

Использование метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе

С. В. Моисеев, В. И. Крылов, Н. Е. Кузьмина, В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

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

Статья поступила 18.01.2016 г. Принята к печати 08.06.2016 г.

Резюме: Показана возможность применения метода спектроскопии мультіядерного магнитного резонанса для комплексного, экспрессного и надежного определения основных показателей качества лекарственных субстанций при проведении фармакопейного анализа.

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия; фармакопейный анализ; структурная интерпретация ЯМР-спектров; подлинность лекарственных субстанций; количественное определение; молекулярно-массовое распределение; молярное замещение.

Библиографическое описание: Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кузьмина НЕ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Использование метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (2): 53–57.

Одним из основных направлений совершенствования методологии фармацевтической экспертизы лекарственных субстанций (ЛС) в нашей стране является разработка и внедрение новых аналитических методов контроля качества ЛС, основанных на современных технологиях. Предпочтение отдается прямым неdestructивным методам анализа, отвечающим требованиям информативности, экспрессности и достоверности, которые позволяют исследовать химические превращения и устанавливать структуры побочных и промежуточных продуктов на всех стадиях аналитического контроля. Более других таким требованиям соответствует метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Использование метода ЯМР для решения аналитических задач началось в начале 50-х годов прошлого века с разработкой концепции химического сдвига и спин-спинового взаимодействия. В настоящее время данный метод описан в Государственной фармакопее XII издания (ГФ XII) [1] и ведущих фармакопеях мира (Европейской, США, Японии [2–4]), где он рекомендован для установления подлинности ряда лекарственных субстанций (например, тобрамицина, бузерелина, гозерелина, низкомолекулярного гепарина, орфенадрина цитрата, эноксапарина натрия и др.). Для определения других показателей качества ЛС (идентификация примесей и остаточных органических растворителей, количественное определение, исследование стабильности) по-прежнему применяют традиционные физико-химические методы анализа, в первую очередь различные варианты хроматографии (ГЖХ, ВЭЖХ, тонкослойная хроматография), а также ИК-спектроскопию и УФ-спектрофотометрию [1], характерной особенностью которых является необходимость использования стандартных образцов (СО). В настоящее время метод ЯМР-спектроскопии не только дополняет традиционные методы аналитического контроля ЛС, но и с успехом может их заменять, решая те же задачи более эффективно, позволяя осуществлять

тонкие структурные исследования, недоступные ранее.

Цель данной работы — показать возможность применения метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе.

Многообразие структурной и аналитической информации, содержащейся в спектрах ЯМР, позволяет использовать метод ЯМР-спектроскопии для проведения качественного и количественного анализа фармацевтических субстанций без использования СО. По сравнению с другими аналитическими методами метод ЯМР имеет ряд преимуществ, что позволяет считать его применение в фармакопейном анализе полностью экономически оправданным:

- 1) не требует использования эталонов и внутренних стандартов при установлении подлинности, так как решает задачу идентификации соединения напрямую, путем определения состава, строения и пространственной структуры соединения;
- 2) является абсолютным количественным методом, поэтому не требует использования стандартов при количественных измерениях;
- 3) не разрушает исследуемый образец, позволяя установить строение примесей в объекте исследования, количественно определить их содержание, выявить сырьевую и технологическую предысторию;
- 4) не требует сложной пробоподготовки, отличается высокой производительностью при небольшом расходе реактивов;
- 5) особенности агрегатного состояния, дисперсность, элементный состав, молекулярно-массовое распределение и другие характеристики системы не препятствуют получению спектров ЯМР.

Пробоподготовка в рамках метода ЯМР очень проста и заключается в растворении препарата в подходящем дейтерированном растворителе (как правило, используется не более 0,5–0,7 мл растворителя). Приготовленный раствор можно использовать для решения большинства химико-аналитических задач фармакологической экспертизы (подтверждение

подлинности, идентификация и количественное определение примесей и остаточных органических растворителей, содержание основного компонента и т.д.).

