5 до 270 кДа) соответствуют диапазону стандартных образцов ЕФ [14].

Проверка пригодности хроматографической системы при определении ММР декстранов обычно осуществляется по пику одного из низкомолекулярных соединений, например, глюкозы, и включает в себя определение фактора асимметрии, эффективности, относительного стандартного отклонения времени удерживания и площади пика [9–11]. Время удерживания пика при определении ММР является наиболее значимым критерием по сравнению с площадью пика.

В описании процедуры калибровки по стандартным образцам следует указать, какие параметры используются для построения зависимости по осям абсцисс и ординат. По оси абсцисс принято откладывать время удерживания, объем удерживания или коэффициент распределения (K , как это предложено в монографии ЕФ), по оси ординат — значение массы в пике (M_p), значение средневесовой молекулярной массы (M_w) или их логарифмов. При использовании ПО обычно строят зависимость времени или объема удерживания от значения массы в вершине пика (M_p) или ее логарифма. Использование значений M_w

требует итерационной подгонки калибровочного графика.

Дополнительно необходимо указывать тип аппроксимации калибровочной кривой. Согласно ЕФ, калибровочная кривая должна описываться уравнением вида $M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)}$ с возможностью оптимизации посредством итерационных процедур Гаусса–Ньютона [9]. Современное ПО для расчета ММР обычно использует аппроксимацию полиномом 3-й степени, что является упрощенной версией 5-параметрического уравнения, указанного в ЕФ. В то же время ПО ведущих производителей позволяет использовать для аппроксимации полиномы 4-й или 5-й степени [5, 10, 11, 15], что при использовании конкретной методики может обеспечить получение более объективных результатов.

Процедура проверки пригодности калибровки должна быть неотъемлемой частью раздела «Молекулярно-массовое распределение», включенного в НД на ЛС. Как правило, именно эта часть раздела является «камнем преткновения» при экспертизе качества ЛС.

Трудности при воспроизведении методик определения ММР, представленных в НД, возникают в трех типовых случаях.

Первый случай — когда заявитель предоставляет аутентичный перевод методики Европейской фармакопеи при отсутствии данных, подтверждающих ее успешный трансфер (передачу).

Второй — когда заявитель приводит собственную методику испытаний, используя для расчета ММР специальные опции программного обеспечения, которыми снабжено его хроматографическое оборудование, при этом в нормативный документ включают требования пригодности хроматографической системы и калибровки, взятые из монографии 2.2.39 ЕФ.

Третий — когда приводится собственная методика, в которой вовсе отсутствуют какие-либо критерии пригодности калибровки и хроматографической системы в целом.

По поводу монографии 2.2.39 ЕФ следует заметить, что она существует в неизменном виде по меньшей мере с 90-х годов прошлого века, поэтому на сегодняшний день некоторые процедуры, изложенные в ней, например, построение калибровки на полулогарифмической бумаге вручную, морально устарели в силу недостаточной точности и субъективности. Однако, общие принципы, изложенные в монографии, актуальны до сих пор. Поскольку трансфер данной методики, несмотря на, казалось бы, детальное описание, является нетривиальной задачей, наличие в НД ссылки на монографию 2.2.39 ЕФ не избавляет производителя ЛС от необходимости проведения верификации указанной методики на своем оборудовании применительно к производимому ЛС с последующим предоставлением подробного отчета о проведенной верификации.

В монографии ЕФ 2.2.39 «Молекулярно-массовое распределение декстранов» оценка пригодности калибровки реализуется в виде: 1) проверки отклонения полученных по калибровке значений молекулярной массы калибровочных стандартов декстрана и глюкозы от паспортных значений; 2) оценки соответствия стандарта «Декстрана для проверки пригодности хроматографической системы» («Dextran for performance test») заявленным диапазонам среднего значения молекулярной массы, а также средних зна-

чений молекулярной массы высоко- и низкомолекулярных фракций, каждая из которых соответствует 10 % площади пика [9].

