ВЕДОМОСТИ
НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ISSN 1991-2919 (Print)
ISSN 2619-1172 (Online)

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

ГЛАВНАЯ ТЕМА:

Контроль качества лекарственных средств

Том 13, № 3
Vol. 13, No. 3
2023

Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
Regulatory research and medicine evaluation

www.vedomostincesmp.ru

QR-гид: документы в мгновенном доступе

Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание

Решения Совета Евразийской экономической комиссии

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза»

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»

Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций»

Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств»

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата»

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 декабря 2021 г. № 169 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного сырья) и лекарственных растительных препаратов»

Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 16 января 2018 г. № 2 «О Руководстве по качеству лекарственных препаратов с модифицированным высвобождением для приема внутрь»

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. № 6 «О Руководстве по качеству лекарственных растительных препаратов»

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 17 «О Руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов»

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 6 августа 2019 г. № 23 «О Руководстве по оценке и контролю ДНК-реактивных (мутагенных) примесей в лекарственных средствах и установлению границ потенциального канцерогенного риска»

Расширенный перечень нормативных документов в области регулирования экспертизы и регистрации лекарственных средств представлен на сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России https://www.regmed.ru/activity/normativnye-pravovye-akty-ls/

Уважаемые коллеги!

Основными направлениями совершенствования системы контроля качества лекарственных средств в настоящее время являются использование принципов управления рисками, стандартизация требований к показателям качества с соответствующей унификацией нормативной документации и гармонизация российского законодательства в сфере обращения лекарственных средств с требованиями Евразийского экономического союза. Применение риск-ориентированного подхода привело к изменению принципа нормирования содержания примесей и действующих веществ многокомпонентных лекарственных средств (с суммарного на селективный). Селективное нормирование повлекло за собой необходимость внедрения в фармацевтическую практику высокочувствительных инструментальных методов анализа и разработки соответствующих методик. Риск-ориентированный подход также позволяет определить приоритетные направления стандартизации показателей качества лекарственных средств.

Большинство методик оценки показателей качества лекарственных средств основано на использовании фармакопейных стандартных образцов. Отсутствие в России до недавнего времени системы аттестации фармакопейных стандартных образцов вынуждало прибегать к закупке стандартных образцов зарубежных фармакопей, что приводило к финансовым и временным издержкам. Проблема усугубилась в связи с ограничительными мерами и нарушением логистических цепочек поставок зарубежных стандартных образцов. В связи с этим крайне актуально создание собственного банка фармакопейных стандартных образцов и эталонных образцов сравнения. Последние позволят российским фармацевтическим компаниям вести эффективный контроль качества на всех этапах производства своей продукции.

В данном номере журнала, посвященном контролю качества лекарственных средств, читатель найдет результаты исследований по использованию риск-ориентированного подхода для определения критериев оценки качества лекарственных средств, по разработке методик количественного определения различных показателей качества с учетом появления новых типов лекарственных форм и средств адресной доставки, по созданию дейтерированных стандартных образцов, по стандартизации и унификации нормативной документации. Отдельно освещены проблемы организации контроля качества лекарственных средств на производстве.

Искренне ваша,
главный редактор

Косенко
Валентина Владимировна

Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель и издатель:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

Федотова Ольга Федоровна
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц.

Ответственные редакторы тематического выпуска:

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук

Научные редакторы:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук
Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Балтина Любовь Александровна

Адрес учредителя и редакции:

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 2005 году.

Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год).

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных:

Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, ЭБС ЛАНЬ, Соционет, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ — 0,627.

Входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

В журнале освещаются передовые достижения по вопросам стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологичные методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, краткие сообщения, методические материалы, тематика которых соответствует медицинским, фармацевтическим и химическим отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Промышленная фармация и технология получения лекарств;
- Фармацевтическая химия, фармакогнозия;
- Организация фармацевтического дела;
- Фармакология, клиническая фармакология.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается	
Подписано в печать:	27.09.2023
Дата выхода в свет	30.09.2023
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» — 57942,
	в каталоге агентства «Урал-Пресс» — 57942

© Оформление, составление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Петров Владимир Иванович, академик РАН, д-р мед. наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)
Родин Игорь Александрович, д-р хим. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Хрущева Мария Леонидовна, канд. хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Члены редакционной коллегии

Астапенко Елена Михайловна, канд. техн. наук, Минздрав России (Москва,Россия)

Бобизода Гуломкодир Мукаммал, д-р биол. наук, д-р фарм. наук, проф., ТГПУ им. С. Айни (Душанбе, Республика Таджикистан)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Гейн Владимир Леонидович, д-р хим. наук, проф., ПГФА (Пермь, Россия)

Глаголев Сергей Владимирович, Минздрав России (Москва, Россия)

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Гравель Ирина Валерьевна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Дмитриев Виктор Александрович, канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

Дурнев Андрей Дмитриевич, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (Москва, Россия)

Егорова Светлана Николаевна, д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

Звартау Эдвин Эдуардович, д-р мед. наук, проф., Первый СПбГМУ им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Кайтель Сьюзан, Ph.D. (Бонн, Германия)

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область, Россия)

Ордабаева Сауле Кутымовна, д-р фарм. наук, проф., Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Республика Казахстан)

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ремезова Ирина Петровна, д-р фарм. наук, проф., ПМФИ (Пятигорск, Россия)

Рождественский Дмитрий Анатольевич, канд. мед. наук, Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК (Москва, Россия)

Самылина Ирина Александровна, член-корр. РАН, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Темердашев Азамат Зауалевич, д-р хим. наук, КубГУ (Краснодар, Россия)

Тулегенова Ардак Уринбасаровна, д-р фарм. наук, проф., Фармакопейный комитет ЕАЭС (Москва, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, акад. РАН, д-р мед. наук, проф., ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, проф., РязГМУ (Рязань, Россия)

Регистрация	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82931 от 14 марта 2022 г.
Исполнитель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	150 экз. Цена свободная

Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya
Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder and publisher:

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Editor-in-Chief:

Valentina V. Kosenko,
Cand. Sci. (Pharm.)

Managing Editor:

Olga F. Fedotova
tel.: +7 (495) 121-06-00 (ext. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Executive Editor:

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci (Biol.), Assoc. Prof.

Guest Editors for the Special Issue:

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)

Science Editor:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.)
Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.)

Editor:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor:

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office:

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
tel.: +7 (499) 190-18-18
(ext. 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Founded in 2005.

Published quarterly (four issues per year).

This is an open access journal indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI) and RUSMED, with the archive included in major aggregator databases, such as WorldCat, DOAJ, Russian State Library, Google Scholar, CyberLeninka, BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lan' ELS, Socionet, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal's two-year impact factor is 0.627.

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, approaches to evaluation of medicinal products, including assessment of medicine interchangeability, discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology, clinical medicine, rational use of medicines based on personalised medicine principles.

The journal publishes reviews and original articles, brief communications, guidance materials related to medical and pharmaceutical sciences and the following specialist fields:

- Pharmaceutical formulation and manufacturing;
- Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy;
- Pharmaceutical management;
- Pharmacology, clinical pharmacology.

The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript
The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Passed for printing:	27.09.2023
Date of publication:	30.09.2023
Subscription codes	Pressa Rossii catalogue: 57942
	Ural-Press agency catalogue: 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2023

Editorial Board

Editor-in-Chief

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Deputy Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)
Igor A. Rodin, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Lomonosov Moscow State University, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Editorial Board Members

Elena M. Astapenko, Cand. Sci. (Tech.), Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Gulomkodir M. Bobizoda, Dr. Sci. (Biol.), Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Aini Tajik State Pedagogical University (Dushanbe, Republic of Tajikistan)

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir L. Gein, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Sergey V. Glagolev, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Irina V. Gravel, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Victor A. Dmitriev, Cand. Sci. (Med.), Association of the Russian Pharmaceutical Manufacturers (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Svetlana N. Egorova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Susanne Keitel, Ph.D. (Bonn, Germany)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Research and Manufacturing Company 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, Russia)

Saule K. Ordabaeva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., South Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kazakhstan)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)

Dmitry A. Rozhdestvensky, Cand. Sci. (Med.), Department for Technical Regulation and Accreditation of the Eurasian Economic Commission (Moscow, Russia)

Irina A. Samylina, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Azamat Z. Temerdashev, Dr. Sci. (Chem.), Kuban State University (Krasnodar, Russia)

Ardak U. Tulegenova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pharmacopoeial Committee of the Eurasian Economic Union

Alexander L. Khokhlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yaroslavl State Medical University (Yaroslavl, Russia)

Nikolay L. Shimanovsky, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia)

Registration	The journal is registered as mass media by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Contract publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	Triada Publishing House: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	150 copies. Free price

Содержание

Том 13, №3 2023

ГЛАВНАЯ ТЕМА: КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

АВТОРИТЕТНОЕ МНЕНИЕ

Е.Л. Ковалева, Ю.А. Золотов, Д.В. Сомов 368 **Обеспечение качества лекарственных средств: основные научные подходы и методы контроля**

ФАРМАКОПЕЯ

А.В. Яруткин, В.Л. Багирова 376 **Риск-ориентированный подход к планированию разработки фармакопейных статей**

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

С.В. Моисеев, Н.Е. Кузьмина, Е.Ю. Северинова, Н.Д. Бунятян, В.А. Евтеев 385 **Изучение методами спектроскопии ЯМР влияния молекулярной массы гипромеллозы фталата на его растворимость**

Ю.Н. Швецова, А.А. Ерина, Е.А. Хорольская, Е.С. Жигилей, Н.Е. Кузьмина 394 **Определение содержания цинка в инсулинах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой**

А.А. Ерина, В.М. Щукин, Е.А. Хорольская, Н.Е. Кузьмина 403 **Модификация методики определения цинка в инсулинах методом атомно-абсорбционной спектрометрии**

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

В.И. Крылов, В.А. Яшкир, А.В. Браун, И.И. Крылов, О.В. Фатеенкова, А.М. Савватеев 411 **Разработка методов синтеза малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов**

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.П. Шефер, Н.П. Антонова, И.М. Моргунов, С.С. Прохватилова, М.С. Зотова 419 **Способ определения компонентов эфирных масел в плодах аниса и фенхеля методом тонкослойной хроматографии**

О.В. Евдокимова, В.Л. Багирова, А.В. Бекетова, М.Н. Лякина 426 **Сравнительный анализ требований к качеству лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян**

В.М. Щукин, Е.А. Хорольская, Н.Е. Кузьмина, И.П. Ремезова 433 **Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов, присутствующих в слоевищах ламинарии**

М.С. Галенко, И.В. Гравель 442 **Оценка транссредовых переходов тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах корневищ с корнями валерианы и травы пустырника**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НА ПРОИЗВОДСТВЕ

Ж.И. Аладышева, Н.В. Пятигорская, В.В. Береговых, Г.Э. Бркич, А.П. Мешковский, М.М. Маршалова, В.В. Беляев, Н.С. Николенко, Е.И. Нестеркина, А.А. Камалетдинова, М.Ф. Лутфуллин 453 **Аналитический обзор процедуры аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в России**

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

О.В. Гунар, Н.Г. Сахно 464 **Микробиологический анализ качества лекарственных препаратов в формах аэрозолей и спреев**

ЭКСПЕРТНОЕ МНЕНИЕ

О.А. Ваганова, А.А. Натыкан 473 **Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: родственные примеси (для метода ВЭЖХ)**

Contents

Volume 13, No. 3 2023

MAIN TOPIC: QUALITY CONTROL OF MEDICINES

AUTHORITATIVE OPINION

E.L. Kovaleva, Yu.A. Zolotov, D.V. Somov 368 **Quality Assurance of Medicines: Main Scientific Approaches and Control Methods**

PHARMACOPOEIA

A.V. Yarutkin, V.L. Bagirova 376 **A Risk-Based Approach to Planning the Elaboration of Pharmacopoeial Monographs**

INSTRUMENTAL METHODS

S.V. Moiseev, N.E. Kuz'mina, E.Yu. Severinova, N.D. Bunyatyan, V.A. Evteev 385 **NMR Spectroscopy Study of the Effect of the Molecular Mass of Hypromellose Phthalate on Its Solubility**

Yu.N. Shvetsova, A.A. Erina, E.A. Khorolskaya, E.S. Zhigilei, N.E. Kuz'mina 394 **Determination of Zinc Content in Insulin Products by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**

A.A. Erina, V.M. Shchukin, E.A. Khorolskaya, N.E. Kuz'mina 403 **Modification of the Method for the Determination of Zinc Content in Insulins by Atomic Absorption Spectrometry**

REFERENCE STANDARDS

V.I. Krylov, V.A. Yashkir, A.V. Braun, I.I. Krylov, O.V. Fateenkova, A.M. Savvateev 411 **Development of Methods for the Synthesis of Malathion-D_6, Chlorophos-D_6, and Dichlorophos-D_6 for Use as Internal Standards in the Analysis of Medicinal Plant Raw Materials and Herbal Medicinal Products**

HERBAL MEDICINES

E.P. Shefer, N.P. Antonova, I.M. Morgunov, S.S. Prokhvatilova, M.S. Zotova 419 **A Thin-Layer Chromatography Method for the Determination of Essential Oil Components in Anise and Fennel Fruits**

O.V. Evdokimova, V.L. Bagirova, A.V. Beketova, M.N. Lyakina 426 **Comparative Analysis of Quality Requirements for Medicines Based on Horse-Chestnut Seeds**

V.M. Shchukin, E.A. Khorolskaya, N.E. Kuz'mina, I.P. Remezova 433 **Carcinogenic and Non-Carcinogenic Health Risks Assessment of Elemental Contaminants in *Laminariae thalli***

M.S. Galenko, I.V. Gravel 442 **Assessment of Trans-Environmental Transitions of Heavy Metals and Arsenic in Herbal Drugs and Herbal Medicinal Products of Valerian Rhizomes with Roots and Motherwort Herb**

QUALITY CONTROL AT THE PRODUCTION SITE

Zh.I. Aladysheva, N.V. Pyatigorskaya, V.V. Beregovykh, G.E. Brkich, A.P. Meshkovskiy, M.M. Marshalova, V.V. Belyaev, N.S. Nikolenko, E.I. Nesterkina, A.A. Kamaletdinova, M.F. Lutfullin 453 **Review of the Certification Procedure for Qualified Persons of Manufacturers of Medicines for Human Use in Russia**

MICROBIOLOGICAL TESTING

O.V. Gunar, N.G. Sakhno 464 **Microbiological Examination of Aerosols and Sprays**

EXPERT OPINION

O.A. Vaganova, A.A. Natykan 473 **Recommendations for the Contents of a Product Specification File: Related Substances (HPLC)**

https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-368-375
Интервью | Interview

Check for updates
CC BY 4.0

Е.Л. Ковалева[1], **Ю.А. Золотов**[2], **Д.В. Сомов**[3]

Обеспечение качества лекарственных средств: основные научные подходы и методы контроля

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

[2] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация*

[3] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения, Славянская пл., д. 4, стр. 1, Москва, 109012, Российская Федерация*

РЕЗЮМЕ

Важнейшей составляющей государственной политики в сфере здравоохранения является обеспечение гарантированности качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, поступающих в гражданский оборот в Российской Федерации. Своими взглядами на содержание контроля качества лекарственных средств, взаимосвязь с различными отраслями науки, в частности аналитической химией, особенностями и проблемами материального и инструментального обеспечения поделились доктор фармацевтических наук, заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Е.Л. Ковалева; академик РАН, профессор, доктор химических наук Ю.А. Золотов; кандидат фармацевтических наук, врио генерального директора ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора Д.В. Сомов.

Ключевые слова: контроль качества; лекарственные средства; аналитическая лаборатория; аналитическое оборудование; стандартные образцы; фармакопейные методы; методы анализа

Для цитирования: Ковалева Е.Л., Золотов Ю.А., Сомов Д.В. Обеспечение качества лекарственных средств: основные научные подходы и методы контроля. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):368–375. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-368-375

© Е.Л. Ковалева, Ю.А. Золотов, Д.В. Сомов, 2023

Elena L. Kovaleva[1], **Yuri A. Zolotov**[2], **Dmitry V. Somov**[3]

Quality Assurance of Medicines: Main Scientific Approaches and Control Methods

[1] *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

[2] *Lomonosov Moscow State University, 1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation*

[3] *Information and Methodological Center for Expertise, Accounting and Analysis of the Circulation of Medicinal Products, 4/1 Slavyanskay Sq., Moscow 109012, Russian Federation*

ABSTRACT

The most important component of national health policy is the assurance of quality, efficacy, and safety of medicines entering the pharmaceutical market in the Russian Federation. In this interview, we have discussed the quality control of medicines; its interconnections with various branches of science, in particular, with analytical chemistry; and the matters of material and equipment supply with Elena L. Kovaleva (Doctor of Pharmaceutical Sciences, Deputy Director of the Centre for Medicinal Products Evaluation and Control of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation), Yuri A. Zolotov (Academician of the Russian Academy of Sciences, Full Professor, Doctor of Chemical Sciences), and Dmitry V. Somov (Candidate of Pharmaceutical Sciences, Acting Director General of the Information and Methodological Center for Expertise, Accounting, and Analysis of the Circulation of Medicinal Products of the Federal Service for Surveillance in Healthcare).

Key words: quality control; medicines; analytical laboratory; analytical equipment; reference standards; compendial methods; methods of analysis

For citation: Kovaleva E.L., Zolotov Yu.A., Somov D.V. Quality assurance of medicines: main scientific approaches and control methods. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):368–375. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-368-375

Елена КОВАЛЕВА: «Контроль качества лекарственных средств следует рассматривать как важнейшую составляющую государственной политики в сфере здравоохранения»

– Елена Леонардовна, лекарства были первым в мире товаром, качество которого стало контролироваться на государственном уровне почти два с половиной века назад, и все это время научные подходы и методики контроля непрерывно совершенствовались. Какие из форм контроля качества лекарственных средств как части системы регулирования фармацевтического рынка, на ваш взгляд, являются сегодня наиболее значимыми?

Действительно, в России начало регулирования фармацевтического рынка с позиции качества продукции было положено изданием Аптекарского устава в 1789 г. Но и сегодня важнейшей составляющей государственной политики в сфере здравоохранения является обеспечение гарантированности качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, поступающих в гражданский оборот в Российской Федерации.

Базовыми элементами системы обеспечения качества фармацевтической продукции являются: надлежащие GxP практики (разработка, исследования, производство, дистрибьюция, продажа, хранение лекарственных препаратов и др.), инспекторат по соблюдению надлежащих практик, регистрация препаратов перед выводом на рынок, пострегистрационный контроль (система контрольных лабораторий, независимых от производства), стандартизация в области качества лекарственных средств. Каждый из элементов системы обеспечения качества одинаково значим.

На этапе регистрации лекарственных препаратов осуществляется оценка адекватности параметров качества и пределов нормирования, воспроизводимость методик испытаний, предлагаемых производителем, и соответствие образцов лекарственного препарата заявляемым требованиям.

Стандарт качества лекарственного средства определяется совокупностью параметров качества, методов/методик испытаний, критериев приемлемости. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) содержит общедоступные стандарты качества лекарственных средств и предлагает унифицированные аналитические методики, стандартизованные показатели качества для различных лекарственных форм и групп лекарственных средств и унифицированнные методики.

До 2001 г. одноименные лекарственные препараты отечественных производителей выпускали по единой технологии, с одинаковым внешним видом, в идентичной упаковке в соответствии с фармакопейной статьей, которая утверждалась помимо ГФ РФ. С введением в действие ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» каждый производитель получил возможность выпускать лекарственные препараты по собственной технологии и собственной спецификации. В 2010 г. в Федеральный закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» было включено определение понятия «качество лекарственного средства» как соответствие фармакопейной статье или, при ее отсутствии, нормативной документации. Практическое применение в контроле качества такого подхода стала возможным только после включения в ГФ РФ XIII изд. (2018 г.) фармакопейных статей на лекарственные препараты.

– Всегда ли возможен контроль качества лекарственного средства на соответствие фармакопейной статье?

Для фармацевтических субстанций, как правило, да, возможен, но могут быть различия в профиле примесей, а для лекарственного препарата — не всегда, в том числе из-за невоспроизводимости методик в препаратах с разным составом вспомогательных веществ.

Вспомогательные вещества в лекарственном препарате могут значительно отличаться у разных производителей и, возможно, оказывать мешающее влияние или вызывать образование примесей, которые не определяются фармакопейной методикой. Есть и другие причины невоспроизводимости, связанные с используемым в анализе оборудованием или материалами. Невоспроизводимость фармакопейных хроматографических методик может быть также связана с используемыми колонками, так как хроматограммы, полученные на колонках разных производителей с одинаковым носителем могут существенно различаться. В ведущих зарубежных фармакопеях информация о хроматографических колонках, на которых разработана методика анализа, включена в фармакопею, а в ГФ РФ эти данные не приводятся.

– Во всех развитых странах государственная фармакопея как основной нормативный документ, сборник стандартов и положений, определяющий показатели качества лекарственных препаратов, периодически пересматривается. Только что вышло в свет новое издание (XV) Государственной фармакопеи Российской Федерации. Существует ли связь между контролем качества и развитием системы фармакопейных стандартов?

Государственная фармакопея устанавливает тот минимальный уровень требований к качеству лекарственных средств, который гарантируется государством.

Качество лекарственных средств напрямую зависит от развития системы стандартизации. Эта система на современном этапе характеризуется целым рядом отличительных особенностей:

- динамичность развития стандартов качества;
- гармонизация подходов к оценке качества лекарственных средств в международном масштабе;
- применение сложных инструментальных методов анализа, которые приходят на смену полуколичественным и/или неспецифическим методам, что открывает

перед специалистами новые аспекты оценки качества и безопасности лекарственных препаратов;
- исключение или замена биологических испытаний на животных;
- включение в фармакопейные статьи на лекарственные средства альтернативных методик анализа;
- расширение сферы действия фармакопейных стандартов с учетом различных вариантов способа синтеза и технологии получения лекарственного средства и состава вспомогательных веществ.

Фармакопейные стандарты должны, с одной стороны, обладать стабильностью требований в течение определенного периода (это касается в первую очередь основополагающих стандартов и общетехнических требований), а с другой стороны, не должны тормозить внедрение достижений науки и техники в фармацевтический анализ.

Критерий простоты выполнения анализа, долгое время являвшийся одной из характеристик фармакопейного анализа, теряет свое первоначальное значение (если речь не идет о лекарственных препаратах аптечного изготовления). Современные методы контроля лекарственных средств нередко требуют сложного и дорогостоящего оборудования. Так, переход от определения тяжелых металлов неспецифическим полуколичественным методом к количественному анализу элементных примесей стал возможным только при использовании метода масс-спектрометрии, атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

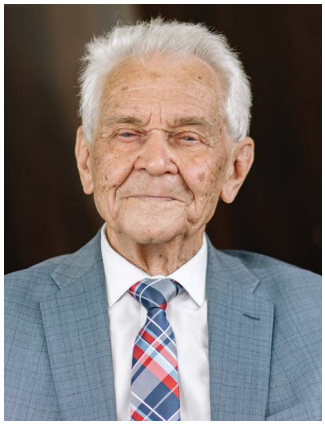
Международные требования определяют необходимость специфических методов идентификации. ИК-спектроскопия уже используется для установления подлинности не только индивидуальных лекарственных веществ, но и лекарственных препаратов. Однако развитие производственных отделов аптек остро ставит вопрос о включении в идентификацию фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ методов, не требующих сложного оборудования, которые могут быть использованы в аптеке, не требующих сложного оборудования: тонкослойной хроматографии, качественных реакций, определения температуры плавления и др.

Неспецифические методы количественного определения (титриметрия, спектрофотометрия) заменяются хроматографическими методами: высокоэффективной жидкостной, газовой хроматографией и др. Без внедрения этих методов было бы невозможно контролировать остаточные количества органических растворителей, генотоксичные примеси в лекарственных средствах.

Помимо введения в фармацевтический анализ современных инструментальных высокочувствительных специфических методов анализа, повысились требования к обеспечению воспроизводимости, достоверности получаемых результатов. Такая гарантия обеспечивается валидацией и верификацией аналитических методик.

– Елена Леонардовна, задача учитывать требования Европейской фармакопеи при разработке российских стандартов с была озвучена еще лет 10–15 назад. Удалось ли нам ее выполнить?

Задача разработки фармакопейных стандартов, гармонизированных с Европейской фармакопеей (Ph.Eur.), была сформулирована в Стратегии развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2020 г. (приказ Минпромторга от 23.10.2009 № 965). Поэтому все последующие издания ГФ РФ в значительной степени включали требования и подходы, соответствующие Ph.Eur. Однако создание гармонизированных с Ph.Eur. частных фармакопейных статей на препараты не всегда возможно, поскольку Ph.Eur. относительно недавно вводит стандарты качества на препараты, во-первых, а во-вторых, на фармацевтический рынок РФ сегодня приходят фармацевтические производители со всего мира, их продукция имеет особенности технологии, состава и т.д., поэтому создание унифицированного стандарта становится все более проблематичным. И здесь, возможно, следует принять концепцию «гибкого подхода», когда фармакопейная статья учитывает возможности разного способа синтеза, технологии получения, разного состава вспомогательных веществ в препарате.



Юрий ЗОЛОТОВ: «Совершенствование методологии контроля качества лекарственных средств должно опираться на достижения аналитической химии»

Фото: Николай Мохначев, «Научная Россия»

– Юрий Александрович, какие аналитические методы в настоящее время активнее всего развиваются и какие из них наиболее перспективны для использования при контроле качества лекарственных средств?

Арсенал методов и средств химического анализа постоянно пополняется, источники такого пополнения исключительно многообразны. Стимулами этого впечатляющего движения являются, с одной стороны, увеличение потребностей, усложнение аналитических задач, которые нужно решать в самых разных областях промышленного производства, охраны окружающей среды, медицины и т.д., а с другой стороны, непрерывно возрастающие возможности: достижения физики, информатики, биохимии, техники, в принципе пригодные для использования в целях анализа. Профессиональные аналитики отыскивают подобные достижения и воплощают их в новые методы анализа, создают соответствующие приемы и инструментарий. Важно подчеркнуть, что аналитики теперь — это и химики, и физики, и биохимики, и приборостроители.

Мы наблюдали за последние годы быстрое развитие и практическое применение, например, инфракрасной спектроскопии в ближней ИК-области, оказавшейся замечательным методом определения макросостава веществ и материалов, часто без всякой пробоподготовки. То же можно сказать о спектрометрии ионных подвижностей, в ряде случаев очень оперативно решающей проблемы определения токсичных веществ, причем для этого используются переносные приборы. С помощью хемометрики, быстро завоевывающей позиции в современной аналитической химии, стало возможным обрабатывать большие массивы аналитических данных и находить решения в случаях, ранее казавшихся неразрешимыми. Оригинальные математические приемы значительно расширяют возможности молекулярной масс-спектрометрии и хроматомасс-спектрометрии, особенно при анализе многокомпонентных смесей.

Многие новые или относительно новые методы анализа помогают решать задачи определения состава лекарственных средств и фармацевтических субстанций. Можно обратить внимание на более широкое использование методологии двухступенчатого анализа, со скринингом проб на первой стадии, когда используются упрощенные приемы. На кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова предложен, например, способ определения общего содержания галогенидов и серы в лекарственных препаратах; сложную и дорогую технику в этом случае необходимо задействовать лишь в том случае, когда это содержание существенно.

– Как вы оцениваете значение новых аналитических методов и методических подходов в области контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств?

Разумеется, специалисты по контролю качества лекарственных средств должны отслеживать появление новых способов и средств анализа, адаптируя их возможности к своим потребностям. После разработки метода анализа необходимо, конечно, провести его валидацию и утверждение; это достаточно длительная процедура.

Контроль эффективности лекарственных средств — не моя сфера, а вот несколько слов о контроле безопасности следует сказать. Для обнаружения и количественного определения остатков хлор- и фосфорсодержащих пестицидов в лекарственных средствах и лекарственном растительном сырье существует в настоящее время значительный набор

методов — хроматографических, иммунохимических и других. Конечно, наибольший потенциал в этой области у хроматомасс-спектрометрии.

– Как обстоит дело в нашей стране с аналитическим оборудованием (в том числе российского производства), и какое оборудование наиболее важно с точки зрения обеспечения фармацевтической отрасли?

Несколько десятилетий назад оснащение фармацевтических лабораторий значительно отставало от оснащения аналитических лабораторий, например в металлургии или нефтехимии, не говоря уже о лабораториях спецназначения. В фармацевтическом анализе использовали титрование, pH-метрию, фотометрические методы, тонкослойную хроматографию — и, пожалуй, всё. Сейчас положение сильно изменилось, широко применяются инструментальные методы: высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, современные спектроскопические методы, включая атомно-абсорбционную спектрометрию, методы с индуктивно-связанной плазмой, спектрометрию ЯМР и другие, что требует соответствующего оснащения. Однако высокий уровень аппаратурного оснащения почти всегда означает наличие импортных приборов. Иногда, имея средства, приобретали зарубежные приборы даже при наличии на рынке отечественных, как это бывало с газовыми хроматографами, атомно-абсорбционными спектрометрами и даже с pH-метрами.

Для анализа и контроля лекарственных средств весьма важны жидкостные хроматографы, которые есть как зарубежного, так и отечественного производства [1]. Виднейшим хроматографистом Я.И. Яшиным, недавно ушедшим из жизни, разработан отличный амперометрический детектор. Сейчас аналитики-хроматографисты предпринимают усилия, чтобы стимулировать разработку новых приборов и расходных материалов для них, а также расширение производства; в течение 2023 года проведено несколько совещаний по этому вопросу на межведомственном уровне.

Однако радикальным решением была бы разработка и реализация государственной программы аналитического приборостроения; фармацевтическая отрасль могла бы быть в числе требовательных заказчиков такой программы.

– А какие еще меры поддержки со стороны государства сейчас особо актуальны для исследователей, работающих в области контроля качества лекарственных средств?

Я бы сказал о необходимости государственной поддержки подготовки высококвалифицированных кадров. Мне всегда казалось, что отраслевые вузы, нацеленные на те отрасли, где химический анализ и контроль играют важную роль, должны готовить отраслевых аналитиков: фармакологов-аналитиков, металлургов-аналитиков, агрономов-аналитиков и т.д. Хотя кафедры аналитической химии в фармацевтических вузах есть, боюсь, что они в значительной степени ограничиваются общим курсом аналитической химии, между тем необходима, на мой взгляд, специализация, т.е. кафедры должны быть выпускающими.

И, наконец, специалисты, занимающиеся аналитическим контролем в фармацевтической отрасли или, тем более, отвечающие за научно-методическую сторону такого контроля, должны расширять профессиональные связи, развивать контакты с такими ассоциациями, как Научный совет РАН по аналитической химии, Всероссийское масс-спектрометрическое общество, «Аналитика», «Экоаналитика», участвовать в профильных конференциях аналитиков. Такие контакты будут способствовать внедрению новейших достижений фундаментальной и прикладной аналитической химии в фармацевтическую химию и сферу контроля качества лекарственных средств.

Дмитрий СОМОВ: «Наша задача — гарантировать защиту граждан от некачественных или фальсифицированных лекарств»

– Дмитрий Владимирович, расскажите о роли вашей организации в системе контроля качества лекарственных средств. Чем конкретно занимается ваш центр?

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора) — это подведомственная Росздравнадзору организация, включающая в себя сеть лабораторных центров, осуществляющих контроль качества лекарственных препаратов перед их вводом в обращение или уже находящихся в обращении на рынке Российской Федерации. Центры расположены во всех федеральных округах, что позволяет проводить испытания в непосредственной близости к производителю или местам отбора лекарственных средств. Мы проводим испытания в рамках государственного контроля, что гарантирует защиту наших граждан от некачественных или фальсифицированных лекарств, а также оказываем помощь отечественным производителям лекарств в постановке сложных высокотехнологичных методов испытаний или исследований лекарственных препаратов.

Лабораторные комплексы ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора работают на единой методологической основе и по единым стандартам. Разработана, внедрена и поддерживается в рабочем состоянии система менеджмента качества на соответствие стандарту ISO/ICE 17025 «Общие требования к компетентности испытательных лабораторий». Каждый из комплексов соответствует критериям аккредитации, имеет технические возможности и квалифицированный персонал, что подтверждается аттестатами аккредитации, выданными Федеральной службой по аккредитации.

– Акцент данного выпуска журнала сделан на развитии в сфере контроля качества аналитических инструментальных методов нового поколения: ЯМР, масс-спектрометрии, атомно-абсорбционного метода анализа и других. Какие из этих методов используются специалистами ваших лабораторий?

Современные лекарственные препараты становятся все более технологичными, и для подтверждения их качества требуются все более сложные методы анализа. Нам необходимо идти в ногу со временем. Для этого мы постоянно совершенствуем и расширяем парк используемого аналитического оборудования. На базе нашего Ярославского филиала создан и активно функционирует центр масс-спектрометрического анализа, оснащенный несколькими современными моделями. Так, тандемный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр применяется для испытаний биофармацевтических препаратов по таким показателям, как подлинность (подтверждение структуры больших и малых молекул), пептидное картирование, гликановый профиль, определение генотоксичных примесей. Использование газового хромато-масс-спектрометра является традиционным методом определения индивидуальных пестицидов или их групп, в том числе и в лекарственном растительном сырье. Применение масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой позволяет проводить точный элементный анализ в различных лекарственных препаратах.

– Ощущает ли ваша организация санкционное давление в области контроля качества лекарственных средств, и если да, то в чем оно проявляется? Насколько велика потребность в импортозамещении оборудования и расходных материалов для лабораторных исследований?

Санкционное давление в нынешних условиях ощущают все участники рынка лекарственных

средств, но практика показывает, что процесс перестройки и замещения привычных моделей функционирования происходит очень быстро. Болезненно воспринимались трудности с поставкой иностранных фармакопейных стандартных образцов, но за прошедшее время были решены проблемы с логистикой, а самое главное, активно начался и сейчас успешно продолжается процесс их замещения национальными стандартами, что лично мне кажется очень позитивным признаком. Появились новые производители оборудования, в том числе отечественные, которые стали предлагать решения в отраслях, ранее полностью «закрытых» западными производителями. Понятно, что о полном импортозамещении речь пока не идет, но позитивные сдвиги уже видны. Наиболее остро сейчас стоит вопрос технического обслуживания того оборудования, которое было поставлено компаниями, покинувшими Россию, но и эту проблему нам пока удается решать. Безусловно, будущее всей отечественной фармацевтической промышленности напрямую связано с тем, насколько успешно и быстро отечественным производителям удастся реализовать импортозамещающие программы — и в этом наши интересы полностью совпадают с интересами всех производителей лекарственных средств в России.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Цизин ГИ, Золотов ЮА. Какие аналитические приборы производят в России? *Журнал аналитической химии*. 2021;76(4)369–79.

Tsizin GI, Zolotov YuA. What analytical instruments are produced in Russia? *Journal of Analytical Chemistry*. 2021;76(4)369–79 (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S0044450221040137

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4163-6219
kovaleva@expmed.ru
Золотов Юрий Александрович, академик РАН, д-р хим. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9225-7767
zolotov.32@mail.ru
Сомов Дмитрий Владимирович, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9667-1014
iro@fgu.ru

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4163-6219
kovaleva@expmed.ru
Yury A. Zolotov, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Chem.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9225-7767
zolotov.32@mail.ru
Dmitry V. Somov, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9667-1014
iro@fgu.ru

УДК 615.072
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-512
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

А.В. Яруткин ✉, **В.Л. Багирова**

Риск-ориентированный подход к планированию разработки фармакопейных статей

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Яруткин Алексей Викторович***; *Yarutkin@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В статье представлены результаты анализа актуальности разработки фармакопейных требований к лекарственным средствам шести фармакотерапевтических групп, включающего в том числе анализ ассортимента и объема ввода в гражданский оборот находящихся в обращении на территории Российской Федерации лекарственных средств рассматриваемых групп и анализ содержания нормативной документации на рассматриваемые лекарственные средства. На основании широко используемого в практике риск-ориентированного подхода предложена система критериев для планирования разработки фармакопейных статей для Государственной фармакопеи.

Цель. Разработать комплексную, многофакторную и основанную на риск-ориентированном подходе систему критериев для планирования разработки фармакопейных статей для Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Материалы и методы. Объектами исследований служили лекарственные средства (ЛС) для медицинского применения ряда международных непатентованных наименований, в отношении которых был проведен анализ следующей информации: сведений, размещенных в Государственном реестре лекарственных средств; сведений об объеме ввода лекарственных препаратов для медицинского применения в гражданский оборот; нормативной документации на ЛС для медицинского применения. Используемые методы исследования: информационно-аналитический, системный анализ.

Результаты. Проведенные исследования показали необходимость многофакторного анализа при планировании разработки фармакопейных статей, основанного на риск-ориентированном подходе, и последующего определения приоритетных групп ЛС и отдельных ЛС для стандартизации.

Выводы. Для использования при планировании разработки фармакопейных статей предложена основанная на риск-ориентированном подходе система, включающая следующие критерии: важность ЛС для здравоохранения в целом и социальная значимость ЛС; доля фармацевтических субстанций, не проходивших лабораторные испытания в рамках экспертизы; масштабный объем ввода в гражданский оборот и значительное количество представленных на рынке лекарственных препаратов и используемых для их производства фармацевтических субстанций различных производителей; содержание нормативной документации на ЛС в части используемых методов и установленных норм.

Ключевые слова: Государственная фармакопея Российской Федерации; фармакопейные статьи; риск-ориентированный подход; лекарственные средства; лекарственные препараты; нормативная документация; гражданский оборот; экспертиза лекарственных средств

Для цитирования: Яруткин А.В., Багирова В.Л. Риск-ориентированный подход к планированию разработки фармакопейных статей. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):376–384. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-512

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© А.В. Яруткин, В.Л. Багирова, 2023

Aleksey V. Yarutkin ✉, **Valeria L. Bagirova**

A Risk-Based Approach to Planning the Elaboration of Pharmacopoeial Monographs

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Aleksey V. Yarutkin***; *Yarutkin@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. This article describes a risk-based analysis of the need for elaborating pharmacopoeial requirements for 6 therapeutic groups of medicines, including an evaluation of the range and number of batches of these medicines put into the stream of commerce in the Russian Federation and a comparison of the corresponding product specification files and quality standards. The article presents a set of criteria for planning the elaboration of monographs for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation according to a risk-based approach, which is used in a variety of other fields.
Aim. The study aimed to develop a comprehensive multivariate risk-based system providing criteria for planning the elaboration of monographs for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.
Materials and methods. This study focused on medicines for human use under a range of international non-proprietary names. The authors analysed entries in the Russian State Register of Medicines, data on the number of batches released to the pharmaceutical market, and product specification files and quality standards. The study was conducted using literature search, data analysis, and system-oriented methods.
Results. According to the results, a multivariate risk-based analysis is needed for planning the elaboration of monographs for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation and the subsequent prioritisation of therapeutic groups or individual medicines for their standardisation.
Conclusions. The suggested risk-based system for planning the elaboration of monographs for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation includes the following criteria: the social significance of a medicinal product and its value for the health care system; the percentage of medicinal products not tested by the national regulatory authority at the level of active pharmaceutical ingredients; the substantial number of batches and the significant range of medicinal products and the respective active pharmaceutical ingredients by different manufacturers present in the pharmaceutical market; and the analytical procedures and requirements established in product specification files and quality standards.

Key words: State Pharmacopoeia of the Russian Federation; pharmacopoeial monographs; risk-based approach; medicines; medicinal products; product specification file; quality standard; pharmaceutical market; expert evaluation of medicines

For citation: Yarutkin A.V., Bagirova V.L. A risk-based approach to planning the elaboration of pharmacopoeial monographs. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):376–384. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-512

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Совершенствование требований к качеству лекарственных средств (ЛС) становится невозможным без использования комплексного подхода [1, 2]. Разработка и актуализация общих фармакопейных статей и фармакопейных статей для Государственной фармакопеи Российской Федерации проводится на основании ежегодных планов с использованием гибкого подхода, допускающего при необходимости оперативное внесение изменений в сформированный план.

Цель работы — разработать комплексную, многофакторную и основанную на риск-ориентированном подходе систему критериев

для планирования разработки фармакопейных статей для Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Материалы и методы

Объектами исследований служили ЛС для медицинского применения ряда международных непатентованных наименований, в отношении которых был проведен анализ следующей информации:

- сведения о ЛС для медицинского применения, размещенные в Государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС), находящемся в ведении Министерства здравоохранения Российской Федерации[1];
- сведения об объеме ввода лекарственных препаратов для медицинского применения в гражданский оборот, находящиеся в ведении Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения[2];
- нормативная документация на ЛС для медицинского применения.

Используемые методы исследования: информационно-аналитический; системный анализ.

Результаты и обсуждение

Поскольку фармакопейными статьями устанавливается минимально допустимый уровень требований к качеству ЛС, то для определения приоритетных направлений стандартизации представляется целесообразной идентификация рисков, связанных с качеством ЛС и групп ЛС.

Риск-ориентированный подход в настоящее время успешно применяется в различных сферах, в том числе:

- при производстве ЛС (необходимым компонентом системы менеджмента качества является наличие системы управления рисками, включающей оценку, контроль и обзор рисков для качества[3]);
- в регуляторных процессах, например, при осуществлении различных видов надзора федеральными органами исполнительной власти, когда проводится предварительная оценка подконтрольных субъектов по ряду параметров, на основании которой юридическому лицу / индивидуальному предпринимателю присваивается категория риска, определяющая периодичность проведения плановых проверок [3].

Применение риск-ориентированного подхода к разработке фармакопейных требований представляется целесообразным и оправданным, поскольку он призван повысить эффективность регулирования обращения ЛС и контроля качества ЛС в целом.

В качестве первого критерия для формирования комплексной риск-ориентированной системы для планирования разработки фармакопейных статей представляется целесообразным определить важность ЛС для здравоохранения в целом и социальную значимость ЛС. Охват фармакопейными требованиями наиболее значимых ЛС в приоритетном порядке призван минимизировать самые чувствительные риски для пациентов с хроническими заболеваниями и (или) заболеваниями, представляющими наиболее серьезную опасность для их жизни и здоровья. На последующих этапах развития Государственной фармакопеи возможна разработка фармакопейных требований для ЛС иных групп.

Для проведения комплексного анализа с применением принципов риск-ориентированного подхода в качестве модельного составного объекта был выбран ряд международных непатентованных наименований (МНН) шести фармакотерапевтических групп лекарственных препаратов, включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения (ЖНВЛП)[4], а также МНН других лекарственных препаратов, предназначенных для лечения социально-значимых заболеваний *(рис. 1)*.

В рамках данного исследования для наибольшей наглядности были выбраны ЛС синтетического происхождения в связи с тем, что данные препараты наиболее широко представлены в перечне ЖНВЛП и занимают значительную долю на фармацевтическом рынке России.