Задача подтверждения подлинности решается напрямую путем определения состава, строения и пространственной структуры соединения, при этом фиксируется наличие определенных структурных фрагментов и последовательность их соединения друг с другом в молекуле. В случае, когда идентифицировать конкретное строение активного компонента ЛС невозможно (например, активный компонент является полимером нерегулярного строения и не имеет конкретной общей формулы) используют спектры ЯМР целиком, как «отпечаток пальца» объекта. Как правило, предпочтение отдают углеродным спектрам, поскольку в спектрах ^{13}C практически не наблюдается перекрывания сигналов вследствие более широкого диапазона химических сдвигов ^{13}C . Кроме того, спектры ^{13}C позволяют определять содержание четвертичных углеродных атомов и функциональных групп, не содержащих протоны. Следует отметить, что при отсутствии какой-либо информации о структурной интерпретации данных одномерных спектров (ЯМР ^1H и ^{13}C) дополнительно регистрируют ряд корреляционных спектров (COSY, HSQC, HMQS, HMBC, CIGAR, INADEQUATE и т.д.) и спектров с переносом намагниченности (DEPT, INEPT и т.д.). С их помощью точно определяются системы спин-взаимодействующих ядер, идентифицируются сигналы перекрывающихся протонных мультиплетов, устанавливаются взаимное соотношение сигналов ^1H и ^{13}C конкретных углеводородных фрагментов и последовательность соединения различных структурных фрагментов в молекуле. В дальнейшем, для идентификации соединений, для которых уже проведена структурная интерпретация спектральных данных, проведение двумерных экспериментов необязательно. Эффективность использования метода ЯМР-спектроскопии при идентификации фармацевтических субстанций показана в литературе [5–8].

Применение ЯМР-спектроскопии в количественном анализе основано на прямой пропорциональности молярной концентрации магнитно-активных ядер интегральной интенсивности соответствующего сигнала поглощения в спектре. При количественном определении любого компонента фармацевтических субстанций (как основного, так и примесного) достаточно сопоставление приведенной интегральной интенсивности сигнала данного компонента к сумме приведенных интегральных интенсивностей сигналов всех компонентов фармацевтических субстанций [9, 10]. В рамках метода ЯМР задачи подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения примесей (включая остаточные органические растворители), решаются параллельно, на основе использования одной пробы образца, без приготовления серии калибровочных растворов СО примесей и остаточных растворителей.

Широко распространенным заблуждением являются представления об исключительно низкой чувствительности метода ЯМР, ограничивающей его ис-

пользование при контроле примесей ЛС. Аппаратурные возможности современных импульсных ЯМР-спектрометров со сверхпроводящими магнитами позволяют фиксировать примеси на уровне сотых долей процента [11], в то время как нормативные документы, как правило, устанавливают максимально допустимые концентрации примесных компонентов на уровне 0,1–0,5 весовых %. В отличие от традиционных хроматографических методов, метод ЯМР позволяет фиксировать все примеси, присутствующие в анализируемом образце, в то время как хроматографические методы — только те примеси, которые наблюдаются при выбранных условиях хроматографирования.

Точность интегрирования сигнала в спектре ЯМР, при проведении количественных измерений, зависит только от соотношения «сигнал : шум» (S/N):

$$u(I)\% = 0,25 + \frac{100}{S/N},$$

где $u(I)$ — стандартная неопределенность интегрирования.

Для того, чтобы неопределенность интегрирования не превышала 1 %, величина S/N не должна быть ниже 150 [12–14].

Спектроскопия ЯМР ^{13}C малоэффективна при идентификации и количественном определении микропримесей. Это связано с низкой чувствительностью метода ^{13}C -ЯМР, поэтому задачи количественного определения примесей решают с помощью метода ^1H -ЯМР, который в 100 раз чувствительнее метода ^{13}C -ЯМР.

Возможности метода ЯМР-спектроскопии позволяют определять количественные характеристики полисахаридов (гидроксипроцетилкрахмалы, пуллуланы, декстраны) в ходе проведения фармакопейного анализа. Особое внимание при этом уделяется определению параметров молекулярно-массового распределения (ММР). Основными параметрами ММР полимеров являются средняя молекулярная масса (ММ) и индекс полидисперсности, отражающий статистическую ширину ММР и позволяющий оценить разброс макромолекул по молекулярным массам. Методы традиционной ЯМР-спектроскопии неприменимы для определения ММ полимеров. Наиболее перспективен в этом направлении метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР (Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY), позволяющий измерить диффузию различных молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем) под действием градиента магнитного поля [15–17]. Метод DOSY основан на регистрации потери фазовой когерентности ядерных спинов за счет трансляционных перемещений молекул в таком поле [16, 17]. Диффузную информацию используют для количественной оценки размера макромолекул полимера и, соответственно, его молекулярной массы [18–24]. В литературе [25–29] показана возможность определения параметров ММР фарма-

цевтических субстанций полисахаридов с использованием метода DOSY ЯМР.