Чаще всего для расчета ММР в программном обеспечении используется полином 3-й степени без возможности итерационной оптимизации. Как показала практика, достичь значения отклонения менее 5 % в этом случае крайне проблематично, особенно для калибровочных декстранов с высокой молекулярной массой. По этой причине в ходе экспертизы качества ЛС просто невозможно воспроизвести требования пригодности калибровки, предложенные в НД, если эти требования были заимствованы из монографии 2.2.39 ЕФ. Это не значит, что такое ПО и такие методики не могут быть использованы и включены в НД. Параметры, предлагаемые для включения в нормативный документ, должны быть скорректированы в допустимых пределах с учетом используемого варианта расчета, в том числе и в сторону их «смягчения» по сравнению с таковыми в монографии 2.2.39 ЕФ. При этом требования, предъявляемые к величине отклонения массы (выраженной в процентах) калибровочных стандартов от номинала, не должны противоречить нормируемому диапазону молекулярной массы декстрана в препарате и должны быть валидированы.

Правильность определения молекулярной массы стандартного образца «Декстрана для проверки пригодности хроматографической системы» является не менее значимым критерием пригодности калибровки. Цель этой проверки — оценить правильность расчета не только средневесовой молекулярной массы, но и молекулярных масс низко- и высокомолекулярных фракций. Декстран, по которому осуществляется такая проверка, должен быть надежно охарактеризован по вышеуказанным параметрам. Наиболее часто для этой цели используются стандарты, указанные в монографиях на декстран 40, декстран 60 или декстран 70 ЕФ и Фармакопеи США [10, 11].

В заключение необходимо еще раз обратить внимание на то, что любая методика определения молекулярно-массового распределения декстранов должна быть валидирована или верифицирована (в том случае, если в нормативном документе стоит ссылка на монографию 2.2.39 ЕФ), а валидационные данные должны содержать максимально полную информацию об оборудовании, версии ПО, серийных номерах колонок, использованных при валидации методики, а также всю первичную информацию, включающую:

- рисунки хроматограмм всех растворов, предусмотренных методикой испытаний;
- рисунки фактически полученных калибровочных кривых вместе с первичными данными, на основании которых они были построены. Должны быть указаны объемы (времена) удерживания всех калибровочных стандартов и соответствующие им массы;
- уравнение фактической калибровочной кривой, удовлетворяющее требованиям пригодности калибровки, предложенным в проекте НД;
- отчеты ПО с результатами расчета ММР испытуемого декстрана;
- в разделе «Правильность» валидационного отчета должны быть приведены фактические данные по открываемости M_w каждого калибровочного стандарта, с указанием рассчитанного по калибровочной кривой значения M_w и его отклонения от паспортного значения, а также аналогичные данные по ММР