---

[1] https://grls.rosminzdrav.ru
[2] https://roszdravnadzor.gov.ru/services/turnover
[3] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».
Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
[4] Распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

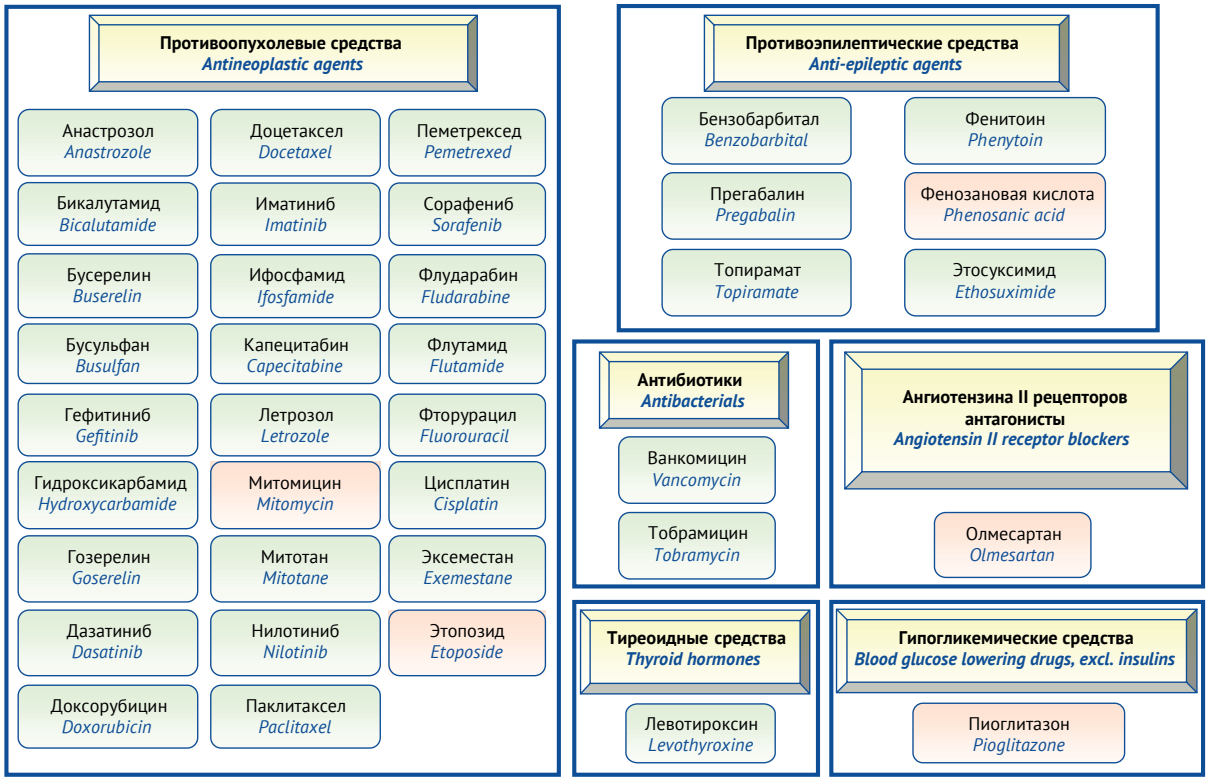


Рисунок подготовлен авторами / Figure is prepared by the authors

Рис. 1. *Международные непатентованные наименования выбранных для анализа лекарственных средств, объединенные по фармакотерапевтическим группам (наименования, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, отмечены заливкой зеленого цвета)*

Fig. 1. *International non-proprietary names of the selected study medicines classified by therapeutic group (names of medicines included in the Russian List of Vital and Essential Medicines are highlighted in green)*

Всего в рамках данной работы проанализированы сведения о ЛС 37 МНН. Наиболее широко была изучена группа противоопухолевых средств (26 МНН), из них препараты 24 МНН включены в перечень ЖНВЛП (выделены на *рисунке 1* зеленым цветом).

В рамках подготовки плана разработки фармакопейных статей на 2023 г. в качестве объектов исследования выступили как лекарственные препараты (310 торговых наименований рассматриваемых МНН), так и используемые при их производстве фармацевтические субстанции (144 наименования).

Для проведения сравнительного анализа была сформирована сводная таблица, содержащая следующие сведения.

1) В отношении фармацевтических субстанций (далее — субстанции):

- наименование производителя субстанции;
- страна-производитель;
- наличие или отсутствие в ГРЛС отдельной записи с присвоенным реестровым номером (наличие записи свидетельствует о проведении экспертизы субстанции, включающей лабораторные испытания);
- номер реестровой записи в ГРЛС;
- метод(-ы) подтверждения подлинности, указанный(-е) в нормативной документации (НД);
- метод(-ы) определения количественного содержания, указанный(-е) в НД;
- норма количественного содержания, указанная в НД;
- метод(-ы) определения содержания примесей, указанный(-е) в НД;
- норма суммарного содержания примесей, указанная в НД.

2) В отношении лекарственных препаратов (далее — препараты):

- наименование производителя препарата;
- страна-производитель;
- номер регистрационного удостоверения;
- метод(-ы) определения подлинности, указанный(-е) в НД;
- метод(-ы) определения количественного содержания, указанный(-е) в НД;
- норма количественного содержания, указанная в НД;
- метод(-ы) определения содержания примесей, указанный(-е) в НД;
- норма суммарного содержания примесей, указанная в НД.

В рамках исследования осуществлялся анализ записей ГРЛС, имеющих следующие статусы: «Действующий» и «Выдано по правилам Евразийского экономического союза», поскольку эти записи содержат наиболее актуальные данные.

В случае если процесс производства ЛС включает несколько стадий на различных производственных площадках, в качестве производителя рассматривалась производственная площадка, на которой осуществляется контроль ЛС перед его вводом в обращение.

Среди исследуемых субстанций преобладала продукция отечественного, индийского и китайского производства, среди препаратов — продукция отечественного и индийского производства *(рис. 2)*.

По результатам анализа сведений о субстанциях установлено, что в настоящее время в ГРЛС в реестровые записи лекарственных препаратов включено значительное количество субстанций, не имеющих отдельных реестровых записей и в отношении которых в рамках экспертизы не проводились лабораторные испытания, следовательно, отсутствует независимое подтверждение качества фармацевтической субстанции уполномоченным государственным учреждением.

В рассматриваемом блоке ЛС выявлено следующее:

- для производства препаратов двух МНН (бусульфан, этосуксимид) используются только не проходившие экспертизу качества субстанции;
- среди противоопухолевых средств доля субстанций, в отношении которых в рамках экспертизы не проводились лабораторные испытания, в среднем составляет 52%.

Для таких субстанций утверждение НД Минздравом России не предусмотрено, и, таким образом, исходя из определения качества ЛС[5], можно сделать вывод, что единственными документами, устанавливающими требования к качеству таких субстанций, следует считать фармакопейные статьи. Одновременно необходимо отметить, что в случае отсутствия в Государственной фармакопее соответствующей фармакопейной статьи у федерального органа исполнительной власти, осуществляющего функции по контролю и надзору в сфере здравоохранения[6], фактически отсутствует возможность проведения отбора и испытаний образцов таких субстанций по причине отсутствия документа, устанавливающего требования к их качеству, что, в свою очередь, влечет риски, связанные с качеством таких субстанций и производимых с их использованием препаратов.

	Лекарственные средства *Medicines*		**Производители лекарственных средств** *Manufacturers*	
	МНН *INN*	**Записи** *Records*	**Страны** *Countries*	**Количество** *Quantity*
Фармацевтические субстанции / *API*	37	144	32	176
Лекарственные препараты *Medicinal products*	37	310	32	145

Фармацевтические субстанции / *API*

Страна *Countries*	**Доля, %** *Percentage, %*
Россия / *Russia*	27,5
Индия / *India*	24,2
Китай / *China*	14,1
Италия / *Italy*	3,9
Германия / *Germany*	3,3

Лекарственные препараты *Medicinal products*

Страна *Countries*	**Доля, %** *Percentage, %*
Россия / *Russia*	57,8
Индия / *India*	11,4
Германия / *Germany*	6,1
Аргентина / *Argentina*	3,2
Беларусь / *Belarus*	2,7

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. *Количественные характеристики объектов исследования (МНН — международные непатентованные наименования)*

Fig. 2. *Quantitative profile of the study medicines (INN, international non-proprietary names; API, active pharmaceutical ingredients)*

[5] Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». П. 22, ст. 4.
[6] Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 323 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения».

В связи с вышеизложенными фактами стандартизация качества таких субстанций посредством разработки фармакопейных статей является крайне актуальной задачей.

Таким образом, определен второй критерий для учета при планировании разработки и актуализации фармакопейных статей — доля субстанций, не проходивших лабораторные испытания в рамках экспертизы.

Третьим критерием, свидетельствующим об актуальности и необходимости стандартизации отдельных ЛС или их групп посредством разработки фармакопейных статей, является объем ввода препаратов в гражданский оборот. Препараты, вводимые в гражданский оборот, при больших объемах серийного производства доступны значительному количеству пациентов и, как правило, представлены продукцией нескольких производителей, которая может отличаться по установленным требованиям к качеству. Указанные обстоятельства приводят к существенно более высокому риску для пациентов по сравнению с препаратами, выпускаемыми в небольших объемах.

Для оценки данного показателя проведен анализ сведений о вводе в гражданский оборот препаратов за период с 01.01.2019 по 31.12.2021 (суммарно по МНН). В зависимости от количества серий, введенных в гражданский оборот, препараты были объединены в следующие группы: менее 50 серий, от 50 до 100 серий, от 100 до 200 серий, от 200 до 400 серий, от 400 до 1000 серий, более 1000 серий. В результате проведенного анализа установлено, что максимальным количеством введенных в гражданский оборот серий характеризуются препараты с МНН «капецитабин» (противоопухолевое средство, 1797 серий) и «левотироксин» (тиреоидное средство, 1085 серий); суммарное количество серий составляет 30,79% от общего количества серий всех препаратов, включенных в исследование *(рис. 3)*.

Необходимо отметить, что ЛС двух указанных МНН представлены значительным количеством записей о субстанциях в ГРЛС:

- капецитабин — 17 записей (5-е место по числу записей среди 37 рассматриваемых МНН);
- левотироксин — 4 записи (27-е место).

Одновременно в ГРЛС имеется значительное количество записей о зарегистрированных препаратах двух указанных МНН:

- капецитабин — 21 запись (5-е место);
- левотироксин — 10 записей (15-е место).

Масштабный объем ввода в гражданский оборот в сочетании со значительным количеством представленных на рынке препаратов и используемых для их производства субстанций различных производителей определяют необходимость стандартизации ЛС МНН «левотироксин» и «капецитабин» в приоритетном порядке по отношению к другим рассматриваемым в настоящей работе ЛС и в комплексе выделяются в качестве третьего критерия для планирования разработки фармакопейных требований.

Определение четвертого критерия основано на гетерогенности находящихся в обращении ЛС, обусловленной большим количеством производителей из разных стран, использующих различное оборудование и исходные материалы, применяющих разные методы контроля качества и устанавливающих различные требования к качеству ЛС. Одними из ключевых и одновременно универсальных показателей качества, применимых к подавляющему большинству ЛС, являются: подлинность, количественное содержание действующих веществ, количественное содержание примесей [4].

По результатам анализа НД на субстанции, включенные в ГРЛС отдельными реестровыми записями (субстанции, произведенные для реализации[7]), выявлены примеры ЛС трех МНН, демонстрирующих значительную гетерогенность требований различных производителей по норме суммарного содержания примесей в субстанциях, предназначенных для производства противоопухолевых препаратов *(табл. 1)*.

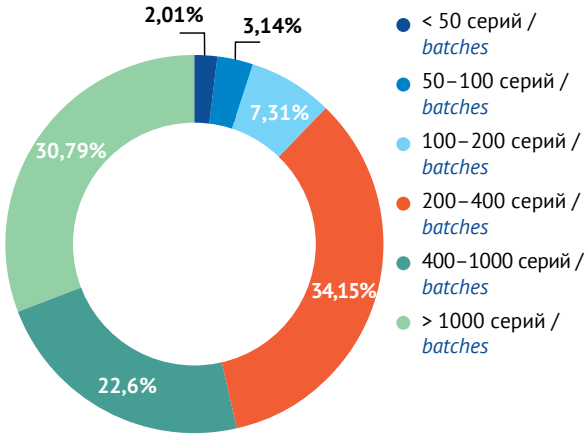


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. *Распределение лекарственных препаратов по объему ввода в гражданский оборот*

Fig. 3. *Medicinal products by number of batches put into the stream of commerce*

[7] Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Ч. 2, ст. 33.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для отдельных субстанций различие в суммарном содержании примесей может быть 25-кратным (субстанции с МНН «иматиниб»), что однозначно указывает на необходимость стандартизации качества таких ЛС на государственном уровне посредством разработки и утверждения фармакопейных требований. Для субстанций с МНН «паклитаксел» различие между минимальным и максимальным значением нормы суммарного содержания примесей оказалось четырехкратным, что в сочетании со значительным объемом ввода препаратов данного МНН в гражданский оборот также обусловливает актуальность стандартизации.

Также установлено, что для контроля содержания примесей в ЛС трех МНН (бензобарбитал, фенитоин, фенозановая кислота) используется исключительно метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). В связи с тем что в настоящее время широкое применение находит более точный и селективный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), представляется целесообразным при разработке соответствующих фармакопейных статей ввести метод ВЭЖХ для определения содержания примесей, что послужит ориентиром для разработчиков и производителей ЛС при переходе к более современным методам анализа.

В связи с тем что эффективность препаратов определяется фармакологическими свойствами и качеством субстанций, их стандартизации необходимо уделять особое внимание, постоянно увеличивая охват фармакопейными требованиями всего массива субстанций. Одновременно содержание примесей в субстанциях играет значительную роль в безопасности производимых препаратов, поскольку отдельные примеси могут представлять опасность при кратковременном применении препарата, а примеси, содержащиеся в принимаемых в течение продолжительного времени препаратах, с учетом накопительного эффекта могут представлять угрозу для здоровья пациентов даже в случае относительно небольшого их содержания в препарате [5].

По мере разработки фармакопейных статей на наиболее значимые для системы здравоохранения субстанции представляется целесообразным аналогичным образом определить перспективные направления стандартизации лекарственных препаратов.

Применение аналогичного подхода к анализу требований НД на лекарственные препараты, проведенного с учетом их лекарственных форм, также показало существенную вариабельность нормы суммарного содержания примесей (для препаратов с МНН «анастрозол» максимально допустимое суммарное содержание примесей в десять раз больше минимального) и необходимость перехода на более точные методы, используемые для контроля качества ЛС (для препаратов с МНН «бензобарбитал» для контроля примесей используется исключительно метод ТСХ).

В отношении препаратов с МНН «левотироксин», необходимость стандартизации которых в приоритетном порядке была отмечена выше, установлено, что для двух препаратов норма

Таблица 1. *Сведения о норме суммарного содержания примесей в субстанциях*

Table 1. *Data on total impurity limits for active pharmaceutical ingredients*

МНН *INN*	**Диапазон норм суммарного содержания примесей в субстанциях, %** *Range of total impurity limits for API, %*	**Страны производителей субстанций с крайними значениями норм в диапазоне** *Countries of API manufacture with minimal and maximum total impurity limits*	**Объем ввода препаратов в гражданский оборот (количество серий)** *Number of batches put into the stream of commerce*
Паклитаксел *Paclitaxel*	0,5–2,0	Минимальное значение — Китай *Minimum value: China* Максимальное значение — Россия *Maximum value: Russia*	566
Цисплатин *Cisplatin*	0,6–3,5	Минимальное значение — Германия *Minimum value: Germany* Максимальное значение — Китай, Россия *Maximum value: China, Russia*	365
Иматиниб *Imatinib*	0,1–2,5	Минимальное значение — Россия *Minimum value: Russia* Максимальное значение — Россия *Maximum value: Russia*	353

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *МНН — международное непатентованное наименование.*
Note. *INN, international non-proprietary names; API, active pharmaceutical ingredients.*

количественного содержания представляет собой наиболее широкий диапазон (85–115%) по сравнению с препаратами зарубежного производства, для которых характерны следующие диапазоны норм: 95–105, 90–105 и 90–110%. Для препаратов левотироксина характерно микродозирование и широкий диапазон доз [6], связанные в первую очередь с природой действующего вещества, которое является производной формой гормона щитовидной железы тироксина. Вышеуказанные особенности препаратов левотироксина являются дополнительным фактором, обусловливающим перспективность и высокую актуальность стандартизации группы препаратов левотироксина.

Таким образом, в качестве четвертого критерия выбрано содержание НД на ЛС в части используемых методов и установленных норм.

Предложенная в статье комплексная система в случае ее применения предполагает оценку целесообразности разработки фармакопейных требований к конкретным ЛС на основании четырех взаимодополняющих параметров высокой степени универсальности, поскольку:

- препараты любого происхождения, в том числе растительного и биологического, могут быть классифицированы по степени их критичности для системы здравоохранения, например по наличию препарата в перечне ЖНВЛП;
- значимость субстанции для системы здравоохранения можно оценить исходя из значимости производимого из нее препарата;
- препараты любого происхождения могут быть охарактеризованы показателями объема ввода в гражданский оборот;
- для препаратов любого происхождения наличие НД является обязательным; для субстанций, произведенных для реализации, также предусмотрено наличие НД.

Заключение

Проведенные исследования показали необходимость применения многофакторного анализа при планировании разработки фармакопейных статей, основанного на риск-ориентированном подходе, и последующего определения приоритетных групп ЛС и отдельных ЛС для стандартизации.

При планировании разработки фармакопейных статей представляется целесообразным использование системы, основанной на риск-ориентированном подходе, включающей следующие критерии:

- важность ЛС для здравоохранения в целом и социальная значимость ЛС;
- доля фармацевтических субстанций, не проходивших лабораторные испытания в рамках экспертизы;
- масштабный объем ввода в гражданский оборот и значительное количество представленных на рынке лекарственных препаратов и используемых для их производства фармацевтических субстанций различных производителей;
- содержание нормативной документации на лекарственные средства в части используемых методов и установленных норм.

Планирование разработки фармакопейных статей с использованием предложенной системы после реализации на национальном уровне для Государственной фармакопеи Российской Федерации также может быть использовано при развитии региональной фармакопеи — Фармакопеи Евразийского экономического союза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Саканян ЕИ, Шемерянкина ТБ, Осипова ИГ, Каргина ТМ, Шишова ЛИ, Бармин АВ и др. Создание фармакопейных стандартов качества для Государственной фармакопеи Российской Федерации. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(2):40–5. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-2-40-45
Sakanyan EI, Shemeryankina TB, Osipova IG, Kargina TM, Shishova LI, Barmin AV, et al. Establishment of pharmacopoeial quality standards for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Pharm Chem J*. 2017;51(2):136–41. https://doi.org/10.1007/s11094-017-1572-9
2. Олефир ЮВ, Саканян ЕИ, Лутцева АИ, Бабешина ЛГ, Шемерянкина ТБ. Апробация методов и методик фармакопейных статей в рамках программы стандартизации лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(10):59–64. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-10-59-64
Olefir YuV, Sakanyan EI, Luttseva AI, Babeshina LG, Shemeryankina TB. Validation of methods and procedures in pharmacopoeial monographs in the framework of drug standardization program. *Pharm Chem J*. 2019;52(10):873–7. https://doi.org/10.1007/s11094-019-1919-5
3. Соколов АЮ, Кротов КС. Об общих принципах применения риск-ориентированного подхода в контрольно-надзорной деятельности. *Вестник Саратовской государственной юридической академии*. 2021;142(5):84–9.
Sokolov AYu, Krotov KS. On the general principles of applying the risk-oriented approach in control and

supervisory activity. *Bulletin of Saratov State Law Academy*. 2021;142(5):84–9 (In Russ.). https://doi.org/10.24412/2227-7315-2021-5-84-89
4. Саканян ЕИ, Шемерянкина ТБ, Бармин АВ, Зайцев СА, Ярушок ТА. Фармацевтические субстанции. Требования Государственной фармакопеи к их стандартизации. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017;62(5–6):63–7.
Sakanyan EI, Shemeryankina TB, Barmin AV, Zaitsev SA, Yarushok TA. Pharmaceutical substances. Requirements of the State Pharmacopoeia for their standardization. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(5–6):63–7 (In Russ.).
EDN: ZRBNOT
5. Shaikh T, Gosar A, Sayyed H. Nitrosamine impurities in drug substances and drug products. *J Adv Pharm Pract*. 2020;2(1):48–57. https://doi.org/10.5281/zenodo.3629095
6. Городецкая ГИ, Сокова ЕА, Муслимова ОВ, Александрова ТВ, Мазеркина ИА, Руднев СГ. Взаимозаменяемость препаратов левотироксина. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(1):33–40.
Gorodetskaya GI, Sokova EA, Muslimova OV, Aleksandrova TV, Mazerkina IA, Rudnev SG. Interchangeability of levothyroxine sodium tablets. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(1):33–40 (In Russ.).
EDN: YHPIGT

Вклад авторов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.В. Яруткин* — сбор, обобщение и анализ данных, написание текста и иллюстративное оформление рукописи; *В.Л. Багирова* — редактирование текста рукописи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. The authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Aleksey V. Yarutkin* collected, summarised, and analysed data, drafted the manuscript, and prepared the graphical material. *Valeria L. Bagirova* edited the manuscript and approved the final version for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Яруткин Алексей Викторович
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3156-5958
Yarutkin@expmed.ru
Багирова Валерия Леонидовна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0379-6158
Bagirova@expmed.ru

Aleksey V. Yarutkin
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3156-5958
Yarutkin@expmed.ru
Valeria L. Bagirova, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0379-6158
Bagirova@expmed.ru

Поступила 30.09.2022
После доработки 09.01.2023
Принята к публикации 07.03.2023
Online first 17.05.2023

Received 30 September 2022
Revised 9 January 2023
Accepted 7 March 2023
Online first 17 May 2023

УДК 544.351.3-16:543.429.23
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-541
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

С.В. Моисеев[1] ✉,
Н.Е. Кузьмина[1],
Е.Ю. Северинова[1],
Н.Д. Бунятян[1,2],
В.А. Евтеев[1]

Изучение методами спектроскопии ЯМР влияния молекулярной массы гипромеллозы фталата на его растворимость

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

[2] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация*

✉ ***Моисеев Сергей Владимирович***; *MoiseevSV@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Гипромеллозы фталат используют как компонент кишечнорастворимых оболочек перорально принимаемых препаратов. Долю фталатных групп в этом полимере нормируют, так как она оказывает существенное влияние на растворимость. Молекулярная масса гипромеллозы фталата не контролируется, и ее влияние на растворимость в средах с различным значением pH изучено недостаточно.

Цель. Изучение методами спектроскопии ЯМР влияния молекулярной массы гипромеллозы фталата на кинетику растворения.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали гипромеллозы фталат, выделенный из кишечнорастворимых оболочек препаратов группы ингибиторов протонной помпы, и его стандартный образец. Оценку молекулярной массы полимера проводили методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР, используя для калибровки полиэтиленгликоли с известной молекулярной массой. Профили растворения гипромеллозы фталата с различной молекулярной массой изучали на основе спектров ^{1}H ЯМР.

Результаты. Разработана методика оценки средней молекулярной массы гипромеллозы фталата методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Установлено, что образцы гипромеллозы фталата различаются по величине молекулярной массы полимера (наблюдаемый разброс значений молекулярной массы составил 10 кДа). Показано, что профиль растворения анализируемых образцов гипромеллозы фталата в водном буферном растворе (pH 5,59) в течение первого часа описывается линейной функцией. Угол наклона прямой, характеризующий скорость их растворения, лежит в интервале 10°–36°.

Выводы. Установлено, что различие в значениях молекулярной массы образцов гипромеллозы фталата существенно влияет на скорость их растворения. Показано, что зависимость скорости растворения гипромеллозы фталата от его молекулярной массы носит нелинейный характер. Обоснована необходимость проведения дальнейших исследований для вывода корреляционного уравнения зависимости скорости растворения гипромеллозы фталата как функции от двух переменных (молекулярной массы и доли фталатных групп полимера).

Ключевые слова: гипромеллозы фталат; средняя молекулярная масса; метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР; профиль растворения

© С.В. Моисеев, Н.Е. Кузьмина, Е.Ю. Северинова, Н.Д. Бунятян, В.А. Евтеев, 2023

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. Н.Е. Кузьмина, Н.Д. Бунятян — члены редакционной коллегии журнала *«Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств»* с 2021 и 2011 года соответственно. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Sergey V. Moiseev[1] ✉,
Natalia E. Kuz'mina[1],
Elena Yu. Severinova[1],
Natalia D. Bunyatyan[1,2],
Vladimir A. Evteev[1]

NMR Spectroscopy Study of the Effect of the Molecular Mass of Hypromellose Phthalate on Its Solubility

[1] *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

[2] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation*

✉ ***Sergey V. Moiseev***; *MoiseevSV@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. Hypromellose phthalate is used in enteric coatings for oral medicinal products. The proportion of phthalate groups in the polymer is standardised because it has a significant effect on solubility. Whereas, the molecular mass of hypromellose phthalate is not controlled, and its impact on solubility in media with different pH values is understudied.

Aim. The study aimed to employ NMR spectroscopy to investigate the effect the molecular mass of hypromellose phthalate may have on the dissolution kinetics at the pH value declared by the polymer manufacturer.

Materials and methods. The study analysed hypromellose phthalate isolated from proton-pump inhibitor enteric coatings and the hypromellose phthalate reference standard. The molecular mass of the polymer was estimated by diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY) with polyethylene glycols of known molecular masses for calibration. The authors studied the dissolution profiles of hypromellose phthalates of different molecular masses using ^{1}H NMR spectra.

Results. The authors developed a procedure for estimating the average molecular mass of hypromellose phthalate by DOSY. The procedure showed variations in the molecular mass of the polymer in the test samples; the molecular mass scatter amounted to 10 kDa. The dissolution profile of the test samples in an aqueous buffer solution (pH 5.59) was described by a linear function during the first hour. The slope characterising the dissolution rate varied from 10° to 36°.

Conclusions. The variation in the molecular mass of hypromellose phthalate significantly affects the dissolution rate of the test samples. The function of the dissolution rate against the molecular mass of hypromellose phthalate is non-linear. The article provides a compelling reason for further research to derive a correlation equation for the dissolution rate of hypromellose phthalate as a function of two variables (molecular mass and proportion of phthalate groups in the polymer).

Key words: hypromellose phthalate; average molecular mass; diffusion-ordered NMR spectroscopy; dissolution profile

For citation: Moiseev S.V., Kuz'mina N.E., Severinova E.Yu., Bunyatyan N.D., Evteev V.A. NMR spectroscopy study of the effect of the molecular mass of hypromellose phthalate on its solubility. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):385–393. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-541

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Natalia E. Kuz'mina and Natalia D. Bunyatyan have been members of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2021 and 2011, respectively. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Одним из факторов обеспечения эффективности лекарственных средств является правильное их применение. Известно, что перорально принятые препараты, проходя по желудочно-кишечному тракту, в желудке подвергаются значительному воздействию кислой среды и могут инактивироваться, не доходя до тонкого кишечника, где они всасываются в кровоток [1]. Для контролируемого высвобождения активного вещества в тонком кишечнике перорально принимаемые препараты покрывают кишечнорастворимыми (или желудочно-резистентными) оболочками на основе полимеров, устойчивых в кислой среде, но растворимых в среде с высоким значением pH. Примером такого полимера является гипромеллозы фталат (общепринятая аббревиатура HPMCP) [2]. HPMCP представляет собой сложный эфир монофталевой кислоты и гидроксипропилметилцеллюлозы (гипромеллозы) нестехиометрического строения. Разные коммерческие марки HPMCP (HP-50, HP-55 и HP-55S) различаются степенью замещения гипромеллозы и физическими свойствами, включая растворимость. Например, HP-55 и HP-55S растворяются в водных буферных растворах при pH 5,5; HP-50 — при pH 5,0.

Известно, что растворимость HPMCP существенно зависит от доли фталатных групп в полимере, которая составляет 27–35% в марках HP-55, HP-55S и 21–27% в марке HP-50[1]. Как следствие, содержание фталатных групп в HPMCP подлежит контролю при его экспертизе качества (норма 21,0–35,0%[2] [3]). Средняя молекулярная масса (ММ) образцов HPMCP не контролируется и ее влияние на растворимость данного полимера изучено слабо. При этом ММ полимера является ключевым параметром, влияющим на его физические свойства, включая растворимость.

Величину ММ образцов HPMCP, как правило, определяют методом эксклюзионной гель-проникающей хроматографии (ГПХ)[3] [3, 4]. Ранее нами была показана возможность точного определения ММ природных и модифицированных полисахаридов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР на протонных ядрах (^{1}H-DOSY) [5]. Преимуществом метода ЯМР является возможность оценить не только ММ полимера, но и его нестехиометрический состав и профиль растворения.

Цель работы — изучение методами спектроскопии ЯМР влияния молекулярной массы гипромеллозы фталата на кинетику растворения.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали референсный стандартный образец HPMCP Европейской фармакопеи (образец I) и образцы HPMCP, выделенные из кишечнорастворимых оболочек препаратов группы ингибиторов протонной помпы: таблеток рабепразола (образцы II, III и IV) и капсул омепразола (образец V) различных производителей.

Для построения калибровочной кривой и вывода корреляционного уравнения зависимости ММ от значения коэффициента самодиффузии (*D*) полимера использовали образцы полиэтиленгликолей (ПЭГ): ПЭГ200 (ММ 200 Да, Fisher Chemical, кат. № P/3675/08), ПЭГ400 (ММ 400 Да, Sigma-Aldrich, кат. № 8.07485), ПЭГ600 (ММ 600 Да, Acros Organics, кат. № 192240010), ПЭГ4000 (ММ 4000 Да, Merck, кат. № 1.09727) и ПЭГ6000 (ММ 6000 Да, Merck, кат. № 8.07491).

К отделенной от активного вещества оболочке в количестве 30 мг (точная навеска необязательна) добавляли 1,5 мл смеси метанола (99,9%, Merck) и хлороформа (99,3%, ЭКОС-1) в соотношении 1:1 (об./об.) и перемешивали на мешалке Vortex (Vortex 1 S000, IKA® Werke GmbH & Co.KG, Германия) до получения однородной суспензии. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 мин с помощью центрифуги Microfuge 20R (Beckman Coulter) при 10000 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость и оставляли ее при комнатной температуре в течение суток до полного испарения растворителя. Навеску осадка в количестве 6 мг (точная навеска необязательна) растворяли в 0,5 мл смеси $CDCl_3$ (Cambridge Isotope Laboratories, кат. № DLM-7-PK) и CD_3OD (Acros Organics, кат. № A0318541) в соотношении 1:1 (об./об.).

Калибровочные растворы ПЭГ готовили, растворяя 6 мг ПЭГ в 0,5 мл смеси $CDCl_3$ и CD_3OD (1:1 об./об.).

Регистрацию спектров ^{1}H-DOSY (Diffusion-Ordered SpectroscopY, диффузионно-упорядоченная

[1] USP Hypromellose Phthalate (HPMCP). Enteric coating material. Shin-Etsu Chemical Co. Ltd; 2002. http://www.metolose.ru/files/hpmcp.pdf
[2] Monograph Hypromellose Phthalate. USP43–NF38 — 5828. https://doi.org/10.31003/USPNF_M39303_06_01
[3] Там же.

спектроскопия ЯМР) проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600, используя импульсную последовательность DBPPSTE-CC (Bipolar Pulse Pair STimulated Echo with Convection Compensation). Параметры DOSY эксперимента: угол поворота намагниченности 45°, время задержки между импульсными последовательностями — 2 с, число накоплений сигнала спада свободной индукции — 16, последовательное 15-шаговое линейное увеличение амплитуды импульса градиента магнитного поля в интервале от 1,8 до 51,5 Гс/см при фиксированных значениях времени диффузии (285 мс) и длительности градиентного импульса (2 мс), число точек аналого-цифрового преобразования — 16 К, экспоненциальный коэффициент аподизации по Лоренцу — 3 Гц. Математическую обработку результатов эксперимента осуществляли методом DISCRETE (discrete sum of exponential decays)[4] [6], в рамках которого каждую кривую диффузионного затухания трехкомпонентной смеси метанол–хлороформ–ГПМЦФ представляли суммой трех экспоненциальных составляющих.

Кинетику растворения изучали, используя водные буферные растворы ГПМЦФ. Буферный раствор готовили, добавляя KH_2PO_4 (BioChemica, for analysis, ACS) к D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, кат. № 11D-693) со следовыми количествами 3-(триметилсилил)-пропионата натрия-D4 (ТСП) (Cambridge Isotope Laboratories, кат. № I-18625) до значений pH 5,59. Данное значение было выбрано в соответствии с пороговым значением pH, при котором начинается растворение ГПМЦФ коммерческой марки HP-55. Именно эта марка была указана производителем препарата (II) в качестве основного компонента оболочки в инструкции к применению. Для других объектов исследования информация о коммерческой марке ГПМЦФ отсутствовала.

Анализировали увеличение в спектрах ^{1}H интегральных интенсивностей фталатных групп полимера относительно интегральной интенсивности внутреннего стандарта — ТСП, которую принимали за 100. Параметры ^{1}H ЯМР эксперимента: температура — 37 °С, время задержки между импульсными последовательностями — 5 с, количество накоплений спада свободной индукции — 32, число точек аналого-цифрового преобразования — 64 К, экспоненциальный коэффициент аподизации по Лоренцу — 3 Гц, дополнение нулями — 32 К, коррекция базовой линии спектра, настройка фазы и интегрирование в автоматическом режиме, калибровка шкалы химических сдвигов (δ) под сигнал ТСП.

При выводе корреляционного уравнения использовали программное обеспечение MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Метод DOSY, как и ГПХ, является косвенным методом определения ММ полимеров. Он требует калибровки, при которой измеряемая величина коэффициента самодиффузии (*D*) градуируется по известным массам однотипных полимеров. Ранее мы подобрали универсальные параметры ^{1}H-DOSY эксперимента, обеспечивающие хорошее разрешение по величине *D* полисахаридов с близкими значениями ММ. С их помощью были выведены корреляционные уравнения зависимости ММ от значений *D* для отдельных классов водорастворимых природных и модифицированных полисахаридов: пуллуланов, декстранов и гидроксиэтилкрахмалов [5]. Применение этих уравнений к водонерастворимым образцам ГПМЦФ невозможно, так как замена растворителя влияет на специфику невалентных взаимодействий его молекул друг с другом и с макромолекулами полимера. Как следствие, меняется вязкость раствора и подвижность макромолекулы полимера, что отражается на значении *D*. Важно отметить отсутствие стандартных образцов ГПМЦФ, аттестованных по величине ММ. Как следствие, оценка ММ этих полимеров носит ориентировочный характер, так как при построении калибровочной кривой используют другие полимеры (пуллуланы, ПЭГ, полистиролы). В *таблице 1* представлены литературные данные о значениях ММ коммерчески доступных марок ГПМЦФ производителя Shin-Etsu Chemical Co. Ltd, полученных методом ГПХ.

Результаты измерения существенно различаются в зависимости от способа усреднения ММ, растворителя и химической природы полимера, используемого при построении калибровочной кривой *(табл. 1)*. При этом не наблюдается четкой тенденции изменения величины ММ в ряду HP-50 — HP-55 — HP-55S.

В нашем исследовании мы использовали для калибровки растворы ПЭГ с известной ММ в смеси дейтерированных метанола и хлороформа (1:1 об./об.). Предварительно нами было установлено, что в данной смеси растворителей образцы ГПМЦФ растворяются лучше, чем в индивидуальных дейтерированных растворителях (хлороформе, хлористом метилене, метаноле). Для нивелирования ошибок, связанных с изменением вязкости при переходе от растворителя к раствору, проводили корректировку экспериментально определенных величин *D*.

[4] http://s-provencher.com/

Таблица 1. *Значения средневесовых (MM_w) и среднечисловых (MM_n) молекулярных масс коммерческих марок гипромеллозы фталата, определенные методом гельпроникающей хроматографии*

Table 1. *Weight-average (MM_w) and number-average (MM_n) molecular mass of commercial grades of hypromellose phthalate measured by gel-permeation chromatography*

Марка *Grade*	Растворитель *Solvent*	Образцы для калибровки *Calibration samples*	MM_w, кДа *(kDa)*	MM_n, кДа *(kDa)*
HP-50	ацетатно-хлоридный буфер (pH 5,61) : N,N-диметилформамид (9:1 об./об.) *acetate-chloride buffer (pH 5.61) : N,N-dimethylformamide (9:1 v/v)*	пуллуланы *pullulans*	37,86 [3]	14,7 [3]
	метанол : хлористый метилен (1:1 мас./мас.) *methanol : dichloromethane (1:1 w/w)*	полистиролы *polystyrenes*	78[5]	24[6]
HP-55	ацетатно-хлоридный буфер (pH 5,61) : N,N-диметилформамид (9:1 об./об.) *acetate-chloride buffer (pH 5.61) : N,N-dimethylformamide (9:1 v/v)*	пуллуланы *pullulans*	45,58 [3]	19,06 [3]
	диоксан : вода (9:1 об./об.) *dioxane : water (9:1 v/v)*	полиэтиленгликоль *polyethylene glycol*	45,0 [4]	12,86* [4]
		полистиролы *polystyrenes*	71,0 [4]	20,23* [4]
	метанол : хлористый метилен (1:1 мас./мас.) *methanol : dichloromethane (1:1 w/w)*	полистиролы *polystyrenes*	84[7]	21[8]
HP-55S	ацетатно-хлоридный буфер (pH 5,61) : N,N-диметилформамид (9:1 об./об.) *acetate-chloride buffer (pH 5.61) : N,N-dimethylformamide (9:1 v/v)*	пуллуланы *pullulans*	60,20 [3]	25,74 [3]
	диоксан : вода (9:1 об./об.) *dioxane : water (9:1 v/v)*	полиэтиленгликоль *polyethylene glycol*	76,2 [4]	21,76* [4]
		полистиролы *polystyrenes*	20,0 [4]	34,29* [4]
	метанол : хлористый метилен (1:1 мас./мас.) *methanol : dichloromethane (1:1 w/w)*	полистиролы *polystyrenes*	132[9]	36[10]

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

* *MM_n рассчитана из данных MM_w и MM_w/MM_n первоисточника.*
* *MM_n is calculated using the data of MM_w and MM_w/MM_n from the reference.*

Коэффициент корреляции ($K_{кор}$) рассчитывали как отношение значения D остаточной воды в растворителе (в нашем случае $19{,}17\times10^{-10}$ м^2/с) к значению D остаточной воды в растворе с анализируемым образцом [7, 8]. Характеристики растворов ПЭГ, используемые при построении калибровочной кривой и вывода корреляционного уравнения зависимости ММ от D, представлены в *таблице 2*.

Регрессионная зависимость представленных в *таблице 2* величин ММ от скорректированных значений D описывается степенной функцией, логарифмическое преобразование которой позволяет получить линейное уравнение *(рис. 1)*, использовавшееся для определения величин ММ анализируемых образцов I–V.

Следует отметить, что в отличие от растворов ПЭГ, для которых на диаграмме распределения D наблюдается один пик, растворы испытуемых образцов I–V характеризуются набором пиков с различными значениями D в пике D_p. Одна из причин этого явления — различная локальная подвижность сегментов полимерной цепи и боковых заместителей в HPMCP. Поэтому для определения ММ мы использовали средний коэффициент самодиффузии (D_s), который определяли по формуле (1) [5, 9]:

$$D_s = \Sigma p_i \times D_i, \quad (1)$$

где D_i — величина D в пике i на диаграмме распределения D в образце полимера; p_i — относительная доля резонирующих ядер в образце, характеризующихся значением D_i, определенная

[5] USP Hypromellose Phthalate (HPMCP). Enteric coating material. Shin-Etsu Chemical Co. Ltd; 2002. http://www.metolose.ru/files/hpmcp.pdf
[6] Там же.
[7] Там же.
[8] Там же.
[9] Там же.
[10] Там же.

Таблица 2. *Коэффициенты самодиффузии компонентов калибровочных растворов полиэтиленгликоля*

Table 2. *Self-diffusion coefficients of the components of polyethylene glycol calibration solutions*

ПЭГ	ММ, Да	lg ММ	$D_{ПЭГ}$×10^{10}, м^2/с	$D_{вода}$×10^{10}, м^2/с	$K_{кор}$	$D^{кор}_{ПЭГ}$ ×10^{10}, м^2/с	lg $D^{кор}_{ПЭГ}$
ПЭГ200	200	2,3010	8,65	18,86	1,0164	8,7922	-9,0559
ПЭГ400	400	2,6021	6,17	20,13	0,9523	5,8758	-9,2309
ПЭГ600	600	2,7782	5,13	19,78	0,9692	4,9718	-9,3035
ПЭГ4000	4000	3,6021	1,83	20,41	0,9392	1,7188	-9,7648
ПЭГ6000	6000	3,7782	1,41	19,25	0,9958	1,4041	-9,8526

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *ММ — молекулярная масса; ПЭГ — полиэтиленгликоль; $D_{ПЭГ}$ — коэффициент самодиффузии ПЭГ; $D_{вода}$ — коэффициент самодиффузии воды; $D^{кор}_{ПЭГ}$ — скорректированный коэффициент самодиффузии ПЭГ; $K_{кор}$ — коэффициент корреляции.*
Note. *MM, molecular mass; ПЭГ, polyethylene glycol; $D_{ПЭГ}$, self-diffusion coefficient of PEG; $D_{вода}$, self-diffusion coefficient of water; $D^{кор}_{ПЭГ}$, corrected self-diffusion coefficient of polyethylene glycol; $K_{кор}$, correlation coefficient; Да, Da; м^2/с, m^2/s.*

Таблица 3. *Значения коэффициентов самодиффузии и соответствующие им значения молекулярных масс образцов гипромеллозы фталата*

Table 3. *Self-diffusion coefficients and corresponding molecular mass values of hypromellose phthalate samples*

Образец *Sample*	D_S×10^{10}, м^2/с	$D_{вода}$×10^{10}, м^2/с	$K_{кор}$	$D^{кор}_S$×10^{10}, м^2/с	ММ, кДа
I	0,6701	17,67	1,0849	0,7270	20,05
II	0,7122	18,32	1,0464	0,7452	19,56
III	0,7488	18,09	1,0597	0,7935	17,06
IV	0,7145	20,88	0,9181	0,6560	24,23
V	0,7722	17,03	1,1257	0,8693	14,41

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *D_S — средний коэффициент самодиффузии испытуемых образцов I–V; $D^{кор}_S$ — скорректированный коэффициент самодиффузии испытуемых образцов I–V; $D_{вода}$ — коэффициент самодиффузии воды; $K_{кор}$ — коэффициент корреляции.*
Note. *D_S, mean self-diffusion coefficient of test samples I–V; $D^{кор}_S$, corrected self-diffusion coefficient of test samples I–V; $D_{вода}$, self-diffusion coefficient of water; $K_{кор}$, correlation coefficient; кДа, kDa; м^2/с, m^2/s.*

путем измерения интегральной интенсивности пиков на диаграмме распределения *D*.

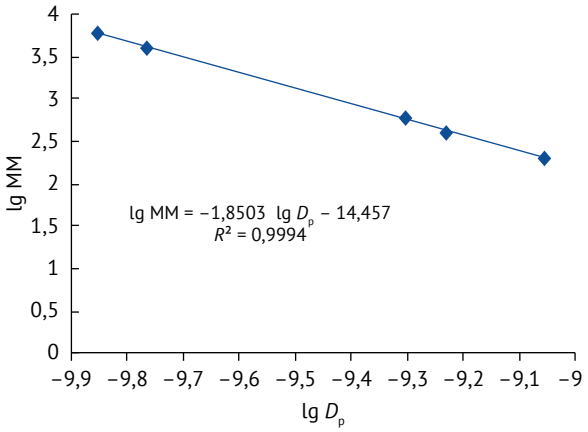


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Зависимость коэффициента самодиффузии (D_p) от молекулярной массы (ММ) образцов полиэтиленгликоля*

Fig. 1. *Self-diffusion coefficients (D_p) as a function of the molecular mass (MM) of polyethylene glycol samples*

Рассчитанные значения D_s образцов I–V далее корректировали аналогично образцам ПЭГ. Диффузионные характеристики испытуемых образцов HPMCP и соответствующие им значения ММ представлены в *таблице 3*.