При анализе гидроксипропилацетата необходимо учитывать также степень молярного замещения (МЗ) — отношение количества гидроксипропиловых групп к общему количеству α -D-GlcP фрагментов. В отличие от хроматографических методов анализа использование метода ЯМР ^1H позволяет повысить точность определения МЗ и не требует построения градуировочной функции с использованием стандартного образца [30, 31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектроскопия ЯМР имеет на сегодняшний день наиболее богатый и успешный опыт установления как химической структуры индивидуальных органических соединений, так и деталей их электронного и пространственного строения. Процедура регистрации спектров ЯМР, сбора и обработки информации легко может быть осуществлена в автоматическом режиме. Выполнение количественных измерений на основе данных ЯМР не требует при регистрации спектров использования эталонов и внутренних стандартов, так как основано на стехиометрических отношениях. Все перечисленное делает метод ЯМР универсальным средством для комплексного решения химико-аналитических задач при проведении фармацевтической экспертизы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008. С. 73–78.
2. European Pharmacopoeia 7.2. 2010. V. 1. P. 52–54.
3. United States Pharmacopoeia 30-National Formulary 25. 761. Nuclear Magnetic Resonance. P. 324–31.
4. The Japanese Pharmacopoeia. 2006. 2.21. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. P. 38–39.
5. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Использование метода ЯМР-спектроскопии для подтверждения подлинности и оценки качества субстанций азитромицина. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (1): 10–14.
6. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Использование метода ЯМР-спектроскопии для подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения посторонних примесей субстанции рутина. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (3): 14–18.
7. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА. Использование метода мультядерной ЯМР-спектроскопии для определения качества лекарственных субстанций. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2012; (4): 4–10.
8. Моисеев СВ, Крылов ВИ, Мастеркова ТВ, Яшкир ВА, Бунятян НД. Использование метода ЯМР-спектроскопии для подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения посторонних примесей субстанции салициловой кислоты. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2014; (1): 15–19.
9. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР. М.: Мир; 1984.
10. Калабин ГА, Каницкая ЛВ, Кушнарев ДФ. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия; 2000.
11. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Возможности метода ЯМР-спектроскопии при определении микрокомпонентов смесей. Журнал аналитической химии 2014; 69(11): 1152–60.
12. Malz F, Jancke H. Validation of quantitative NMR. J Pharm Biomed Anal. 2005; 38(5): 813–23.
13. Malz F. Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren in der analytischen Chemie. Dissertation. Berlin: Humboldt Universität; 2003.
14. Crouch R, Russell D. Easy, precise and accurate quantitative NMR. Application note. Santa Clara: Agilent Technologies Inc. USA; 2011.
15. Morris KF, Johnson Jr. CS. Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. J Am Chem Soc. 1993; 115(10): 4291–99.
16. Price WS. Pulsed-field gradient NMR as a tool for studying translational diffusion. Part I. Basic theory. Concepts Magn Reson. 1997; 9: 299–336.
17. Price WS. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion. Part 2. Experimental aspects. Concepts Magn. Reson. 1998; 10: 197–237.
18. Li W, Chung H, Daefler C, Johnson JA, Grubbs RH. Application of (^1H) DOSY for Facile Measurement of Polymer Molecular Weights. *Macromolecules* 2012; 45(24): 9595–603.
19. Mazarin M, Viel S, Allard-Breton B, Thevand A, Charles L. Use of Pulsed Gradient Spin-Echo NMR as a Tool in MALDI Method Development for Polymer Molecular Weight Determination. Anal Chem. 2006; 78(8): 2758–64.
20. Viel S, Capitani D, Mannina L, Segre A. Diffusion-ordered NMR spectroscopy: a versatile tool for the molecular weight determination of uncharged polysaccharides. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1843–7.
21. Tomati U, Belardinelli M, Galli E, Ior V, Capitani D, Mannina L, Viel S, Segre A. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. *Carbohydr Res.* 2004; 339(6): 1129–34.
22. Politi M, Groves P, Chavez MI, Canada FJ, Jimenez-Barbero J. Useful applications of DOSY experiments for the study of mushroom polysaccharides. *Carbohydr Res.* 2006; 341(1): 84–9.
23. Suarez ER, Syvitski R, Kralovec JA, Nosedá MD, Barrow CJ, Ewart HS, Lumsden MD, Grindley TB. Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules* 2006; 7(8): 2368–76.
24. Maina NH. Structure and macromolecular properties of *Weissella confusa* and *Leuconostoc citreum* dextrans with a potential application in sourdough. Ph. D. Dis. Helsinki: University of Helsinki; 2012.
25. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Возможности применения метода диффузно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для количественной оценки средней молекулярной массы полулланов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (4): 8–11.
26. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение параметров молекулярно-массового распределения декстранов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2014; (2): 9–15.
27. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Количественное определение средней молекулярной массы декстранов методом диффузно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Журнал аналитической химии 2014; 69(10): 1047–53.
28. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение средней молекулярной массы гидроксипропилацетата методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Журнал аналитической химии 2015; 70(1): 30–36.
29. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение параметров молекулярно-массового распределе-