«декстрана для проверки пригодности хроматографической системы».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение многолетнего опыта фармэкспертизы декстранов и лекарственных средств на их основе в экспертном учреждении позволило сформулировать основные рекомендации и требования к изложению раздела «Молекулярно-массовое распределение» в нормативной документации, которые могут быть использованы и для других биополимеров при определении ММР с использованием метода гель-проникающей (эксклюзионной) хроматографии. Подробно рассмотрены ключевые аспекты определения ММР декстранов методом эксклюзионной хроматографии, такие как выбор хроматографических колонок, выбор стандартных образцов для построения градуировки и др. Особое внимание уделено вопросам адекватного выбора программного обеспечения для построения градуировочной зависимости и расчета ММР, а также вопросам проверки пригодности получаемых градуировочных кривых. Критически рассмотрена монография ЕФ 2.2.39 «Молекулярно-массовое распределение декстранов», которая чаще всего является основой для оригинальных методик определения ММР декстранов, предлагаемых заявителями. Отмечена актуальность изложенных в ней подходов к определению ММР декстранов, остающаяся по сей день. Кроме того, рассмотрены типичные ошибки заявителей при разработке оригинальных методик определения ММР декстранов на основе методики монографии 2.2.39 ЕФ, связанные в основном с построением градуировочной зависимости и оценкой ее пригодности. В заключение конкретизирован перечень материалов по валидации (верификации) методики определения ММР декстранов методом эксклюзионной хроматографии, необходимых для представления в экспертное учреждение для полной и объективной оценки предлагаемой методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Набиуллина МР. Метод эксклюзионной хроматографии и электрофореза для определения характеристик молекулярно-массового распределения препаратов на основе биополимеров. Разработка и регистрация лекарственных средств 2015; 1(10): 106–111.
2. Nilsson G, Nilsson K. Molecular-weight distribution determination of clinical dextran by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A* 1974; 101(1): 137–53.
3. Striegel AM. Size-Exclusion Chromatography. In: Fanali S, Haddad PR, Schoenmakers P, Lloyd D, eds. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier; 2013. P. 193–223.
4. Size exclusion chromatography. Principles and methods. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2014. Available from: <https://goo.gl/SotlbX>.
5. Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2nd ed. Wiley; 2009.
6. Набиуллина МР, Белов АБ. Гель-фильтрационная хроматография (ГПХ) в фармацевтическом анализе. Разработка и регистрация лекарственных средств 2014; 4(9): 126–30.
7. Рудаков ОБ, Востров ИА, Федосов СВ, Филлипов АА, Селемев ВФ, Приданцев АА. *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*. Воронеж: Водолей; 2004.
8. De Belder AN. *Dextran. Handbook*. Uppsala: Amersham Biosciences AB; 2003. Available from: <https://goo.gl/ohBjPy>.
9. Европейская фармакопея. 8-е издание (на русском языке). Т. 1. М.: Ремедиум; 2015. Глава 2.2.39. Молекулярно-массовое рас-

- пределение декстранов (2.2.39. Molecular mass distribution in dextrans).
10. Леонтьев ДА, Гризодуб АИ, Подпружников ЮВ, Иванов ЛВ. Фармакопейные аспекты методики определения молекулярно-массового распределения в субстанции декстран 40 и готовом лекарственном препарате «Реополиглюкин». Фармаком 2004; (1): 1–20.
 11. Варченко В, Дидух И, Герасимчук Т, Козлов А, Коробов А, Левин М. Некоторые особенности определения параметров молекулярно-массового распределения декстранов по Европейской Фармакопее. Вісник фармакології і фармації 2003; (11): 45–9.
 12. EDQM Knowledge Database. Molecular mass distribution in dextrans (2.2.39). Available from: <https://goo.gl/jeDScw>.
 13. Dextran for calibration. EDQM reference standards catalogue. Available from: <https://goo.gl/1es6FP>.
 14. Pharmocosmos dextran standards (GPC standard kit). Available from: <https://goo.gl/GQiA4v>.
 15. Installing and understanding your GPC data analysis software. Agilent GPC data analysis software for Agilent ChemStation. Agilent Technologies, Inc.; 2006. Available from: <https://goo.gl/pINlcR>.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
Смирнов Роман Сергеевич. Ведущий эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.
Иванайнен Елена Викторовна. Главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
Лутцева Анна Ивановна. Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.
Ваганова Ольга Александровна. Начальник лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.
Орлов Дмитрий Александрович. Главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Смирнов Роман Сергеевич; SmirnovRS@expmed.ru

METHODOLOGICAL ASPECTS OF DETERMINING MOLECULAR MASS DISTRIBUTION OF DEXTRANS BY SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR VARIOUS GROUPS OF MEDICINES

R. S. Smirnov, E. V. Ivanainen, A. I. Lutseva, O. A. Vaganova, D. A. Orlov

Federal State Budgetary Institution
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: The article analyses the results of quality evaluation of dextran substances and medicines produced thereof which was carried out by the Institution as part of pre-authorisation testing and involved the analysis of the «molecular mass distribution» parameter. The article gives recommendations on how to present data on determination of dextran molecular mass distribution by size-exclusion chromatography in corresponding sections of product specifications with due consideration for specificity of the tested products and methods of their analysis, as well as on how to interpret the obtained results. It is suggested that particular attention should be paid to the creation of a calibration curve (choice of reference standards, type of experimental curve approximation) and testing of its suitability. The validation/verification (practical testing) of procedures used for determination of dextran molecular mass distribution which was carried out as part of pre-authorisation testing, made it possible to compile a list of documents that have to be submitted to the Institution for evaluation.