Значение ММ стандартного образца HPMCP (I), полученное методом DOSY, близко к значению среднечисловой MM_n, заявленному оригинальным производителем HP-55 (21 кДа) с учетом различия в полимерах, применяемых для построения калибровочной кривой (ПЭГ и полистиролы соответственно) *(табл. 3)*. Что касается HPMCP из оболочек препаратов протонной помпы, то максимальное соответствие значению ММ стандартного образца наблюдается у образца II, наибольшее отклонение от стандарта — у образца V. Наблюдаемый разброс в значениях молекулярных масс образцов HPMCP, входящих в состав кишечнорастворимых оболочек препаратов — ингибиторов протонной помпы, составил 10 кДа. Следует отметить, что правильность методики определения ММ полисахаридов методом DOSY в диапазоне

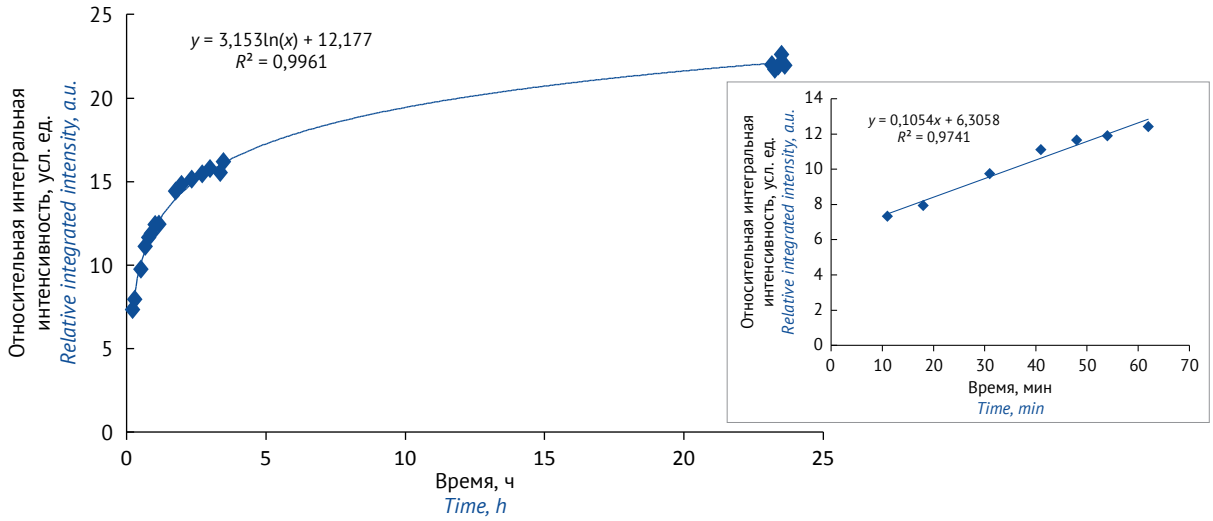


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. *Профиль растворения образца гипромеллозы фталата I, ММ 20,05 кДа. На вставке — временной диапазон 10–60 мин*

Fig. 2. *Dissolution profile of hypromellose phthalate sample I, MM 20.05 kDa. The inset shows the time range of 10–60 min*

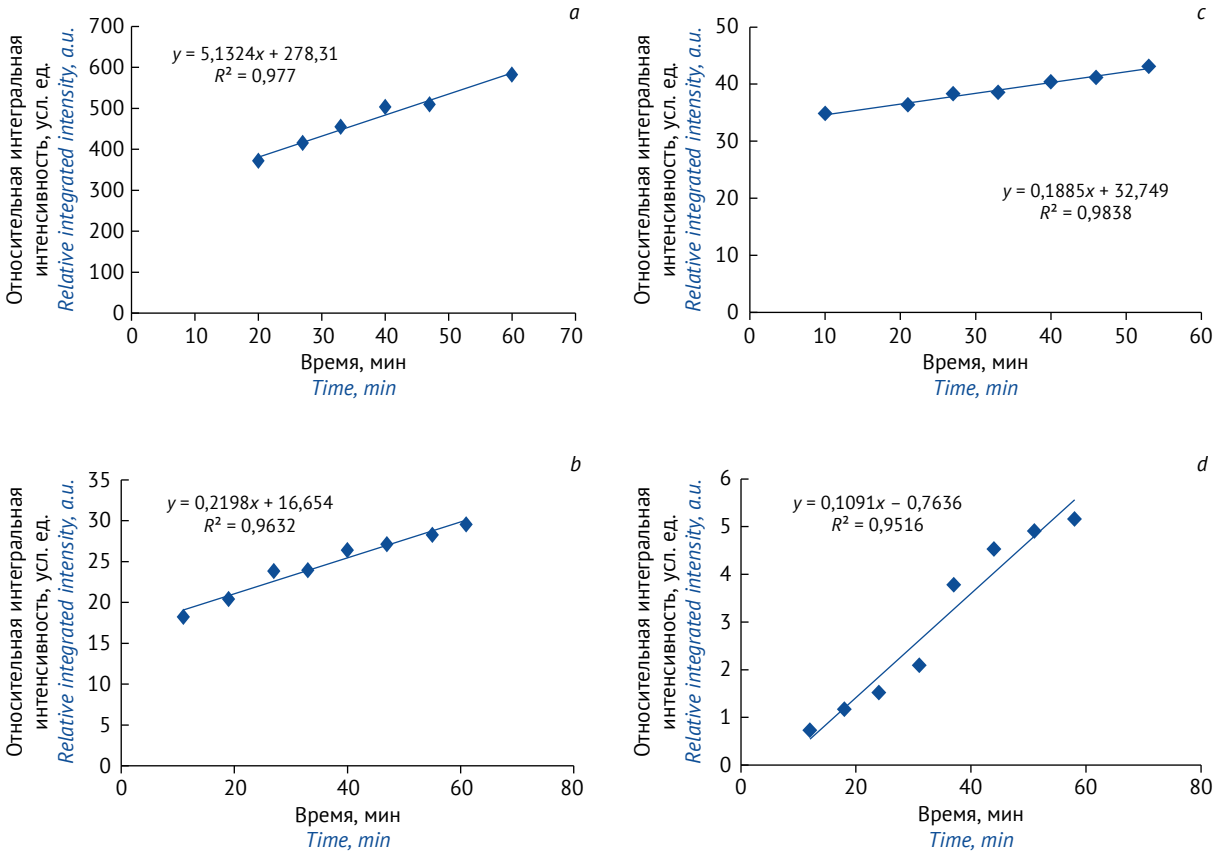


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. *Профиль растворения образцов гипромеллозы фталата: II — ММ 19,56 кДа (a); III — ММ 17,06 кДа (b); IV — ММ 24,23 кДа (c); V — ММ 14,41 кДа (d) во временном диапазоне 10–60 мин*

Fig. 3. *Dissolution profiles of hypromellose phthalate samples: II, MM 19.56 kDa (a); III, MM 17.06 kDa (b); IV, MM 24.23 kDa (c); and V, MM 14.41 kDa (d) in the time range of 10–60 min*

применения 1–80 кДа [10] соответствует критериям приемлемости, описанным в руководствах по валидации аналитических методик[11]. Ее систематическая погрешность (0,14%) не превышает доверительный интервал (2,26%), который включает в себя 100% значение отношения опорных и определенных величин ММ. Как следствие, систематические ошибки в определении молекулярных масс образцов ГПМЦФ различных производителей не оказывают сколько-нибудь значимого влияния на конечный результат.

Для понимания значимости разницы в молекулярных массах ГПМЦФ в 10 кДа был проведен сравнительный анализ кинетики растворения в водных буферных растворах при значениях pH 5,59. Профиль растворения стандартного образца ГПМЦФ (I) во временном диапазоне 0,2–24 ч с момента растворения описывается уравнением логарифмической функции, однако на начальной стадии растворения (не более 60 мин) кинетику растворения ГПМЦФ можно описать линейной функцией, у которой угол наклона прямой характеризует скорость растворения *(рис. 2)*.

Углы наклона прямых, описывающих профиль растворения ГПМЦФ в течение первого часа, равны 16°, 16°, 15°, 10° и 36° для образцов I–V соответственно *(рис. 2, 3)*. Наибольшей скоростью растворения характеризуется образец V с наименьшей ММ (14,41 кДа) (угол наклона 36°) *(рис. 3)*. Напротив, кривая, описывающая профиль растворения образца с максимальной ММ (24,23 кДа) (IV), характеризуется минимальным углом наклона (10°). Следовательно, увеличение ММ на 10 кДа замедляет скорость растворения более чем в 3,5 раза. Зависимость скорости растворения от значений ММ не является линейной: образцы I и II имеют близкие молекулярные массы и схожие профили растворения, в то время как у образца III меньше молекулярная масса и меньше скорость растворения. Очевидно, необходимо учитывать влияние на скорость растворения доли фталатных групп в полимере.

Заключение

Разработана методика оценки средней молекулярной массы гипромеллозы фталата методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. Результаты измерения с помощью данной методики сопоставимы с результатами измерения методом гельпроникающей хроматографии. Гипромеллозы фталат, входящий в состав кишечнорастворимых оболочек препаратов группы протонной помпы, различается по величине молекулярной массы полимера, наблюдаемый разброс в величинах молекулярных масс составил 10 кДа. Изменение молекулярной массы гипромеллозы фталата существенно влияет на скорость его растворения. Зависимость скорости растворения гипромеллозы фталата от его молекулярной массы носит нелинейный характер.

Следует отметить, что для вывода корреляционного уравнения скорости растворения гипромеллозы фталата как функции от двух переменных (молекулярной массы и доли фталатных групп полимера) необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Перцев ИМ, Зупанец ИА, Дегтярева ТВ. Правильное применение лекарств как фактор обеспечения их эффективности. *Провизор*. 2001;(6):19–22.
Pertsev IM, Zupanets IA, Degtyareva TV. Correct use of medicines as a factor in ensuring their effectiveness. *Pharmacist*. 2001;(6):19–22 (In Russ.).
2. Зауер А. Применение производных целлюлозы в технологии покрытия таблеток. *Фармацевтическая отрасль*. 2018;(5):76–8.
Sauer A. Application of cellulose derivatives in tablet coating technology. *Pharmaceutical Industry*. 2018;(5):76–8 (In Russ.).
3. Fukasawa M, Obara S. Molecular weight determination of hypromellose phthalate (HPMCP) using size exclusion chromatography with a multi-angle laser light scattering detector. *Chem Pharm Bull*. 2003;51(11):1304-1306.
https://doi.org/10.1248/cpb.51.1304
4. Kato T, Tokuya T, Takahashi A. Measurements of molecular weight and molecular weight distribution for water-soluble cellulose derivatives used in the film coating of tablets. *Kobunshi Ronbunshu*. 1982;39(4):293–8.
https://doi.org/10.1295/koron.39.293
5. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Северинова ЕЮ, Лутцева АИ. Применение метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для анализа полисахаридов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):24–40.
Kuz'mina NE, Moiseev SV, Severinova EYu, Lutseva AI. Diffusion-ordered NMR spectroscopy application for analysis of polysaccharides. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evalua-*

[11] Юргель НВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). М.: Спорт и культура — 2000; 2007.
Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литерра; 2008.

tion. 2022;2(1):24–40 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-24-40
6. Provencher SW. An eigenfunction expansion method for the analysis of exponential decay curves. *J Chem Phys*. 1976;64(7):2772–7. https://doi.org/10.1063/1.432601
7. Bakkour Y, Vermeersch G, Morcellet M, Boschin F, Martel B, Azaroual N. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycyclin-hyclate: NMR investigation of their characterisation and stability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2006;54(1–2):109–14. https://doi.org/10.1007/s10847-005-5108-7
8. Danielsson J, Jarvet J, Damberg P, Gräslund A. Two-site binding of β-cyclodextrin to the Alzheimer Aβ(1–40) peptide measured with combined PFG-NMR diffusion and induced chemical shifts. *Biochemistry*. 2004;43(20):6261–9. https://doi.org/10.1021/bi036254p
9. Маклаков АИ, Скирда ВД, Фаткуллин НФ. *Самодиффузия в растворах и расплавах*. Казань: Изд. Казанского государственного университета; 1987. Maklakov AI, Skirda VD, Fatkullin NF. *Self-diffusion in polymer solutions and melts*. Kazan: Kazan State University Publ.; 1987 (In Russ.).
10. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения средней молекулярной массы декстранов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(9):60–3. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-9-60-63
Moiseev SV, Kuz'mina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of a method of measuring mean molecular weight of dextrans by diffusion-ordered spectroscopy. *Pharm Chem J*. 2017;51(9):829–32. https://doi.org/10.1007/s11094-017-1701-5

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *С.В. Моисеев* — идея, подбор и анализ литературы, проведение экспериментальных исследований методом ЯМР, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, подготовка и оформление рукописи; *Н.Е. Кузьмина* — идея, планирование исследования, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, редактирование текста рукописи; *Е.Ю. Северинова* — пробоподготовка образцов, поиск литературы; *Н.Д. Бунятян* — вклад в концепцию, критический пересмотр текста рукописи; *В.А. Евтеев* — пробоподготовка образцов, подбор и анализ литературы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Sergey V. Moiseev* elaborated the study idea; selected and analysed literature; conducted NMR experiments; analysed, collated, and summarised experimental data; interpreted the study results; drafted and formatted the manuscript. *Natalia E. Kuz'mina* elaborated the study idea; planned the study; analysed, collated, and summarised experimental data; interpreted the study results; edited the manuscript. *Elena Yu. Severinova* prepared samples, selected and analysed literature. *Natalia D. Bunyatyan* contributed to the study concept and critically revised the manuscript. *Vladimir A. Evteev* prepared samples and searched literature.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1310-4477
MoiseevSV@expmed.ru
Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru
Северинова Елена Юрьевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5695-8048
Severinova@expmed.ru
Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0936-5551
Bunyatyan@expmed.ru
Евтеев Владимир Александрович
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6150-5796
Evteev@expmed.ru

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1310-4477
MoiseevSV@expmed.ru
Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru
Elena Yu. Severinova
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5695-8048
Severinova@expmed.ru
Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0936-5551
Bunyatyan@expmed.ru
Vladimir A. Evteev
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6150-5796
Evteev@expmed.ru

Поступила 01.03.2023
После доработки 04.04.2023
Принята к публикации 22.05.2023
Online first 07.07.2023

Received 1 March 2023
Revised 4 April 2023
Accepted 22 May 2023
Online first 7 July 2023

УДК 615.36:615.074:543.51:546.47
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-394-402
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

Ю.Н. Швецова,
А.А. Ерина,
Е.А. Хорольская ✉,
Е.С. Жигилей,
Н.Е. Кузьмина

Определение содержания цинка в инсулинах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Хорольская Елена Александровна***; *blinkovaea@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Одним из показателей качества препаратов инсулина является содержание в них цинка. В фармакопейном анализе цинк в инсулинах определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией (ПААС). В настоящее время многие производители лекарственных средств отдают предпочтение методу масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), который признан наиболее перспективным методом элементного анализа в фармацевтике и биомедицине.

Цель. Разработка и валидация методики определения цинка в инсулинах методом ИСП-МС.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использованы фармацевтические субстанции, суспензии для подкожного введения и растворы для инъекций инсулина человеческого, лизпро, аспарта и гларгина различных производителей. Содержание цинка определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой с использованием прибора Agilent 7900, фиксируя интенсивность сигналов ^{66}Zn.

Результаты. Проведено сравнение результатов определения содержания цинка в исследуемых образцах при использовании в качестве растворителей при пробоподготовке хлороводородной и азотной кислот. Подобраны условия эксперимента, обеспечивающие относительное стандартное отклонение *RSD* результата измерения не выше 2,5%. В диапазоне 0,4–1,6 мг/л оценены специфичность, линейность, правильность и прецизионность методики определения содержания цинка методом ИСП-МС. Проведено сравнение результатов определения содержания цинка в испытуемых образцах с использованием методик ПААС и ИСП-МС.

Выводы. Валидационные характеристики методики определения содержания цинка в инсулинах методом ИСП-МС соответствуют критериям приемлемости методики. Разработанная и валидированная методика рекомендуется к использованию при проведении экспертизы качества в системе здравоохранения России и в производстве на стадии выходного контроля готовой продукции.

Ключевые слова: цинк; инсулин; валидация методики; масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой; ИСП-МС; атомно-абсорбционная спектрометрия с пламенной атомизацией; ПААС

Для цитирования: 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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. Н.Е. Кузьмина — член редакционной коллегии журнала «Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» с 2021 года. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© Ю.Н. Швецова, А.А. Ерина, Е.А. Хорольская, Е.С. Жигилей, Н.Е. Кузьмина, 2023

Yulia N. Shvetsova,
Alina A. Erina,
Elena A. Khorolskaya ✉,
Evgeniya S. Zhigilei,
Natalia E. Kuz'mina

Determination of Zinc Content in Insulin Products by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Elena A. Khorolskaya;*** *blinkovaea@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. Zinc content is a quality attribute of insulin products. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation requires that it should be determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). However, many pharmaceutical manufacturers currently prefer inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), which is considered the most promising method for pharmaceutical and biomedical elemental analysis.

Aim. The study aimed to develop and validate an ICP-MS-based analytical procedure for zinc content determination in insulin products.

Materials and methods. The study focused on human insulin, insulin lispro, insulin aspart, and insulin glargine in the form of active substances, suspensions for subcutaneous injection, and solutions for injection from different manufacturers. Zinc content was determined on an Agilent 7900 ICP-MS; the analysis included ^{66}Zn signal intensity registration.

Results. The study compared the results of zinc content determination in test samples with either hydrochloric or nitric acid used as the solvent for sample preparation. The authors selected the experimental conditions to achieve relative standard deviations (*RSD*s) of not more than 2.5% for the measurements. The ICP-MS-based analytical procedure was validated for its specificity, linearity, accuracy, and precision in the range of 0.4–1.6 mg/L. The authors compared the measurements of zinc content made using FAAS and ICP-MS.

Conclusions. The ICP-MS-based analytical procedure for zinc content determination in insulin products meets the validation criteria. This analytical procedure, as developed and validated, may be used in the quality control of medicinal products in the Russian healthcare system and at the batch release stage of pharmaceutical manufacturing.

Key words: zinc; insulin; analytical method validation; inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS; flame atomic absorption spectrometry; FAAS

For citation: Shvetsova Yu.N., Erina A.A., Khorolskaya E.A., Zhigilei E.S., Kuz'mina N.E. Determination of zinc content in insulin products by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):394–402. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-394-402

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Natalia E. Kuz'mina has been a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2021. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Инсулиновая терапия — основной метод лечения сахарного диабета различной этиологии — заболевания высокой социальной значимости, являющегося наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями одной из основных причин смертности [1–5]. В медицинской практике в настоящее время применяют главным образом генно-инженерные препараты инсулина человека, произведенные с использованием технологии получения рекомбинантной ДНК из генетически стабильных и безопасных микроорганизмов[1] [5–7]. Одним из показателей качества таких препаратов является содержание в них цинка[2], который добавляют в препараты инсулина для улучшения

[1] ОФС.1.7.1.0017.18 Генно-инженерные препараты инсулина человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[2] Там же.

профиля действия [6–9]. Содержание цинка в препаратах инсулина нормируется и подлежит контролю как на стадии производства (выходной контроль готовой продукции), так и при проведении экспертизы качества лекарственных средств.

В фармакопейном анализе содержание цинка определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией (ПААС)[3]. Несомненное преимущество этого метода — дешевизна аппаратного оснащения и расходных материалов. Его недостатком является низкая чувствительность, которая не позволяет напрямую проводить определение многих тяжелых металлов (в том числе As и Hg, которые относятся к элементам 1-го класса токсичности). Другие недостатки ПААС — времязатратный последовательный одноэлементный анализ, узкий линейный динамический диапазон определения, а также необходимость использования при анализе горючего газа. В настоящее время наблюдается тенденция перехода к риск-ориентированной стратегии контроля содержания элементных примесей в лекарственных средствах (ЛС)[4], вследствие чего эти недостатки имеют принципиальное значение для производителей, чья продукция не ограничивается препаратами инсулина. В рамках риск-ориентированной стратегии неселективное определение суммарного содержания тяжелых металлов полуколичественным колориметрическим методом заменяется селективным количественным определением их содержания спектральными методами, в том числе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), который признан наиболее перспективным методом экспрессного многоэлементного анализа в фармацевтике и биомедицине [10, 11]. ИСП-МС характеризуется максимальной чувствительностью, широтой динамического диапазона и наиболее низкой границей определяемых концентраций по сравнению с другими фармакопейными методами элементного анализа.

Цель работы — разработка и валидация методики определения цинка в инсулинах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали фармацевтические субстанции инсулина лизпро (I) и (II), препараты инсулина человеческого генно-инженерного (инсулина-изофана (III), инсулина растворимого (IV), инсулина двухфазного (V)), инсулина лизпро двухфазного (VI), инсулина лизпро (VII), инсулина аспарта (VIII), инсулина гларгина (IX) в различных лекарственных формах.

В ходе исследования были использованы следующие реактивы: азотная кислота 69% аналитической степени чистоты (Scharlau), кислота хлороводородная 37% (PanReac AppliChem), стандартный образец цинка с аттестованным значением 1000 мг/дм^3 (CO_{1000}) (Inorganic Ventures, кат. № CGZN1), вода деионизованная, очищенная на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore, Франция).

Приготовление испытуемых растворов образцов I–IX проводили согласно фармакопейной методике[5], используя в качестве растворителя 0,01 М HNO_3 или 0,01 М HCl. Навески проб субстанций инсулина I и II отбирали с помощью электронных аналитических весов XPE205DR (Mettler Toledo AG, Швейцария, прибор поверен до 31.10.2023).

Приготовление образцов сравнения проводили следующим образом. Испытуемый раствор II разбавляли в 10 раз 0,01 М HNO_3, используя его в качестве холостой пробы. CO_{1000} цинка разбавляли 0,01 М HNO_3 до концентрации 10 мг/л (CO_{10}). В мерную колбу на 25 мл вносили 20 мл холостой пробы, добавляли варьируемый объем CO_{10} цинка (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 мл) и доводили объем до метки 0,01 М HNO_3. Получили образцы сравнения с концентрацией цинка 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 и 1,6 мг/л.

Содержание цинка в испытуемых образцах и образцах сравнения определяли методом ИСП-МС на приборе Agilent 7900 (Agilent, США, прибор поверен до 05.12.2023), фиксируя интенсивность сигналов изотопа ^{66}Zn. Параметры эксперимента: мощность плазмы — 1500 Вт; поток плазменного газа (аргон) — 15,0 л/мин, поток газа-носителя (аргон) — 1,0 л/мин, поток вспомогательного газа (аргон) — 0,9 л/мин, температура распылительной камеры Скотта — 2 °С, скорость подачи образца — 0,1 об./с. Для расчета концентраций цинка применяли метод калибровочной кривой. Готовили по три параллельных испытуемых раствора для каждого образца; каждый испытуемый раствор исследовали в 6 повторностях. Итоговые

[3] ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[4] ОФС 2.3.10.0. Примеси элементов. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. 2023.
Q3D(R2) Guideline for Elemental Impurities. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; 2022.
[5] ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

величины концентраций определяли как среднее арифметическое определенных значений. Стабильность работы прибора подтверждали, оценивая относительное стандартное отклонение (*RSD*) результата измерения содержания цинка в образце сравнения с концентрацией 0,8 мг/л для 6 реплик (значение *RSD* при такой концентрации не должно превышать 1,4%, аналогично определению методом ПААС[6]).

Статистическая обработка результатов была произведена в программе Microsoft Office Excel 2007 с установленным пакетом «Анализ данных».

Обсуждение результатов

В фармакопейной методике определения цинка в инсулине методом ПААС в качестве растворителя используют хлороводородную кислоту, которая является прекурсором наркотических средств и психотропных веществ[7]. Применение прекурсоров накладывает ряд ограничений на работу с ними (определенный порядок допуска лиц к работе с прекурсорами; соответствие особым требованиям и охрана помещений, в которых осуществляется работа с прекурсорами; особые требования к хранению прекурсоров, ежемесячная инвентаризация прекурсоров и т.д.)[8]. Поэтому на первом этапе мы изучали возможность замены хлороводородной кислоты азотной. Азотная кислота чаще всего используется при анализе методом ИСП-МС, так как она, в отличие от хлороводородной кислоты, не образует соединений, вызывающих полиатомные наложения сигналов[9]. Кроме того, ее легко очистить от неорганических примесей путем перегонки в лабораторных условиях.

В *таблице 1* представлены результаты измерения содержания цинка методом ИСП-МС в испытуемых образцах I и II с использованием на стадии пробоподготовки 0,01 М растворов хлороводородной и азотной кислот. Измерения проводили по изотопу ^{66}Zn с природным содержанием 27,9%, так как определение наиболее распространенного изотопа ^{64}Zn (48,6%) затруднено полиатомными наложениями, содержащими ионы серы[10] ($^{32}S^{16}O^{16}O^{+}$ и $^{32}S^{32}S^{+}$), которая входит в состав инсулина. Результаты измерения содержания цинка, полученные с использованием этих кислот, совпадают с учетом доверительных интервалов. Все последующие измерения проводили с использованием HNO_3.

Варьируя время стабилизации плазмы (от 30 до 240 с), число реплик (от 3 до 6) и время экспозиции (от 0,1 до 1 с), были подобраны оптимальные условия эксперимента. Опытным путем установлено, что значение *RSD* результата измерения не превышает 2,5% при времени

Таблица 1. *Результаты определения содержания цинка в образцах фармацевтических субстанций инсулина лизпро методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой с использованием HCl и HNO_3 в качестве растворителей*

Table 1. *Zinc content measured by inductively coupled plasma mass spectrometry in samples of insulin lispro active substances prepared using HCl or HNO_3 as solvents*

Образец	Содержание Zn, % (*RSD*, %)		
	№ измерения	HCl	HNO_3
I (Zn 0,50%*)	1	0,50	0,49
	2	0,48	0,47
	3	0,45	0,48
	Среднее	0,48±0,06 (4,8)	0,48±0,02 (1,7)
II (Zn 0,62%)	1	0,68	0,67
	2	0,71	0,67
	3	0,71	0,65
	Среднее	0,70±0,04 (2,5)	0,66±0,01 (0,9)

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

* *Опорное значение, представленное в сертификате качества.*

[6] ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[7] Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.1998 № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».
[8] Федеральный закон Российской Федерации от 08.01.1998 № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах».
[9] Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003.
[10] Там же.

стабилизации плазмы 1 мин, времени экспозиции 1 с и 6 репликах.

На следующем этапе проводили валидацию методики определения содержания цинка в различных лекарственных формах инсулина методом ИСП-МС. Специфичность данной методики обусловлена отсутствием спектральных наложений изотопа ^{66}Zn с полиатомными ионами других элементов, присутствующими в биологических средах[11]. Линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторную прецизионность определяли в диапазоне концентраций 0,4–1,6 мг/л (диапазон применения фармакопейной методики определения цинка методом ПААС) в соответствии с нормативной документацией Евразийского экономического союза[12].

При оценке линейности изучали зависимость интенсивности сигнала *m/z*=66 от концентрации цинка, внесенного в образец сравнения *(табл. 2, рис. 1)*. В соответствии с фармакопейными требованиями[13] критериями приемлемости линейной зависимости является коэффициент корреляции $r \geqslant 0{,}99$ и отношение относительных стандартных отклонений для наименьшего и наибольшего калибровочного уровня 0,5–2,0 (в нашем случае 0,6). Из приведенных в *таблице 2* и на *рисунке 1* данных следует, что валидируемая методика характеризуется приемлемой линейностью.

Правильность при отсутствии сертифицированных стандартных образцов верифицируют, проверяя открываемость на образцах сравнения. В случае методик количественного определения методом ИСП-МС она должна составлять 90–110%[14]. Открываемость валидируемой методики оценивали, используя данные, полученные в ходе установления линейности *(табл. 3)*.

Таблица 2. *Результаты оценки линейности валидируемой методики определения содержания цинка*

Table 2. *Results of zinc quantification method validation for linearity*

Раствор сравнения	Концентрация Zn, мг/л	Интенсивность сигнала, имп/с	Среднее значение, имп/с (*RSD*)
1	0,4	5985756	5988316 (0,494)
		6019109	
		5960084	
2	0,6	8879646	8887376
		8832306	
		8950175	
3	0,8	11777286	11885712
		11919669	
		11960180	
4	1,0	14718226	14799564
		14819979	
		14860486	
5	1,2	17863753	17883277
		17887739	
		17898340	
6	1,6	23506130	23546232 (0,817)
		23755460	
		23377105	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *RSD — относительное стандартное отклонение.*

[11] Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003.

[12] Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Утверждено решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

[13] ОФС.2.1.2.55. Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. 2023.

[14] Там же.

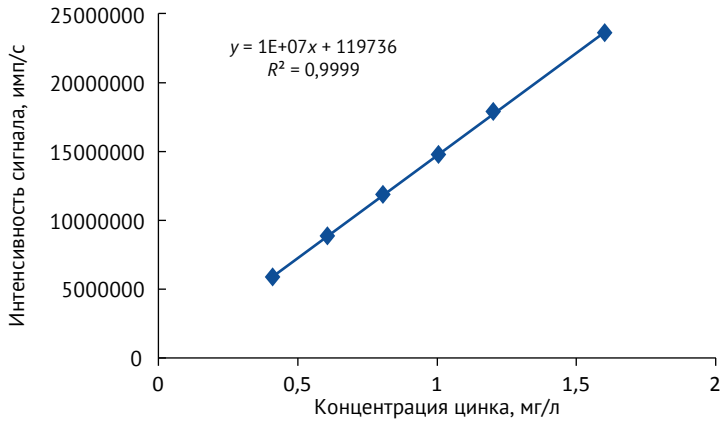


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Линейная зависимость интенсивности сигнала m/z=66 от концентрации цинка в валидационном образце. R^2 — коэффициент достоверности аппроксимации*

Fig. 1. *Linear function of signal intensity at m/z=66 vs zinc concentration in the validation sample. R^2 — approximation confidence factor*

Таблица 3. *Результаты оценки правильности валидируемой методики определения содержания цинка*

Table 3. *Results of zinc quantification method validation for accuracy*

Образец сравнения	Введено, мг/л	Найдено, мг/л	Открываемость, %
1	0,4	0,401	100,2
		0,403	100,8
		0,399	99,8
2	0,6	0,596	99,3
		0,593	98,8
		0,601	100,2
3	0,8	0,792	99,0
		0,801	100,1
		0,804	100,5
4	1,0	0,990	99,0
		0,997	99,7
		1,000	100,0
5	1,2	1,202	100,2
		1,204	100,3
		1,205	100,4
6	1,6	1,583	98,9
		1,600	100,0
		1,575	98,4

Статистические характеристики	
Среднее значение открываемости, %	99,8
Систематическая погрешность, %	0,2
Стандартное отклонение, %	0,67
Коэффициент вариации, %	0,67
Доверительный интервал (P=0,95%), %	0,33

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Валидируемая методика соответствует фармакопейным требованиям, предъявляемым к открываемости *(табл. 3)*. Следует отметить, что она соответствует и более жестким критериям правильности аналитических методик, приведенным в соответствующей методической литературе:

1) доверительный интервал включает 100% значение открываемости[15];
2) систематическая погрешность не превышает свой доверительный интервал[16].

Прецизионность оценивали на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности *(табл. 4)*. Фактические значения статистических критериев Фишера и Стьюдента оценивали на уровне значимости 95%. Степень свободы (df) определяли по формуле (1).

$$df = n1 + n2 - 2, \quad (1)$$

где степени свободы двух выборок n1=n2=9.

Из данных *таблицы 4* следует, что фармакопейное требование к повторяемости аналитической методики измерения методом ИСП-МС (коэффициент вариации не более 5% для количественного определения содержания примесей[17]) выполняется.

Поскольку фармакопейные требования к приемлемости показателей внутрилабораторной прецизионности отсутствуют, мы руководствовались

Таблица 4. *Результаты оценки повторяемости и внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики определения содержания цинка*

Table 4. *Results of zinc quantification method validation for repeatability and intermediate precision*

Образец сравнения	Введено, мг/л	Оператор 1		Оператор 2	
		Найдено, мг/л	Открываемость, %	Найдено, мг/л	Открываемость, %
1	0,4	0,401	100,2	0,399	99,7
		0,403	100,8	0,403	100,6
		0,399	99,8	0,405	101,1
3	0,8	0,792	99,0	0,801	100,1
		0,801	100,1	0,791	98,9
		0,804	100,5	0,810	101,3
6	1,6	1,583	98,9	1,588	99,3
		1,600	100,0	1,595	99,7
		1,575	98,4	1,608	100,5

Статистические характеристики	Оператор 1	Оператор 2
Среднее значение открываемости, %	99,7	100,1
Стандартное отклонение, %	0,78	0,77
Коэффициент вариации, %	0,78	0,77
Доверительный интервал (P=0,95%), %	0,60	0,59
Объединенное среднее значение открываемости, %	99,9	
Объединенное стандартное отклонение, %	0,80	
Объединенный коэффициент вариации, %	0,80	
Объединенный доверительный интервал, %	0,40	
F-критерий Фишера ($F_{табл}$=3,44)	1,08	
t-критерий Стьюдента ($t_{табл}$=2,12)	1,03	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

[15] Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литтерра, 2008.
[16] Юргель НВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). М.: Спорт и культура-2000; 2007.
[17] ОФС.2.1.2.55. Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. 2023.

Таблица 5. *Сравнение результатов измерения содержания цинка методами атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией (ПААС) и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС)*

Table 5. *Comparison of zinc content measurements by flame atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry*

Образец	Лекарственная форма	Международное непатентованное наименование	Содержание Zn (*RSD*, %)	
			ПААС	ИСП-МС
I	Субстанция	Инсулин лизпро	0,48±0,060% (4,8)	0,48±0,020% (1,7)
II	Субстанция	Инсулин лизпро	0,70±0,040% (2,50)	0,66±0,010% (0,90)
III	Суспензия для подкожного введения	Инсулин человеческий генно-инженерный (инсулин-изофан)	14,49±1,9 мг/л (1,45)	14,53±2,0 мг/л (1,52)
IV	Раствор для инъекций	Инсулин человеческий генно-инженерный (инсулин растворимый)	13,72±1,9 мг/л (1,57)	14,39±1,3 мг/л (0,99)
V	Суспензия для подкожного введения	Инсулин человеческий генно-инженерный (инсулин двухфазный)	20,56±0,33 мг/л (0,64)	21,32±2,1 мг/л 1,11)
VI	Суспензия для подкожного введения	Инсулин лизпро двухфазный	25,09±0,61 мг/л (0,97)	25,82±0,82 мг/л (1,02)
VII	Раствор для подкожного и внутривенного введения	Инсулин лизпро	22,85±0,74 мг/л (0,36)	23,69±0,77 мг/л (0,37)
VIII	Раствор для подкожного введения	Инсулин аспарт	19,30±0,060 мг/л (0,04)	20,42±1,8 мг/л (0,97)
IX	Раствор для подкожного введения	Инсулин гларгин	28,34±1,3 мг/л (0,54)	29,98±3,9 мг/л (1,46)

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание: *RSD — относительное стандартное отклонение.*

рекомендациями, представленными в методической литературе[18], и сравнили фактические значения статистических критериев Фишера и Стьюдента с их табличными значениями (максимальными значениями критериев под влиянием случайных факторов при текущих степенях свободы и уровне значимости 95%). Фактические значения критериев Фишера и Стьюдента существенно ниже табличных значений *(табл. 4)*, следовательно, различия результатов измерения двух операторов статистически незначимы и валидируемая методика характеризуется приемлемой внутрилабораторной прецизионностью.

Следует отметить, что результаты измерения содержания цинка в испытуемых образцах, полученные по фармакопейной методике с использованием ПААС и разработанной методике ИСП-МС, совпадают с учетом доверительных интервалов *(табл. 5)*.

Заключение

В результате проведенного исследования разработана методика определения содержания цинка в инсулине методом ИСП-МС. Специфичность методики основана на отсутствии спектральных наложений сигнала изотопа ^{66}Zn и сигналов полиатомных ионов других элементов биологической матрицы. Показано, что в диапазоне применения (0,4–1,6 мг/л) данная методика характеризуется приемлемыми линейностью, правильностью, повторяемостью и внутрилабораторной прецизионностью. Рекомендуется использовать разработанную и валидированную методику в качестве альтернативной при проведении экспертизы качества лекарственных средств и в производстве на стадии выходного контроля готовой продукции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Викулова ОК, Железнякова АВ, Исаков МА, Сазонова ДВ и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. *Сахарный диабет*. 2023;26(2):104–23. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, et al. Diabetes mellitus in the Russian Federation: dynamics of epidemiological indicators according to the Federal Register of Diabetes Mellitus for the period 2010–2022. *Diabetes Mellitus*. 2023;26(2):104–23 (In Russ.). https://doi.org/10.14341/DM13035
2. Liu C, De Roza J, Ooi CW, Mathew BM, Tang WE. Impact of patients' beliefs about insulin on acceptance and adherence to insulin therapy: a qualitative study in primary care. *BMC Prim Care*. 2022;23:15. https://doi.org/10.1186/s12875-022-01627-9
3. Асфандиярова НС. Смертность при сахарном диабете 2 типа. *Сахарный диабет*. 2015;18(4):12–21.

[18] Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литтерра; 2008.

Asfandiyarova NS. A review of mortality in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus*. 2015;18(4):12–21 (In Russ.). https://doi.org/10.14341/DM6846
4. Кыртиков СИ, Бекбаева ИВ, Ахматова АН, Кузьмина ЕА, Муковникова ЕВ, Оразмурадова АА, Апресян АА. Современный взгляд на лечение и профилактику гестационного сахарного диабета. *Акушерство и гинекология. Новости, Мнения, Обучение*. 2023;11(Спецвыпуск):115–21.
Kyrtikov SI, Bekbaeva IV, Akhmatova AN, Kuzmina EA, Mukovnikova EV, Orazmuradova AA, Apresyan AA. Modern view on the treatment and prevention of gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology. News, Opinions, Training*. 2023;11(Supplement):115–21 (In Russ.). https://doi.org/10.33029/2303-9698-2023-11-suppl- 115-121
5. Мохорт ТВ. Препараты инсулина — 100 лет открытий и успеха. *Медицинские новости*. 2021;(6):5–12.
Mokhort TV. Insulin preparations — 100 years of discovery and success. *Medical News*. 2021;(6):5–12 (In Russ.). EDN: UXIKQX
6. Alyas J, Rafiq A, Amir H, Khan SU, Sultana T, Ali A, et al. Human insulin: history, recent advances, and expression systems for mass production. *Biomed Res Ther*. 2021;8(9):4540–61. https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i9.692
7. Bolli GB, Cheng AY, Owens DR. Insulin: evolution of insulin formulations and their application in clinical practice over 100 years. *Acta Diabetologica*. 2022;59(9):1129–44. https://doi.org/10.1007/s00592-022-01938-4
8. Кононенко ИВ, Смирнова ОМ. Новый препарат в эволюции инсулинов длительного действия. *Медицинский совет*. 2017;(20):160–5.
Kononenko IV, Smirnova OM. New drug in the evolution of long-acting insulins. *Medical Council*. 2017;(20):160–5 (In Russ.). https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-20-160-165
9. Jarosinski MA, Dhayalan B, Chen Y-S, Chatterjee D, Varas N, Weiss MA. Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Mol Metab*. 2021;52:101325 https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101325
10. Balaram V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals — Status, challenges and moving frontiers. *TrAC — Trends Anal Chem*. 2016;80:83–95. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.001
11. Nageswara Rao R, Kumar Talluri MVN. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(1):1–13. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.004

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Ю.Н. Швецова* — идея, концепция и дизайн исследования, анализ экспериментальных данных; *А.А. Ерина* и *Е.С. Жигилей* — пробоподготовка образцов, проведение экспериментальных исследований; *Е.А. Хорольская* — проведение экспериментальных исследований, анализ данных литературы; *Н.Е. Кузьмина* — интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Yulia N. Shvetsova* elaborated the idea, concept, and design of the study and analysed experimental data. *Alina A. Erina* and *Evgeniya S. Zhigilei* prepared samples and conducted experiments. *Elena A. Khorolskaya* conducted experiments and analysed literature data. *Natalia E. Kuz'mina* interpreted the study results and drafted the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Швецова Юлия Николаевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2125-6174
shvetsovajn@expmed.ru
Ерина Алина Андреевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7488-7204
erina@expmed.ru
Хорольская Елена Александровна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Жигилей Евгения Сергеевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1637-9081
lismanes@expmed.ru
Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru

Yulia N. Shvetsova
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2125-6174
shvetsovajn@expmed.ru
Alina A. Erina
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7488-7204
erina@expmed.ru
Elena A. Khorolskaya
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Evgeniya S. Zhigilei
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1637-9081
lismanes@expmed.ru
Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru

Поступила 21.06.2023
После доработки 17.07.2023
Принята к публикации 06.09.2023

Received 21 June 2023
Revised 17 July 2023
Accepted 6 September 2023

УДК 615.07:577.175.722:543.421:54.062
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-403-410
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

А.А. Ерина,
В.М. Щукин ✉,
Е.А. Хорольская,
Н.Е. Кузьмина

Модификация методики определения цинка в инсулинах методом атомно-абсорбционной спектрометрии

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Щукин Виктор Михайлович;*** *Schukin@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Хлороводородная кислота, используемая на стадии пробоподготовки при определении содержания цинка в субстанциях и препаратах инсулина методом атомно-абсорбционной спектрометрии, является прекурсором наркотических веществ и психотропных препаратов. Исключение прекурсоров из лабораторной практики заметно снижает трудозатраты при проведении анализа.

Цель. Модификация фармакопейной методики определения цинка в инсулинах, направленная на исключение прекурсоров наркотических веществ, и оценка применимости модифицированной методики для анализа препаратов инсулина.

Материалы и методы. Фармацевтические субстанции и препараты инсулина различных лекарственных форм и дозировок. Определение содержания цинка проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Agilent 240FS при характеристической длине волны 213,86 нм.

Результаты. Подобраны условия проведения элементного анализа (концентрация азотной кислоты, ширина щели монохроматора, время стабилизации пламени), обеспечивающие соответствие фармакопейным требованиям к определению цинка в инсулинах (*RSD*≤1,4% для стандартного раствора цинка с концентрацией 0,8 мг/дм^3, коэффициент корреляции калибровочного графика не менее 0,99). Проведено сравнение результатов измерения содержания цинка в исследуемых образцах при использовании в качестве растворителя хлороводородной или азотной кислоты. Сравнение модифицированной методики с фармакопейной не выявило существенного расхождения в результатах определения цинка при замене хлороводородной кислоты на азотную.

Выводы. Модифицированная методика позволяет проводить анализ содержания цинка в различных лекарственных формах инсулина без использования прекурсоров наркотических веществ.

Ключевые слова: цинк; инсулин; атомно-абсорбционная спектрометрия; азотная кислота; хлороводородная кислота; фармакопейная методика

Для цитирования: Ерина А.А., Щукин В.М., Хорольская Е.А., Кузьмина Н.Е. Модификация методики определения 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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. Н.Е. Кузьмина — член редакционной коллегии журнала «*Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*» с 2021 года, остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© А.А. Ерина, В.М. Щукин, Е.А. Хорольская, Н.Е. Кузьмина, 2023

Alina A. Erina,
Victor M. Shchukin ✉,
Elena A. Khorolskaya,
Natalia E. Kuz'mina

Modification of the Method for the Determination of Zinc Content in Insulins by Atomic Absorption Spectrometry

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Victor M. Shchukin;*** *Schukin@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. Zinc quantification in insulin active substances and preparations by atomic absorption spectrometry requires a sample preparation procedure using hydrochloric acid, a narcotic and psychotropic precursor. The exclusion of precursors from laboratory practice significantly reduces labour costs during analysis.
Aim. This study aimed to modify the pharmacopoeial method for quantifying zinc in insulins with a view to eliminating drug precursors and to evaluate the applicability of the modified method across different insulin preparations.
Materials and methods. The study considered insulin active substances and preparations of various types, dosage forms, and strengths. Zinc content determination involved using an Agilent 240FS atomic absorption spectrometer at a characteristic wavelength of 213.86 nm.
Results. The authors selected the conditions for elemental analysis (nitric acid concentration, monochromator slit width, and flame stabilisation time) corresponding to the pharmacopoeial requirements for quantifying zinc in insulins (*RSD* ⩽1.4%, standard zinc solution with a concentration of 0.8 mg/dm^3, and calibration curve correlation coefficient ⩾0.99). The study compared zinc content measurements in the studied insulin samples with hydrochloric acid or nitric acid as a solvent; it did not reveal any significant differences between the results obtained by the pharmacopoeial method and the modified method.
Conclusions. The modified method enables analysts to quantify zinc in insulin preparations in various dosage forms without drug precursors.

Key words: zinc; insulin; atomic absorption spectrometry; nitric acid; hydrochloric acid; method modification

For citation: Erina A.A., Shchukin V.M., Khorolskaya E.A., Kuz'mina N.E. Modification of the method for the determination of zinc content in insulins by atomic absorption spectrometry. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):403–410. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-403-410

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Natalia E. Kuz'mina has been a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2021. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Развитие сахарного диабета (СД) связано с нарушением секреции инсулина, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови [1]. Протекание этой болезни связано со многими тяжелыми осложнениями [2–4] вплоть до гипергликемической комы с возможным летальным исходом [5]. Связь между СД и многими другими заболеваниями имеет двунаправленный взаимоотягощающий характер [6]. По оценкам Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation), в 2021 г. в мире заболеваемость СД в возрастной группе 20–79 лет составила примерно 537 млн человек, при этом прогнозируется, что к 2045 г. распространенность данного заболевания вырастет до 783 млн человек [7]. Общая численность пациентов с СД в Российской Федерации, состоящих на диспансерном учете[1] на 01.01.2021, составила 4,8 млн человек, или 3,23% населения страны [8].

Подсчитано, что до 40% людей с СД во всем мире (150–200 млн) нуждаются в инсулинотерапии [1]. Применение инсулина остается абсолютным

[1] По данным Федерального регистра сахарного диабета. https://sd.diaregistry.ru/

требованием для поддержания жизни пациентов с диабетом 1 типа, а также требуется некоторым пациентам с диабетом 2 типа из-за снижения секреции инсулина [9, 10].