ния гидроксипроцеллюлоз методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Журнал аналитической химии 2015; 70(7): 727–733.

30. Прокофьев ЕП, Юрин ОА. Определение степени замещения и молярного замещения в оксипроцеллюлозных крахмалах мето-

дом ЯМР ^1H . Химико-фармацевтический журнал 1990; 24(7): 82–84.

31. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Модификация методики определения молярного замещения гидроксипроцеллюлоз методом ^1H ЯМР спектроскопии. Химико-фармацевтический журнал 2015; 49(8): 44–48.

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.
 Моисеев Сергей Владимирович. Эксперт 1-й категории лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, канд. хим. наук.
 Кузьмина Наталья Евгеньевна. Ведущий эксперт лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, д-р хим. наук.
 Крылов Владислав Игоревич. Ведущий инженер лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии.
 Яшкир Вадим Анатольевич. Начальник лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии, канд. хим. наук.
 Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, проф.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmed.ru

THE USE OF NMR-SPECTROSCOPY IN PHARMACOPOEIAL ANALYSIS

S. V. Moiseev, V. I. Krylov, N. E. Kuzmina, V. A. Yashkir, V. A. Merkulov

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 illustrates the prospects of using nuclear magnetic resonance spectroscopy for complex, fast and reliable determination of key quality attributes of drug substances while performing pharmacopoeial analysis.

Key words: NMR-spectroscopy; pharmacopoeial analysis; structural interpretation of NMR spectra; identification of drug substances; assay; molar mass distribution; molar substitution.

For citation: Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. The use of NMR-spectroscopy in pharmacopoeial analysis. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (2): 53–57.

REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Moscow: NCESMP; 2008. P. 73–78 (in Russian).
2. European Pharmacopoeia 7.2. 2010. V. 1. P. 52–54.
3. United States Pharmacopoeia 30-National Formulary 25. 761. Nuclear Magnetic Resonance. P. 324–31.
4. The Japanese Pharmacopoeia. 2006. 2.21. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. P. 38–39.
5. Kuzmina NE, Moiseev SV, Yashkir VA, Merkulov VA. Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy method for the identification and quality evaluation of azithromycin substance. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2012; (1): 10–14 (in Russian).
6. Kuzmina NE, Moiseev SV, Yashkir VA, Merkulov VA. The use of magnetic resonance spectroscopy for authentication, identification and assay of impurities in routine substance. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2012; (3): 14–18 (in Russian).
7. Kuzmina NE, Moiseev SV, Yashkir VA. Multinuclear NMR-spectroscopy for drug substances quality assessment. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2012; (4): 4–10 (in Russian).
8. Moiseev SV, Krylov VI, Masterkova TV, Yashkir VA, Bunyatyan ND. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for drug identification, characterization and quantification of impurities in substance of salicylic acid. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2014; (1): 15–19 (in Russian).
9. Gunter H. NMR Spectroscopy. An Introduction. Moscow: Mir; 1984 (in Russian).
10. Kalabin GA, Kanitskaya LV, Kushnarev DF. Quantitative NMR spectroscopy of natural organic raw materials and its products. Moscow: Himiya; 2000 (in Russian).
11. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Features of NMR determination of microcomponents in mixtures. *Zhurnal analiticheskoy himii* 2014; 69(11): 1152–60 (in Russian).
12. Malz F, Jancke F. Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(5): 813–23.
13. Malz F. Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren in der analytischen Chemie. Dissertation. Berlin: Humboldt Universität; 2003.
14. Crouch R, Russell D. Easy, precise and accurate quantitative NMR. Application note. Santa Clara: Agilent Technologies Inc. USA; 2011.
15. Morris KF, Johnson Jr. CS. Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 1993; 115(10): 4291–99.
16. Price WS. Pulsed-field gradient NMR as a tool for studying translational diffusion. Part I. Basic theory. *Concepts Magn Reson.* 1997; 9: 299–336.
17. Price WS. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion. Part 2. Experimental aspects. *Concepts Magn. Reson.* 1998; 10: 197–237.
18. Li W, Chung H, Daeflter C, Johnson JA, Grubbs RH. Application of (1)H DOSY for Facile Measurement of Polymer Molecular Weights. *Macromolecules* 2012; 45(24): 9595–603.
19. Mazarin M, Viel S, Allard-Breton B, Thivand A, Charles L. Use of Pulsed Gradient Spin-Echo NMR as a Tool in MALDI Method Development for Polymer Molecular Weight Determination. *Anal Chem.* 2006; 78(8): 2758–64.
20. Viel S, Capitani D, Mannina L, Segre A. Diffusion-ordered NMR spectroscopy: a versatile tool for the molecular weight determination of uncharged polysaccharides. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1843–7.
21. Tomati U, Belardinelli M, Galli E, Ior V, Capitani D, Mannina L, Viel S, Segre A. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Leontodon edodes* grown on olive mill waste waters. *Carbohydr Res.* 2004; 339(6): 1129–34.

22. Politi M, Groves P, Chavez MI, Canada FJ, Jimenez-Barbero J. Useful applications of DOSY experiments for the study of mushroom polysaccharides. *Carbohydr Res.* 2006; **341**(1): 84–9.
23. Suarez ER, Syvitski R, Kralovec JA, Noseda MD, Barrow CJ, Ewart HS, Lumsden MD, Grindley TB. Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules* 2006; **7**(8): 2368–76.
24. Maina NH. Structure and macromolecular properties of *Weissella confusa* and *Leuconostoc citreum* dextrans with a potential application in sourdough. Ph. D. Dis. Helsinki: University of Helsinki; 2012.
25. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. The possibility of using diffusion-ordered NMR spectroscopy for quantitative analysis of Pullulan average molecular weight. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (4): 8–11 (in Russian).
26. Moiseev SV, Kuzmina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. The determination of molecular weight distribution parameters of dextrans with the diffusion-ordered NMR spectroscopy technique. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2014; (2): 9–15 (in Russian).
27. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Quantitative determination of the average molecular weight of dextrans by method of diffusely-ordered NMR spectroscopy. *Zhurnal analiticheskoy himii* 2014; **69**(10): 1047–53 (in Russian).
28. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Determination of average molecular weight hydroxyethyl starch by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Zhurnal analiticheskoy himii* 2015; **70**(1): 30–36 (in Russian).
29. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Determination of the parameters of the molecular weight distribution of hydroxyethyl starch by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Zhurnal analiticheskoy himii* 2015; **70**(7): 727–33 (in Russian).
30. Prokofiev EP, Yurin OA. Determining the degree of substitution and molar substitution in ethoxylated starches by ^1H NMR. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 1990; **24**(7): 82–84 (in Russian).
31. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Modification of the methodology for determining the molar substitution of hydroxyethyl starch by ^1H NMR spectroscopy. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2015; **49**(8): 44–48 (in Russian).

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.

Moiseev SV. 1st professional category expert of the Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products. Candidate of Chemical Sciences.

Kuzmina NE. Leading expert of the Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products. Doctor of Chemical Sciences.

Krylov VI. Leading engineer of the Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products.

Yashkir VA. Head of the Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products. Candidate of Chemical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director-General for Evaluation of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences, professor.