Keywords: dextrans; molecular mass; molecular-mass distribution; size-exclusion chromatography; quality evaluation; marketing authorization.

For citation: Smirnov RS, Ivanainen EV, Lutseva AI, Vaganova OA, Orlov DA. Methodological aspects of determining molecular mass distribution of dextrans by size-exclusion chromatography for various groups of medicines. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(1): 3–8.

REFERENCES

1. Nabiullina MR. Method of size-exclusion chromatography and electrophoresis for characterization of the molecular weight distribution of products on the basis of biopolymers. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2015; 1(10): 106–11 (in Russian).
2. Nilsson G, Nilsson K. Molecular-weight distribution determination of clinical dextran by gel permeation chromatography. Journal of Chromatography A 1974; 101(1): 137–53.
3. Striegel AM. Size-Exclusion Chromatography. In: Fanali S, Haddad PR, Schoenmakers P, Lloyd D, eds. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. Elsevier; 2013. P. 193–223.
4. Size exclusion chromatography. Principles and methods. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2014. Available from: <https://goo.gl/SotlbX>.
5. Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography. 2nd ed. Wiley; 2009.
6. Nabiullina MR, Belov AB. Gel filtration chromatography (GPC) in the pharmaceutical analysis. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2014; 4(9): 126–30 (in Russian).
7. Rudakov OB, Vostrov IA, Fedosov SV, Fillipov AA, Selemenev VF, Pridantsev AA. Satellite of chromatographist. Liquid chromatography methods. Voronezh: Vodoley; 2004 (in Russian).
8. De Belder AN. Dextran. Handbook. Uppsala: Amersham Biosciences AB; 2003. Available from: <https://goo.gl/ohBjPy>.
9. European Pharmacopoeia. 8th ed. V. 1. Moscow: Remedium; 2015. Chapter 2.2.39. Molecular mass distribution in dextrans (in Russian).
10. Leontiev DA, Grizodub AI, Podpruzhnikov YuV, Ivanov LV. Pharmacopoeial aspects of the methodology for determining the molecular

- weight distribution in the substance of dextran 40 and finished product «Rheopolyglukin». *Farmakom* 2004; (1): 1–20 (in Russian).
11. Varchenko V, Didukh I, Gerasimchuk T, Kozlov A, Korobov A, Levin M. Some features of determining the parameters of the molecular weight distribution of dextrans on the European Pharmacopoeia. *Visnik farmakologii i farmatsii* 2003; (1 1): 45–9 (in Russian).
 12. EDQM Knowledge Database. Molecular mass distribution in dextrans (2.2.39). Available from: <https://goo.gl/jeDScw>.
 13. Dextran for calibration. EDQM reference standards catalogue. Available from: <https://goo.gl/1es6FP>.
 14. Pharmocosmos dextran standards (GPC standard kit). Available from: <https://goo.gl/GQiA4v>.
 15. Installing and understanding your GPC data analysis software. Agilent GPC data analysis software for Agilent ChemStation. Agilent Technologies, Inc.; 2006. Available from: <https://goo.gl/plNlcR>.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Smirnov RS. Leading expert of the Laboratory of Biotechnological Products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences.

Ivanainen EV. Chief expert of the Laboratory of Biotechnological Products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Lutseva AI. Deputy head of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Vaganova OA. Head of the Laboratory of Biotechnological Products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Orlov DA. Chief expert of the Laboratory of Biotechnological Products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.