Практически все современные препараты инсулина содержат соединения цинка [9, 11, 12] (обычно в виде хлорида [13–15], ацетата [14, 16] или оксида [17, 18]). Присутствие цинка влияет на время начала и продолжительность действия этих препаратов [12, 13, 15, 19]. Количественное содержание цинка зависит от используемой лекарственной формы и варьируется производителем в зависимости от целей терапии, поэтому контроль содержания данного элемента необходим для обеспечения качества препаратов инсулина.

Согласно фармакопейным требованиям[2], определение содержания цинка в инсулинах проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией (ПААС), при этом методикой предусмотрено использование на стадии пробоподготовки хлороводородной кислоты в качестве растворителя. Данная методика хорошо отработана и валидирована [20–22]. Хлороводородная кислота является прекурсором наркотических веществ и психотропных препаратов. Применение прекурсоров налагает ряд ограничений[3] на работу лаборатории: определенный порядок допуска лиц к работе; особые требования к помещениям, их охрана; особые требования к хранению и инвентаризации прекурсоров и т.д. Исключение прекурсоров из лабораторной практики заметно снижает трудозатраты при проведении анализа. Представляется актуальным заменить хлороводородную кислоту азотной, которая не является прекурсором. Азотная кислота наиболее часто используется при элементном анализе биологических объектов, так как является хорошим окислителем для их растворения [23]. Кроме того, она легко поддается очистке от элементных примесей [23, 24].

Цель работы — модификация фармакопейной методики определения цинка в инсулинах, направленная на исключение использования прекурсоров наркотических веществ, и оценка применимости модифицированной методики для анализа препаратов инсулина.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы 23 образца инсулина различных лекарственных форм и дозировок, среди которых 1 субстанция инсулина, 5 суспензий для подкожного введения, 8 растворов для внутривенного и подкожного введения, 3 раствора для инъекций и 3 раствора для подкожного введения производства России, Франции и Дании.

В работе использовали следующие реактивы: хлороводородная кислота концентрированная 35% для элементного анализа (PanReac AppliChem), азотная кислота 67–70% для элементного анализа (Fisher Chemical), одноэлементные стандартные растворы цинка с концентрацией 1000 мг/л (Sigma-Aldrich). Для приготовления стандартных и испытуемых растворов использовали деионизованную воду, полученную на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore).

Пробоподготовку образцов осуществляли согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)[4], используя в качестве растворителя хлороводородную или азотную кислоты. Определение цинка проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Agilent 240FS (Agilent Technologies), регистрируя атомное поглощение при характеристической длине волны 213,86 нм. Использовали одношелевую горелку шириной 100 мм и пламя воздух–ацетилен (13,5 и 2,0 л/мин соответственно). Измерение абсорбции проводили в следующих условиях: сила тока лампы 5,0 мА, ширина щели монохроматора 1,0 нм, задержка перед анализом 10 с, мануальный режим ввода пробы. Измерения для стандартных и рабочих растворов проводили в шести повторностях, результаты измерения трех параллельных проб рабочих растворов усредняли, диапазон калибровки составлял 0,2–1,6 мг/л. Методом наименьших квадратов был проведен регрессионный анализ и рассчитаны коэффициенты наклона прямой калибровочного графика.

Изучение кратковременной и долговременной стабильности работы прибора (стабильность интегрального сигнала абсорбции и базовой линии) проводили на стандартном растворе цинка с концентрацией 0,8 мг/л (ppm).

[2] ОФС 2.1.5.18. Цинк в инсулине. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. 1. Ч. 2. 2023.
ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
Insulin injection. United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2023.
Monograph 04/2021:0854. Insulin preparations, injectable. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg; 2023.

[3] Федеральный закон Российской Федерации от 08.01.1998 № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах».

[4] ОФС.1.4.1.0019.15 Настойки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Кратковременную стабильность оценивали, определяя среднеквадратичное отклонение (*RSD*) для результатов пяти параллельных измерений интенсивности сигнала иона цинка, каждое в шести повторностях (всего 30 определений). Долговременную стабильность оценивали как отношение результата определения концентрации цинка в растворе после 20 мин эксплуатации прибора (контрольное измерение) к результату определения его концентрации в том же растворе непосредственно после построения калибровочного графика.

В качестве номинального значения содержания цинка в образцах инсулина использовали результат, полученный при анализе этого элемента по фармакопейной методике. Статистическая обработка результатов была проведена при помощи программы Microsoft Office Excel 2007 с установленным пакетом «Анализ данных».

Результаты и обсуждение

Поскольку целью модификации фармакопейной методики определения цинка в инсулинах методом ПААС была замена хлороводородной кислоты на азотную на стадии подготовки проб к анализу, на первом этапе исследования было проведено сравнение кратковременной и долговременной стабильности работы оборудования с изменением концентрации азотной кислоты в диапазоне 0,01–0,25 ммоль/л. Оборудование калибровали в диапазоне содержания ионов цинка 0,2–1,6 мг/л, согласно условиям, приведенным в ГФ РФ[5]. Коэффициент корреляции во всех случаях составлял более 0,99. Результаты определения стабильности работы оборудования представлены в *таблице 1*.

Было установлено, что увеличение концентрации азотной кислоты приводит к незначительному повышению долговременной стабильности, при этом заметно снижается кратковременная стабильность. Согласно требованиям ГФ РФ[6], прибор считается пригодным к работе, если *RSD*, рассчитанное для 6 последовательных измерений стандартного раствора с концентрацией 0,8 ppm, составляет не более 1,4% (кратковременная стабильность). По данным *таблицы 1* такое значение *RSD* было получено при использовании для пробоподготовки азотной кислоты в концентрации 0,01 ммоль/л. Результат соответствующего контрольного измерения концентрации цинка в стандартном растворе (97,6%) соответствует требованиям Фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС) для правильности методики (90–110%)[7] при использовании атомно-абсорбционного метода анализа (долговременная стабильность). Таким образом, полное соответствие фармакопейным требованиям к стабильности работы прибора наблюдается при использовании азотной кислоты 0,01 ммоль/л.

На втором этапе исследования, варьируя ширину щели монохроматора (0,2–1,0 нм) и время предварительной стабилизации пламени (от 5 до 20 с), выбрали оптимальные условия эксперимента. Известно, что ширина щели влияет на соотношение сигнал/шум и дрейф установленной длины волны [25]. Экспериментально нами было установлено, что оптимальная интенсивность сигнала и более высокое соотношение сигнал/шум достигаются при значении ширины щели в 1,0 нм.

Таблица 1. *Влияние концентрации азотной кислоты на стабильность работы спектрометра*

Table 1. *Effect of nitric acid concentration on the operational stability of the spectrometer*

Концентрация азотной кислоты, ммоль/л	Кратковременная стабильность	Долговременная стабильность		
	Относительное стандартное отклонение (*RSD*), %	Концентрация цинка в растворе в начале испытания, ppm	Концентрация цинка в растворе в конце испытания, ppm	Соотношение концентраций цинка в начале и в конце испытания, %
0,01	1,40	0,80±0,01	0,78±0,01	97,6
0,05	1,93	0,81±0,004	0,79±0,01	98,4
0,1	2,88	0,80±0,01	0,79±0,01	98,8
0,15	2,92	0,81±0,01	0,80±0,02	99,0
0,25	3,38	0,81±0,01	0,80±0,01	99,3

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

[5] ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[6] Там же.
[7] ОФС 2.1.2.22. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. I. Ч. 1. 2023.

Стабилизация пламени обеспечивает равномерность образования атомного пара и является решающим фактором, определяющим правильность, сходимость и повторяемость результатов атомно-абсорбционного анализа [26]. Этот параметр не установлен фармакопейными требованиями, поэтому выбор времени стабилизации пламени был одним из важных этапов данного исследования. На *рисунке 1* представлен график зависимости *RSD* результата измерения концентрации цинка в трех стандартных растворах (0,2, 0,8 и 1,6 ppm) от времени стабилизации пламени.

Показано, что время стабилизации пламени больше 10 с не приводит к существенному снижению значений *RSD* результатов определения концентрации цинка в растворах, при этом время эксперимента увеличивается.

Модифицированную методику использовали для определения содержания цинка в испытуемых образцах инсулина. Правильность результатов измерения оценивали относительно референсных значений, за которые в соответствии с требованиями ЕАЭС[8] принимали результаты измерения, полученные по фармакопейной методике[9] с использованием соляной кислоты *(табл. 2)*.

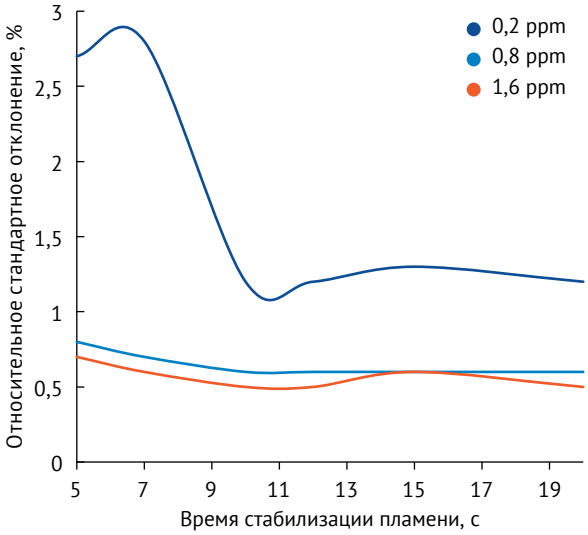


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Зависимость относительного стандартного отклонения результата измерения содержания цинка в стандартных растворах с концентрацией 0,2, 0,8 и 1,6 ppm от времени стабилизации пламени*

Fig. 1. *Relative standard deviation between the results of zinc quantification in standard solutions with a concentration of 0.2, 0.8, and 1.6 ppm as a function of flame stabilisation time*

Значение *RSD* результатов измерений цинка во всех испытуемых образцах *(табл. 2)* составляет не более 2,5%. Правильность модифицированной методики удовлетворяет требованиям Фармакопеи ЕАЭС к методикам количественного определения с использованием атомно-абсорбционной спектрометрии (90–110%)[10]. Следовательно, замена хлороводородной

Таблица 2. *Результаты определения цинка в различных типах инсулина с использованием фармакопейной и модифицированной методик*

Table 2. *Results of zinc quantification in various insulins using pharmacopoeial and modified methods*

Международное непатентованное наименование, дозировка препарата	Наименование образца	Фармакопейная методика (пробоподготовка с HCl)	Модифицированная методика (пробоподготовка с HNO_3)	
		Концентрация цинка, мг/л (*RSD*, %)	Концентрация цинка, мг/л (*RSD*, %)	Правильность, %
Суспензии для подкожного введения				
Инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный, 100 МЕ/мл	Образец 1	19,6±0,7 (0,38)	19,8±0,2 (0,12)	101,17
	Образец 2	20,7±0,3 (0,16)	20,6±3,2 (1,70)	99,52
	Образец 3	20,6±0,3 (0,64)	20,4±0,4 (0,83)	98,98
	Образец 4	19,4±6,7 (3,84)	18,6±0,8 (0,48)	95,86
Инсулин-изофан человеческий генно-инженерный, 100 МЕ/мл	Образец 5	23,9±0,7 (0,32)	24,5±1,4 (0,61)	102,56
	Образец 6	24,7±0,7 (0,31)	25,0±1,2 (0,55)	100,93
	Образец 7	14,5±1,9 (1,45)	14,3±2,1 (1,66)	98,76
Инсулин лизпро двухфазный, 100 МЕ/мл	Образец 8	25,1±0,6 (0,97)	25,4±0,8 (1,31)	100,55

[8] Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».
[9] ОФС.1.2.3.0018.15 Определение цинка в инсулине. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[10] ОФС 2.1.2.22. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. I. Ч. 1. 2023.

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Международное непатентованное наименование, дозировка препарата	Наименование образца	Фармакопейная методика (пробоподготовка с HCl)	Модифицированная методика (пробоподготовка с HNO_3)	
		Концентрация цинка, мг/л (*RSD*, %)	Концентрация цинка, мг/л (*RSD*, %)	Правильность, %
Растворы для внутривенного и подкожного введения				
Инсулин лизпро, 200 МЕ/мл	Образец 9	22,9±0,7 (0,36)	22,7±1,6 (0,79)	99,30
Инсулин лизпро, 100 МЕ/мл	Образец 10	19,4±0,5 (1,07)	19,8±0,2 (0,37)	102,33
	Образец 11	24,0±1,6 (0,73)	23,9±0,4 (0,18)	99,63
Инсулин гларгин, 100 МЕ/мл	Образец 12	29,0±0,1 (0,17)	29,3±0,3 (0,42)	101,21
Инсулин аспарт, 100 МЕ/мл	Образец 13	17,3±0,9 (0,6)	17,6±2,8 (1,74)	101,44
	Образец 14	14,3±0,1 (0,1)	15,0±1,2 (0,66)	104,95
	Образец 15	20,4±0,4 (0,23)	20,6±0,1 (0,05)	101,23
	Образец 16	19,3±0,1 (0,04)	19,3±1,8 (1,04)	100,21
Растворы для инъекций				
Инсулин растворимый человеческий генно-инженерный, 100 МЕ/мл	Образец 17	12,2±0,9 (0,84)	12,3±0,2 (0,16%)	100,99
	Образец 18	12,4±0,2 (0,2)	12,9±1,1 (0,9%)	104,37
	Образец 19	13,7±1,9 (1,57)	14,0±1,0 (0,78%)	102,33
Растворы для подкожного введения				
Инсулин гларгин, 100 МЕ/мл	Образец 20	28,2±1,1 (0,42%)	27,5±1,9 (0,76%)	97,62
	Образец 21	28,3±1,3 (0,54%)	26,9±2,6 (1,08%)	95,02
Инсулин деглюдек + инсулин аспарт 100 ЕД/мл	Образец 22	25,9± 2,2 (0,93%)	26,4±0,03 (0,01%)	101,74
Субстанции				
Инсулин лизпро	Образец 23	0,70±0,04 (2,5%)	0,69±0,02 (1,45%)	98,57

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

кислоты на азотную не оказывает существенного влияния на результат измерения.

Заключение

В ходе проведенного исследования была модифицирована методика определения цинка в инсулине, позволяющая проводить определение этого элемента в различных лекарственных формах инсулина без использования прекурсоров наркотических веществ. Показано, что расхождение результатов, полученных с помощью фармакопейной и модифицированной методик, не превышает 1,5% для субстанций, 4,5% для суспензий, 5,0% для растворов для внутривенного и подкожного введения. Средняя погрешность результата определения цинка с помощью модифицированной методики при сравнении с референсным значением составляет 0,4%. Рекомендуется включить модифицированную методику в качестве альтернативной в ОФС.1.2.3.0018.15 «Определение цинка в препаратах инсулина» ГФ РФ после проведения полного цикла валидационных испытаний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bolli GB, Cheng AYY, Owens DR. Insulin: evolution of insulin formulations and their application in clinical practice over 100 years. *Acta Diabetol*. 2022;59(9):1129–44. https://doi.org/10.1007/s00592-022-01938-4
2. Хамидуллина ЗЗ, Нагаев ИР, Бобрик АГ, Авзалетдинова ДШ, Моругова ТВ, Загидуллин НШ, Гареева ДФ. Предикторы летального исхода при тяжелом течении коронавирусной инфекции у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. *Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение*. 2022;11(3):15–26.
Hamidullina ZZ, Nagaev IR, Bobrik AG, Avzalet-

dinova DSh, Morugova TV, Zagidullin NSh, et al. Predictors of mortality in severe cases of coronavirus infection in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology: News, Opinions, Training.* 2022;11(3):15–26 (In Russ.).
https://doi.org/10.33029/2304-9529-2022-11-3-15-26

3. Миронова СВ, Козиолова НА, Улыбина ЕВ. Риск развития хронической сердечной недостаточности у больных сахарным диабетом 2 типа, получающих терапию инсулином: метаанализ наблюдательных исследований. *Российский кардиологический журнал.* 2023;28(3):56–62.
Mironova SV, Koziolova NA, Ulybina EV. Risk of heart failure in patients with type 2 diabetes receiving insulin therapy: a meta-analysis of observational studies. *Russian Journal of Cardiology.* 2023;28(3):56–62 (In Russ.).
https://doi.org/10.15829/1560-4071-2023-5375
4. Гражданкина ДВ, Бондарь ИА, Демин АА. Оценка значения факторов, ассоциированных с развитием отдаленных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий при сахарном диабете второго типа. *Лечащий врач.* 2022;(7–8):27–35.
Grazhdankina DV, Bondar IA, Demin AA. Assessment of the significance of factors associated with the development of long-term adverse cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus. *Lechaschi Vrach Journal.* 2022;(7–8):27–35 (In Russ.).
https://doi.org/10.51793/OS.2022.25.8.004
5. Акимов ПА. Прекоматозное состояние как фактор насильственной смерти больных сахарным диабетом: случаи из экспертной практики. *Судебная медицина.* 2022;8(2):59–64.
Akimov PA. Precomatosis condition as a factor of violent death in patients with diabetes mellitus: a rare case report. *Russian Journal of Forensic Medicine.* 2022;8(2):59–64 (In Russ.).
https://doi.org/10.17816/fm689
6. Остроумова ОД, Суркова ЕВ, Голобородова ИВ, Стародубова АВ, Кочетков АИ, Кикнадзе ТД и др. Гипогликемии и риск когнитивных нарушений и деменции у больных пожилого и старческого возраста с сахарным диабетом 2 типа. *Сахарный диабет.* 2020;23(1):72–87.
Ostroumova OD, Surkova EV, Goloborodova IV, Starodubova AV, Kochetkov AI, Kiknadze TD, et al. Hypoglycemia and the risk of cognitive impairment and dementia in elderly and senile patients with type 2 diabetes. *Diabetes Mellitus.* 2020;23(1):72–87 (In Russ.).
https://doi.org/10.14341/DM10202
7. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119
8. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Викулова ОК, Железнякова АВ, Исаков МА. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021. *Сахарный диабет.* 2021;24(3):204–21.
Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA. Epidemiological characteristics of diabetes mellitus in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the Federal diabetes register data of 01.01.2021. *Diabetes Mellitus.* 2021;24(3):204–21 (In Russ.).
https://doi.org/10.14341/DM12759
9. Пашкова ЕЮ, Гезалян МА. Время менять стереотипы: новый взгляд на фиксированные комбинации инсулинов. *Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение.* 2021;36(3):59–65.
Pashkova EYu, Gezalyan MA. It's time to change stereotypes: a new look at fixed-mixtures insulins. *Endocrinology: News, Opinions, Training.* 2021;36(3):59–65 (In Russ.).
https://doi.org/10.33029/2304-9529-2021-10-3-59-65
10. Swain J, Jena S, Manglunia A, Singh J. The journey of insulin over 100 years. *J Diabetol.* 2022;13(1):8–15.
https://doi.org/10.4103/jod.jod_100_21
11. Manoharan C, Singh J. Addition of zinc improves the physical stability of insulin in the primary emulsification step of the poly (lactide-co-glycolide) microsphere preparation process. *Polymers.* 2015;7(5):836–50.
https://doi.org/10.3390/polym7050836
12. Jarosinski MA, Dhayalan B, Chen YS, Chatterjee D, Varas N, Weiss MA. Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Mol Metab.* 2021;52:101325.
https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101325
13. Dunn MF. Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer — a review. *Biometals.* 2005;18(4):295–303.
https://doi.org/10.1007/s10534-005-3685-y
14. Brange J. *Galenics of insulin: the physico-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations.* Springer; 2012.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-02526-0
15. Das A, Shah M, Saraogi I. Molecular aspects of insulin aggregation and various therapeutic interventions. *ACS Bio Med Chem Au.* 2022;2(3):205–21.
https://doi.org/10.1021%2Facsbiomedchemau.1c00054
16. Link FJ, Heng JYY. Unraveling the impact of pH on the crystallization of pharmaceutical proteins: a case study of human insulin. *Cryst Growth Des.* 2022;22(5):3024–33.
https://doi/10.1021/acs.cgd.1c01463
17. El-Gharbawy RM, Emara AM, Abu-Risha SES. Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:810–20.
https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.068
18. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorg Chem Appl.* 2018;2018:1062562.
https://doi.org/10.1155/2018/1062562
19. Майоров АЮ, Драй РВ, Каронова ТЛ, Авдеева ОИ, Макаренко ИЕ, Кокшарова ЕО и др. Оценка биоподобия препаратов РинГлар® (ООО «Герофарм», Россия) и Лантус® («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия) с использованием метода эугликемического гиперинсулинемического клэмпа

у пациентов с сахарным диабетом 1 типа: двойное слепое рандомизированное клиническое исследование. *Сахарный диабет*. 2020;23(4):304–15.
Mayorov AYu, Drai RV, Karonova TL, Avdeeva OI, Makarenko IE, Koksharova EO, et al. Evaluation of biosimilarity of RinGlar® (GEROPHARM LLC, Russia) and Lantus® (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Germany) using the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique in patients with type 1 diabetes: double-blind randomized clinical trial. *Diabetes Mellitus*. 2020;23(4):304–15 (In Russ.).
https://doi.org/10.14341/DM10095

20. Ata S, Wattoo FH, Ahmed M, Wattoo MHS, Tirmizi SA, Wadood A. A method optimization study for atomic absorption spectrophotometric determination of total zinc in insulin using direct aspiration technique. *Alexandria J Med*. 2015;51(1):19–23.
https://doi.org/10.1016/j.ajme.2014.03.004
21. Shkunnikova S, Širac T, Lalić K, Kulišić A, Jablan J. Comparison of Zn content in rapid-acting insulin and biphasic suspension by FAAS. *Croat Chem Acta*. 2021;94(2):P1–P8.
https://doi.org/10.5562/cca3830
22. Qadir MA, Ahmed M, Ahmed S. Improved limit of detection and quantitation development and validation procedure for quantification of zinc in Insulin by atomic absorption spectrometry. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28(3):875–9.
PMID: 26004720
23. Wu S, Feng X, Wittmeier A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 1997;12(8):797–806.
https://doi.org/10.1039/A607217H
24. Castro JT, Santos EC, Santos WP, Costa LM, Korn M, Nóbrega JA, et al. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*. 2009;78(4–5):1378–82.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.030
25. Альмашев РО, Романько НА, Лапинская ТН, Таразова ЭН, Сергеев ДС, Гатина РФ, Михайлов ЮМ. Применение атомно-абсорбционной спектроскопии при определении неоганических компонентов в порохах и промышленных отходах пороховых производств. *Бутлеровские сообщения*. 2012;30(5):132–8.
Almashev RO, Romanko NA, Lapinskaya TN, Tarazova EN, Sergeev DS, Gatina RF, Mikhailov YuM. Application of atomic absorption spectroscopy in determining inorganic components of gunpowders and industrial waste of gunpowder production. *Butlerov Communications*. 2012;30(5):132–8 (In Russ.).
EDN: PCFIUT
26. Пупышев АА. *Атомно-абсорбционный спектральный анализ*. М.: Техносфера; 2009.
Pupyshev AA. *Atomic absorption spectral analysis*. Moscow: Technosfera; 2009 (In Russ.).
EDN: QKCKEH

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.А. Ерина* — идея, концепция и дизайн исследования, проведение исследований и сбор экспериментальных данных; *В.М. Щукин* — анализ экспериментальных данных, написание текста рукописи, анализ данных литературы; *Е.А. Хорольская* — пробоподготовка и проведение экспериментальных исследований; *Н.Е. Кузьмина* — интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Alina A. Erina* elaborated the idea, concept, and design of the study, conducted experiments, and collected experimental data. *Victor M. Shchukin* analysed experimental data, drafted the manuscript, and analysed literature data. *Elena A. Khorolskaya* carried out sample preparation and experiments. *Natalia E. Kuz'mina* interpreted the study results and drafted the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ерина Алина Андреевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7488-7204
erina@expmed.ru
Щукин Виктор Михайлович
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9440-0950
Schukin@expmed.ru
Хорольская Елена Александровна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru

Alina A. Erina
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7488-7204
erina@expmed.ru
Victor M. Shchukin
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9440-0950
Schukin@expmed.ru
Elena A. Khorolskaya
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru

Поступила 05.07.2023
После доработки 14.08.2023
Принята к публикации 06.09.2023

Received 5 July 2023
Revised 14 August 2023
Accepted 6 September 2023

УДК 615.074:543.429.23:544.173.2
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-517
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

В.И. Крылов[1],
В.А. Яшкир[1],
А.В. Браун[1],
И.И. Крылов[1],
О.В. Фатеенкова[2] ✉,
А.М. Савватеев[2]

Разработка методов синтеза малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, проезд Энтузиастов, д. 19, стр. 20, Москва, 111024, Российская Федерация*

[2] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация*

✉ ***Фатеенкова Ольга Владимировна***; *fateenkova-olga@mail.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Использование дейтерированных аналогов исследуемых веществ в качестве внутренних стандартов позволяет определять остаточные пестициды в лекарственном растительном сырье в следовых количествах методами газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Таким образом, становится актуален вопрос доступного синтеза дейтерированных стандартов для расширения готового банка стандартов отечественного производства.

Цель. Синтез дейтерированных внутренних стандартов — малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6. Определение спектральных характеристик полученных соединений с помощью ^1H, ^2H, ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Материалы и методы. Использовали метанол-D_4, фосфора пентасульфид, трехлористый фосфор, диэтиловый эфир малеиновой кислоты, триэтиламин, гидрохинон, хлоральгидрат. Спектры ЯМР ^1H, ^2H, ^{13}C и ^{31}P записаны на ЯМР-спектрометре QONE AS400 при температуре 298 °K на частотах 399,83; 61,38; 100,55 и 161,85 МГц соответственно. Регистрация масс-спектров проведена на аналитической станции, состоящей из жидкостного хроматографа Agilent Infinity 1260, оборудованного системой автоматического ввода пробы, с масс-селективным тандемным анализатором высокого разрешения Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos, в режиме электрораспылительной ионизации.

Результаты. На основе разработанных ранее методик синтеза фосфорорганических пестицидов определены пути синтеза их дейтерированных аналогов малатиона-D_6, хлорофоса-D_6, дихлофоса-D_6. Подлинность синтезированных соединений подтверждена методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Выводы. Полученные соединения характеризуются высокой чистотой и пригодны для использования в качестве внутренних стандартов при определении фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье. Разработанные методики синтеза могут использоваться для получения отечественных стандартных образцов.

Ключевые слова: фосфорорганические пестициды; лекарственное растительное сырье; стандартизация; ЯМР; масс-спектрометрия высокого разрешения; стандартные образцы; дейтериевая метка

© В.И. Крылов, В.А. Яшкир, А.В. Браун, И.И. Крылов, О.В. Фатеенкова, А.М. Савватеев, 2023

Для цитирования: Крылов В.И., Яшкир В.А., Браун А.В., Крылов И.И., Фатеенкова О.В., Савватеев А.М. Разработка методов синтеза малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):411–418. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-517

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Vladislav I. Krylov[1], **Vadim A. Yashkir**[1], **Arkady V. Braun**[1], **Igor I. Krylov**[1], **Olga V. Fateenkova**[2] ✉, **Alexey M. Savvateev**[2]

Development of Methods for the Synthesis of Malathion-D_6, Chlorophos-D_6, and Dichlorophos-D_6 for Use as Internal Standards in the Analysis of Medicinal Plant Raw Materials and Herbal Medicinal Products

[1] *27 Scientific Centre, 19/20 Entuziastov Dr., Moscow 111024, Russian Federation*

[2] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation*

✉ ***Olga V. Fateenkova;*** *fateenkova-olga@mail.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. Deuterated analogues of test substances, when used as internal standards, enable analysts to determine traces of residual pesticides in a medicinal plant raw material by gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry. This prompts the search for an undemanding method for the synthesis of deuterated reference standards, with the ultimate goal of expanding the range of reference standards produced in Russia.

Aim. The study aimed to synthesise deuterated reference standards (malathion-D_6, chlorophos-D_6, dichlorophos-D_6, and their precursors) and determine their spectral characteristics using ^1H, ^2H, ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high-resolution mass spectrometry.

Materials and methods. The study involved methanol-D_4, phosphorus pentasulfide, phosphorus trichloride, maleic acid diethyl ether, triethylamine, hydroquinone, and chloral hydrate. The authors recorded ^1H, ^2H, ^{13}C, and ^{31}P NMR spectra using a QONE AS400 NMR spectrometer operating at a temperature of 298 °K and respective frequencies of 399.83, 61.38, 100.55, and 161.85 MHz. Mass spectra were obtained using an analytical system comprising an Agilent Infinity 1260 liquid chromatograph equipped with an automatic sample injector and coupled with a Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos high-resolution mass-selective tandem spectrometer operating in electrospray ionisation mode.

Results. The authors used existing methods for the synthesis of organophosphate pesticides as a basis and developed synthesis routes to produce the deuterated analogues malathion-D_6, chlorophos-D_6, and dichlorophos-D_6. The synthesised compounds were identified by NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry.

Conclusions. The synthesised compounds are highly pure and suitable for use as internal standards in the determination of organophosphate pesticides in medicinal plant raw materials. The synthesis methods developed by the authors can be used to produce reference standards in Russia.

Key words: organophosphate pesticides; medicinal plant raw materials; standardisation; NMR; high-resolution mass spectrometry; reference standards; deuterium label

For citation: Krylov V.I., Yashkir V.A., Braun A.V., Krylov I.I., Fateenkova O.V., Savvateev A.M. Development of methods for the synthesis of malathion-D_6, chlorophos-D_6, and dichlorophos-D_6 for use as internal standards in the analysis of medicinal plant raw materials and herbal medicinal products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):411–418. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-517

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Одна из задач фармацевтической науки — совершенствование методов анализа фармацевтических субстанций. Определение примесей пестицидов в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и препаратах на его основе — неотъемлемая часть обеспечения безопасности фармакотерапии. Для определения содержания остаточных хлорорганических пестицидов в ЛРС в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд.[1] регламентирован метод хроматомасс-спектрометрии с расчетом концентрации по внутреннему стандарту трифенилфосфата или 4,4'-дибромдифенила. На данный момент фармакопейного метода определения содержания фосфорорганических пестицидов (ФОП) не предложено.

Для идентификации ФОП в ЛРС в мировой практике используются методы газовой и жидкостной хроматомасс-спектрометрии[2]. При обнаружении веществ в низких концентрациях важно учитывать возможные потери аналитов в процессе пробоподготовки и при хроматографировании. Наиболее соответствует данным условиям использование дейтерированных внутренних стандартов, так как их потери при анализе полностью сопоставимы с потерями определяемых веществ. Такой подход позволяет точно анализировать образцы ЛРС с малыми количествами примесей, в том числе ФОП, а также позволяет избегать ложноотрицательных результатов [1–3].

Для точного определения низких концентраций ФОП в ЛРС важно учитывать влияние матричного эффекта, который является валидационным параметром[3]. Применение в анализе дейтерированных внутренних стандартов позволяет не проводить отдельное определение матричного эффекта для каждого ЛРС, так как отношение откликов внесенного дейтерированного внутреннего стандарта и целевого ФОП будет неизменно вне зависимости от матричного эффекта. Использование данного подхода значительно уменьшает время анализа и позволяет получать наиболее достоверные данные.

Таким образом, актуальным оказывается вопрос доступного синтеза дейтерированных стандартов для расширения реестра фармакопейных стандартных образцов отечественного производства.

Цель работы — синтез дейтерированных внутренних стандартов: малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6. Определение спектральных характеристик полученных соединений с помощью ^1H, ^2H, ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Материалы и методы

В работе использовали метанол-D_4 (≥99,8% D, кат. № 151947), фосфора пентасульфид (для синтеза, кат. № 8.21024), треххлористый фосфор (99%, кат. № 157791), диэтиловый эфир малеиновой кислоты (97,0%, кат. № D97703), триэтиламин (ч. д. а., ⩾ 99,5%, кат. № 90340), гидрохинон (99,0%, кат. № H17902), хлоральгидрат (≥98,0%, кат. № 23100). Все реагенты производства Merck (Sigma-Aldrich).

Спектры ядерного магнитного резонанса ^1H, ^2H, ^{13}C и ^{31}P ЯМР образцов пестицидов и их предшественников получены на ЯМР-спектрометре QONE AS400 (Zhongke Niujin Magnetic Resonance Technology Company Co. Ltd) при температуре 298 °K. Частота регистрации спектров: ^1H — 399,83, ^2H — 61,38, ^{13}C — 100,55, ^{31}P — 161,85 МГц. Шкалу для протонных, дейтериевых и углеродных экспериментов градуировали по отношению к сигналу соответствующего дейтерорастворителя, в экспериментах ^{31}P — по отношению к внутреннему стандарту (фосфорная кислота).

Регистрацию ВЭЖХ-МС спектров проводили на аналитической станции Agilent Infinity 1260 / Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos в режиме ионизации электрораспылением.

Результаты и обсуждение

Синтез О,О-бис-дейтерометилдитиофосфорной-D_7 кислоты. 22,23 г (0,1 моль) тонко измельченного пентасульфида фосфора помещали в трехгорлую колбу, снабженную термометром, обратным холодильником и капельной воронкой. Добавляли 100 мл сухого бензола и суспензировали при перемешивании. Смесь нагревали до 70 °C, затем в течение 1 ч прибавляли по каплям 14,43 г (0,4 моль) метанола-D_4 так, чтобы поддерживать кипение реакционной смеси. После смесь выдерживали

[1] ОФС.1.5.3.0011.15. Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

[2] Monograph 2.5 Pesticide Residue. The Unani Pharmacopoeia of India. 1st ed. Part 2. Vol. 3. Ghaziabad: Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy; 2016.
Quality control procedures for pesticide residues analysis. Document No. SANCO/10232/2006. 24 March 2006.
Residue Chemistry Test Guideline. OPPTS 860.1340. Residue Analytical Methods. EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS); 1996.

[3] Monograph 2.8.13. Pesticide residues. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.
Monograph pesticide residue analysis. United States Pharmacopeia. 44th ed. USP44–NF39. Rockville, MD; 2021.

при кипении в течение 2 ч, доводя температуру реакционной смеси до 90–100 °С, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и упаривали растворитель под вакуумом. Остаток помещали в перегонную колбу и перегоняли при 90–92 °С / 1 мм рт. ст. Получали 6,2 г О,О-бис-дейтерометилдитиофосфорной-D_7 кислоты в виде бесцветной жидкости. Выход составил 75% от теоретического.

^{13}С ЯМР ($CDCl_3$): δ = 53,01 ppm (м., J = 4,98 Гц); ^{31}Р ЯМР ($CDCl_3$): δ = 90,17 ppm (м., J = 4,98 Гц).

Синтез О,О-бис-дейтерометил-S-(1,2-дикарбоэтоксиэтил)-дитиофосфата (малатиона-D_6). К смеси 5,78 г (0,035 моль) О,О-бис-дейтерометилдитиофосфорной-D_7 кислоты, 0,3 мл триэтиламина и 0,1 г гидрохинона добавляли небольшими порциями из капельной воронки 5,02 г (0,03 моль) диэтилового эфира малеиновой кислоты, поддерживая температуру реакционной смеси около 60 °С. После завершения экзотермической реакции смесь выдерживали при 65 °С в течение 15 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и растворяли в 100 мл бензола. Бензольный раствор промывали 10% раствором бикарбоната натрия и водой. Растворитель удаляли в вакууме при нагревании. Получали 8,8 г О,О-(бис-дейтерометил)-S-(1,2-дикарбоэтоксиэтил)-дитиофосфата (малатиона-D_6) в виде бледно-желтой жидкости. Выход составил 87% от теоретического.

^{1}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 1,23 ppm (т., J_1 = 7,1 Гц, J_2 = 14,2 Гц, 3Н); δ = 1,27 ppm (т., J_1 = 7,1 Гц, J_2 = 14,2 Гц, 3Н); δ = 2,92 ppm (м., J_1 = 5,1 Гц, J_2 = 9,0 Гц, 2Н); δ = 4,07 ppm (м., J_1 = 5,1 Гц, J_2 = 9,0 Гц, 1Н); δ = 4,13 ppm (кв., J_1 = 7,1 Гц, J_2 = 14,2 Гц, 2Н); δ = 4,20 ppm (кв., J_1 = 7,1 Гц, J_2 = 14,2 Гц, 2Н). ^{2}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 3,8 ppm (д., J = 2,2 Гц, 3D). ^{31}Р ЯМР ($CDCl_3$): δ = 95,5 ppm (т., J= 2,2 Гц, 1Р).

Синтез О,О-бис-дейтерометилфосфита-D_7. 13,7 г (0,1 моль) треххлористого фосфора помещали в четырехгорлую колбу, снабженную термометром, капельной воронкой, барботером и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой. Во время перемешивания и охлаждения реакционной массы до –18 °С, в течение 1 ч по каплям прибавляли 10,82 г (0,3 моль) дейтерометанола-D_4 так, чтобы температура не поднималась выше 0 °С. Для удаления хлористого водорода через реакционную смесь пропускали ток CO_2 в течение 2 ч. Затем смесь помещали в перегонную колбу и перегоняли в вакууме, собирая фракцию с температурой кипения 86–87 °С / 20 мм рт. ст. Получали 7,8 г О,О-бис-дейтерометилфосфита-D_7 в виде бесцветной жидкости. Выход составил 67% от теоретического.

^{2}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 3,50 ppm (д., J = 2,0 Гц; 3D); δ = 6,54 ppm (д., J = 105 Гц, 1D). ^{31}Р ЯМР ($CDCl_3$): δ = 10,06 ppm (м., J_1= 2,0 Гц, J_2= 105 Гц, 1Р).

Синтез О,О-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил) фосфоната (хлорофоса-D_6). Получали безводный хлораль путем обработки хлоральгидрата концентрированной серной кислотой, отделением сернокислого слоя и перегонкой. 8,84 г (0,06 моль) получившегося безводного хлораля помещали в двугорлую колбу, снабженную термометром и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой. Добавляли по каплям 7,06 г (0,06 моль) О,О-бис-дейтерометилфосфита-D_7 при охлаждении льдом и перемешивании. После окончания экзотермической реакции смесь нагревали в течение 20 мин при 75 °С. Остаток помещали в холодильник, после кристаллизации продукта его перекристаллизовывали из циклогексана. Получали 8,66 г О,О-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил)фосфоната (хлорофоса-D_6) в виде белых аморфных кристаллов. Выход составил 58% от теоретического.

^{1}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 4,50 ppm (д., J= 11 Гц, 1Н); δ = 4,10 ppm (уш.с. 1Н). ^{2}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 3,56 ppm (т., J = 1,9 Гц, 3D). ^{31}Р ЯМР ($CDCl_3$): δ = 17,69 ppm (м., J= 1,9 Гц 1Р).

Синтез О,О-бис-дейтерометил-О-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса-D_6). 8,0 г (0,032 моль) хлорофоса-D_6 растворяли в 30 мл воды и добавляли 50 мл толуола. К смеси при интенсивном перемешивании добавляли в течение 30 мин раствор 4 г гидроксида натрия в 12 мл воды. После прибавления щелочи реакционную массу обрабатывали соляной кислотой, доводя до значения pH = 4. Отделяли органический слой, промывали водой и отгоняли растворитель в вакууме. Получали 5,4 г О,О-бис-дейтерометил-О-2,2-дихлорвинилфосфата (дихлофоса-D_6) в виде бесцветной жидкости. Выход составил 80% от теоретического.

^{1}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 6,97 ppm (д., J = 5 Гц, 1Н). ^{2}Н ЯМР ($CDCl_3$): δ = 3,79 ppm (д., J = 1,9 Гц, 3D). ^{31}Р ЯМР ($CDCl_3$): δ = -3,38 ppm (м., J_1 = 1,9 Гц, J_2= 5,0 Гц, 1Р).

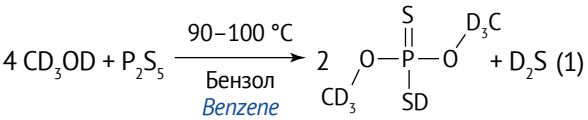
Определение подлинности полученных соединений. Для определения параметров качества и подтверждения структуры соединений были выбраны методы ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ-МС высокого разрешения.

Разделение синтезированных стандартов проводили на колонке Zorbax 300SB-C18 100 мм × 2,1 мм × 3,5 мкм. Хлорофос-D_6, дихлофос-D_6 и малатион-D_6 разделяли в режиме градиентного элюирования, расход подвижной фазы 0,35 мкл/мин, температура термостата колонки 40 °С. Подвижная фаза А — 0,1 об.% HCOOH в воде, подвижная фаза Б — ацетонитрил. Программа градиентного элюирования: 0–2 мин: 95% А; 2–10 мин: 5–95% Б; 10–11 мин: 95% Б; 11–15 мин: 95% А. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. В выбранных условиях времена удерживания хлорофоса-D_6, дихлофоса-D_6 и малатиона-D_6 составили 5,03±0,20, 6,57±0,20 и 8,46±0,20 мин соответственно.

При проведении масс-спектрометрического исследования использовали источник ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации масс-спектров фрагментации ионов-предшественников. Величина разрешения масс-анализатора составляла не менее 30000, погрешность при определении величины *m/z* не превышала 8,3 млн$^{-1}$. В ходе исследований регистрировали масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов хлорофоса-D_6, дихлофоса-D_6 и малатиона-D_6 с *m/z* 263, 227 и 337 Да, соответственно. Диапазон сканирования *m/z* составлял 60–400 Да. Масс-спектры фрагментации получали в варианте диссоциации, активируемой высокоэнергетическими соударениями (HCD-фрагментация), энергии фрагментации — 25 эВ для хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6 и 15 эВ для малатиона-D_6. Температура переходного капилляра составляла 325 °С, температура испарителя — 350 °С, скорость подачи обдувочного газа составляла 50 усл. единиц, вспомогательного газа — 10 усл. единиц и продувочного газа — 1 усл. единица (усл. единицы — согласно номенклатуре производителя), используемый газ — азот. Напряжение на распыляющем капилляре составляло 3500 В. В выбранных оптимальных условиях получены масс-спектры фрагментации положительно заряженных ионов малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6. В *таблице 1* приведены характеристики фрагментных ионов, зарегистрированных в масс-спектрах протонированных молекулярных ионов дейтерированных пестицидов. Полученные результаты позволяют выбрать наиболее интенсивные фрагментные ионы для дальнейшего детектирования ФОС в ЛРС. Полученные точные массы позволяют воссоздать структуру фрагментов, полученных в процессе HCD-фрагментации *(рис. 1)*.

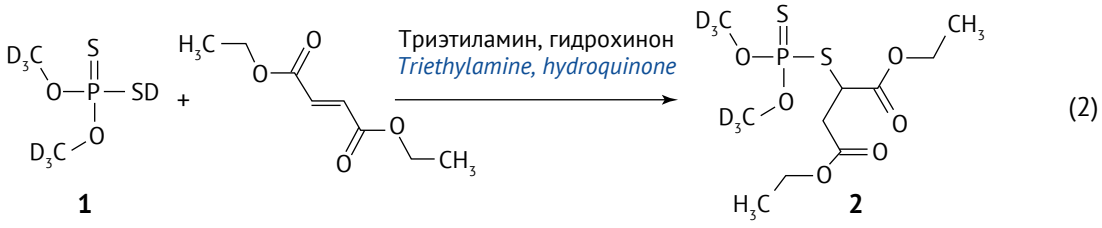
Описанные ранее методики синтеза малатиона, хлорофоса и дихлофоса были адаптированы для синтеза малатиона-D_6, хлорофоса-D_6 и дихлофоса-D_6. Способ введения атомов дейтерия в молекулу соответствующего пестицида основан на использовании дейтерометанола-D_4 в качестве реагента для получения исходных веществ: O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорной-D_7 кислоты и O,O-бис-дейтерометилфосфита-D_7.

O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорная-D_7 кислота **1** получена по методу [4, 5] путем взаимодействия дейтерометанола-D_4 с пентасульфидом фосфора (1).



1

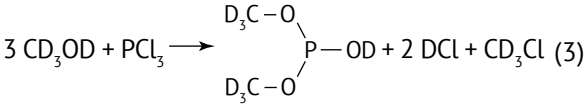
Для синтеза малатиона-D_6 **2** внесены следующие изменения в описанную в [6] методику: O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорную-D_7 кислоту **1** вовлекали в реакцию с диэтиловым эфиром малеиновой кислоты в присутствии каталитических количеств триэтиламина и гидрохинона при нагревании до 65 °С в течение 15 ч с последующей обработкой реакционной массы бикарбонатом натрия для нейтрализации непрореагировавшей O,O-бис-дейтерометилдитиофосфорной-D_7 кислоты и водой (2).



(2)

1 **2**

O,O-бис-дейтерометилфосфит-D_7 **3** получен по методике, предложенной B. Teichmann [7], с заменой метилового спирта на метанол-D_4 (3), при охлаждении и удалении из реакционной смеси хлористого водорода потоком углекислого газа.



3

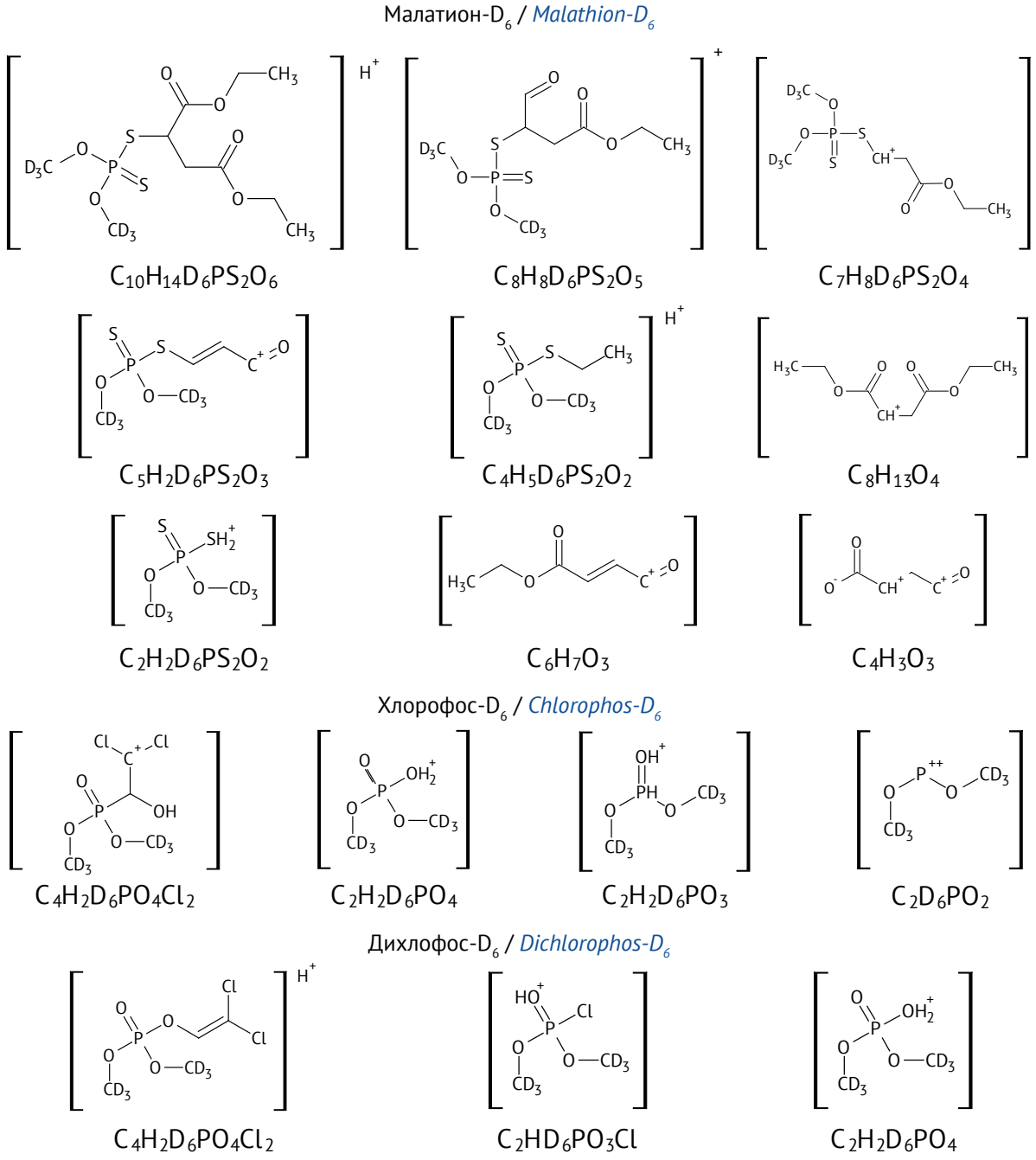
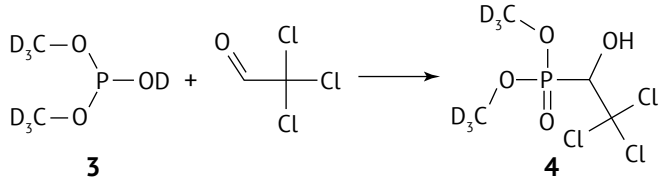


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Возможные структурные формулы ионов дейтерированных стандартов в режиме диссоциации, активируемой соударениями при повышенной энергии*

Fig. 1. *Possible structural formulas of deuterated standards in higher-energy C-trap dissociation fragmentation mode*

Хлорофос-D_6 **4** получали путем присоединения свободного хлораля к О,О-бис-дейтерометилфосфиту-D_7 **3,** как описано в работе [7] (4).



(4)

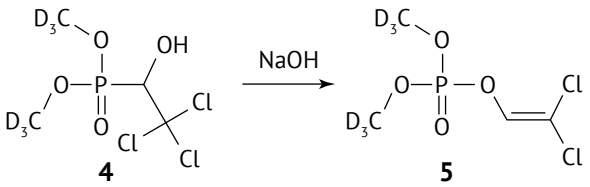
Таблица 1. *Характеристики ионных фрагментов, образованных в результате фрагментации*

Table 1. *Characteristics of ionic fragments formed as a result of fragmentation*

Элементный состав фрагмента *Fragment elemental composition*	**$m/z_{теор.}$** *$m/z_{theor.}$*	**$m/z_{набл.}$** *$m/z_{obs.}$*	**Δ m/z, млн$^{-1}$** *Δ m/z, ppm*	**Интенсивность, %** *Intensity, %*
Малатион-D_6 / ***Malathion-D_6***				
$C_{10}H_{14}D_6PS_2O_6$	337,0810	337,0838	8,30	1,39
$C_8H_8D_6PS_2O_5$	291,0391	291,0392	0,26	20,94
$C_7H_8D_6PS_2O_4$	263,0442	263,0443	0,22	9,57
$C_5H_2D_6PS_2O_3$	217,0024	217,0024	0,17	2,80
$C_4H_6D_6PS_2O_2$	193,0387	193,0391	1,88	1,39
$C_8H_{13}O_4$	173,0808	173,0807	-1,03	1,32
$C_2H_2D_6PS_2O_2$	165,0074	165,0075	0,20	1,73
$C_6H_7O_3$	127,0390	127,0389	-0,60	100
$C_4H_3O_3$	99,0077	99,0076	-0,80	48,31
Хлорофос-D_6 / ***Chlorophos-D_6***				
$C_4H_2D_6PO_4Cl_2$	226,9908	226,9908	-0,04	4,39
$C_2H_2D_6PO_4$	133,0531	133,0530	-0,93	100
$C_2H_2D_6PO_3$	117,0582	117,0581	-0,63	0,55
$C_2D_6PO_2$	99,0477	99,0475	-1,31	1,19
Дихлофос-D_6 / ***Dichlorophos-D_6***				
$C_4H_2D_6PO_4Cl_2$	226,9908	226,9908	-0,30	9,61
$C_2HD_6PO_3Cl$	151,0192	151,0192	-0,53	6,06
$C_2H_2D_6PO_4$	133,0531	133,0530	-0,70	100

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

W.B. Burton описал метод получения дихлофоса из триметилфосфита и хлораля [8], однако выход целевого продукта по этой методике невысок. Наиболее целесообразным, с точки зрения расходования метанола-D_4, является метод с последовательным получением бис-дейтерометилфосфита, хлорофоса-D_6 и в итоге дихлофоса-D_6. Синтез дихлофоса-D_6 **5** проводили по методу, предложенному в [9]. Хлорофос-D_6 **4** вовлекали в реакцию дегидрохлорирования и перегруппировку в щелочной среде (5).



(5)

Заключение

В результате анализа литературных источников подобраны оптимальные методы синтеза фосфорсодержащих пестицидов и на их основе предложены пути синтеза дейтерированных аналогов. Синтезированы O,O-бис-дейтерометил-*S*-(1,2-дикарбоэтоксиэтил) дитиофосфат (малатион-D_6), O,O-бис-дейтерометил-(2,2,2-трихлор-1-оксиэтил)фосфонат (хлорофос-D_6), O,O-бис-дейтерометил-O-2,2-дихлорвинилфосфат (дихлофос-D_6). Подлинность полученных соединений подтверждена методами ^1H, ^2H, ^{13}C, ^{31}P ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Разработанные методики могут стать основой синтеза дейтерированных стандартных образцов, используемых при аналитическом контроле лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Reichert B, Pizzutti IR, Costabeber IH, Uclés A, Herrera S, Fernández-Alba AR. Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. *Talanta*. 2015;134:415–24. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.047
2. Liu X, Li Y, Meng W, Li D, Sun H, Tong L, Sun G. A multi-residue method for simultaneous determination of 74 pesticides in Chinese *material medica* using modified QuEChERS sample preparation procedure and gas chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatography B*. 2016;1015–1016:1–12. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.029
3. Gómez-Ramos M, Nannou C, Martínez Bueno MJ, Goday A, Murcia-Morales M, Ferrer C, Fernández-Alba AR. Pesticide residues evaluation of organic crops. A critical appraisal. *Food Chem X*. 2020;5:100079. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100079
4. Luther AR, Vanderwerf H, Vanderwerf C. A new commercial synthesis of the insecticide parathion. *Trans Kans Acad Sci*. 1952;55(1):131–7. https://doi.org/10.2307/3626281
5. Fletcher JH, Hamilton JC, Hechenbleikner I, Hoegberg EI, Sertl BJ, Cassaday JT. The synthesis of parathion and some closely related compounds. *J Am Chem Soc*. 1950;72(6):2461–4. https://doi.org/10.1021/ja01162a028
6. Cassaday JT. Addition product of diester of dithiophosphoric acid and maleic acid and its esters, and method of preparation. US Patent No. 2578652; 1951.
7. Teichmann B. Über O,O-dialkyl-2,2,2-1-hydroxyäthylphosphonate. *J Prakt Chem*. 1965;28(1–2):94–8. https://doi.org/10.1002/prac.19650280110
8. Burton W. Synthesis of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate labeled with carbon-14, chlorine-36, and phosphorus-32. *J Agric Food Chem*. 1971;19(5):869–71. https://doi.org/10.1021/jf60177a040
9. Вершинин ВП, Головцов ИН, Ермолаев ВВ, Колодяжный ВН, Комова СН, Кутянин ЛИ и др. Способ получения О,О-диметил-О-2,2-дихлорвинилфосфата. Патент СССР № 545647; 1977.
Vershinin VP, Golovtsov IN, Ermolaev VV, Kolodyazhny VN, Komova SN, Kutyanin LI et al. USSR Patent No. 545647; 1977 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.И. Крылов* — планирование исследования, синтез малатиона-D_6, хлорофоса-D_6, ЯМР-спектроскопия, подбор и анализ литературы; *В.А. Яшкир* — синтез дихлофоса-D_6, ЯМР-спектроскопия и описание спектров синтезированных соединений; *А.В. Браун* — регистрация и описание хроматограмм и масс-спектров; *И.И. Крылов* — синтез исходных дейтерированных соединений, анализ литературы; *О.В. Фатеенкова* — идея исследования, регистрация хроматограмм и масс-спектров синтезированных соединений, подбор и анализ литературы; *А.М. Савватеев* — идея исследования, подбор и анализ литературы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Vladislav I. Krylov* planned the study, synthesised malathion-D_6 and chlorophos-D_6, carried out NMR spectroscopy, selected and analysed literature. *Vadim A. Yashkir* synthesised dichlorophos–D_6, carried out NMR spectroscopy, and described the spectra of synthesised compounds. *Arkady V. Braun* obtained and described chromatograms and mass spectra. *Igor I. Krylov* synthesised deuterated starting materials and analysed literature. *Olga V. Fateenkova* elaborated the study idea, obtained chromatograms and mass spectra, selected and analysed literature. *Alexey M. Savvateev* elaborated the study idea, selected and analysed literature.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Крылов Владислав Игоревич
SPIN-код 9710-3262, AuthorID 819948
vladkrylo@yandex.ru
Яшкир Вадим Анатольевич, канд. хим. наук, доцент
SPIN-код 5410-1152, AuthorID 760813
chemtraid@mail.ru
Браун Аркадий Владимирович, канд. хим. наук
SPIN-код 4325-6855, AuthorID 1167857
avbraun@yandex.ru
Крылов Игорь Иванович, канд. хим. наук, доцент
SPIN-код 6848-6420, AuthorID 1052863
igor.krylov.51@mail.ru
Фатеенкова Ольга Владимировна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0076-5498
fateenkova-olga@mail.ru
Савватеев Алексей Михайлович, канд. фарм. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3679-977X
savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

Vladislav I. Krylov
SPIN-code 9710-3262, AuthorID 819948
vladkrylo@yandex.ru
Vadim A. Yashkir, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
SPIN-code 5410-1152, AuthorID 760813
chemtraid@mail.ru
Arkady V. Braun, Cand. Sci. (Chem.)
SPIN-code 4325-6855, AuthorID 1167857
avbraun@yandex.ru
Igor I. Krylov, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
SPIN-code 6848-6420, AuthorID 1052863
igor.krylov.51@mail.ru
Olga V. Fateenkova
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0076-5498
fateenkova-olga@mail.ru
Alexey M. Savvateev, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3679-977X
savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

Поступила 20.10.2022
После доработки 21.12.2022
Принята к публикации 07.03.2023
Online first 04.07.2023

Received 20 October 2022
Revised 21 December 2022
Accepted 7 March 2023
Online first 4 July 2023

УДК 615.072:615.074
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-545
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

Е.П. Шефер ✉, **Н.П. Антонова**, **И.М. Моргунов**, **С.С. Прохватилова**, **М.С. Зотова**

Способ определения компонентов эфирных масел в плодах аниса и фенхеля методом тонкослойной хроматографии

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Шефер Елена Павловна***; *shefer@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ) идентификация плодов аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного проводится методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) по одинаковым методикам с использованием неспецифичных маркеров судана III и ментола — веществ, не связанных с терапевтической активностью препаратов. Визуальная оценка получаемых хроматограмм затруднена из-за слабой окраски зон адсорбции; кроме того, в нормирующей части фармакопейных статей отсутствует характеристика зон адсорбции, отличающих оба вида растения. Доминирующим компонентом эфирных масел аниса обыкновенного и фенхеля является *транс*-анетол, поэтому использование его в качестве стандартного образца (СО) методологически более верно.

Цель. Усовершенствование ТСХ-методики определения компонентов эфирных масел в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды» с целью дальнейшей рекомендации включения ее в соответствующие фармакопейные статьи ГФ РФ.

Материалы и методы. Объектами исследования служили несколько серий образцов лекарственных растительных препаратов «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды» отечественных производителей. В качестве СО использовали коммерческие реагенты: *транс*-анетол, анисовое масло, линалоол, свежеотогнанные эфирные масла плодов аниса и фенхеля. Эфирные масла плодов аниса обыкновенного и фенхеля получали из исследуемых объектов методом дистилляции с водяным паром на приборе Клевенджера. Исследование осуществляли методом ТСХ. В процессе пробоподготовки использовали аналитические ТСХ-пластинки на алюминиевой подложке фирмы Merck, орбитальный шейкер IKA KS-501 Digital, автоматизированную систему для нанесения проб на пластинки Linomat 5 CAMAG. Нагревали пластинки в термошкафу Binder ED53 или на нагревателе для пластинок TCX CAMAG. Просмотр пластин проводили в УФ-кабинете CAMAG TLC VISUALIZER 2 с системой документирования.

Результаты. На основании информационно-аналитического и экспериментального исследований показана целесообразность использования *транс*-анетола в качестве СО для подтверждения подлинности плодов аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного. Подобран наиболее оптимальный растворитель (гексан) для проведения экстракции действующих веществ из препаратов и проявляющий реагент (ванилина раствор 1% в серной кислоте) для лучшей визуальной оценки хроматограмм. Определены специфические зоны адсорбции, позволяющие различать аниса обыкновенного плоды и фенхеля обыкновенного плоды.

Выводы. Усовершенствованная методика позволяет идентифицировать основные компоненты эфирных масел плодов аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного с использованием специфического СО и может быть рекомендована для включения в проект фармакопейных статей на соответствующие препараты.

© Е.П. Шефер, Н.П. Антонова, И.М. Моргунов, С.С. Прохватилова, М.С. Зотова, 2023

Ключевые слова: аниса обыкновенного плоды; *Pimpinella anisum*; фенхеля обыкновенного плоды; *Foeniculum vulgare*; анисовое масло; масло фенхеля; *транс*-анетол; тонкослойная хроматография; Государственная фармакопея Российской Федерации

Для цитирования: Шефер Е.П., Антонова Н.П., Моргунов И.М., Прохватилова С.С., Зотова М.С. Способ определения компонентов эфирных масел в плодах аниса и фенхеля методом тонкослойной хроматографии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):419–425. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-545

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Elena P. Shefer ✉, **Natalia P. Antonova**, **Igor M. Morgunov**, **Svetlana S. Prokhvatilova**, **Maria S. Zotova**

A Thin-Layer Chromatography Method for the Determination of Essential Oil Components in Anise and Fennel Fruits

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Elena P. Shefer***; *shefer@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, edition XIV, requires the identification of aniseed and fennel fruits by the same thin-layer chromatography (TLC) procedure using Sudan III and menthol. These markers are neither specific nor related to the therapeutic effects of these herbal drug products. The visual interpretation of chromatograms is complicated because of the low intensity of adsorption zones. Moreover, the corresponding compendial monographs do not characterise the adsorption zones specific to each of the plants. The most abundant component in aniseed and fennel essential oils, *trans*-anethole, would make a better reference standard from a methodological point of view.

Aim. This study aimed to optimise the TLC procedure for essential oil determination in herbal drugs and herbal medicinal products of aniseed and fennel fruits and subsequently recommend it for inclusion in the relevant compendial monographs.

Materials and methods. The study examined samples from several batches of herbal drugs, including aniseed and common fennel fruits, sourced from Russian manufacturers. The reference standards comprised commercial reagents, including *trans*-anethole, anise oil, and linalool, as well as fresh essential oils that had been steam distilled from the test samples in a Clevenger apparatus. The study was conducted by TLC. Sample preparation involved using Merck aluminium TLC plates, an IKA KS-501 digital orbital shaker, and a CAMAG Linomat 5 semi-automatic sample application system. The authors heated the plates in either a Binder ED53 drying oven or a CAMAG TLC plate heater. For visualisation, the authors selected a CAMAG TLC VISUALIZER 2 UV imaging and documentation system.

Results. The informational and experimental research showed the feasibility of using *trans*-anethole as an identification reference standard for common anise and fennel fruits. The authors selected the optimal solvent for extracting active substances from the test products (hexane) and a detection reagent for improving visual evaluation of the chromatograms (1% sulfovanillin). The authors established characteristic adsorption zones for differentiating between aniseed and fennel fruits.

Conclusions. The optimised procedure identifies the main components in the essential oils of aniseed and fennel fruits with a specific reference standard. This procedure may be recommended for inclusion in draft monographs for the corresponding herbal medicinal products.

Key words: common anise fruits; aniseed; *Pimpinella anisum*; common fennel fruits; *Foeniculum vulgare*; anise oil; fennel oil; *trans*-anethole; thin-layer chromatography; State Pharmacopoeia of the Russian Federation

For citation: Shefer E.P., Antonova N.P., Morgunov I.M., Prokhvatilova S.S., Zotova M.S. A thin-layer chromatography method for the determination of essential oil components in anise and fennel fruits. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):419–425. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-545

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

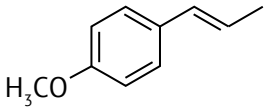
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Совершенствование фармакопейных статей (ФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) проводится на основании современных подходов к стандартизации лекарственных средств с учетом требований ведущих зарубежных фармакопей. При контроле качества лекарственных препаратов растительного происхождения, имеющих в составе компоненты с известной терапевтической активностью, целесообразно использовать стандартные образцы (СО), идентичные по химическому составу веществам, обеспечивающим фармакологическое действие растения [1].

В настоящее время в ГФ РФ XIV изд. в 97 из 107 ФС на лекарственное растительное сырье (ЛРС) включена оценка подлинности методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Из них в 18 ФС предусмотрено применение маркеров, не отражающих терапевтическую активность препарата, а позволяющих оценить расположение отдельных зон на хроматограмме: группа нейтральных жирорастворимых красителей (судан красный G и судан III), метиловый красный, флуоресцеин, а также ментол и рутин. Для идентификации терпеноидов в эфирномасличном ЛРС (аниса обыкновенного плодах, фенхеля обыкновенного плодах, укропа пахучего плодах, тмина обыкновенного плодах, эвкалипта прутовидного листьях, тысячелистника обыкновенного листьях и др.) в основном используется комбинация судана разных типов и ментола. Использование неспецифичных маркеров, по-видимому, обусловлено экономической выгодой и упрощенным подходом.

Плоды аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного имеют близкий химический состав, характеризующийся высоким содержанием анетола. Анетол относится к классу фенилпропаноидных органических соединений и может присутствовать в двух изомерных формах (*цис-* и *транс-*). *Транс*-форма — наиболее устойчивая и распространенная в природе.



анетол / *anethole*

Зрелые и высушенные плоды аниса обыкновенного (*Pimpinella anisum*), семейство сельдерейных (*Apiaceae*), содержат 1,2–3,5% (иногда 6%) эфирного масла в зависимости от ареала произрастания и методов ведения сельского хозяйства (орошение, используемые удобрения и время посадки). Доминирующим компонентом анисового масла, определяющим его характерный ароматный запах, является анетол (75–90%). Кроме того, масло содержит метилхавикол (эстрагол), анисовый альдегид, α-пинен, камфен, анискетон и др. Плоды аниса содержат жирное масло (16–28%), белковые вещества (до 19%), а также кумарины и флавоноиды [2, 3].

Препараты плодов аниса обыкновенного назначают в составе комбинированной терапии при заболеваниях дыхательных путей, сопровождающихся кашлем, затрудненным отделением мокроты, в качестве мягкого отхаркивающего, бактерицидного и противовоспалительного средства. Водный раствор плодов аниса усиливает деятельность кишечника, обладает ветрогонным, антисептическим и слабительным действием[1]. Анисовое эфирное масло входит в состав нашатырно-анисовых капель и грудного эликсира, его нередко используют для улучшения вкуса лекарственных препаратов, например в составе микстуры от кашля для взрослых и детей.

Фенхеля обыкновенного плоды (*Foeniculum vulgare*), семейство сельдерейных (*Apiaceae*), также отличаются высоким содержанием эфирного масла (4–6%), основным компонентом которого является анетол (до 60%). В плодах обнаружены анисовый альдегид, кислота анисовая, фенхон, α-пинен и другие терпеноиды. Содержание жирного масла в плодах достигает 18% [4]. Настой плодов фенхеля оказывает ветрогонное, спазмолитическое и отхаркивающее действие и назначается при метеоризме, кишечных коликах у младенцев, в комплексной терапии трахеитов

[1] Справочник лекарственных средств Vidal. https://www.vidal.ru

и бронхитов. Показано, что анетол обладает эстрогенной активностью, имея структурное сходство с катехоламинами, может вытеснять дофамин из его рецепторов и тем самым способствовать секреции пролактина и усилению лактации [5, 6]. Фармакологические свойства препарата в значительной степени обусловлены рефлекторными реакциями, связанными с раздражением чувствительных нервных окончаний желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей[2].

Плоды аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного достаточно хорошо изучены, монографии на них представлены в зарубежных фармакопеях, например в Европейскую фармакопею включены статьи на аниса обыкновенного плоды и анисовое масло[3]. В плодах аниса обыкновенного идентифицируют терпеноиды методом ТСХ по СО анетола и триглицериды жирного масла плодов в сравнении с СО оливкового масла.

В Европейскую фармакопею внесены монографии на разновидности фенхеля обыкновенного: фенхель сладкий и фенхель горький[4]. Горький вкус эфирного масла горькой разновидности обусловливается наличием фенхона, поэтому в ТСХ-методике оценки содержания терпеновых соединений в горькой разновидности фенхеля наряду с СО анетола используется фенхон.

При контроле качества анисового и фенхелевого масел дополнительно к методике ТСХ предусмотрена оценка хроматографического профиля образцов методом газовой хроматографии.

В соответствии с ГФ РФ[5] основная группа биологически активных веществ в плодах аниса и фенхеля — терпеноиды — определяется методом ТСХ с использованием одинаковых методик пробоподготовки и условий проведения испытания. Для идентификации навеску ЛРС экстрагируют этиловым спиртом 96%, в качестве СО используют 0,05% раствор судана III и 0,1% раствор ментола в этиловом спирте 96%. Аналитическую пластинку хроматографируют в подвижной фазе толуол–этилацетат в соотношении 95:5 (об.:об.). После прохождения фронта растворителей пластинку обрабатывают 0,0005% раствором ванилина и нагревают при температуре 100–105 °С в течение 2–3 мин. На хроматограмме испытуемого раствора при просмотре в дневном свете должны наблюдаться не менее 7 зон адсорбции.

К недостаткам данной методики можно отнести затрудненную визуальную оценку слабоокрашенных зон адсорбции, так как детектирование осуществляется разбавленным раствором обнаруживающего реагента, а также отсутствуют указания на характерные отличия двух видов растений. Кроме того, возникает вопрос о целесообразности использования ментола и судана III в качестве маркеров, так как доступны более специфичные коммерческие СО, например *транс*-анетол, анисовое масло.

Цель работы — усовершенствование ТСХ-методики определения терпеноидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды» с целью дальнейшей рекомендации включения ее в соответствующие фармакопейные статьи ГФ РФ.

Материалы и методы

Объектами исследования служили две серии образцов лекарственных растительных препаратов (ЛРП) «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды» отечественных производителей. В качестве СО использовали *транс*-анетол квалификации USP RS, свежеотогнанное эфирное масло плодов аниса и эфирное масло плодов фенхеля, анисовое масло (Sigma-Aldrich, кат. № 117870, содержание не менее 99%), линалоол (Carl Roth GmbH). Исследование осуществляли методом ТСХ. В процессе пробоподготовки использовали аналитические ТСХ-пластинки на алюминиевой подложке (Merck), орбитальный шейкер IKA KS-501 Digital, автоматизированную систему для нанесения проб на пластинки Linomat 5 (CAMAG). Нагревали пластинки в термошкафу суховоздушном Binder ED53 или на нагревателе для пластинок ТСХ (CAMAG). Просмотр ТСХ-пластин проводили в УФ-кабинете CAMAG TLC VISUALIZER 2 с системой документирования. Эфирное масло плодов аниса и фенхеля получали из исследуемых объектов ЛРП методом дистилляции с водяным паром на приборе Клевенджера.

Проведены исследования по определению наиболее оптимального растворителя для экстракции действующих веществ из препаратов, позволяющего получить четкую хроматографическую картину с хорошо

[2] Справочник лекарственных средств Vidal. https://www.vidal.ru
[3] Monograph 07/2017:0262 Aniseed, 01/2008:0804 Anise oil. European Pharmacopeia. Supplement 11.1. Strasbourg; 2022.
[4] Monographs 04/2013:0824 Fennel, bitter, 04/2011:0825 Fennel, sweet. European Pharmacopeia. Supplement 11.1. Strasbourg; 2022.
[5] ФС.2.5.0057.18 Аниса обыкновенного плоды; ФС.2.5.0102.18 Фенхеля обыкновенного плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: 2018.

разделенными и не перегруженными зонами адсорбции. При экстракции органическими растворителями извлекаются компоненты не только эфирного масла, но и жирных масел, содержание которых в плодах аниса и фенхеля велико. Из проанализированных растворителей (этиловый спирт 96%, гексан и хлороформ) наилучший результат был достигнут при использовании в качестве экстрагента гексана. Это позволило сократить время экстракции с 20 до 5 мин и ускорить нанесение проб на хроматографическую пластинку с помощью автоматической системы нанесения проб.

Выбор СО проводили по следующему принципу: *транс*-анетол — доминирующий компонент эфирного масла аниса и фенхеля; свежеотогнанные эфирные масла аниса и фенхеля — для сравнительной оценки основных веществ масел с целью определить зоны адсорбции, характерные для конкретного ЛРС, и отличия компонентов эфирных и жирных масел; коммерческий стандарт анисового масла — альтернативный вариант использованию СО *транс*-анетола; линалоол — компонент анисового и фенхелевого масел.

В качестве проявляющего реактива предложен ванилина раствор 1% в серной кислоте, позволяющий получить четкую хроматограмму с яркоокрашенными зонами адсорбции в дневном свете.

Пробоподготовку препаратов «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды» проводили в одинаковых условиях. Для приготовления испытуемого раствора навеску сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, экстрагировали гексаном, встряхивая на орбитальном шейкере в течение 5 мин. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр, получая прозрачный испытуемый раствор. В качестве растворов СО использовали гексановые растворы *транс*-анетола, эфирного масла аниса обыкновенного плодов и эфирного масла фенхеля обыкновенного плодов, коммерческого стандарта анисового масла и линалоола.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносили по 20 мкл испытуемого раствора, 5 мкл раствора СО *транс*-анетола, 10 мкл эфирного масла аниса обыкновенного плодов, 10 мкл эфирного масла фенхеля обыкновенного плодов, 1 мкл стандарта анисового масла и 5 мкл линалоола. Пластинку с нанесенными пробами испытуемых и стандартных растворов помещали в камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей толуол–этилацетат в соотношении 19:1 (об.:об.), и хроматографировали восходящим способом. После прохождения фронта подвижной фазы около 80–90% длины пластинки от линии старта ее вынимали из камеры и сушили до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывали ванилина раствором 1% в серной кислоте, затем нагревали в течение 2–3 мин при температуре 100–105 °С, после чего оценивали в видимом свете.

Результаты и обсуждение

На хроматограмме раствора СО *транс*-анетола *(рис. 1, № 6)* наблюдалась зона адсорбции фиолетово-коричневого цвета; на хроматограммах эфирных масел аниса и фенхеля *(рис. 1, № 3, 4)* — доминирующая зона адсорбции анетола фиолетово-коричневого цвета на уровне СО *транс*-анетола и дополнительные зоны адсорбции розово-фиолетового цвета; на хроматограмме эфирного масла аниса *(рис. 1, № 3)* — две зоны адсорбции от фиолетового до фиолетово-красного цвета с Rf 0,40 и 0,50; на хроматограмме эфирного масла фенхеля *(рис. 1, № 4)* в нижней трети пластинки — желтая зона адсорбции (с Rf 0,27); на хроматограмме анисового масла коммерческого производства *(рис. 1, № 5)* — доминирующая зона адсорбции от красновато-коричневого до фиолетово-коричневого цвета; на хроматограмме линалоола отмечались зоны адсорбции в нижней трети пластинки *(рис. 1, № 7)*.

На хроматограмме испытуемого раствора препарата «Аниса обыкновенного плоды» *(рис. 1, № 2)* наблюдалась зона адсорбции фиолетово-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО транс-анетола. Над ней — ярко-фиолетовая зона адсорбции. Под зоной адсорбции анетола обнаруживалась интенсивная зона адсорбции от сине-фиолетового до фиолетово-красного цвета, под ней две зоны адсорбции от фиолетового до фиолетово-красного цвета (в отличие от фенхеля). Также на хроматограмме присутствовали другие менее яркие зоны адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора препарата «Фенхеля обыкновенного плоды» *(рис. 1, № 3)* наблюдалась зона адсорбции фиолетово-коричневого цвета на уровне зоны адсорбции СО *транс*-анетола. Под ней обнаруживалась интенсивная зона адсорбции от сине-фиолетового до фиолетово-красного цвета, в нижней трети пластинки — желтая зона адсорбции (отличие от аниса обыкновенного). На хроматограмме присутствовали другие менее яркие зоны адсорбции.

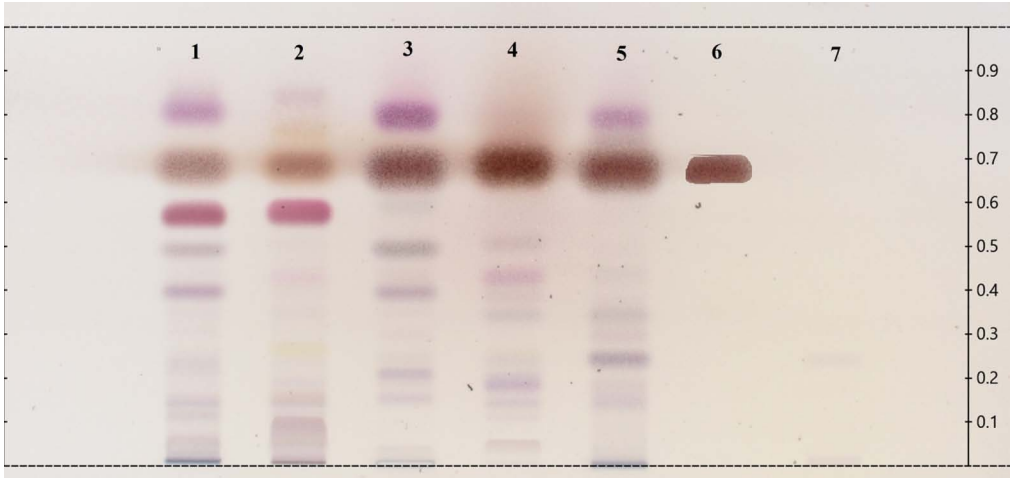


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Сравнительные ТСХ-хроматографические данные образцов: 1 — испытуемый раствор аниса обыкновенного плодов; 2 — испытуемый раствор фенхеля обыкновенного плодов; 3 — свежеотогнанное эфирное масло аниса обыкновенного плодов; 4 — свежеотогнанное эфирное масло фенхеля обыкновенного плодов; 5 — стандартный образец (СО) анисового масла; 6 — СО транс-анетола; 7 — СО линалоола.*

Fig. 1. *Comparative TLC profiles: 1, test solution of common anise fruits; 2, test solution of common fennel fruits; 3, fresh essential oil of common anise fruits; 4, fresh essential oil of common fennel fruits; 5, reference standard (RS) for anise oil; 6, RS for trans-anethole; 7, RS for linalool.*

В ходе исследования была проведена оценка специфичности аналитической методики определения эфирных масел в плодах аниса обыкновенного и фенхеля *(рис. 1)*. Показано, что на хроматограммах растворов эфирных масел, выделенных из лекарственных препаратов, четко видны основные зоны адсорбции, соответствующие зонам компонентов эфирных масел аниса обыкновенного и фенхеля обыкновенного. Присутствие других компонентов не мешает проведению анализа.

На хроматограмме, полученной для оценки подлинности ЛРП «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды», наблюдалась доминирующая зона адсорбции *транс*-анетола, что подтверждает обоснованность использования в качестве СО *транс*-анетола. Предложено использовать коммерчески доступные реактивы *транс*-анетол или анисовое масло, которые экономически выгодны. Использование СО линалоола в рутинном анализе считаем нецелесообразным.

При визуальной оценке хроматограммы испытуемых растворов выделены зоны адсорбции, характерные для плодов аниса обыкновенного — ярко-фиолетовая зона над зоной *транс*-анетола (монотерпены) и две зоны адсорбции от фиолетового до фиолетово-красного цвета в средней трети и плодов фенхеля обыкновенного — желтая зона в нижней трети пластинки. Для обоих ЛРП общей является интенсивная зона адсорбции от сине-фиолетового до фиолетово-красного цвета, расположенная под зоной адсорбции *транс*-анетола, вероятнее всего, относящаяся к компонентам жирных масел плодов.

Заключение

В рамках выполнения исследовательской работы усовершенствована ТСХ-методика оценки подлинности в ЛРС и ЛРП «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды»:

- предложено использование СО *транс*-анетола, который является доминирующим компонентом эфирных масел аниса обыкновенного плодов и фенхеля обыкновенного плодов;
- показано, что в качестве альтернативного СО возможно использование СО анисового масла;
- выбран оптимальный экстрагент — гексан, позволяющий сократить время экстрагирования и ускорить нанесение проб на хроматографические пластинки;
- выбран чувствительный и специфичный проявляющий реагент — ванилина раствор 1% в серной кислоте, позволяющий получить ярко окрашенные и более четкие зоны адсорбции определяемых компонентов, что улучшает визуальную оценку хроматограмм;
- определены специфические зоны адсорбции, позволяющие различать аниса обыкновенного плоды и фенхеля обыкновенного плоды.

Предложенная ТСХ-методика может быть рекомендована для включения в проекты фармакопейных статей ГФ РФ «Аниса обыкновенного плоды» и «Фенхеля обыкновенного плоды».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рязанова ТК, Куркин ВА. Актуальные вопросы стандартизации лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения, содержащих эфирные масла. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2):146–53.
   Ryazanova TK, Kurkin VA. Relevant issues of standardisation of herbal drugs and herbal drug preparations containing essential oils. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):146–53 (In Russ.).
   https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-495
2. Orav A, Raal A, Arak E. Essential oil composition of *Pimpinella anisum L*. fruits from various European countries. *Nat Prod Res*. 2008;22(3):227–32.
   https://doi.org/10.1080/14786410701424667
3. Sun W, Shahrajabian MH, Cheng Q. Anise (*Pimpinella anisum L*.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biol*. 2019;5(1):1–25.
   https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1673688
4. Тимашева ЛА, Горбунова ЕВ. Возможности рационального использования плодов фенхеля обыкновенного. *Научные труды Южного филиала Национального университета биоресурсов и природопользования Украины «Крымский агротехнологический университет». Серия: Технические науки*. 2012;(150):43–7.
   Timasheva LA, Gorbunova EV. Possibilities of the rational use of fruits of Fennel usual. *Scientific works of the Southern Branch of the National University of bioresources and nature management of Ukraine "Crimean Agrotechnological University". Series: Technical Sciences*. 2012;(150):43–7 (In Russ.).
   EDN: TAGCOD
5. Жданова СИ, Мустафина-Бредихина ДМ, Левадная АВ, Садыкова ДИ, Бабинцева АА. Немедикаментозная терапия младенческих колик. *Медицинский совет*. 2021;(17):40–6.
   Zhdanova SI, Mustafina-Bredikhina DM, Levadnaya AV, Sadykova DI, Babintseva AA. Non-pharmacological therapy for infantile colic. *Medical Council*. 2021;(17):40–6 (In Russ.).
   https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-17-40-46
6. Кароматов ИД, Музаффарова СК, Тураев ПТ. Лечебные свойства фенхеля. *Биология и интегративная медицина*. 2017;(9):23–43.
   Karomatov ID, Muzaffarova SK, Turaev PT. Medicinal properties of fennel. *Biology and Integrative Medicine*. 2017;(9):23–43 (In Russ.).
   EDN: YKWAHG

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Е.П. Шефер* — концепция работы, оценка полученных экспериментальных данных, написание текста рукописи; *Н.П. Антонова* — концепция работы, критический пересмотр содержания рукописи; *И.М. Моргунов* — проведение экспериментальных исследований; *С.С. Прохватилова* — редактирование текста рукописи; *М.С. Зотова* — сбор данных литературы, проведение экспериментальных исследований методом ТСХ, работа с графическим материалом.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Elena P. Shefer* conceptualised the study, evaluated the experimental data, and drafted the manuscript. *Natalia P. Antonova* conceptualised the study and critically revised the manuscript. *Igor M. Morgunov* carried out experiments. *Svetlana S. Prokhvatilova* edited the manuscript. *Maria S. Zotova* collected literature data, carried out TLC experiments, and prepared the illustrative material.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8389-4799
shefer@expmed.ru
Антонова Наталия Петровна, канд. биол. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7818-5303
nantonova@expmed.ru
Моргунов Игорь Михайлович
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3907-3456
Morgunov@expmed.ru
Прохватилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3278-1994
prokhvatilova@expmed.ru
Зотова Мария Сергеевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0743-0420
zotovams@expmed.ru

Elena P. Shefer, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8389-4799
shefer@expmed.ru
Natalia P. Antonova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7818-5303
nantonova@expmed.ru
Igor M. Morgunov
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3907-3456
Morgunov@expmed.ru
Svetlana S. Prokhvatilova, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3278-1994
prokhvatilova@expmed.ru
Maria S. Zotova
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0743-0420
zotovams@expmed.ru

Поступила 28.03.2023
После доработки 28.04.2023
Принята к публикации 22.05.2023
Online first 01.08.2023

Received 28 March 2023
Revised 28 April 2023
Accepted 22 May 2023
Online first 1 August 2023

УДК 615.07:615.322
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-426-432
Обзорная статья | Review

Check for updates
CC BY 4.0

О.В. Евдокимова, В.Л. Багирова, А.В. Бекетова, М.Н. Лякина ✉

Сравнительный анализ требований к качеству лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Лякина Марина Николаевна***; *Ljakina@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В рамках работы по унификации условий качественного и количественного анализа биологически активных веществ лекарственных средств растительного происхождения было установлено отсутствие отечественных стандартов качества на лекарственные средства на основе конского каштана обыкновенного.

Цель. На основе изучения зарубежных стандартов качества выявить наиболее перспективные методы анализа основных групп биологически активных веществ конского каштана обыкновенного семян и использовать данные методы при разработке проектов фармакопейных статей на соответствующие лекарственные препараты растительного происхождения.

Обсуждение. Проведен сравнительный анализ требований зарубежных фармакопей к качеству лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения конского каштана обыкновенного семян по показателям «Идентификация» и «Количественное определение».

Выводы. Основным методом установления подлинности лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян является метод тонкослойной хроматографии, а количественного определения — спектрофотометрический метод с использованием эсцина в качестве фармакопейного стандартного образца. Подготовлен проект фармакопейной статьи «Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой + тиамина гидрохлорид, раствор для приема внутрь», который предусматривает оценку качества лекарственного препарата с использованием методов тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии в видимой области спектра.

Ключевые слова: конского каштана обыкновенного семена; конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой; эсцин; стандартизация; тонкослойная хроматография; спектрофотометрия; фармакопейные требования; фармакопейная статья

Для цитирования: Евдокимова О.В., Багирова В.Л., Бекетова А.В., Лякина М.Н. Сравнительный анализ требований к качеству лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):426–432. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-426-432

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© О.В. Евдокимова, В.Л. Багирова, А.В. Бекетова, М.Н. Лякина, 2023

Olga V. Evdokimova,
Valeria L. Bagirova,
Anastasia V. Beketova,
Marina N. Lyakina ✉

Comparative Analysis of Quality Requirements for Medicines Based on Horse-Chestnut Seeds

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Marina N. Lyakina;*** *Ljakina@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. When harmonising conditions for qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds in herbal medicines, it was discovered that horse-chestnut products lack national quality standards.
Aim. This study aimed to review international quality standards in order to identify the most promising testing methods for the main groups of bioactive compounds in horse-chestnut seeds and draw upon these methods when drafting national pharmacopoeial monographs for horse-chestnut seed products.
Discussion. The authors compared the requirements established by leading world pharmacopoeias for the identification and assay of herbal drugs and herbal drug preparations derived from horse-chestnut seeds.
Conclusions. The study results show that, predominantly, identification tests are based on thin-layer chromatography, assays rely on spectrophotometry, and aescin is used as a pharmacopoeial reference standard. The authors drafted a pharmacopoeial monograph for the medicinal product Horse-Chestnut Seed Dry Extract + Thiamine Hydrochloride, Oral Solution, which requires using thin-layer chromatography and spectrophotometry for qualitative and quantitative testing.

Key words: horse-chestnut seeds; horse-chestnut dry extract; aescin; standardisation; thin-layer chromatography; spectrophotometry; pharmacopoeia requirements; pharmacopoeial monograph

For citation: Evdokimova O.V., Bagirova V.L., Beketova A.V., Lyakina M.N. Comparative analysis of quality requirements for medicines based on horse-chestnut seeds. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):426–432. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-426-432

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No.121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Хроническая венозная недостаточность (ХВН) нижних конечностей является самым распространенным заболеванием периферических сосудов, что позволяет рассматривать данную патологию как одну из болезней цивилизации. Ранее венозную недостаточность нижних конечностей относили к проблемам людей старше 50 лет, но сейчас признаки данного заболевания выявляют у подростков[1] [1–3], что свидетельствует об омоложении заболевания.

Конского каштана обыкновенного семена, а именно экстракт из них, используют в медицинской практике при лечении хронической венозной недостаточности, геморроя и послеоперационного отека [4–6]. На основе экстракта сухого из лекарственного растительного сырья (ЛРС) конского каштана обыкновенного выпускают лекарственные препараты для профилактики и лечения венозной недостаточности, которые широко представлены на отечественном фармацевтическом рынке[2].

Институтом фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на протяжении ряда лет проводится сравнительный анализ требований стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения для гармонизации с требованиями ведущих зарубежных фармакопей и для унификации условий качественного и количественного анализа биологически активных веществ [7].

Цель работы — на основе изучения зарубежных стандартов качества выявить наиболее

[1] Савельев ВС. Флебология: Руководство для врачей. М.: Медицина; 2001.
[2] https://grls.rosminzdrav.ru/

перспективные методы анализа основных групп биологически активных веществ конского каштана обыкновенного семян и использовать данные методы при разработке проектов фармакопейных статей на соответствующие лекарственные препараты растительного происхождения.

Основная часть

Согласно данным литературы, из конского каштана обыкновенного выделено и идентифицировано более 200 соединений [8]. Тритерпеноиды представлены баррингтогенолом-D [9], R1-барригенолом, баррингтогенолом-C, 21-O-ангелоил-баррингтогенолом-C, 21-O-тиглоил-22-O-ангелоил-R1-барригенолом [10], 16-O-ацетилпротоэсцигенином, 21-O-ангелоилпротоэсцигенином и 28-O-ангелоилпротоэсцигенином [11].

Тритерпеновые сапонины являются одной из основных групп биологически активных веществ (БАВ) семян конского каштана обыкновенного, всего выделено 12 тритерпеновых гликозидов: эсцины Ia, Ib, IIa, IIb и IIIa [12, 13], а также эсцины IIIb, IV, V, VI [14] и изоэсцины Ia, Ib, V [15]. Практическое применение находит β-эсцин, представляющий собой смесь сапонинов [15, 16].

Основными кумаринами являются зонтлиферон, эскулетин, скополетин, изоскополетин, скимин, чихорин, фраксин, эскулин, скополин и изоскополин [17]. Семена содержат также жирные масла, лауриновую, миристиновую, пальмитиновую, стеариновую, арахиновую и олеиновую кислоты [18]. Из оболочек семян конского каштана обыкновенного был выделен полисахаридный комплекс, состоящий в основном из арабинозы и галактозы [19].

Фармакологические свойства лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян, обусловленные богатым химическим составом данного ЛРС, подробно описаны в научной литературе. Тритерпеновые сапонины являются флебоактивными средствами, применяемыми для уменьшения венозных симптомов [20, 21]. Эти БАВ проявляют противовоспалительное действие, которое связывают с улучшением поступления ионов в Ca-зависимые K-каналы [22], повышением в результате венозного давления [23], высвобождением простагландина F2α из вен [24], высвобождением медиаторов воспаления за счет снижения активации и адгезивности лейкоцитов [25, 26], антагонизмом к провоспалительным 5-HT-рецепторам и гистамину [27], а также снижением активности тканевой гиалуронидазы [28].

Эсцины Ia, Ib, IIa и IIb предотвращают увеличение проницаемости сосудов, ингибируют отек [29]. Эсцин (β-эсцин) является основным компонентом сухого экстракта семян конского каштана обыкновенного, обладающим клинически значимой активностью при хронической венозной недостаточности, геморрое и послеоперационных отеках [20]. Эсцин и экстракты из сырья конского каштана обыкновенного дозозависимо сокращают стенки как вен, так и артерий, причем вены более чувствительны к этому воздействию, и значительно снижают АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека. Эти результаты могут, по крайней мере частично, объяснить механизм противовоспалительного действия лекарственных средств конского каштана обыкновенного при лечении хронической венозной недостаточности [30].

Эсцин усиливает систему антиоксидантной защиты организма и предотвращает перекисное окисление липидов, вызванное диетой с высоким содержанием жиров [31]. Исследования показали наличие антирадикальной активности у полисахаридного комплекса [19]. Данными, полученными *in vivo* и *in vitro*, было подтверждено, что эсцин обладает значительной противоопухолевой активностью, ингибирует химически индуцированный канцерогенез толстой кишки и пролиферацию клеток рака толстой кишки [32].

В настоящее время отсутствуют отечественные стандарты качества на лекарственные средства на основе конского каштана обыкновенного. Проведенный информационно-аналитический поиск среди монографий ведущих зарубежных фармакопей[3] (Европейской, Французской, Японской, Китайской и Фармакопеи США) показал, что только в фармакопеях стран Европы и США присутствуют монографии на лекарственное растительное сырье и фармацевтические субстанции конского каштана обыкновенного семян *(табл. 1)*. Оценка качества этих лекарственных средств согласно указанным фармакопейным стандартам проводится с использованием

[3] European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.
Pharmacopée française. Paris, Adrapharm; 1996.
United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2023.
Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo; 2006.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. I. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2015.

Таблица 1. *Показатели качества лекарственного растительного сырья и лекарственных средств на основе конского каштана обыкновенного семян, методы их определения в соответствии с требованиями зарубежных фармакопей и проектов фармакопейных статей для Государственной фармакопеи Российской Федерации*

Table 1. *Quality parameters of herbal drugs, herbal drug preparations, and herbal medicinal products based on horse-chestnut seeds; and methods to determine these parameters in accordance with the requirements of foreign pharmacopoeias and the monographs drafted for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation*

Наименование ЛРС/ЛСРП	Раздел монографии	Методы и условия анализа			
		Европейская фармакопея[4]	Французская фармакопея[5]	Фармакопея США[6]	Проекты ФС
Конского каштана обыкновенного семена	Определение основных групп БАВ	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: уксусная кислота ледяная — этилацетат — вода — пропанол (1,5:30:30:40) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: этилацетат — вода — пропанол (30:30:40) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: бутанол — уксусная кислота ледяная — вода (5:1:4) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: бутанол — уксусная кислота ледяная — вода (5:1:4) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле
	Количественное определение	ВЭЖХ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на проэсцигенин — не менее 1,5%	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 3,0%	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 3,0%	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 3,0%
Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой	Определение основных групп БАВ	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: уксусная кислота ледяная — этилацетат — вода — пропанол (1,5:30:30:40) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле	–	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: бутанол — уксусная кислота ледяная — вода (5:1:4) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: бутанол — уксусная кислота ледяная — вода (5:1:4) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле
	Количественное определение	ВЭЖХ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на проэсцигенин — не менее 6,5% и не более 10,0%	–	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 90,0% и не более 110,0% от указанного на упаковке	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 90,0% и не более 110,0% от указанного на упаковке
Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой + тиамина гидрохлорид, раствор для приема внутрь	Определение основных групп БАВ	–	–	–	ТСХ ФСО: эсцин ПФ: бутанол — уксусная кислота ледяная — вода (5:1:4) Реактив для детектирования: анисового альдегида раствор уксусно-кислый в метаноле

[4] European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.
[5] Pharmacopée française. Paris, Adrapharm; 1996.
[6] United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2023.

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Наименование ЛРС/ЛСРП	Раздел монографии	Методы и условия анализа			
		Европейская фармакопея[4]	Французская фармакопея[5]	Фармакопея США[6]	Проекты ФС
Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой + тиамина гидрохлорид, раствор для приема внутрь	Количественное определение	–	–	–	СФ ФСО: эсцин сумма тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — не менее 90,0% и не более 110,0% от указанного на упаковке

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. *ЛРС — лекарственное растительное сырье; ЛСРП — лекарственные средства растительного происхождения; БАВ — биологически активные вещества; ТСХ — тонкослойная хроматография; ФСО — фармакопейный стандартный образец; ПФ — подвижная фаза; СФ — спектрофотометрия; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; «–» — определение не проводится.*

фармакопейного стандартного образца (ФСО) эсцина — доминирующего компонента суммы тритерпеновых гликозидов, содержащихся в конском каштане обыкновенном семенах. Идентификация тритерпеновых сапонинов согласно монографиям зарубежных фармакопей осуществляется методом тонкослойной хроматографии, условия проведения анализа ЛРС, указанные в Европейской и Французской фармакопеях, а также в Фармакопее США, аналогичны. Контроль качества фармацевтической субстанции растительного происхождения (ФСРП) согласно Европейской фармакопее и Фармакопее США также проводят в сходных хроматографических условиях анализа.

Для количественного определения тритерпеновых гликозидов по требованиям Европейской фармакопеи используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, содержание суммы тритерпеновых гликозидов рассчитывают в пересчете на проэсцигенин. Требования Фармакопеи США и Французской фармакопеи для ЛРС и ФСРП конского каштана предусматривают использование метода спектрофотометрии в видимой области спектра (540 нм) после реакции с солями железа, содержание суммы тритерпеновых гликозидов пересчитывают на эсцин.

При подготовке отечественных фармакопейных стандартов на лекарственные средства конского каштана обыкновенного семян был использован подход, принятый в монографиях Фармакопеи США[7] и Французской фармакопеи[8], который предусматривает использование ФСО эсцина и для идентификации, и для оценки содержания суммы тритерпеновых гликозидов. Выбор эсцина в качестве ФСО *(табл. 1)* обоснован тем, что он является доминирующим компонентом среди тритерпеновых гликозидов, обусловливающих терапевтическую активность лекарственных препаратов конского каштана обыкновенного семян. Характеристики спектра раствора ФСО эсцина совпадают с характеристиками спектра испытуемых растворов.

На основании проведенного анализа литературы при разработке фармакопейной статьи на лекарственный препарат «Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой + тиамина гидрохлорид, раствор для приема внутрь» для обнаружения и определения тритерпеновых гликозидов также предложено использовать комплекс методов хроматографии в тонком слое сорбента и спектрофотометрии в видимой области спектра.

Выводы

1. Проведен сравнительный анализ требований зарубежных фармакопей к качеству ЛРС «Конского каштана обыкновенного семена» и ФСРП «Конского каштана обыкновенного семян экстракт сухой» по показателям «Идентификация» и «Количественное определение». Показано, что основным методом установления подлинности является метод тонкослойной хроматографии, а количественного определения — спектрофотометрический метод. Оба эти метода предусматривают использование ФСО эсцина, доминирующего компонента суммы тритерпеновых гликозидов.

2. Подготовлен проект фармакопейной статьи «Конского каштана обыкновенного семян

[7] United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2023.
[8] Pharmacopée française. Paris, Adrapharm; 1996.

экстракт сухой + тиамина гидрохлорид, раствор для приема внутрь», который предусматривает оценку качества лекарственного препарата с использованием методов тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии в видимой области спектра.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Яблоков ЕГ, Кириенко АИ, Богачев ВЮ. *Хроническая венозная недостаточность*. М.: Медицина; 1999.
Yablokov EG, Kirienko AI, Bogachev VYu. *Chronic venous insufficiency*. Moscow: Meditisina; 1999 (In Russ.).
2. Золотухин ИА, Селиверстов ЕИ, Шевцов ЮН, Авакьянц ИП, Никишков АИ, Татаринцев АМ, Кириенко АИ. Распространенность хронических заболеваний вен: результаты популяционного эпидемиологического исследования. *Флебология*. 2016;10(4):119–25.
Zolotukhin IA, Seliverstov EI, Shevtsov YuN, Avakiants IP, Nikishkov AI, Tatarintsev AM, Kirienko AI. Prevalence of chronic venous disease: results of population based epidemiological study. *Phlebology*. 2016;10(4):119–25 (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/flebo2016103119-125
3. Evans CJ, Fowkes FG, Ruckley CV, Lee AJ. Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*. 1999;53(3):149–53.
https://doi.org/10.1136/jech.53.3.149
4. Bielanski TE, Piotrowski ZH. Horse-chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. *J Fam Pract*. 1999;48(3):171–2.
PMID: 10086755
5. Kahn SR. Review: horse chestnut seed extract is effective for symptoms of chronic venous insufficiency. *ACP J Club*. 2006;145(1):20.
PMID: 16813368
6. Persson IAL, Persson K. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *Recent Prog Med Plants*. 2010;28:159–71.
7. Евдокимова ОВ, Бекетова АВ, Лякина МН. Определение антраценпроизводных соединений в лекарственных средствах растительного происхождения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(2):104–14.
Evdokimova OV, Beketova AV, Lyakina MN. Determination of anthracene derivatives in herbal medicines. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(2):104–14 (In Russ.).
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-104-114
8. Zhang Z, Li S, Yuan X. An overview of Genus Aesculus L.: ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological activities. *Pharm Crops*. 2010;1(1):24–51.
https://doi.org/10.2174/2210290601001010024
9. Wulff G, Tschesche R. Uber triterpene-XXVI. Uber die struktur der rosskastaniensaponine (aescin) und die aglykone verwandter glykoside. *Tetrahedron*. 1969;25:415–36.
10. Konoshima T, Lee KH. Antitumor agents, 82. Cytotoxic sapogenols from *Aesculus hippocastanum*. *J Nat Prod*. 1986;49(4):650–6.
https://doi.org/10.1021/np50046a015
11. Kuhn R, Low I. Uber die protoascigenin aus ascin. *Tetrahedron*. 1966;22:1899–906.
12. Yoshikawa M, Harada E, Murakami T, Matsuda H, Wariishi N, Yamahara J, Murakami N, Kitagawa I. Escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa, bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.: their inhibitory effects on ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1994;42(6):1357–9.
https://doi.org/10.1248/cpb.42.1357
13. Yoshikawa M, Murakami T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N, Kitagawa I. Bioactive saponins and glycosides. III. Horse chestnut. (1): the structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1996;44(8):1454–64.
https://doi.org/10.1248/cpb.44.1454
14. Yoshikawa M, Murakami T, Yamahara J, Matsuda H. Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse chesnut. (2): Structures of escins IIIb, IV, V, and VI and Isoescins Ia, Ib, and V, acylated polyhydroxyoleanene triterpene oligoglycosides, from the seeds of horse chestnut tree (*Aesculus hippocastanum* L., *Hippocastanaceae*). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1998;46(11):1764–9.
https://doi.org/10.1248/cpb.46.1764
15. Pietta P, Mauri P, Maffei Faccino R, Carini M. High-performance liquid chromatographic analysis of β-escin. *J Chromatogr A*. 1989;478:259–63.
https://doi.org/10.1016/0021-9673(89)90026-5
16. Facino RM, Carini M, Moneti G, Arlandini E, Pietta P, Mauri P. Mass spectrometric characterization of horse chestnut saponins (escin). *Org Mass Spectrom*. 1991;26:989.
17. Комиссаренко НФ, Деркач АИ, Комиссаренко АН, Черменева ГВ, Спиридонов ВН. Кумарины *Aesculus hippocastanum* L. *Растительные ресурсы*. 1994;30(3):53–9.
Komissarenko NF, Derkach AI, Komissarenko AN, Cheremnyova GV, Spiridonov VN. Coumarins of *Aesculus hippocastanum* L. *Rastitel'nye Resursy*. 1994;30(3):53–9 (in Russ.).
18. Srijayanta S, Raman A, Goodwin BL. A comparative study of the constituents of *Aesculus hippocastanum* and *Aesculus indica*. *J Med Food*. 1999;2(2):45–50.
https://doi.org/10.1089/jmf.1999.2.45
19. Азимова ЛБ, Филатова АВ, Тураев АС, Джурабаев ДТ. Изучение полисахаридного комплекса, выделенного из *Aesculus hippocastanum* L. *Химия растительного сырья*. 2021;(3):115–22.
Azimova LB, Filatova AV, Turaev AS, Dzhurbaev DT. Isolation and study of the polysaccharide complex isolated from *Aesculus hippocastanum* L. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2021;(3):115–22 (In Russ.).
https://doi.org/10.14258/jcprm.2021039173
20. Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res*. 2001;44(3):183–93.
https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0847
21. Кириенко АИ, Григорян РА, Золотухин ИА. Современные принципы лечения хронической ве-

нозной недостаточности. *Consilium Medicum*. 2003;5(6):361–6.
Kirienko AI, Grigoryan RA, Zolotukhin IA. Current principles in the treatment of chronic venous insufficiency. *Consilium Medicum*. 2003;5(6):361–6 (In Russ.). EDN: UDGSMH
22. Muraki K, Imaizumi Y, Watanabe M. Ca-dependent K channels in smooth muscle cells permeabilized by h-escin recorded using the cellattached patch-clamp technique. *Pflugers Arch*. 1992;420(5–6):461–9. https://doi.org/10.1007/bf00374620
23. Pearson PJ, Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1993;122:1–67. https://doi.org/10.1007/bfb0035273
24. Berti F, Omini C, Longiave D. The mode of action of aescin and the release of prostaglandins. *Prostaglandins*. 1977;14(2):241–9. https://doi.org/10.1016/0090-6980(77)90169-1
25. Guillaume M, Padioleau V. Veinotonic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. *Arzneimittelforschung*. 1994;44(1):25–35. PMID: 8135874
26. Panigati D. Farmacologia dell'escina, saponina dell'*Aesculus hippocastanum* L. Parte II. Farmacologia dell'escina. Capitolo I. *Boll Chim Farm*. 1992;131:242–6.
27. Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Possible involvement of 5-HT and 5-HT2 receptors in acceleration of gastrointestinal transit by escin Ib in mice. *Life Sci*. 2000;66(23):2233–8. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00551-8
28. Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L. Antielastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix, Aesculus hippocastanum,* and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Arch Pharm (Weinheim)*.1995;328(10):20–4. https://doi.org/10.1002/ardp.19953281006
29. Matsuda H, Li Y, Murakami T, Ninomiya K, Yamahara J, Yoshikawa M. Effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. *Biol Pharm Bull*. 1997;20(10):1092–5. https://doi.org/10.1248/bpb.20.1092
30. Felixsson E, Persson IA, Eriksson AC, Persson K. Horse chestnut extract contracts bovine vessels and affects human platelet aggregation through 5-HT(2A) receptors: an *in vitro* study. *Phytother Res*. 2010;24(9):1297–301. https://doi.org/10.1002/ptr.3103
31. Küçükkurt I, Ince S, Keleş H, Akkol EK, Avci G, Yeşilada E, Bacak E. Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(1):18–22. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.017
32. Patlolla JM, Raju J, Swamy MV, Rao CV. Beta-escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21(waf1/cip1) in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(6):1459–66. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-05-0495

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *О.В. Евдокимова* — постановка задач исследования и подготовка текста рукописи; *В.Л. Багирова* — существенный вклад в концепцию работы, редактирование текста, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; *А.В. Бекетова* — сбор и анализ данных литературы; *М.Н. Лякина* — редактирование и переработка текста, ответственность за целостность всех частей рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga. V. Evdokimova* set the research objectives and drafted the manuscript. *Valeria L. Bagirova* made a significant contribution to the study concept, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Anastasia V. Beketova* collected and analysed literature data. *Marina N. Lyakina* edited the manuscript, revised it, and agreed to be accountable for the integrity of all parts of the work.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Евдокимова Ольга Владимировна, д-р фарм. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2191-1033
evdokimovaov@expmed.ru
Багирова Валерия Леонидовна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0379-6158
bagirova@expmed.ru
Бекетова Анастасия Викторовна, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6975-516X
beketova@expmed.ru
Лякина Марина Николаевна, д-р фарм. наук, старший научный сотрудник
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8220-1054
Ljakina@expmed.ru

Olga V. Evdokimova, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2191-1033
evdokimovaov@expmed.ru
Valeria L. Bagirova, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0379-6158
bagirova@expmed.ru
Anastasia V. Beketova, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6975-516X
beketova@expmed.ru
Marina N. Lyakina, Dr. Sci. (Pharm.), Senior Research Associate
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8220-1054
Ljakina@expmed.ru

Поступила 09.11.2022
После доработки 18.07.2023
Принята к публикации 06.09.2023

Received 9 November 2022
Revised 18 July 2023
Accepted 6 September 2023

УДК 615.074:504.054:58.02
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-534
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

В.М. Щукин[1] ✉,
Е.А. Хорольская[1],
Н.Е. Кузьмина[1],
И.П. Ремезова[2]

Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов, присутствующих в слоевищах ламинарии

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

[2] *Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, просп. Кирова, д. 33, Пятигорск, 357500, Российская Федерация*

✉ ***Щукин Виктор Михайлович;*** *Schukin@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Слоевища ламинарии как нативные продукты принимают в течение нескольких недель или месяцев при лечении и профилактике ряда заболеваний. Важно не ограничиваться контролем содержания нормируемых элементов в исходном сырье слоевищ ламинарии, а дополнительно оценивать риски негативного воздействия других тяжелых металлов, потребляемых в составе лекарственного препарата в течение периода экспозиции.

Цель. Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов, поступающих в организм человека вместе с терапевтической дозой лекарственных растительных препаратов на основе слоевищ ламинарии.

Материалы и методы. В работе исследовано содержание элементных контаминантов *Laminaria saccharina* и *Laminaria japonica* (Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, Zn). Содержание неорганического мышьяка определено методом твердофазной экстракции с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Результаты. Значения средних концентраций нормируемых элементов, усредненных на уровне 90-го процентиля, не превышают норм их содержания в водорослях и морских травах, используемых в качестве пищевых продуктов. Суммарный индекс опасности от воздействия всех анализируемых элементов составляет 0,173 (медианный уровень) и 0,616 (усреднение на уровне 90-го процентиля). Максимальный вклад в суммарный индекс опасности вносят элементы As, Fe, Cd, Sr. Значения индивидуальных канцерогенных рисков (CR) воздействия потенциальных канцерогенов As, Cd, Pb, Cr укладываются в диапазон $1\times10^{-6}<CR<1\times10^{-4}$.

Выводы. Суммарное негативное воздействие анализируемых элементов при потреблении суточной терапевтической дозы слоевищ ламинарии в течение периода экспозиции не наносит вред организму человека. При употреблении максимальной терапевтической дозы препарата «Ламинарии слоевища, морская капуста» в течение 1 месяца и более содержание хрома в препарате подлежит контролю наряду с нормируемыми в лекарственном растительном сырье и препаратах элементами для предотвращения вероятности развития новообразований.

Ключевые слова: *Laminaria saccharina*; *Laminaria japonica*; слоевища ламинарии; элементные контаминанты; коэффициент опасности; индекс опасности; индивидуальный канцерогенный риск

© В.М. Щукин, Е.А. Хорольская, Н.Е. Кузьмина, И.П. Ремезова, 2023

Для цитирования: Щукин 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. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-534

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. Н.Е. Кузьмина и И.П. Ремезова — члены редакционной коллегии журнала «*Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*» с 2021 года. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Victor M. Shchukin[1] ✉, **Elena A. Khorolskaya**[1], **Natalia E. Kuz'mina**[1], **Irina P. Remezova**[2]

Carcinogenic and Non-Carcinogenic Health Risks Assessment of Elemental Contaminants in *Laminariae thalli*

[1] *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

[2] *Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, 33 Kirov Ave., Pyatigorsk 357500, Russian Federation*

✉ ***Victor M. Shchukin;*** *Schukin@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. *Laminariae thalli* are a native herbal preparation used to prevent or treat multiple diseases. To achieve the optimal effect, this herbal preparation is usually taken for several weeks or months. The control of *Laminariae thalli* should extend beyond the element content in the herbal drug limited by specifications; additionally, it is important to assess the health risks of ingesting heavy metals with the medicinal product during the exposure period.

Aim. The study aimed to assess the carcinogenic and non-carcinogenic risks of consuming elemental contaminants with therapeutic doses of herbal medicinal products based on *Laminariae thalli*.

Materials and methods. The study investigated the content of elemental contaminants (Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, and Zn) in *Laminaria saccharina* and *Laminaria japonica*. The content of inorganic arsenic was determined by solid-phase extraction using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Results. When averaged at the 90th percentile level, the mean concentrations of the specified elements did not exceed the limits for seaweed and seagrass foods. The total hazard index from exposure to all analysed elements amounted to 0.173 at the median level and 0.616 at the 90th percentile level. The leading contributors to the total hazard index were As, Fe, Cd, and Sr. The individual carcinogenic risk (CR) values for the potential carcinogens (As, Cd, Pb, and Cr) fell within the range of $1\times10^{-6}<CR<1\times10^{-4}$.

Conclusions. If the elements analysed are ingested with a daily therapeutic dose of *Laminariae thalli* for the exposure period, their total negative effect will not cause harm to the human body. To eliminate the risk of developing neoplasms when the studied medicinal product (*Laminariae thalli*) is taken at its maximum recommended therapeutic dose for a month or more, the Cr content should be controlled along with the elements limited by specifications for herbal medicines.

Key words: *Laminaria saccharina*; *Laminaria japonica*; *Laminariae thalli*; kelp; elemental contaminants; hazard quotient; hazard index; individual carcinogenic risk

For citation: Shchukin V.M., Khorolskaya E.A., Kuz'mina N.E., Remezova I.P. Carcinogenic and non-carcinogenic health risks assessment of elemental contaminants in *Laminariae thalli*. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):433–441. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-534

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Natalia E. Kuz'mina and Irina P. Remezova have been members of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2021. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В последнее десятилетие при нормировании содержания контаминантов в лекарственных средствах (ЛС) реализуется переход от принципа безвредности к принципу допустимости пренебрежимо малых негативных эффектов воздействия этих контаминантов на организм человека[1]. Как следствие, в нормативных документах предельно допустимые дозы содержания контаминантов в ЛС заменяют на предельно допустимые концентрации элементной примеси в суточной дозе препарата (суточные ПДК) с учетом пути поступления препарата в организм человека[2]. Оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков проводится, как правило, в отношении контаминантов продуктов питания и объектов окружающей среды[3]. Однако в настоящее время сформировалась тенденция также оценивать канцерогенные и неканцерогенные риски негативного воздействия контаминантов лекарственных препаратов, принимаемых длительным курсом: синтетических обезболивающих препаратов [1], лекарственных растительных препаратов (ЛРП) различного фармакологического профиля [2–5].

ЛРП на основе ламинарии слоевищ (морская капуста) применяются для лечения хронических атонических запоров, мастопатии, а также для профилактики заболеваний щитовидной железы и атеросклероза[4]. Кроме того, слоевища ламинарии используют в качестве биологически активной добавки к пище — дополнительного источника йода[5]. Характерной особенностью слоевищ ламинарии является высокая степень поглощения элементов из морской воды в ходе процессов биосорбции и биоаккумуляции [6, 7].

Цель работы — оценка канцерогенных и неканцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов, поступающих в организм человека вместе с терапевтической дозой лекарственных растительных препаратов на основе слоевищ ламинарии.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали ЛРП «Ламинарии слоевища (морская капуста)» производства АО «Красногорсклексредства» (серия 10121) и ЗАО «СТ-Медифарм» (серия 011121/ОП); образцы слоевищ ламинарии японской (*Laminaria japonica*), собранной в акватории залива Петра Великого, Тихий океан, и ламинарии сахаристой (*Laminaria saccharina*), собранной в акватории Соловецкого острова Белого моря. Сбор образцов проводился в августе 2020 г. с последующим высушиванием на солнце в течение двух дней, видовая принадлежность образцов была определена с помощью макро- и микроскопического анализа. Кроме того, использовали данные литературы о содержании элементных контаминантов в слоевищах ламинарии фармакопейных видов[6] различных мест сбора [8].

Оценивали канцерогенные и неканцерогенные риски воздействия тяжелых металлов (Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, Zn), мышьяка, а также алюминия, который обладает схожими с тяжелыми металлами токсическими свойствами [9]. Селективное определение неорганических форм мышьяка (iAs) в слоевищах ламинарии проводили по собственной разработанной методике, основанной на методах твердофазной экстракции и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) [10]. На первом этапе из испытуемого образца слоевищ ламинарии экстрагировали мышьяк-содержащие соединения (с одновременным окислением мышьяка (III) до мышьяка (V)) водорода пероксида 3% раствором при микроволновом нагревании при 95 °С в течение 90 мин. Затем отфильтрованный экстракт наносили на твердофазный картридж, на котором сорбировалась неорганическая фракция мышьяка. Остатки органической фракции с картриджа смывали раствором 0,5 М уксусной кислоты. Неорганическую фракцию мышьяка смывали с картриджа 0,4 М раствором азотной кислоты; определение содержания мышьяка проводили методом ИСП-МС.

---

[1] ICH Q3D (R2) Guideline for elemental impurities. EMA/CHMP/ICH/353369/2013.
WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. World Health Organization; 2007. https://apps.who.int/iris/handle/10665/43510

[2] Elemental impurities — limits <232>. United States Pharmacopeia. USP–NF 2023.

[3] МУ 2.3.7.2519-09 Определение экспозиции и оценка риска воздействия химических контаминантов пищевых продуктов на население. 2009.
Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. 2004.

[4] https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx

[5] http://fp.crc.ru/

[6] ФС.2.5.0080.18 Ламинарии слоевища (морская капуста). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

В работе использовали весы электронные аналитические XPE205DR (Mettler Toledo AG), воду деионизованную, полученную на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore). Разложение проб проводили в микроволновой системе ETHOS UP (Milestone). Для фильтрации проб применяли мембранные PTFE фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (Thermo Scientific Nalgene). При твердофазной экстракции использовали картриджи Maxi-Clean (S*Pure). Для проведения экстракции картриджи были установлены в вакуумную камеру Visiprep DL (Supelco). Элементный анализ проводили на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 (Agilent Technologies).

В ходе исследования были использованы следующие реактивы: водорода пероксид (30%, Merck, кат. № 1.07298), кислота азотная (69%, Ultratrace, Scharlau, кат. № 7697-37-2), метанол (CARLO ERBA Reagents, кат. № 67-56-1), стандартный образец мышьяка (аттестованное содержание 1000 мг/дм^3, Supelco, кат. № 1.70303.0100).

Для расчета концентраций анализируемых элементов в образцах слоевищ ламинарии применяли метод калибровочной кривой. Готовили по три параллельных испытуемых раствора для каждого образца. Итоговые величины концентраций определяли как среднее арифметическое полученных значений.

Единицей измерения терапевтической дозы измельченных слоевищ ламинарии является чайная ложка[7]. Средняя масса 1 чайной ложки высушенных и измельченных слоевищ ламинарии (3,0±0,16 г) определена усреднением результатов 12 последовательных измерений.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 с установленным пакетом «Анализ данных».

Результаты и обсуждение

Неканцерогенный риск определяется как показатель ожидаемого роста заболеваемости населения за счет токсических свойств посторонних химических веществ в исследуемых объектах окружающей среды. При оценке неканцерогенного риска исходят из предположения о наличии порога вредного действия, ниже которого вредные эффекты не развиваются. Количественной характеристикой неканцерогенного риска является коэффициент опасности (HQ), который представляет собой отношение воздействующей дозы химического вещества к его безопасному (референтному) уровню воздействия[8]:

$$HQ = \frac{ADD}{RfD}, \quad (1)$$

где ADD — среднесуточная доза потребления элементной примеси (экспозиция контаминантом), мг/(кг×сут); RfD — референтная доза, мг/(кг×сут).

Величину ADD определяли по уравнению [1]:

$$ADD = \frac{C \times IR}{BW}, \quad (2)$$

где C — концентрация исследуемой элементной примеси в слоевищах ламинарии, мг/кг; IR — среднесуточная терапевтическая доза слоевищ ламинарии, кг/сут; BW — среднее значение массы тела человека (70 кг)[9].

За период усреднения при определении среднесуточной терапевтической дозы слоевищ ламинарии принимали 1 месяц[10].

Значение HQ принято рассчитывать при двух уровнях концентраций элементного контаминанта: медианном (C_{med}) и 90-го процентиля ($C_{90\%}$). Для определения величин C_{med} и $C_{90\%}$ использовали составленную нами выборку данных по контаминированию слоевищ ламинарии [8]. Следует отметить, что в работе [8] представлена информация об общем содержании мышьяка, в то время как значение RfD в отечественных и зарубежных нормативных документах указано для неорганических форм мышьяка[11]. Это связано с тем, что неорганические соединения мышьяка значительно токсичнее, чем органические формы [11]. В *таблице 1* приведены обобщенные собственные экспериментальные данные и данные литературы о содержании iAs в слоевищах ламинарии фармакопейных видов *L. saccharina* и *L. japonica*, которые были использованы при расчете значений C_{med} и $C_{90\%}$.

[7] https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx
[8] Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. 2004.
[9] МУ 2.3.7.2519-09 Определение экспозиции и оценка риска воздействия химических контаминантов пищевых продуктов на население. 2009.
[10] Там же.
[11] Regional Screening Level (RSL) Summary Table. United States Environmental Protection Agency (USEPA); 2022.
Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. 2004.

Таблица 1. *Содержание неорганических форм мышьяка в слоевищах ламинарии различных ареалов обитания*

Table 1. *Inorganic arsenic content of Laminariae thalli from different habitats*

Вид *Species*	Содержание iAs, мг/кг *iAs content, mg/kg*	Вид *Species*	Содержание iAs, мг/кг *iAs content, mg/kg*
Laminaria saccharina	0,17 [12]	*Laminaria japonica*	0,34 [17]
Laminaria saccharina	0,03–0,07 [13]	*Laminaria japonica*	0,35 [17]
Laminaria saccharina	0,16–0,8 [14]	*Laminaria japonica*	0,8 [18]
Laminaria saccharina	0,16 [15]	*Laminaria japonica*	0,2 [19]
Laminaria saccharina	0,23 [15]	*Laminaria japonica*	0,254–0,297 [14]
Laminaria japonica	0,838 [16]	*Laminaria japonica*	1,71*
Laminaria japonica	0,30 [17]	*Laminaria japonica*	4,70*

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

* *Собственные экспериментальные данные.*
* *Own experimental data.*

Таблица 2. *Коэффициенты опасности (HQ) элементных контаминантов слоевищ ламинарии*

Table 2. *Hazard quotients (HQ) for elemental contaminants in Laminariae thalli*

Элемент *Element*	Объем выборки *Number of samples*	RfD мг/(кг×сут) *mg/kg/day*	C_{med} ($C_{90\%}$) мг/кг *mg/kg*	ADD_{med} ×10^{-3} ($ADD_{90\%}$ ×10^{-3}), мг/(кг×сут) *mg/kg/day*	HQ_{med} ($HQ_{90\%}$)
Al	14	1,0	25,47 (285,2)	1,091 (12,22)	0,001 (0,012)
iAs	14	0,0003	0,297 (1,187)	0,013 (0,051)	0,042 (0,170)
Cd	30	0,001*	0,595 (2,028)	0,026 (0,087)	0,026 (0,087)
Cr	18	1,5**	0,600 (1,210)	0,026 (0,052)	0,017×10^{-3} (0,035×10^{-3})
Co	16	0,0003	0,085 (0,330)	0,004 (0,014)	0,012 (0,047)
Cu	31	0,04	1,392 (2,500)	0,060 (0,107)	0,001 (0,003)
Fe	33	0,70	116,0 (393,6)	4,971 (16,87)	0,036 (0,120)
Hg	19	0,0003***	0,023 (0,112)	0,001 (0,005)	0,003 (0,016)
Mn	30	0,14*	5,984 (19,08)	0,256 (0,818)	0,002 (0,006)
Mo	7	0,005	0,948 (1,805)	0,041 (0,077)	0,008 (0,015)
Ni	20	0,02***	0,470 (2,400)	0,020 (0,103)	0,001 (0,005)
Pb	31	0,0035	0,340 (3,100)	0,015 (0,133)	0,004 (0,038)
Se	14	0,005	0,140 (1,877)	0,006 (0,080)	0,001 (0,016)
Sr	9	0,60	349,8 (805,9)	14,991 (34,539)	0,025 (0,058)
V	13	0,005	0,900 (1,970)	0,039 (0,084)	0,008 (0,017)
Zn	36	0,30	15,63 (40,15)	0,670 (1,721)	0,002 (0,006)

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. *RfD — референтная доза, мг/(кг×сут); C_{med} — концентрации элементной примеси на уровне медианы, мг/кг; $C_{90\%}$ — концентрации элементной примеси на уровне 90-го процентиля, мг/кг; ADD_{med} — среднесуточная доза потребления элементной примеси на уровне медианы, мг/(кг×сут); $ADD_{90\%}$ — среднесуточная доза потребления элементной примеси на уровне 90-го процентиля, мг/(кг×сут); HQ_{med} — коэффициент опасности на уровне медианы; $HQ_{90\%}$ — коэффициент опасности на уровне 90-го процентиля.*
* *Значение RfD приведено для диетических добавок.*
** *Значение RfD приведено для Cr^{3+}.*
*** *Значение RfD приведено для солей Hg, Ni.*
Note. *RfD, reference dose (mg/kg/day); C_{med}, elemental impurity concentrations at the median level (mg/kg); $C_{90\%}$, elemental impurity concentrations at the 90th percentile level (mg/kg); ADD_{med}, average daily doses of elemental impurities at the median level (mg/kg/day); $ADD_{90\%}$, average daily doses of elemental impurities at the 90th percentile level (mg/kg/day); HQ_{med}, hazard quotients at the median level; $HQ_{90\%}$, hazard quotients at the 90th percentile level (mg/kg/day).*
* *RfD for dietary supplements.*
** *RfD for Cr^{3+}.*
*** *RfD for Hg and Ni salts.*

В *таблице 2* представлены значения RfD анализируемых элементов при пероральном приеме, C_{med} и $C_{90\%}$ в слоевищах ламинарии, а также рассчитанные на их основе значения ADD и HQ.

Следует отметить, что значения $C_{90\%}$ нормируемых элементов в слоевищах ламинарии ниже (As, Hg, Pb) или практически совпадают (Cd) с отечественными нормами их содержания в водорослях и морских травах, используемых в качестве пищевых продуктов (5; 2; 0,2 и 10 мг/кг для As, Cd, Hg и Pb соответственно[12]). Представленные в *таблице 2* значения HQ варьируют в широких пределах, максимальные значения HQ наблюдаются для As, Fe, Cd и Sr.

Для оценки суммарного негативного воздействия элементных контаминантов используют индекс опасности (HI), который представляет собой сумму значений HQ анализируемых элементов на уровнях медианы и 90-процентиля (HI_{med} и $HI_{90\%}$ соответственно). Принято считать, что при значении $HI_{med} \geqslant 1$ элементного контаминанта происходит недопустимое воздействие на здоровье человека, требующее принятия соответствующих мер по обеспечению безопасности. Сочетание $HI_{med}<1$ и $HI_{90\%}<1$ указывает на отсутствие риска для здоровья человека при воздействии контаминантов. При $HI_{med}<1$, но $HI_{90\%}>1$ необходимо усилить контроль за содержанием контаминантов с наибольшим вкладом в экспозицию[13]. Для слоевищ ламинарии HI_{med}=0,173, $HI_{90\%}$=0,616. Следовательно, воздействие элементов Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, Zn, попадающих в организм с суточной терапевтической дозой слоевищ ламинарии, не наносит вред организму человека в течение периода приема препарата.

Под канцерогенным риском понимают вероятность развития злокачественных новообразований на протяжении всей жизни человека, обусловленную воздействием потенциального канцерогена. Оценку канцерогенных рисков проводят в отношении элементных контаминантов с безусловной (Cd, Cr(VI), iAs) или с вероятной (Co, Pb, Ni) канцерогенностью для человека[14]. Основным параметром для оценки канцерогенного риска является фактор наклона (SF), характеризующий степень нарастания канцерогенного риска с увеличением воздействующей дозы на одну единицу. С его помощью определяют индивидуальный канцерогенный риск (CR), который представляет собой параметр оценки вероятности развития рака при воздействии потенциального канцерогена в течение 70 лет. Значение индивидуального канцерогенного риска от потребления потенциальных канцерогенных элементных контаминантов, перорально поступающих в организм вместе с терапевтической дозой слоевищ ламинарии в период контаминации (CR_o), определяли по формуле[15]:

$$CR_o = LADD \times SF_o, \quad (3)$$

где LADD — пожизненная среднесуточная доза элементного контаминанта, поступающего в организм человека, мг/(кг×сут); SF_o — фактор наклона при пероральном поступлении потенциального канцерогена (мг/(кг×сут))$^{-1}$.

Значение LADD определяли по формуле[16]:

$$LADD = \frac{C_{90\%} \times IR \times ED \times EF}{BW \times AT \times 365}, \quad (4)$$

где $C_{90\%}$ — средняя концентрация элемента на уровне 90-го процентиля; IR — среднесуточная терапевтическая доза слоевищ ламинарии, кг/сут; ED — продолжительность воздействия, лет; EF — частота воздействия, сут/год; AT — период усреднения экспозиции, (для канцерогенов 70 лет); BW — среднее значение массы тела человека (70 кг).

При определении значения CR_o мы руководствовались инструкцией по применению препарата «Ламинарии слоевища (морская капуста)» (с 12 лет 15–30 дней по ½–1 чайной ложке в день)[17]. Рассматривали три варианта применения данного ЛРП: вариант 1 — 15 дней по ½ чайной ложки (0,0015 кг), вариант 2 — 30 дней по 1 чайной ложке (0,003 кг), вариант 3 — в течение года ежедневно по 1 чайной ложке. Использовали следующие значения

[12] СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. 2001.
[13] МУ 2.3.7.2519-09 Определение экспозиции и оценка риска воздействия химических контаминантов пищевых продуктов на население. 2009.
United States Environmental Protection Agency (USEPA); 2020.
[14] Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2019. https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/
[15] Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. 2004.
[16] Там же.
[17] https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx

Таблица 3. *Величина канцерогенного риска для различных вариантов перорального приема препаратов ламинарии слоевищ*

Table 3. *Carcinogenic risks upon oral intake (CR_o) for different elemental carcinogen consumption patterns*

Вариант приема *Consumption pattern*	Канцерогенный риск (CR_o) *Carcinogenic risk (CR_o)*			
	iAs	Cd	Cr	Pb
15 дней по ½ чайной ложки *15 days, ½ teaspoon*	$1{,}3\times10^{-6}$	$5{,}6\times10^{-7}$	$3{,}7\times10^{-7}$	$1{,}1\times10^{-7}$
30 дней по 1 чайной ложке *30 days, 1 teaspoon*	$5{,}4\times10^{-6}$	$2{,}2\times10^{-6}$	$1{,}5\times10^{-6}$	$4{,}3\times10^{-7}$
В течение года ежедневно по 1 чайной ложке *1 year, 1 teaspoon daily*	$6{,}3\times10^{-5}$	$2{,}7\times10^{-5}$	$1{,}8\times10^{-5}$	$5{,}2\times10^{-6}$

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. *iAs — неорганическая форма мышьяка.*
Note. *iAs, inorganic arsenic.*

SF_o, кг×сут/мг: 1,5 (iAs), 0,38 (Cd), 0,42 (Cr), 0,047 (Pb)[18]. Следует отметить, что для Co и Ni в отечественной и зарубежной документации приведены значения SF только для ингаляционного введения, поэтому для этих элементов CR_o не рассчитывали. Данные об индивидуальных канцерогенных рисках от потребления iAs, Cd, Cr, Pb, при пероральном приеме ЛРП «Слоевища ламинарии, морская капуста», представлены в *таблице 3*.

Канцерогенный риск воздействия элементов iAs, Cd, Cr, Pb, поступающих в организм человека со слоевищами ламинарии, зависит от продолжительности курса лечения и от принимаемой дозы ЛРП (*табл. 3*). Необходимо подчеркнуть, что даже при ежедневном приеме максимальной терапевтической дозы слоевищ ламинарии значения CR_o укладываются в диапазон предельно допустимого канцерогенного риска ($1\times10^{-6} < CR < 1\times10^{-4}$)[19], на котором основано большинство рекомендуемых международными организациями гигиенических нормативов для населения. Данный уровень канцерогенного риска приемлем для населения в целом, однако содержание элементных контаминантов подлежит постоянному контролю.

Заключение

В ходе проведенного исследования оценены количественные характеристики неканцерогенных и канцерогенных рисков негативного воздействия тяжелых металлов, алюминия и неорганических форм мышьяка, поступающих в организм человека при потреблении слоевищ ламинарии фармакопейных видов (*L. saccharina* и *L. japonica*). Рассчитанные значения суммарного индекса опасности с использованием медианных концентраций элементов и концентраций, усредненных на уровне 90-го процентиля, существенно меньше 1. Следовательно, суммарное токсическое воздействие элементов Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Se, Pb, Sr, V, Zn при потреблении максимальной суточной терапевтической дозы слоевищ ламинарии (3,0 г) в течение периода экспозиции характеризуется как допустимое и не наносит вред организму человека. Анализ индивидуальных канцерогенных рисков воздействия элементных контаминантов показал, что при потреблении максимальной терапевтической дозы ламинарии слоевищ в течение 1 месяца и более содержание хрома в препарате подлежит контролю наряду с нормируемыми в лекарственном растительном сырье и ЛРП элементами (As, Cd, Pb)[20] для предотвращения вероятности развития новообразований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nduka JK, Kelle HI, Ogoko EC. Hazards and risk assessment of heavy metals from consumption of locally manufactured painkiller drugs in Nigeria. *Toxicol Rep*. 2020;7:1066–74. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.009
2. Geronimo AC, Melo ES, Silva KR, Pereira HS, Nasci-

[18] Regional Screening Level (RSL) Summary Table. United States Environmental Protection Agency (USEPA); 2022. Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. 2004.
[19] Там же.
[20] ОФС.1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

mento VA, Machate DJ, et al. Human health risk assessment of heavy metals and metalloids in herbal medicines used to treat anxiety: Monitoring of safety. *Front Pharmacol*. 2021;12:772928. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.772928
3. Adusei-Mensah F, Essumang DK, Agjei RO, Kauhanen J, Tikkanen-Kaukanen C, Ekor M. Heavy metal content and health risk assessment of commonly patronized herbal medicinal preparations from the Kumasi metropolis of Ghana. *J Environ Health Sci Eng*. 2019;17(2):609–18. https://doi.org/10.1007/s40201-019-00373-y
4. Xu X, Li L, Zhou H, Fan M, Wang H, Wang L, et al. MRTCM: A comprehensive dataset for probabilistic risk assessment of metals and metalloids in traditional Chinese medicine. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2023;249:114395. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114395
5. Zuo TT, Jin HY, Zhang L, Liu YL, Nie J, Chen BL, et al. Innovative health risk assessment of heavy metals in Chinese herbal medicines based on extensive data. *Pharmacol Res*. 2020;159:104987. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104987
6. Yadav P, Singh J, Mishra V. Biosorption-cum-bioaccumulation of heavy metals from industrial effluent by brown algae: Deep insight. In: Tripathi V, Kumar P, Tripathi P, Kishore A, eds. *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems*. Singapore: Springer; 2019. P. 249–70. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8739-5_13
7. Volesky B. Biosorption and me. *Water Res*. 2007;41(18):4017–29. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.062
8. Щукин ВМ, Хорольская ЕА, Кузьмина НЕ, Ремезова ИП, Косенко ВВ. Особенности элементного состава ламинарии слоевищ (*Laminariae thalli)* различного происхождения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2):154–72.
Shchukin VM, Khorolskaya EA, Kuz'mina NE, Remezova IP, Kosenko VV. Elemental composition of kelp thalli (*Laminariae thalli)* of various origins. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):154–72 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-527
9. Минтель МВ, Землянова МА, Жданова-Заплесвичко ИГ. Некоторые аспекты совместного действия алюминия и фтора на организм человека (обзор литературы). *Экология человека*. 2018;(9):12–7.
Mintel MV, Zemlyanova MA, Zhdanova-Zaplesvichko IG. Some aspects of synergetic action of aluminum and fluorine on human body (literature review*). Human Ecology*. 2018;(9):12–7 (In Russ.). https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-9-12-17
10. Щукин ВМ, Ерина АА, Швецова ЮН, Жигилей ЕС, Кузьмина НЕ. Селективное определение органических и неорганических форм мышьяка в слоевищах ламинарии и продуктах на их основе. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2):206–15.
Shchukin VM, Erina AA, Shvetsova YN, Zhigilei ES, Kuz'mina NE. Selective quantification of organic and inorganic arsenic in kelp thalli and kelp-based products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):206–15 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-522
11. Багрянцева ОВ, Хотимченко СА. Токсичность неорганических и органических форм мышьяка. *Вопросы питания*. 2021;90(6):6–17.
Bagryantseva OV, Khotimchenko SA. Risks associated with the consumption of inorganic and organic arsenic. *Problems of Nutrition*. 2021;90(6):6–17 (In Russ.). https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-6-6-17
12. Duinker A, Kleppe M, Fjære E, Biancarosa I, Heldal HE, Dahl L, et al. Knowledge update on macroalgae food and feed safety. *Rapport fra Havforskningen*. 2020. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20134.14407
13. Duinker A. Report from the project: Alger: mat-forskning-formidling. Mineraler og tungmetaller i alger fra Lindesnes. Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES) report. 2014. https://lindesnesfyr.no/wp-content/uploads/2019/03/FYRET_algerapport.pdf
14. Mac Monagail M, Morrison L. Arsenic speciation in a variety of seaweeds and associated food products. *Compr Anal Chem*. 2019;85:267–310. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.03.005
15. Stévant P, Marfaing H, Duinker A, Fleurence J, Rustad T, Sandbakken I, et al. Biomass soaking treatments to reduce potentially undesirable compounds in the edible seaweeds sugar kelp *(Saccharina latissima*) and winged kelp (*Alaria esculenta*) and health risk estimation for human consumption. *J Appl Phycol*. 2018;30(3):2047–60. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1343-8
16. Kim M, Kim J, Noh CH, Choi S, Joo YS, Lee KW. Monitoring arsenic species content in seaweeds produced off the southern coast of Korea and its risk assessment. *Environments*. 2020;7(9):68. https://doi.org/10.3390/environments7090068
17. Zhao Y, Shang D, Ning J, Zhai Y. Arsenic and cadmium in the marine macroalgae (*Porphyra yezoensis* and *Laminaria Japonica*) — forms and concentrations. *Chem Speciation Bioavailability*. 2012;24(3):197–203. https://doi.org/10.3184/095422912X13404690516133
18. Shinagawa A, Shiomi K, Yamanaka H, Kikuchi T. Selective determination of inorganic arsenic (III), (V) and organic arsenic in marine organisms. *Bull Jpn Soc Sci Fish*. 1983;49(1):75–8. https://doi.org/10.2331/suisan.49.75
19. Zhao YF, Wu JF, Shang DR, Ning JS, Ding HY, Zhai YX. Arsenic species in edible seaweeds using *in vitro* biomimetic digestion determined by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int J Food Sci*. 2014;2014:436347. https://doi.org/10.1155/2014/436347

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.М. Щукин* — идея, планирование исследования, редактирование текста рукописи; *Е.А. Хорольская* — подбор литературы, сбор и систематизация данных, проведение эксперимента; *Н.Е. Кузьмина* — сбор, систематизация и обобщение данных, изложенных в нормативных документах, написание текста рукописи; *И.П. Ремезова* — редактирование текста рукописи, формулировка выводов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Victor M. Shchukin* elaborated the study idea, planned the study, and edited the manuscript. *Elena A. Khorolskaya* selected literature, collected and collated data, and conducted the experiment. *Natalia E. Kuz'mina* collected, collated, and consolidated data from regulatory documents; drafted the manuscript. *Irina P. Remezova* edited the manuscript and formulated the conclusions.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Щукин Виктор Михайлович
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9440-0950
Schukin@expmed.ru
Хорольская Елена Александровна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru
Ремезова Ирина Петровна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3456-8553
i.p.remezova@pmedpharm.ru

Victor M. Shchukin
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9440-0950
Schukin@expmed.ru
Elena A. Khorolskaya
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4813-4740
blinkovaea@expmed.ru
Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9133-0835
KuzminaN@expmed.ru
Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3456-8553
i.p.remezova@pmedpharm.ru

Поступила 03.02.2023
После доработки 31.03.2023
Принята к публикации 22.05.2023
Online first 28.07.2023

Received 3 February 2023
Revised 31 March 2023
Accepted 22 May 2023
Online first 28 July 2023

УДК 615.07:543.423.1
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-442-452
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

М.С. Галенко[1,2] ✉, **И.В. Гравель**[2]

Оценка транссредовых переходов тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах корневищ с корнями валерианы и травы пустырника

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация*

[2] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация*

✉ ***Галенко Марта Сергеевна***; *galenkoms@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Для подтверждения безопасности применения жидких лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья определения суммарного содержания тяжелых металлов в настойках в рамках гармонизации фармакопейных требований недостаточно. Для обоснования норм количественного содержания отдельных элементов в лекарственных растительных препаратах необходима оценка закономерностей переходов экотоксикантов из сырья в лекарственные формы.

Цель. Определить транссредовые переходы тяжелых металлов и мышьяка в ряду «почва — сырье — лекарственная форма» на примере спиртовых и водных извлечений из лекарственного растительного сырья пустырника и валерианы.

Материалы и методы. Объектами исследования были трава пустырника и корневища с корнями валерианы, изготовленные из них лекарственные препараты, а также образцы почвы из прикорневого слоя производящих растений. Определение элементного состава изучаемых объектов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Результаты. Определено содержание 15 элементов (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Cd, Sb, Hg, Pb) в сырье и сопряженных почвах, а также настоях и настойках, изготовленных из этого сырья. Концентрации элементов в траве пустырника составили 0,002–109,884 мг/кг, в корневищах с корнями валерианы — 0,017–866,618 мг/кг. Pb, Cd и As обнаружены во всех образцах сырья, Hg — лишь в 25% образцов, при этом содержание этих элементов не превышало допустимые нормы. В настоях определены все элементы, за исключением Hg, их содержание не превышало 3,169 мг/кг. В настойках элементы определены в концентрациях не более 1,27 мг/кг, преобладали Zn, Cu, Mg и Ti, в минимальных количествах были Sb и Cd. В настойках не обнаружены Fe и Hg, а в настойке пустырника также отсутствовали Sr, Cd и Pb.

Выводы. Корневища с корнями валерианы и трава пустырника способны концентрировать Cu, Cr, Fe и V из почв. Переход тяжелых металлов и мышьяка в настои не превышал 65% от содержания элементов в исходном сырье, в настойки — 30%. Отдельные элементы извлекались в настойки в 1,5–5 раз меньше, чем в настои.

© М.С. Галенко, И.В. Гравель, 2023

Ключевые слова: валериана; пустырник; настойка; настой; почва; нормативная документация; тяжелые металлы; масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой; ИСП-МС

Для цитирования: Галенко М.С., Гравель И.В. Оценка транссредовых переходов тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах корневищ с корнями валерианы и травы пустырника. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):442–452. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-442-452

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. И.В. Гравель — член редакционной коллегии журнала «*Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*» с 2021 года. М.С. Галенко заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Marta S. Galenko[1,2] ✉, **Irina V. Gravel**[2]

Assessment of Trans-Environmental Transitions of Heavy Metals and Arsenic in Herbal Drugs and Herbal Medicinal Products of Valerian Rhizomes with Roots and Motherwort Herb

[1] *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

[2] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation*

✉ ***Marta S. Galenko***; *galenkoms@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. In the context of pharmacopoeial harmonisation, the available methods for quantifying the total heavy metal content in tinctures are not sufficient to demonstrate the safety of liquid dosage forms based on herbal drugs. However, the establishment of individual limits for the heavy metal content requires analysing the patterns of environmental toxicant transitions from plant raw materials to herbal medicinal products in finished dosage forms.

Aim. This study aimed to analyse the trans-environmental transitions of heavy metals and arsenic from the soil through plants to herbal medicinal products using a case study of aqueous and alcoholic extracts of valerian and motherwort herbal drugs.

Materials and methods. The study focused on motherwort herb and valerian rhizomes with roots, the corresponding herbal medicinal products, and the rhizospheric soil. The elemental composition of the studied samples was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry.

Results. The authors determined the content of 15 elements (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Cd, Sb, Hg, and Pb) in plant raw materials, the rhizosphere, and herbal drug infusions and tinctures. The concentrations of elements were 0.002–109.884 mg/kg in motherwort herb samples and 0.017–866.618 mg/kg in the samples of valerian rhizomes with roots. Pb, Cd, and As were detected in all plant raw materials, while Hg was found only in 25% of the study samples. The content of these elements was within acceptable limits. Valerian and motherwort infusions contained all elements, except for Hg; valerian tinctures were free from Fe and Hg; and motherwort tinctures included no Fe, Hg, Sr, Cd, and Pb. The concentrations of elements in the infusions did not exceed 3.169 mg/kg, while the concentrations of elements in the tinctures were below 1.27 mg/kg. In the tinctures, Zn, Cu, Mg, and Ti were the most abundant elements, and Sb and Cd were present in minimum amounts.

Conclusions. Valerian and motherwort plants can concentrate Cu, Cr, Fe, and V from the soil. The transition of heavy metals and arsenic into infusions did not exceed 65% of the content of these elements in herbal drugs, while tinctures contained less than 30% of the content of heavy metals and arsenic in herbal drugs. Some elements passed into infusions 1.5–5 times more efficiently than into tinctures.

Key words: valerian; motherwort; tincture; infusion; soil; regulatory standards; heavy metals; inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS

For citation: Galenko M.S., Gravel I.V. Assessment of trans-environmental transitions of heavy metals and arsenic in herbal drugs and herbal medicinal products of valerian rhizomes with roots and motherwort herb. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):442–452. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-442-452

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. Irina V. Gravel has been a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* since 2021. Marta S. Galenko declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Лекарственные растительные препараты (ЛРП) получают все более широкое распространение в медицинской практике [1]. Их преимуществами являются мягкое физиологическое действие с минимумом побочных явлений, широкий ассортимент лекарственных форм, невысокая стоимость. Наиболее распространенными лекарственными формами являются настои и настойки за счет удобства их применения [2–4].

Контроль качества ЛРП на соответствие требованиям нормативной документации включает оценку безопасности для медицинского применения. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ) для лекарственного растительного сырья (ЛРС) регламентировано содержание тяжелых металлов (ТМ), остаточных пестицидов, радионуклидов и микробиологической чистоты[1], а для ЛРС и ЛРП — содержание тяжелых металлов и мышьяка[2]. Для лекарственных препаратов содержание ТМ определяют методом образования окрашенных сульфидов[3], в частности для настоек нормировано суммарное содержание тяжелых металлов (не более 0,001%)[4]. При использовании колориметрического метода после реакции взаимодействия с сульфид-ионом определяется весь спектр ТМ (Pb, Hg, Bi, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu, Mo, V, Ru, Pt, Pd)[5]. Степень извлечения каждого элемента в лекарственные формы различается, поэтому невозможно дать заключение о содержании каждого из нормируемых элементов (Pb, Cd, As, Hg) [5, 6]. Согласно требованиям ведущих фармакопей зарубежных стран[6] содержание ТМ в ЛРП определяется количественно современными физико-химическими методами.

Наряду с ЛРП в медицинской практике применяются биологически активные добавки (БАД). Безопасность их использования регламентирована СанПиН 2.3.2.1078-01[7], согласно которым нормируется содержание отдельных токсичных элементов (Pb, Cd, As, Hg) в жидких БАД на растительной основе, таких как эликсиры, бальзамы, настойки.

В рамках гармонизации фармакопейных требований необходима оценка закономерностей переходов экотоксикантов из сырья в лекарственные формы для обоснования количественного определения отдельных элементов в ЛРП.

Цель работы — определить транссредовые переходы тяжелых металлов и мышьяка в ряду «почва — сырье — лекарственная форма» на примере спиртовых и водных извлечений из лекарственного растительного сырья пустырника и валерианы.

Материалы и методы

Объектами исследования были трава пустырника, заготовленная в июне 2021 и 2022 гг. в парковой зоне района Митино на территории Северо-Западного административного округа

[1] ОФС.1.5.1.0001.15 Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[2] ОФС.1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[3] ОФС.1.2.2.2.0012.15 Тяжелые металлы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[4] ОФС.1.4.1.0019.15 Настойки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[5] ОФС.1.2.2.2.0012.15 Тяжелые металлы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
[6] USP44–NF39. Rockville, MD; 2020.
European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2020.
[7] СанПиН 2.3.2.1078-01 Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. М.: Минздрав России; 2002.

Москвы (далее — пустырник 2021, пустырник 2022); корневища с корнями (КсК) валерианы, заготовленные в мае 2021 г. в Ботаническом саду Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, расположенного на территории Пресненского района Центрального административного округа Москвы (далее — валериана БС), КсК валерианы, используемые для промышленного производства ЛРП и прошедшие входной контроль качества на фармацевтической фабрике (далее — валериана ФФ). Также были изучены почвы из прикорневого слоя производящих лекарственных растений. Образцы почв отбирали согласно ГОСТ 17.4.4.02-2017[8].

Повышенная антропогенная нагрузка в Московском регионе обусловлена наличием большого количества производственных предприятий, автомобильных магистралей с высокой плотностью транспортного потока и других факторов[9]. Влияние антропогенной нагрузки отрицательно сказывается на экологической обстановке [7], однако представляет интерес для изучения накопления элементных токсикантов в лекарственных растениях.

Из заготовленного сырья в лабораторных условиях, позволяющих минимизировать дополнительное попадание ТМ и мышьяка из внешней среды, были получены настои и настойки. Настои готовили согласно требованиям ГФ РФ[10] в соотношении сырье/экстрагент 1:10; настойки — в соотношении 1:5, в качестве экстрагента использовали этанол 70% [8].

Для оценки содержания подвижных форм элементов в почве применяли экстракцию аммонийно-ацетатным буфером с pH 4,8 [9] согласно методическим указаниям[11].

Пробоподготовку для определения элементного состава настоек проводили по ранее разработанной методике определения содержания ТМ и мышьяка в ЛРП [10]. Аналогичным образом осуществляли минерализацию настоев.

Количественное содержание 15 элементов определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе Agilent 7900 (Agilent Technologies, Inc.), фиксируя интенсивности сигналов по следующим атомным единицам массы (а.е.м.): Ti — 47, V — 51, Cr — 52, Mn — 55, Fe — 56, Co — 59, Ni — 60, Cu — 63, Zn — 66, As — 75, Sr — 88, Cd — 111, Sb — 121, Hg — 202, Pb — 208, в условиях анализа, описанных в работе [11]. Измерения проводили для трех параллельных образцов каждого объекта, показания прибора регистрировали в пяти повторностях. Для расчета концентраций элементов применяли метод калибровочной кривой. Обработку и анализ результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение

В прикорневом слое почв, ЛРС, настоях и настойках, изготовленных на его основе в лабораторных условиях, было определено содержание 15 элементов *(табл. 1)*.

При анализе полученных результатов было показано, что абсолютное содержание элементов в ЛРС значительно выше, чем в ЛРП на его основе, что согласуется с данными литературы [12].

Диапазон содержания различных элементов в траве пустырника составил 0,002–109,884 мг/кг. В максимальных количествах обнаружены Fe, Sr и Mn, в минимальных — Sb и Cd; Hg не обнаружена. Концентрации эссенциальных элементов[12], таких как Fe, Mn, Zn, Cr, Cu, Co, находились в пределах 0,110–109,884 мг/кг. Содержание условно эссенциальных и потенциально токсичных элементов (V, Ni, Sr, Ti, Sb) варьировало от 0,027 до 39,687 мг/кг. Аналогичные результаты были получены в работе [13].

В КсК валерианы, заготовленных в Москве, ТМ и мышьяк обнаружены в диапазоне 0,017–866,618 мг/кг. В условиях повышенной антропогенной нагрузки сырье содержало в среднем на 30% больше элементных токсикантов, чем собранное на экологически благоприятных участках (КсК валерианы ФФ). В максимальном количестве было обнаружено железо, в минимальном — ртуть. Содержание эссенциальных элементов составило 0,367–866,618 мг/кг, условно эссенциальных и потенциально токсичных — 2,083–28,329 мг/кг. В сырье обнаружена ртуть.

В КсК валерианы ФФ элементы содержались в количествах до 589,327 мг/кг. Было выявлено,

[8] ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.
[9] Экологическая карта Москвы. https://ecostandardgroup.ru/center/ecorating/moscow/
[10] ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[11] Кузнецов АМ, Фесюн АП, Самохвалов СГ, Махонько ЭП. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации; 1992.
[12] Гравель ИВ, Шойхет ЯН, Яковлев ГП. Фармакогнозия. Экотоксиканты в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. Учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.

Таблица 1. *Содержание тяжелых металлов и мышьяка в прикорневом слое почв, исследуемом лекарственном растительном сырье, настоях и настойках на его основе*

Table 1. *Content of heavy metals and arsenic in the study samples of rhizospheric soil, herbal drugs, and herbal drug infusions and tinctures (mg/kg)*

Объект исследования	Образец	Содержание тяжелых металлов и мышьяка, мг/кг														
		Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Cd	Sb	Hg	Pb
Пустырник 2021	почва ААБ	43,207	0,161	0,332	84,172	20,442	0,265	0,718	0,835	17,895	0,499	17,225	0,151	0,606	<п.о.	0,765
	ЛРС	13,233	0,123	0,659	61,544	96,962	0,175	3,602	25,945	51,471	0,097	30,746	<п.о.	0,027	<п.о.	0,334
	настой	0,731	0,005	0,011	3,169	0,632	0,004	0,102	0,475	1,299	0,006	0,424	<п.о.	<п.о.	<п.о.	0,002
	настойка	0,186	0,001	0,008	0,256	<п.о.	0,003	0,149	0,888	1,270	0,002	<п.о.	<п.о.	<п.о.	<п.о.	<п.о.
Пустырник 2022	почва ААБ	45,289	0,201	0,539	89,839	30,769	0,290	0,726	0,660	11,718	0,931	29,282	0,178	0,519	<п.о.	0,902
	ЛРС	13,826	0,160	0,973	34,875	109,88	0,110	0,729	26,978	32,531	0,090	39,687	0,002	<п.о.	<п.о.	0,327
	настой	0,851	0,006	0,012	1,365	0,326	0,003	0,097	0,709	1,363	0,006	0,559	<п.о.	<п.о.	<п.о.	0,002
	настойка	0,158	0,003	0,016	0,135	<п.о.	0,002	0,105	0,767	0,709	0,003	<п.о.	<п.о.	<п.о.	<п.о.	<п.о.
Валериана БС	почва ААБ	37,020	0,112	0,357	126,48	14,127	0,452	1,376	0,916	29,034	0,627	17,188	0,356	0,397	<п.о.	3,040
	ЛРС	28,329	2,083	7,293	27,079	866,62	0,367	4,708	68,755	52,088	0,663	25,791	0,101	0,090	0,017	3,926
	настой	0,390	0,018	0,029	0,862	3,138	0,013	0,049	0,517	1,326	0,017	0,201	0,001	0,001	<п.о.	0,009
	настойка	0,293	0,006	0,012	0,222	<п.о.	0,012	0,125	0,623	0,737	0,012	0,006	<п.о.	0,002	<п.о.	0,005
Валериана ФФ	почва ААБ	15,082	0,094	0,282	214,35	16,722	0,640	0,522	0,471	3,315	0,275	5,263	0,191	0,300	<п.о.	1,779
	ЛРС	32,061	1,392	6,729	53,670	589,33	0,337	3,499	29,679	21,905	0,240	7,814	0,083	0,012	<п.о.	1,169
	настой	0,261	0,007	0,009	2,134	0,262	0,007	0,119	0,463	0,706	0,004	0,086	0,001	<п.о.	<п.о.	0,004
	настойка	0,250	0,003	0,015	0,446	<п.о.	0,019	0,123	1,075	0,401	0,004	<п.о.	<п.о.	<п.о.	<п.о.	0,001

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *ААБ — образец после экстракции аммонийно-ацетатным буфером; ЛРС — лекарственное растительное сырье; <п.о. — результат ниже предела обнаружения метода (с ошибкой определения в диапазоне 0,51–18%).*

что тенденция сохраняется: железо обнаружено в максимальном количестве, сурьма — в минимальном. Эссенциальные элементы были обнаружены в количестве 0,337–589,327 мг/кг, условно эссенциальные и потенциально токсичные — от 0,0001 до 32,061 мг/кг.

Содержание токсичных элементов во всех изученных образцах ЛРС было в пределах допустимого содержания (Pb — 6,0 мг/кг, Cd — 1,0 мг/кг, As — 0,5 мг/кг, Hg — 0,1 мг/кг)[13] и не превышало 3,926 мг/кг [14, 15]. Проведенный анализ позволил составить последовательности уменьшения концентраций элементов в ЛРС *(табл. 2)*.

Отмечено, что во всех изученных образцах преобладали по содержанию Fe, Mn и Zn; в минимальных количествах были обнаружены Cd и Sb. Содержание токсичных элементов убывало в ряду Pb>As>Cd. Ртуть была обнаружена лишь в 25% образцов. В траве пустырника определено 86% из 15 определяемых элементов, в КсК валерианы — более 90%.

Для оценки перехода элементов из почвы в ЛРС был рассчитан коэффициент биологического поглощения как отношение содержания ТМ и мышьяка в сырье к их концентрации в почве [16]. Было выявлено, что трава пустырника накапливает медь, корневища с корнями валерианы — Cu, Cr, Fe и V *(табл. 3)*.

Pb, Cd и As относились к группе элементов со средней степенью биологического поглощения[14] (0–1,292). Содержание этих элементов в ЛРС возрастало при увеличении их содержания в почве [17]. Ртуть не усваивалась лекарственными растениями изученных видов из почв региона исследования, но, предположительно, могла содержаться в ЛРС в виде минеральной примеси.

В настоях из 15 определяемых элементов были обнаружены 14. Ртуть во всех изученных образцах настоев не была обнаружена. Содержание остальных элементов не превышало 3,169 мг/кг. В максимальных количествах в водных извлечениях содержались Mn, Zn, Fe, Ti и Cu, в минимальных — Sb и Cd [18]. Содержание токсичных элементов находилось в диапазоне от 0 до 0,017 мг/кг, что не превышало предельно допустимых концентраций[15].

На основании полученных данных был рассчитана доля перехода ТМ и мышьяка из сырья в настои *(табл. 4)*. Переход элементов в водные извлечения не превышал 65%.

В настой травы пустырника в максимальных количествах (более 50%) переходили Ti и As, в средних количествах (от 20 до 50%) — Mn, V, Co, Ni, в минимальных (от 0 до 20%) — Fe, Sr, Sb, Cd и Pb. Ti, V, Cr, Ni, Cu и Sr в большей степени переходили в настои из ЛРС, представленного надземными частями. Это связано с особенностями распределения элементов в организме растения. Стронций преимущественно аккумулируется в стеблях растения [19, 20].

Для настоев КсК валерианы переход элементов в среднем на 35% ниже в сравнении с извлечением из пустырника. В максимальных количествах извлекается Mn, Co, Zn, Ni и As (10,46 — 39,77%). Для остальных элементов (Ti, V, Cr, Fe, Cu, Sr, Cd, Sb, Pb) переход составил от 2,35 до 15,59%. Токсичные элементы переходят в настой валерианы в количестве от 2,35 до 64,94%. В наибольших количествах извлекается мышьяк, в наименьших — свинец. Ртуть не была

Таблица 2. *Убывающие ряды содержания элементов в исследуемом лекарственном растительном сырье*

Table 2. *Content of elements in the study samples of herbal drugs in descending order*

Объект исследования	Убывающий ряд элементов
Пустырник 2021	Fe>Mn>Zn>Sr>Cu>Ti>Ni>Cr>Pb>Co>V>As>Sb
Пустырник 2022	Fe>Sr>Mn>Zn>Cu>Ti>Ni>Cr>Pb>V>Co>As>Cd
Валериана БС	Fe>Cu>Zn>Ti>Mn>Sr>Cr>Ni>Pb>V>As>Co>Cd>Sb>Hg
Валериана ФФ	Fe>Mn>Ti>Cu>Zn>Sr>Cr>Ni>V>Pb>Co>As>Cd>Sb

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

[13] ОФС.1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
[14] Касимов НС, Перельман АИ. Геохимия ландшафта. М.: Издательство Московского государственного университета; 1999.
[15] ОФС.1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
СанПиН 2.3.2.1078-01. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2002.

Таблица 3. *Коэффициент биологического поглощения элементов в исследуемом лекарственном растительном сырье*

Table 3. *Coefficients of biological absorption of elements in the study samples of herbal drugs*

Элемент	Коэффициент биологического поглощения лекарственного растительного сырья			
	Пустырник 2021	Пустырник 2022	Валериана БС	Валериана ФФ
Ti	0,306	0,305	0,765	2,126
V	0,762	0,793	18,523	14,739
Cr	1,987	1,806	20,453	23,867
Mn	0,731	0,388	0,214	0,250
Fe	4,743	3,571	61,345	35,243
Co	0,661	0,378	0,811	0,527
Ni	5,014	1,003	3,421	6,697
Cu	31,071	40,850	75,067	63,028
Zn	2,876	2,776	1,794	6,609
As	0,194	0,097	1,056	0,872
Sr	1,785	1,355	1,500	1,485
Cd	0,000	0,014	0,284	0,433
Sb	0,044	–	0,227	0,039
Hg	–	–	–	–
Pb	0,437	0,363	1,292	0,657

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *«–» — элемент не был обнаружен в почве или сырье.*

Таблица 4. *Переходы тяжелых металлов и мышьяка из исследуемого лекарственного растительного сырья в настои*

Table 4. *Transition of heavy metals and arsenic from the study samples of herbal drugs to infusions*

Элемент	Доля элементов в настоях от их содержания в лекарственном растительном сырье, %			
	Пустырник 2021	Пустырник 2022	Валериана БС	Валериана ФФ
Ti	55,21	61,51	13,75	8,14
V	36,35	35,85	8,76	4,74
Cr	16,08	11,85	4,03	1,35
Mn	51,49	39,13	31,81	39,77
Fe	6,52	2,97	3,62	0,44
Co	23,08	30,22	35,62	21,34
Ni	28,39	26,05	10,46	34,04
Cu	18,32	26,29	7,52	15,59
Zn	25,24	41,89	25,46	32,24
As	64,94	61,16	25,66	17,87
Sr	13,80	14,09	7,79	11,06
Cd	–	14,75	7,01	14,72
Sb	16,43	–	6,84	–
Hg	–	–	–	–
Pb	6,69	6,42	2,35	3,08

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *«–» — элемент не был обнаружен в сырье или лекарственной форме.*

обнаружена в большинстве образцов исходного ЛРС (кроме валерианы БС), в лекарственные формы она не переходит.

В настойках содержание элементов находилось в диапазоне от 0,0001 до 1,2703 мг/кг. В максимальных количествах присутствовали цинк, медь, марганец и титан, в минимальных — сурьма и кадмий. Во всех настойках не были обнаружены железо и ртуть, в настойке пустырника не найдены стронций, кадмий и свинец, что согласуется с данными литературы [21, 22].

Переход элементов в настойки не превышал 30% от их содержания в исходном ЛРС *(табл. 5)*. В максимальных количествах извлекались кобальт и никель, в минимальных — кадмий и свинец. V, Cr, Ni, Cu, Zn, As на 60% больше переходили в настойки из травы пустырника. В настойку валерианы на 50% больше извлекались Mn, Co, Sb, Pb. Переходы титана из КсК валерианы и травы пустырника в настойки были приблизительно равными.

Извлечение токсичных элементов составляло от 0 до 16,58%. В максимальных количествах 70% этанолом извлекался мышьяк, в минимальных — свинец. Установлено, что ртуть и кадмий в спиртовые извлечения не переходят.

На основании полученных результатов были построены убывающие ряды содержания элементов в ЛРП *(табл. 6)*.

В настои КсК валерианы и травы пустырника в максимальных количествах переходили марганец и цинк, а также железо при его высоком содержании в исходном сырье. Убывающие ряды содержания элементов для настоев из изученных видов сырья были идентичны между собой. Показано, что в лекарственную форму не переходит ртуть. Содержание токсичных элементов убывало в ряду As>Pb>Cd.

В настойку пустырника переходило около 60% из 15 определяемых элементов, в настойку валерианы — 90%. В максимальных количествах в настойки извлекались медь и цинк, не переходили железо и ртуть, в настойку пустырника не извлекались стронций, свинец, кадмий и сурьма. Из токсичных элементов в настойку пустырника переходил лишь мышьяк, в настойку валерианы — мышьяк и свинец.

Таблица 5. *Переходы тяжелых металлов и мышьяка из исследуемого лекарственного растительного сырья в настойки*

Table 5. *Transition of heavy metals and arsenic from the study samples of herbal drugs to tinctures*

Элемент	Доля элементов в настойках от их содержания в лекарственном растительном сырье, %			
	Пустырник 2021	Пустырник 2022	Валериана БС	Валериана ФФ
Ti	7,02	5,73	5,17	3,89
V	2,18	10,41	1,54	1,04
Cr	6,39	7,98	0,83	1,13
Mn	2,08	1,93	4,09	4,15
Fe	–	–	–	–
Co	9,16	8,75	16,61	28,01
Ni	20,63	14,06	13,29	17,59
Cu	17,12	14,21	4,53	18,11
Zn	12,34	10,91	7,08	9,14
As	7,73	16,58	8,98	8,59
Sr	–	–	–	–
Cd	–	–	–	–
Sb	–	–	9,19	4,00
Hg	–	–	–	–
Pb	–	–	0,65	0,51

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *«–» — элемент не был обнаружен в сырье или лекарственной форме.*

Таблица 6. *Убывающие ряды содержания элементов в лекарственных растительных препаратах*

Table 6. *Content of elements in the study samples of herbal medicinal products in descending order*

Лекарственная форма	Объект исследования	Убывающий ряд элементов
Настой	Пустырник 2021	Mn>Zn>Ti> Fe>Cu>Sr>Ni>Cr>As>V>Co>Pb>Sb>Cd
	Пустырник 2022	Mn>Zn>Ti> Cu>Sr>Fe>Ni>Cr>V>As>Co>Pb>Cd>Sb
	Валериана БС	Fe >Zn>Mn>Cu>Ti>Sr>Ni>Cr>V>As>Co>Pb>Cd>Sb
	Валериана ФФ	Mn>Zn>Cu>Fe> Ti>Ni>Sr>Cr>Co>V>As>Pb>Cd>Sb
Настойка	Пустырник 2021	Zn>Cu>Mn>Ti>Ni>Cr>Co>As>V
	Пустырник 2022	Cu>Zn>Ti> Mn>Ni>Cr>V>As>Co
	Валериана БС	Zn>Cu>Ti>Mn>Ni>Co>Cr>As>V>Sr>Pb>Sb>Cd
	Валериана ФФ	Cu>Mn>Zn>Ti>Ni>Co>Cr>As>V>Pb>Cd>Sb

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Выводы

1. Рассчитаны коэффициенты биологического поглощения элементов из почвы в ЛРС валерианы и пустырника. Обнаружено, что изученные лекарственные растения в регионе исследования аккумулируют из почвы медь, подземные органы накапливают железо, хром и ванадий. В большинстве случаев было отмечено, что при увеличении содержания элементов в почве возрастали их концентрации в ЛРС. Токсичные элементы, коэффициенты биологического поглощения которых не превышали 1,292, были выявлены преимущественно в подземных органах валерианы.

2. Определены переходы тяжелых металлов и мышьяка из ЛРС валерианы и пустырника в настои. Установлено, что в водные извлечения переходит более 90% из 15 искомых элементов. Уровень их извлечения из ЛРС в настои не превышал 65% из травы пустырника и 40% для КсК валерианы. В максимальных количествах переходили титан, марганец, кобальт, никель и цинк, не переходила ртуть. Извлечение токсичных элементов за исключением мышьяка не превышало 15% от их содержания в исходном ЛРС.

3. Определены переходы тяжелых металлов и мышьяка из ЛРС валерианы и пустырника в настойки. В спиртовые извлечения переходило около 60% определяемых элементов из травы пустырника и 86% из корневищ с корнями валерианы. Уровни перехода не превышали 30% от содержания в исходном сырье. В максимальных количествах извлекались медь и цинк, в минимальных — стронций и свинец. Из всех видов изученного сырья не переходили в настойки железо и ртуть, из травы пустырника — кадмий, свинец, сурьма и стронций. В настойки переходило в 1,5–5 раз меньше элементных токсикантов, чем в настои, что согласуется с данными литературы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бойко НН, Бондарев АВ, Жилякова ЕТ, Писарев ДИ, Новиков ОО. Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации. *Научный результат. Медицина и фармация.* 2017;3(4):30–8.
Boyko NN, Bondarev AV, Zhilyakova ET, Pisarev DI, Novikov OO. Phytodrugs, analysis of Russian Federation pharmaceutical market. *Research Result. Medicine and Pharmacy.* 2017;3(4):30–8 (In Russ.).
https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-4-30-38
2. Сергиенко ОМ, Жигунова АК. Роль и место фитотерапии, сопровождающейся продуктивным кашлем. *Український медичний часопис.* 2013;(1):77–80.
Sergienko OM, Zhigunova AK. The role and place of herbal medicine, accompanied by a productive cough. *Ukrainian Medical Journal.* 2013;(1):77–80 (In Russ.).
3. Bhardwaj S, Verma R, Gupta J. Challenges and future prospects of herbal medicine. *Int Res Med Health Sci.* 2018;1(1):12–5.
https://doi.org/10.36437/irmhs.2020.3.1.E
4. Самбукова ТВ, Овчинников БВ, Ганапольский ВП, Ятманов АН, Шабанов ПД. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2017;15(2):56–63.
Sambukova TV, Ovchinnikov BV, Ganapolsky VP, Yatmanov AN, Shabanov PD. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2017;15(2):56–63 (In Russ.).
https://doi.org/10.17816/RCF15256-63
5. Ширяева ОЮ, Ширяева ММ. Изменение содержания эссенциальных элементов в растениях разных сортов. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* 2021;(4):93–8.
Shiryaeva OYu, Shiryaeva MM. Changes in the content of essential elements in plants of different varieties. *Izvestia Orenburg State Agrarian University.* 2021;(4):93–8 (In Russ.).
https://doi.org/10.37670/2073-0853-2021-90-4-93-99
6. Сенченко МА, Степанова МВ. Тяжелые металлы и микроэлементы в системе «почва — растение —

продукт переработки растений». *Вестник АПК Верхневолжья*. 2021;(1):13–8.
Senchenko MA, Stepanova MV. Heavy metals and microelements in the system "soil — plant — plant processing product". *Bulletin of the Upper Volga Agroindustrial Complex*. 2021;(1):13–8 (In Russ.). https://doi.org/10.35694/YARCX.2021.53.1.002

7. Арустамов ЭА, Гильденскиольд СР. Экологическая оценка состояния Московской области в год экологии в России. *Вестник Международной академии наук*. 2017;(1):35–8.
Arustamov EA, Gildenskiold SR. Environmental assessment of the state of the Moscow region in the year of ecology in Russia. *Bulletin of the International Academy of Science*. 2017;(1):35–8 (In Russ.). EDN: YTNXVT
8. Каухова ИЕ. Новая методика получения растительных препаратов. *Фармация*. 2006;(1):37–9.
Kaukhova IE. A new method for obtaining herbal preparations. *Pharmacy*. 2006;(1):37–9 (In Russ.). EDN: KXHGRL
9. Овсиенко СВ, Кузьмина НЕ, Щукин ВМ, Блинкова ЕА. Оценка методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой степени перехода элементных контаминантов из сопряженных почв в семена тыквы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2022;56(10):39–43.
Ovsienko SV, Kuz'mina NE, Shchukin VM, Blinkova EA. Evaluation by inductively coupled plasma mass spectrometry of the degree of transition of elemental contaminants from conjugated soils to pumpkin seeds. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(10):39–43 (In Russ.). https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-10-39-43
10. Галенко МС, Аляутдин РН, Гравель ИВ. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой для анализа тяжелых металлов и мышьяка в настойках. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):173–82.
Galenko MS, Alyautdin RN, Gravel IV. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for the analysis of heavy metals and arsenic in tinctures. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):173–82 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-2-173-182
11. Щукин ВМ, Жигилей ЕС, Ерина АА, Швецова ЮН, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Валидация методики определения ртути, свинца, кадмия и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах на его основе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):57–64.
Shchukin VM, Zhigiley ES, Erina AA, Shvetsova YuN, Kuz'mina NE, Luttseva AI. Validation of an ICP-MS method for the determination of mercury, lead, cadmium and arsenic in medicinal plants and related drug preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(9):57–64 (In Russ.). https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-9-57-64
12. Субботина НС, Дмитрук СЕ, Бабешина ЛГ, Келус НВ, Никифоров ЛА, Носкова ГН, Тартынова МИ. Исследование исходного сырья и экстрактов на содержание тяжелых металлов. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2010;8(3):92–7.
Subbotina NS, Dmitruk SE, Babeshina LG, Kelus NV, Nikiforov LA, Noskova GN, Tartynova MI. The heavy metals content of raw materials and extracts research. *Bulletin of the Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. 2010;8(3):92–7 (In Russ.). EDN: MTXOWJ
13. Дьякова НА. Эколого-фармакогностическая оценка качества травы пустырника пятилопастного, произрастающего в различных урбо- и агробиоценозах Воронежской области. *Традиционная медицина*. 2022;(4):44–8.
Dyakova NA. Ecological-pharmacognostic assessment of herb quality of five-lobed wasteberry herb growing in various urb- and agrobiocenoses of Voronezh region. *Traditional Medicine*. 2022;(4):44–8 (In Russ.). https://doi.org/10.54296/18186173_2022_4_44
14. Фурса НС, Караванова ЕН. Сравнительный анализ элементного, углеводного и аминокислотного состава подземных органов валерианы лекарственной. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. 2013;21(3):143–7.
Fursa NS, Karavanova EN. Comparative analysis of element, carbohydrate and amino acid composition of Valeriana officinalis underground organs. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2013;21(3):143–7 (In Russ.). EDN: RKXTLJ
15. Станишевская ИЕ, Марахова АИ, Грязнов МЮ, Хазиева ФМ. Контроль качества лекарственного сырья и фитопрепаратов валерианы лекарственной (Valeriana officinalis L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;(1):122–8.
Stanishevskaya IE, Marakhova AI, Gryaznov MYu, Khazieva FM. Quality control of medicinal raw materials and phytopreparations of Valeriana officinalis L. *Development and Registration of Medicines*. 2015;(1):122–8 (In Russ.). EDN: UKJTZL
16. Дьякова НА. Изучение закономерностей накопления наиболее опасных экотоксикантов в дикорастущем лекарственном растительном сырье различных экотопов Воронежской области. *Известия Саратовского университета Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2023;(1):77–85.
Dyakova NA. Study of patterns of accumulation of the most dangerous ecotoxicants in wild medicinal plant raw materials of various ecotopes of the Voronezh region. *Izvestiya of Saratov University. New series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2023;(1):77–85 (In Russ.). https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-1-77-85
17. Немерешина ОН, Гусев НФ. Накопление кобальта и кадмия в растительном сырье и почвах техногенных зон. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2020;(3):122–6.
Nemereshina ON, Gusev NF. Accumulation of cobalt and cadmium in plants and soils of technogenic zones. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2020;(3):122–6 (In Russ.). https://doi.org/10.37670/2073-0853-2020-83-3-122-126
18. Дьякова НА. Особенности транссредового перехода тяжелых металлов и мышьяка по цепочке «почва — лекарственное растительное сырье — водные извлечения». *Человек и его здоровье*. 2023;(1):64–70.
Dyakova NA. Peculiarities of heavy metal and arsenic trans-medium transition along the chain "soil — me-

dicinal plant material — water extracts". *Humans and Their Health*. 2023;(1):64–70 (In Russ.). https://doi.org/10.21626/vestnik/2023-1/08
19. Галенко МС, Гравель ИВ. Изучение элементного состава морфологических частей травы пустырника. Сборник материалов Научно-практической конференции с международным участием *«Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики»*. Пермь; 2022. С. 163–6.
Galenko MS, Gravel IV. Research of the elemental composition of the morphological parts of motherwort herb. Collection of materials of the Scientific and Practical Conference with international participation *"Actual problems of medical safety in the field of pharmaceutical and medical science and practice"*. Perm; 2022. P. 163–6 (In Russ.).
EDN: HPYUSO
20. Санжарова НИ, Гешель ИВ, Крыленкин ДВ, Гордиенко ЕВ. Современное состояние исследований поведения ^{90}Sr в системе почва — сельскохозяйственные растения (обзор). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019;59(6):643–55.
Sanzharova NI, Geshel IV, Krylenkin DV, Gordienko EV. Current state of studies on ^{90}Sr behavior in the soil — agricultural plants system (overview). *Radiation Biology. Radioecology*. 2019;59(6):643–55 (In Russ.). https://doi.org/10.1134/S0869803119060109
21. Плетенева ТВ, Потапова НИ, Скальный АВ, Елисеева ЮА, Самылина ИА, Сыроешкин АВ. Тяжелые металлы и стандартизация настоек. *Фармация*. 2004;(4):9–10.
Pleteneva TV, Potapova NI, Skalny AV, Eliseeva YuA, Samylina IA, Syroeshkin AV. Heavy metals and tincture standardization. *Pharmacy*. 2004;(4):9–10 (In Russ.).
EDN: WBRUDL
22. Матвейко НП, Брайкова АМ, Бушило КА, Садовский ВВ. Инверсионно-вольтамперометрический контроль содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе. *Вестник Витебского государственного технологического университета*. 2016;(1):82–9.
Matveiko NP, Braikova AM, Bushilo KA, Sadovsky VV. Stripping voltammetric monitoring of the content of heavy small metals in medical plant raw material and preparations on its basis. *Bulletin of Vitebsk State Technological University*. 2016;(1):82–9 (In Russ.).
EDN: WAWFYL

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *М.С. Галенко* — участие в разработке дизайна исследования, определение содержания элементов методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, интерпретация результатов исследования, сбор, анализ и систематизация данных научной литературы, написание и редактирование текста рукописи, работа с табличными материалами, ответственность за все аспекты работы, связанные с достоверностью данных; *И.В. Гравель* — разработка дизайна исследования, решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей рукописи, ответственность за все аспекты работы, критический пересмотр содержания рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории спектральных методов анализа ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Ериной А.А., Жигилей Е.С., Швецовой Ю.Н., Хорольской Е.А. и начальнику лаборатории Кузьминой Н.Е. за помощь в выполнении экспериментальных исследований.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Marta S. Galenko* contributed to the development of the study design; quantified the elemental content by inductively coupled plasma mass spectrometry; interpreted the study results; collected, collated, and analysed literature data; drafted and edited the manuscript; prepared the tables; and agreed to be accountable for all aspects of the work related to the reliability of data. *Irina V. Gravel* developed the study design; agreed to be accountable for all aspects of the work, in particular, contributed to resolving the issues related to the reliability of data and the integrity of all parts of the work; critically revised the manuscript; and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the employees of the Laboratory of Spectroscopic Methods of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products: Erina A.A., Zhigilei E.S., Shvetsova Yu.N., Khorolskaya E.A., and Head of the Laboratory Kuz'mina N.E. for their help in carrying out the experiments.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Галенко Марта Сергеевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9050-5947
marta.galenko@mail.ru
galenkoms@expmed.ru
Гравель Ирина Валерьевна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3735-2291
igravel@yandex.ru

Marta S. Galenko
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9050-5947
marta.galenko@mail.ru
galenkoms@expmed.ru
Irina V. Gravel, Dr. Sci. (Pharm.), Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3735-2291
igravel@yandex.ru

Поступила 19.05.2023
После доработки 14.07.2023
Принята к публикации 06.09.2023

Received 19 May 2023
Revised 14 July 2023
Accepted 6 September 2023

УДК 615.1:342.9
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-540
Научно-методическая статья | Scientific and methodical article

Check for updates
CC BY 4.0

Ж.И. Аладышева[1], Н.В. Пятигорская[1], В.В. Береговых[1], Г.Э. Бркич[1], А.П. Мешковский[1], М.М. Маршалова[1], В.В. Беляев[1] ✉, Н.С. Николенко[1], Е.И. Нестеркина[1], А.А. Камалетдинова[2], М.Ф. Лутфуллин[2]

Аналитический обзор процедуры аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в России

[1] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация*

[2] *Министерство здравоохранения Российской Федерации, Рахмановский пер., д. 3, Москва, ГСП-4, 127994, Российская Федерация*

✉ ***Беляев Василий Викторович***; *belyaev_v_v_1@staff.sechenov.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Порядок аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения (УЛ) с декабря 2020 г. претерпел существенные изменения в связи с переходом на требования Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Актуальной является необходимость дальнейшего совершенствования соответствующей нормативной базы в российском законодательстве.
Цель. Анализ изменений в механизме государственного регулирования сферы обращения лекарственных средств, произошедших за два года применения нового порядка аттестации уполномоченных лиц, и оценка влияния этих изменений на фармацевтическую отрасль.
Обсуждение. Представлены результаты сравнительного анализа двух административных процедур аттестации УЛ, установленных приказом Минздрава России от 12.01.2021 № 7н: ускоренной (для УЛ, аттестованных ранее) и первичной (для УЛ, аттестуемых впервые; для УЛ, срок действия аттестации которых истек; в случае необходимости расширения производственных специализаций УЛ). Приведены типичные ошибки заявителей при оформлении документов, описаны наиболее распространенные пробелы знаний заявителей, выявляемые при тестовом контроле. Отмечено, что использование ускоренной процедуры аттестации позволило достаточно плавно осуществить переход на требования к УЛ в ЕАЭС. Так, по состоянию на 01.02.2023 по данной процедуре на новый пятилетний период было заново аттестовано 506 человек, чуть более половины всех ранее аттестованных УЛ в Российской Федерации. Общее количество аттестованных в качестве УЛ за период 2021–2022 гг. выросло в 1,5 раза в сравнении с таким же периодом в 2014–2015 гг.
Выводы. Отмечено, что введение обновленного порядка аттестации в Российской Федерации привело к заметным изменениям сформированной в последнее десятилетие профессиональной группы УЛ. При анализе нормативной базы выявлен ряд процедурных вопросов, которые требуют дополнительных уточнений и разъяснений Минздрава России при применении действующего порядка аттестации УЛ.

Ключевые слова: уполномоченное лицо по качеству; лекарственные средства; производство лекарственных средств; аттестация

Для цитирования: Аладышева Ж.И., Пятигорская Н.В., Береговых В.В., Бркич Г.Э., Мешковский А.П., Маршалова М.М., Беляев В.В., Николенко Н.С., Нестеркина Е.И., Камалетдинова А.А., Лутфуллин М.Ф. Аналитический обзор процедуры аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в России. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):453–463. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-540

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© Ж.И. Аладышева, Н.В. Пятигорская, В.В. Береговых, Г.Э. Бркич, А.П. Мешковский, М.М. Маршалова, В.В. Беляев, Н.С. Николенко, Е.И. Нестеркина, А.А. Камалетдинова, М.Ф. Лутфуллин, 2023

Zhanna I. Aladysheva[1], **Natalia V. Pyatigorskaya**[1], **Valery V. Beregovykh**[1], **Galina E. Brkich**[1], **Andrei P. Meshkovskiy**[1], **Marina M. Marshalova**[1], **Vasiliy V. Belyaev**[1] ✉, **Natalia S. Nikolenko**[1], **Ekaterina I. Nesterkina**[1], **Aisylu A. Kamaletdinova**[2], **Marsel F. Lutfullin**[2]

Review of the Certification Procedure for Qualified Persons of Manufacturers of Medicines for Human Use in Russia

[1] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation*

[2] *Ministry of Health of the Russian Federation, 3 Rakhmanovsky Ln., Moscow, GSP-4, 127994, Russian Federation*

✉ ***Vasiliy V. Belyaev***; belyaev_v_v_1@staff.sechenov.ru

ABSTRACT

Scientific relevance. In December 2020, the Russian Federation adopted the Eurasian Economic Union (EAEU) requirements. This has significantly changed the certification procedure for qualified persons (QPs) of manufacturers of medicinal products for human use in the Russian Federation. To accommodate these changes, the Russian regulatory framework needs further improvement.
Aim. This study aimed to review the changes made to the mechanism of state regulation of medicines and to evaluate the impact on the pharmaceutical industry two years after the adoption of the current QP certification procedure.
Discussion. This review compares two QP certification procedures established by Order No. 7n of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 12 January 2021. The first is an abbreviated one for QPs certified under the previous procedure, and the second is an initial one for QPs being certified for the first time, having an expired certificate, or wishing to extend their professional qualification profiles. The article illustrates common mistakes made by certification applicants when preparing their documents. Furthermore, the authors describe the most prevalent knowledge gaps identified by testing. The abbreviated certification procedure ensured a sufficiently smooth transition to the EAEU requirements. For example, by 1 February 2023, 506 QPs were recertified for the next five-year period according to this procedure. This accounts for slightly more than half of all QPs certified in the Russian Federation according to the previous requirements. The total number of QPs certified according to the EAEU requirements in Russia in 2021–2022 is approximately 1.5 times higher than the number of QPs certified during the same period in 2014–2015.
Conclusions. The updated procedure for QP certification has noticeably changed the occupational group of QPs formed in the Russian Federation in the last decade. The implementation of the new QP certification procedure has revealed several procedural issues that require additional explanation and clarification by the Ministry of Health of the Russian Federation.

Key words: qualified person responsible for quality; medicines; manufacturing of medicines; certification

For citation: Aladysheva Zh.I., Pyatigorskaya N.V., Beregovykh V.V., Brkich G.E., Meshkovskiy A.P., Marshalova M.M., Belyaev V.V., Nikolenko N.S., Nesterkina E.I., Kamaletdinova A.A., Lutfullin M.F. Review of the certification procedure for qualified persons of manufacturers of medicines for human use in Russia. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):453–463. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-540

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Защита населения от недоброкачественных лекарственных препаратов обеспечивается государством на различных уровнях с использованием целого ряда механизмов государственного регулирования сферы обращения лекарственных средств. Одним из них является аттестация уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения (УЛ). Обязательность аттестации УЛ установлена законодательно как на национальном[1], так и на межгосударственном[2] уровнях.

[1] Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Постановление Правительства Российской Федерации от 06.07.2012 № 686 «Об утверждении Положения о лицензировании производства лекарственных средств».

[2] Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза от 23.12.2014.

Процедура аттестации УЛ в Российской Федерации была установлена в конце 2013 г. соответствующим приказом[3]. Принципиальными отличиями установленного в дальнейшем порядка аттестации УЛ в Евразийском экономическом Союзе (ЕАЭС)[4] были, на наш взгляд, требования по освоению УЛ 12 фармацевтических и связанных с ними дисциплин (введено в действие с 01.01.2019) и указанию при аттестации видов деятельности по производству лекарственных средств, на которые аттестовано УЛ. Начиная с декабря 2020 г. согласно изменениям в Положении о лицензировании производства лекарственных средств[5] все производители лекарственных средств для медицинского применения должны иметь УЛ, аттестованных с учетом порядка аттестации в ЕАЭС и внесенных в реестр УЛ ЕАЭС. Указанные изменения повлекли за собой введение новых правил проведения аттестации УЛ[6], вступивших в действие 09.02.2021.

Цель работы — анализ изменений в механизме государственного регулирования сферы обращения лекарственных средств, произошедших за два года применения нового порядка аттестации уполномоченных лиц, и оценка результатов влияния этих изменений на фармацевтическую отрасль.

Административные и практические аспекты нового порядка аттестации уполномоченных лиц

Основные отличия порядка аттестации УЛ, введенного приказом Минздрава России от 12.01.2021 № 7н[7], от ранее использовавшейся процедуры приведены в *таблице 1*. Кроме указанных в таблице отличий в новом порядке аттестации были изменены некоторые процедурные аспекты: объем, критерии и тематика тестирования, сроки выполнения отдельных действий.

Новым порядком аттестации[8] *de facto* были введены две административные процедуры: для УЛ, аттестованных ранее, и для всех остальных *(рис. 1)*. Процедура ускоренной аттестации описана в п. 33–34 и Приложении № 3 приказа[9] и состоит из трех этапов: размещение ранее аттестованным УЛ заявления об аттестации и прилагаемых к нему документов, проверка сотрудниками Минздрава России полноты и достоверности представленных данных и издание приказа Минздрава России об аттестации заявителя в качестве УЛ с размещением его данных в реестре уполномоченных лиц производителей лекарственных средств ЕАЭС.

Такое регуляторное решение позволило многим УЛ, аттестованным согласно приказу Минздрава России от 01.11.2013 № 811н, ускоренно пройти аттестацию с учетом требований ЕАЭС и, следовательно, в короткие сроки обеспечить соблюдение предприятиями обновленных лицензионных требований. По состоянию на 01.02.2023 по данной процедуре на новый пятилетний период было заново аттестовано 506 человек, чуть более половины всех ранее аттестованных УЛ.

Следует отметить, что процесс аттестации по ускоренной процедуре полностью цифровизирован и переведен в безбумажный формат взаимодействия с заявителем: заявление формируется автоматически из данных, вносимых аттестуемым лицом, подпись заявителя удостоверяется в личном кабинете, предоставления бумажных документов не требуется. В качестве значимых практических аспектов использования данной процедуры аттестации можно выделить следующее:

- выполнение требований к любому аттестуемому лицу в отношении освоения 12 образовательных дисциплин и наличия действующего удостоверения о повышении квалификации УЛ[10];

[3] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.11.2013 № 811н «Об утверждении Порядка аттестации уполномоченного лица производителя лекарственных средств для медицинского применения».
[4] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 73 «О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств».
[5] Постановление Правительства Российской Федерации от 22.12.2020 № 2206 «О внесении изменений в Положение о лицензировании производства лекарственных средств».
[6] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12.01.2021 № 7н «Об утверждении перечня документов, представляемых аттестуемым уполномоченным лицом производителя лекарственных средств государства — члена Евразийского экономического союза, этапов процедуры и порядка принятия решений об аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в соответствии с Порядком аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств, утвержденным решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 73 “О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств”».
[7] Там же.
[8] Там же.
[9] Там же.
[10] Удостоверение о повышении квалификации УЛ действует в течение 5 лет согласно Положению о лицензировании производства лекарственных средств (п. 5, пп. «л»). Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 06.07.2012 № 686.

Таблица 1. *Основные отличия процедур аттестации уполномоченных лиц (УЛ), установленных приказами Минздрава России от 01.11.2013 № 811н[11] и от 12.01.2021 № 7н[12]*

Table 1. *Major differences in the certification procedures for Quality Persons (QPs) established by orders of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 811n[11] dated 01.11.2013 and No. 7n[12] dated 12.01.2021*

Требования *Requirements*	**Положения приказа Минздрава России от 01.11.2013 № 811н** *Provisions of Order No. 811n of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 01.11.2013*	**Положения приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н** *Provisions of Order No. 7n of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 12.01.2021*
Длительность трудового стажа *Duration of practical experience*	5 лет *5 years*	3 года *3 years*
Соответствие высшего образования *Compliance with higher education requirements*	Сформулированы в виде 9 направлений подготовки *The requirements are formulated as a list of 9 scientific disciplines*	Сформулированы в виде 5 областей образования. Установлены отдельные требования к образованию УЛ производителей радиофармацевтических препаратов и медицинских газов *The requirements are formulated as a list of 5 education areas. Individual education requirements are established for QPs of manufacturers of radiopharmaceuticals and medicinal gases*
Требования к содержанию образования *Curriculum requirements*	Отсутствуют *Absent*	Наличие обучения по 12 дисциплинам при получении высшего или дополнительного образования: а) прикладная (медицинская и биологическая) физика; б) общая и неорганическая химия; в) органическая химия; г) аналитическая химия; д) фармацевтическая химия (включая анализ лекарственных средств); е) биологическая химия; ж) физиология; з) микробиология; и) фармакология; к) фармацевтическая технология; л) токсикология (токсикологическая химия); м) фармакогнозия *Higher or further education in 12 subjects: a) applied (medical and biological) physics; b) general and inorganic chemistry; c) organic chemistry; d) analytical chemistry; e) pharmaceutical chemistry (including analysis of medicinal products); f) biological chemistry; g) physiology; h) microbiology; i) pharmacology; k) pharmaceutical technology; l) toxicology (toxicological chemistry); m) pharmacognosy*
Область аттестации *Certification area*	Отсутствует *Absent*	Аттестация проводится по видам производственной деятельности в соответствии с перечнем работ, составляющих деятельность по производству лекарственных средств. Тестирование проводится с учетом заявленных для аттестации видов деятельности *Certification is carried out for types of production activities in accordance with the list of activities that comprise medicinal product manufacturing. Testing is based on the types of activities to be certified*
Реестр УЛ *QP Register*	Не предусмотрен *Not provided*	Информация вносится в реестр УЛ ЕЭАС *The information is entered in the EAEU QP Register*

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

- действующий статус УЛ[13];
- виды производственной деятельности в соответствии с перечнем работ, составляющих деятельность по производству лекарственных средств, формулируются согласно лицензии на производство лекарственных средств работодателя заявителя.

Таким образом, на настоящий момент УЛ, аттестованные в 2018–2020 гг., могут воспользоваться ускоренной процедурой при выполнении всех формальных условий, а виды деятельности на основании имеющейся лицензии на производство лекарственных средств для медицинского применения, на которые аттестовано

[11] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.11.2013 № 811н «Об утверждении Порядка аттестации уполномоченного лица производителя лекарственных средств для медицинского применения».

[12] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12.01.2021 № 7н «Об утверждении перечня документов, представляемых аттестуемым уполномоченным лицом производителя лекарственных средств государства — члена Евразийского экономического союза, этапов процедуры и порядка принятия решений об аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в соответствии с Порядком аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств, утвержденным решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 73 “О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств”».

[13] Аттестация УЛ действовала в течение 5 лет после издания приказа об аттестации в соответствии с п. 23 приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.11.2013 № 811н «Об утверждении Порядка аттестации уполномоченного лица производителя лекарственных средств для медицинского применения».

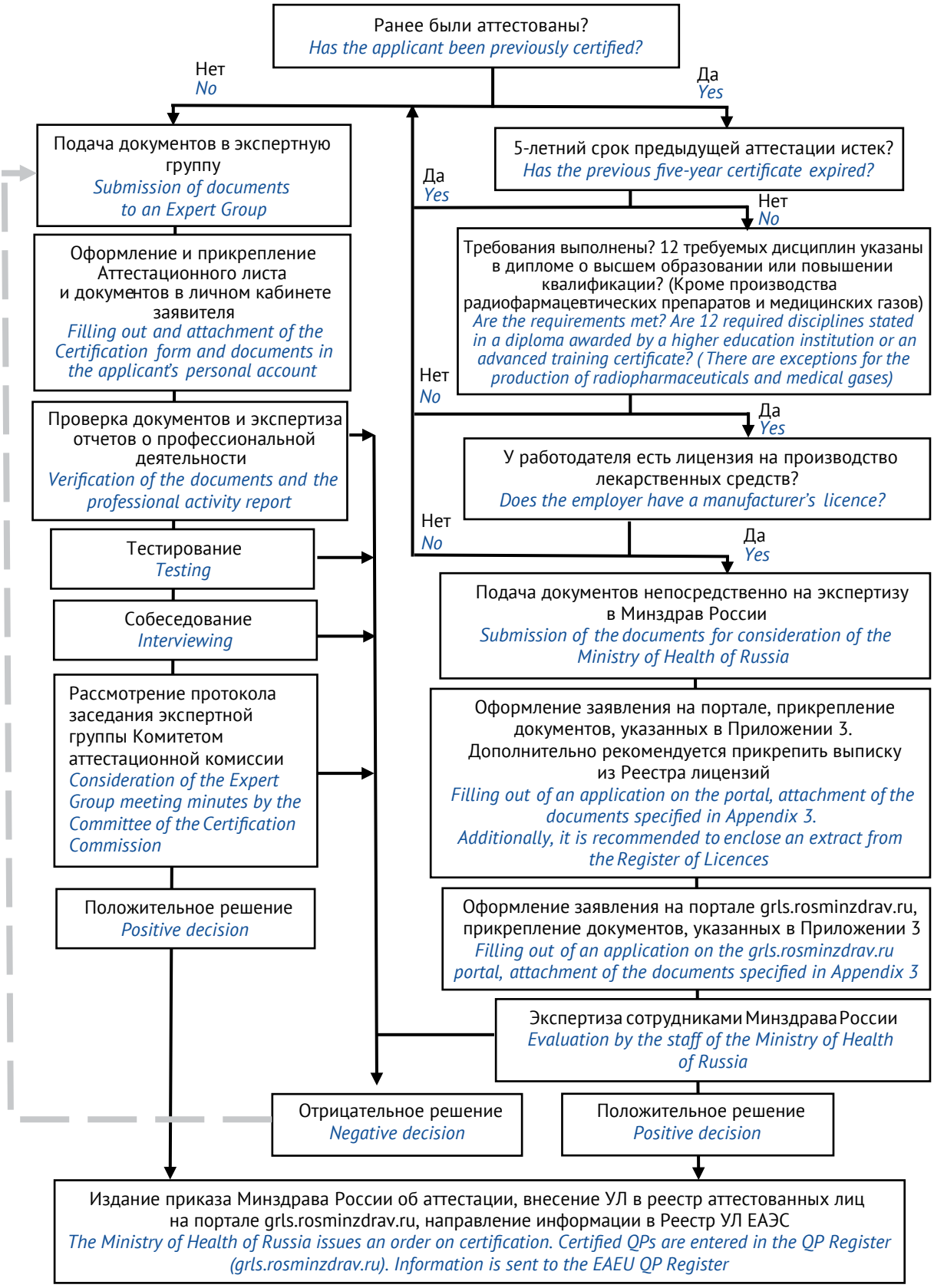


Рисунок подготовлен авторами / Figure is prepared by the authors

Рис. 1. *Алгоритм принятия решения о выборе процедуры аттестации уполномоченных лиц (УЛ)*

Fig. 1. *Decision tree for choosing between the Qualified Person (QP) certification procedures*

УЛ и его работодатель, указываются в приказе об аттестации.

Основная процедура аттестации (первичная) применяется для впервые аттестуемых лиц, для ранее аттестованных УЛ, срок действия аттестации которых истек, и в случае необходимости расширения видов производственной деятельности (специализаций), на осуществление которых проводится аттестация. Эта процедура состоит из достаточно большого количества этапов и предусматривает участие экспертных групп аттестационной комиссии Минздрава России, формируемых на базе образовательных организаций высшего образования, подведомственных министерству *(рис. 1)*. В настоящее время в состав аттестационной комиссии входят 4 экспертные группы[14]. Требования к процедуре приведены в п. 19–28 и Приложениях 1 и 2 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н.

Вместо заявления, подаваемого по ускоренной процедуре, при проведении первичной аттестации заявитель также в электронном виде оформляет аттестационный лист и представляет на экспертизу отчет о профессиональной деятельности с приложением копий документов о высшем образовании, о дополнительном профессиональном образовании, трудовой книжки (или выписки из электронной трудовой книжки), о повышении квалификации за последние 5 лет по соответствующей образовательной программе для уполномоченного лица и копии документа, подтверждающего факт изменения фамилии, имени, отчества (при наличии). При проведении первичной аттестации предусмотрены тестирование и собеседование в выбранной заявителем экспертной группе. После собеседования рекомендации экспертных групп рассматриваются Комитетом аттестационной комиссии, принимается решение об их утверждении или отклонении. Различия двух процедур аттестации УЛ, определенных в приказе Минздрава России от 12.01.2021 № 7н, обобщены в *таблице 2*.

Нередко заявители при проведении процедуры первичной аттестации допускают ошибки в представляемых в электронном виде документах и информации, что приводит к отказу в принятии документов в соответствии с п. 21 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н. При представлении данных в личном кабинете заявителя на портале Государственного реестра лекарственных средств наиболее часто встречались следующие ошибки[15]: не указывался полностью адрес места жительства, отсутствовали контактные данные заявителя (телефон и электронная почта), сведения о прохождении повышения квалификации УЛ, сведения об освоении 12 образовательных дисциплин (кроме производства радиофармацевтических лекарственных препаратов и медицинских газов), полные сведения о трудовой деятельности, реквизиты, контактные сведения, подпись работника кадровой службы и печать отдела кадров организации, работником которой является аттестуемое лицо. Также достаточно часто выявлялось несоответствие информации, указанной в аттестационном листе, с документами об образовании, трудовой деятельности или с лицензией на производство лекарственных средств для медицинского применения.

В представляемых отчетах о профессиональной деятельности заявителя не указывались основные должностные обязанности, сведения о лицензии на производство лекарственных средств для медицинского применения и виды производственной деятельности согласно приложению к лицензии работодателя, выпускаемая продукция (количество наименований, типы по источнику происхождения), количество действующих УЛ и их должности, информация о полученных за отчетный период претензиях и осуществленном отзыве продукции из обращения, информация об участии в инспекционных проверках и аудитах качества. Также часто заявители забывали подписать отчет и согласовать его с руководителем организации, работником которой является аттестуемое лицо, заверить подписи печатью этой организации. Наряду с ошибками в аттестационных листах и отчетах о профессиональной деятельности отмечалось отсутствие в досье требуемых согласно процедуре документов.

На основе анализа указанных типичных ошибок Экспертной группой Сеченовского Университета были разработаны и размещены на веб-сайте кафедры промышленной фармации в сети Интернет[16] шаблоны заполнения аттестационного листа, отчета о профессиональной деятельности, а также чек-лист для проверки представляемых заявителями документов и экспертного заключения на отчет о профессиональной деятельности, формулировки видов

[14] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 02.03.2021 № 157 «Об утверждении состава Аттестационной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств государств-членов Евразийского экономического союза».
[15] По данным Экспертной группы при Сеченовском Университете.
[16] https://www.gmp-mma.ru/attestacia-ul

Таблица 2. *Основные отличия процедур аттестации уполномоченного лица (УЛ), установленных приказом Минздрава России от 12.01.2021 № 7н*[17]

Table 2. *Fundamental differences in the certification procedures established by Order No. 7n of the Ministry of Health of the Russian Federation of 12 January 2021*

Основные положения процедуры *Main provisions of the procedure*	**Ускоренная процедура** *Abbreviated*	**Первичная аттестация** *Initial*
Представляемые документы *Documents to submit*		
Обращение в Аттестационную комиссию *Application to the Certification Commission*	Заявление (форма в Приложении 3 приказа) *Application form (Appendix 3 of the Order)*	Аттестационный лист* (форма в Приложении 1 приказа) *Certification form (Appendix 1 of the Order)*
Копия диплома(ов) о высшем образовании *A copy of the diploma(s) awarded by a higher education institution*	+	+
Копия трудовой книжки (выписки), трудового договора *A copy of the employment record book (extracts), employment contracts*	+	+
Копии документов о дополнительном образовании по 12 обязательным дисциплинам (если их нет в дипломе о высшем образовании) *Copies of documents on additional training in 12 compulsory disciplines (if they are not mentioned in the diploma awarded by a higher education institution)*	+	+
Отчет о профессиональной деятельности *Professional activity report*	–	+
Копия документа о повышении квалификации УЛ за последние 5 лет *A copy of advanced training credentials for the last 5 years*	–	+
Копии лицензий на производство лекарственных средств работодателей (по запросу) *Copies of manufacturer's licences of employers (on request)*	+	+
Этапы процедуры *Procedure steps*		
Выбираемая экспертная группа *Selected Expert Group*	Минздрав России *Ministry of Health of Russia*	Экспертная группа *Expert Group*
Экспертиза правильности и комплектности документов и сведений *Examination of the correctness and completeness of documents and information*	+	+
Экспертиза отчета о профессиональной деятельности *Examination of the professional activity report*	Не применимо *Not applicable*	+
Тестовый контроль знаний *Knowledge testing*	Не применимо *Not applicable*	+
Собеседование *Interview*	Не применимо *Not applicable*	+
Оформление протокола заседания экспертной группы и его представление в Минздрав России *Preparation of the Expert Group meeting minutes and their submission to the Ministry of Health of Russia*	Не применимо *Not applicable*	+*
Рассмотрение рекомендаций экспертной группы Комитетом аттестационной комиссии *Consideration of the Expert Group's recommendations by the Committee of the Certification Commission*	Не применимо *Not applicable*	+*
Подготовка и издание приказов Министерства об аттестации в качестве УЛ *Preparation and issuance of orders of the Ministry of Health on the certification as a QP*	+	+

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. *«+» — требуется; «–» — не требуется.*
** Этапы, не переведенные в безбумажный формат.*
Note. *+, required; –, not required.*
** Paper-based steps.*

[17] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12.01.2021 № 7н «Об утверждении перечня документов, представляемых аттестуемым уполномоченным лицом производителя лекарственных средств государства — члена Евразийского экономического союза, этапов процедуры и порядка принятия решений об аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в соответствии с Порядком аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств, утвержденным решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 73 "О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств"».

производственной деятельности для аттестации УЛ. Документы приведены в формате Word, чтобы облегчить подготовку заявителями требуемых документов.

При разработке шаблона отчета о профессиональной деятельности учитывались положения надлежащей производственной практики (GMP) о выполняемых действиях и функциях УЛ и профессионального стандарта «Специалист по промышленной фармации в области обеспечения качества лекарственных средств»[18]. Но, несмотря на все эти принимаемые меры, до сих пор более чем в половине случаев документы и информация содержат ошибки и возвращаются заявителю на доработку.

Также есть проблемы и с прохождением заявителями тестового контроля, который проводится в рамках утвержденных Минздравом России единых вопросов[19]. Порядок проведения этого контроля регламентирован п. 25 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н. По данным Экспертной группы Сеченовского Университета, у заявителей возникают затруднения с написанием тестов по части 2 правил GMP[20] (Основные требования к активным фармацевтическим субстанциям, субстанциям, используемым в качестве исходных материалов), Приложениям: 1 (Требования к производству стерильных лекарственных средств), 2 (Требования к производству биологических (в том числе иммунобиологических) активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов для медицинского применения), 6 (Требования к производству медицинских газов), 13 (Требования к лекарственным препаратам для клинических исследований) и фармакопейному анализу. Обращает на себя внимание высокая частота ошибок в написании тестов, касающихся Приложения 1 правил GMP, у заявителей, работающих на предприятиях, производящих радиофармацевтические препараты. На наш взгляд, сложности понимания концепций микробиологического качества и предупреждения микробной контаминации, рисков для пациента при стерильном производстве у этих лиц обусловлены отсутствием требований к наличию образования по 12 фармацевтическим и связанным с ними дисциплинам. Также следует отметить, что до сих пор не урегулирован объем знаний по указанным дисциплинам, а требование, что данное образование должно быть равноценным независимо от способа его получения (высшее образование или дополнительное профессиональное), не соблюдается. Это может быть обусловлено различиями в содержании образовательных программ по областям знаний, указанным в п. 14 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н.

Собеседование является важным элементом процедуры аттестации УЛ, которое позволяет определить, насколько самостоятельно заявитель проходил тестовый контроль, ориентируется ли он в фармацевтической системе качества и технологических процессах работодателя, способен ли принимать ответственные решения о выпуске серий лекарственного препарата в обращение. Проведение собеседования регламентировано п. 25 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н.

По состоянию на 01.02.2023 в Российской Федерации за два предыдущих года в качестве УЛ аттестованы в соответствии с требованиями ЕАЭС 803 человека. Для сравнения за тот же период в 2014–2015 гг. было аттестовано 519 человек (в 1,5 раза меньше). В 2022 г. было аттестовано 267 человек, в том числе 95 человек по ускоренной процедуре, что в 4,3 раза меньше, чем в 2021 г.

Большинство действующих УЛ — женщины (80,2%), распределение по возрастным группам представлено на *рисунке 2*. Следует отметить, что за последние 2 года распределение УЛ по возрастным группам изменилось в сравнении с данными 2020 г. [1]: количество специалистов, находящихся на этапе стабилизации, консолидации и продвижения карьеры, увеличилось приблизительно на 4%, а находящихся на этапе снижения профессиональной и социальной активности — соответственно, снизилось на эти 4%, что свидетельствует о тренде на возрастное обновление ключевых специалистов отечественных фармацевтических предприятий.

[18] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза» (часть I, п. 2.4, Приложение 16).
Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 22.05.2017 № 429н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист по промышленной фармации в области обеспечения качества лекарственных средств» (трудовая функция B/05.7).

[19] Перечень вопросов, для прохождения тестового контроля знаний при аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств государств — членов Евразийского экономического союза. https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/11/perechen-voprosov-dlya-prohozhdeniya-testovogo-kontrolya-znaniy-pri-attestatsii-upolnomochennyh-lits-proizvoditeley-lekarstvennyh-sredstv-gosudarstv-chlenov-evraziyskogo-ekonomicheskogo-soyuza

[20] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

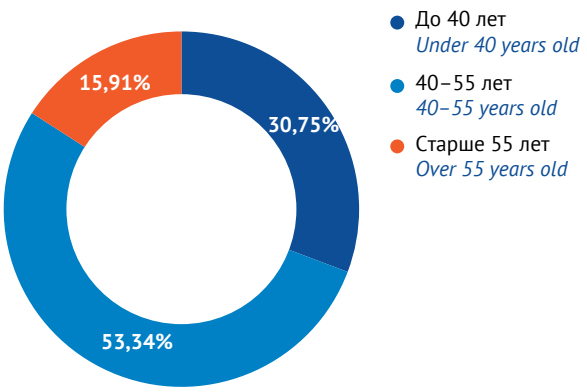


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. *Возрастные группы уполномоченных лиц*

Fig. 2. *Qualified Persons by age group*

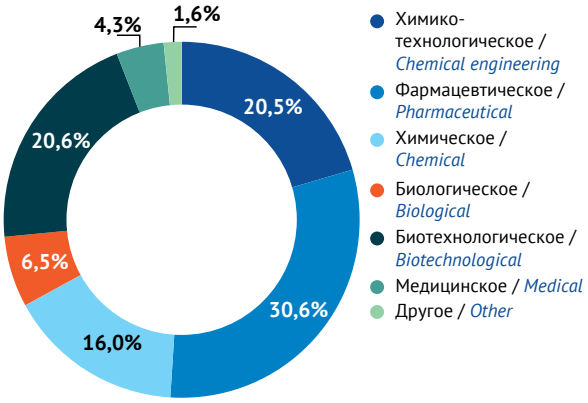


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. *Образование уполномоченных лиц*

Fig. 3. *Qualified Persons by education*

Распределение УЛ по направлениям образования представлено на *рисунке 3*. В сравнении с данными 2020 г. [1] отмечается увеличение УЛ с фармацевтическим образованием (почти на 8%), биотехнологическим (на 4%) и медицинским (на 3%). Наблюдаемое изменение обусловлено, на наш взгляд, введенными в 2021 г. требованиями ЕАЭС к наличию у заявителей образования по 12 фармацевтическим и связанным с ними дисциплинам.

Стаж большинства УЛ (68,8%) в области производства, контроля или обеспечения качества лекарственных средств составляет от 10 до 30 лет. Большинство УЛ (73,2%) работали на разных должностях или в области обеспечения качества (32,8%), или в области контроля качества (27,3%), или в области производства лекарственных средств (13,0%).

Выделенную должность уполномоченного лица занимают 8,6% аттестованных лиц, что почти в 2 раза больше, чем в 2020 г. [1]; из них почти треть совмещают эту должность с другой. Остальные совмещают функции УЛ с функциями других должностей: 29,9% — с функциями административных руководителей (директор, заместитель директора, главный технолог и т.п.), 38,4% — с функциями руководителей отделов контроля или обеспечения качества или других отделов и их заместителей; 16,7% — с функциями главных или ведущих специалистов, начальников лабораторий и их заместителей. Распределение УЛ по должностям приведено на *рисунке 4*.

На *рисунке 5* представлено распределение отечественных фармацевтических предприятий по количеству УЛ, аттестованных для этих работодателей. Обращает на себя внимание увеличение количества предприятий, на которых работает более одного УЛ.

За время применения нового порядка аттестации УЛ[21] был выявлен ряд процедурных вопросов, потребовавших дополнительных уточнений. В частности, в связи с получением лицензий на производство лекарственных средств контрактными испытательными лабораториями заявление на аттестацию в качестве УЛ начали подавать специалисты, не работавшие на фармацевтических предприятиях, но осуществлявшие работы по контролю и обеспечению качества лекарственных средств в контрактных или государственных испытательных лабораториях. Минздравом России было дано разъяснение, что допускается учитывать стаж работы в таких лабораториях в соответствии с требованиями п. 14 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н[22].

Также был разъяснен вопрос об отсутствии необходимости повторной аттестации УЛ в случае приведения в соответствие формулировок наименования работ по производству лекарственных средств для медицинского применения в лицензии на производство лекарственных средств с действующей редакцией постановления Правительства Российской Федерации от 06.07.2012 № 686[23] или добавления

[21] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12.01.2021 № 7н «Об утверждении перечня документов, представляемых аттестуемым уполномоченным лицом производителя лекарственных средств государства — члена Евразийского экономического союза, этапов процедуры и порядка принятия решений об аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств для медицинского применения в соответствии с Порядком аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств, утвержденным решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 73 "О Порядке аттестации уполномоченных лиц производителей лекарственных средств"».

[22] https://www.sechenov.ru/upload/iblock/695/rmvv8fa3dc7mwljgtcufdgedaarcmnv4/Pro-attestatsiyu-UL-dlya-laboratoriy.pdf

[23] Постановление Правительства Российской Федерации от 06.07.2012 № 686 «Об утверждении Положения о лицензировании производства лекарственных средств».

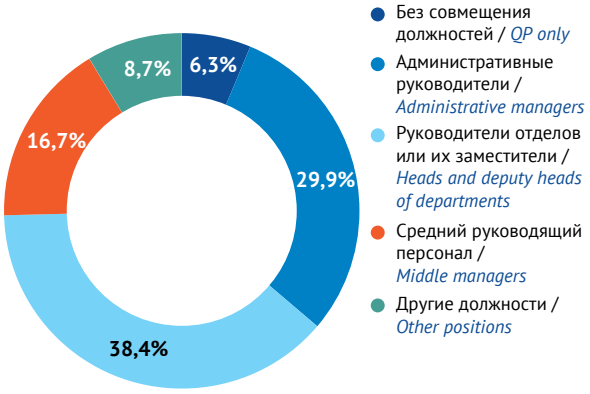


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. *Совмещаемые функции уполномоченных лиц*

Fig. 4. *Quality Persons by concurrent employment*

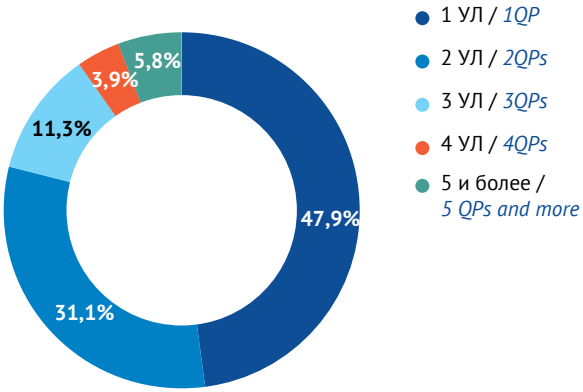


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. *Количество уполномоченных лиц (УЛ), работающих на предприятии*

Fig. 5. *Number of Qualified Persons (QPs) working in a pharmaceutical company*

в номенклатуру продукции расширенного названия лекарственной формы, производимой в тех же условиях[24].

Более подробно была разъяснена и техническая процедура уведомления аттестационной комиссии Минздрава России об изменении места работы УЛ или прекращения профессиональной деятельности[25], предусмотренная п. 29 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н.

Подтверждение аттестации в качестве уполномоченного лица проводится по истечении 5-летнего срока аттестации. Согласно п. 31 приказа Минздрава России от 12.01.2021 № 7н процедура подтверждения совпадает с процедурой первичной аттестации. Такой же подход в настоящее время принят и в случае необходимости расширения видов производственной деятельности (специализаций), на осуществление которых проводится аттестация, так как другой административной процедуры в приказе не описано.

Заключение

Опыт проведения аттестации УЛ по процедурам, определенным в приказе Минздрава России от 12.01.2021 № 7н, подтверждает высокую результативность обновленного регуляторного механизма, обеспечившего достаточно плавный переход на требования к УЛ в ЕАЭС. Количество аттестованных в качестве УЛ за период 2021–2022 гг. выросло в 1,5 раза в сравнении с тем же периодом в 2014–2015 гг.

Введение обновленного порядка аттестации УЛ в Российской Федерации привело к возрастному обновлению этой профессиональной группы. Но наибольшее влияние, на наш взгляд, оказала реализация требования к наличию у УЛ образования по 12 фармацевтическим и связанным с ними дисциплинами. Дополнительного урегулирования требует содержание образовательных программ по этим дисциплинам, а также распространение этого требования на лиц, выполняющих функции УЛ производителей радиофармацевтических препаратов. Также отдельного изучения требует выявленная проблема недостаточной проработки заявителями методических материалов по подготовке документов для аттестации и теоретических знаний в рамках вопросов для тестирования, определенных Минздравом России. За указанный период количество выделенных должностей «уполномоченное лицо» на фармацевтических предприятиях увеличилось в 2 раза.

На основании выявленных в ходе применения порядка аттестации УЛ недочетов и потребности в создании условий для безбумажного формата взаимодействия с заявителем и экспертными группами при первичной аттестации и процедуре ее подтверждения представляется целесообразным внесение изменений в приказ Минздрава России от 12.01.2021 № 7н.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Аладышева ЖИ, Пятигорская НВ, Беляев ВВ, Николенко НС, Нестеркина ЕИ, Лосева СА. Актуальные проблемы профессионально-личностного развития уполномоченных лиц по качеству производителей лекарственных средств для медицинского применения. *Фармация и фармакология.*

[24] https://www.sechenov.ru/upload/iblock/d55/trjjk5j8raeujxxpnicyvf0a3xlc6zth/O-vidakh-deyatelnosti-v-litsenii.pdf

[25] Инструкция по размещению в личном кабинете уведомления об изменении места работы или прекращения профессиональной деятельности. https://www.sechenov.ru/upload/iblock/691/2lia5eruyp3abcgjf966eyp9s05spp7c/Instruktsiya-po-uvedomleniyu.docx

2021;9(5):410–22.
Aladysheva ZhI, Pyatigorskaya NV, Belyaev VV, Nikolenko NS, Nesterkina EI, Loseva SA. Actual problems of professional and personal development of qualified persons responsible for quality of medicinal products for human use. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(5):410–22 (In Russ.).
https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-5-410-422

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *Ж.И. Аладышева* — разработка концепции, написание текста рукописи, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *Н.В. Пятигорская* — критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; *В.В. Береговых* — вклад в концепцию, критический пересмотр текста; *Г.Э. Бркич, А.П. Мешковский, М.М. Маршалова* — сбор, анализ и обобщение данных, вклад в концепцию, редактирование текста рукописи; *В.В. Беляев, Н.С. Николенко, Е.И. Нестеркина* — разработка концепции, анализ и обобщение данных, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; *А.А. Камалетдинова* — разработка концепции, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; *М.Ф. Лутфуллин* — обработка данных, написание текста рукописи, редактирование.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Zhanna I. Aladysheva* conceptualised the study, drafted and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Natalia V. Pyatigorskaya* critically revised the manuscript and approved the final version for publication. *Valery V. Beregovykh* contributed to the study concept and critically revised the manuscript. *Galina E. Brkich, Andrei P. Meshkovskiy,* and *Marina M. Marshalova* collected, analysed, and collated data; contributed to the study concept; and edited the manuscript. *Vasiliy V. Belyaev, Natalia S. Nikolenko,* and *Ekaterina I. Nesterkina* conceptualised the study, analysed and collated data, and approved the final version of the manuscript for publication. *Aisylu A. Kamaletdinova* conceptualised the study, edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. *Marsel F. Lutfullin* processed data, drafted and edited the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Аладышева Жанна Игоревна, канд. мед. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2441-3542
zhaladysheva@gmail.com
Пятигорская Наталья Валерьевна, д-р фарм. наук, профессор, чл.-корр. РАН
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4901-4625
osipova-mma@list.ru
Береговых Валерий Васильевич, д-р техн. наук, профессор, академик РАН
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0210-4570
ber2742@gmail.com
Бркич Галина Эдуардовна, канд. фарм. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3469-9062
brkich_g_e@staff.sechenov.ru
Мешковский Андрей Петрович, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6016-3237
meshkvskijj@mail.ru
Маршалова Марина Максимовна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5281-7771
marshalova_m_m@staff.sechenov.ru
Беляев Василий Викторович, канд. фарм. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3011-9390
belyaev_v_v_1@staff.sechenov.ru
Николенко Наталья Сергеевна, канд. фарм. наук, доцент
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5567-8570
nikolenko_n_s@staff.sechenov.ru
Нестеркина Екатерина Игоревна
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4102-4394
catherinenesterkina@gmail.com
Камалетдинова Айсылу Абраровна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0807-6953
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru
Лутфуллин Марсель Фанисович
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1484-6587
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Zhanna I. Aladysheva, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2441-3542
zhaladysheva@gmail.com
Natalia V. Pyatigorskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Corresponding Member of RAS
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4901-4625
osipova-mma@list.ru
Valery V. Beregovykh, Dr. Sci. (Tech.), Professor, Academician of RAS
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0210-4570
ber2742@gmail.com
Galina E. Brkich, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3469-9062
brkich_g_e@staff.sechenov.ru
Andrei P. Meshkovskiy, Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6016-3237
meshkvskijj@mail.ru
Marina M. Marshalova
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5281-7771
marshalova_m_m@staff.sechenov.ru
Vasiliy V. Belyaev, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3011-9390
belyaev_v_v_1@staff.sechenov.ru
Natalia S. Nikolenko, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5567-8570
nikolenko_n_s@staff.sechenov.ru
Ekaterina I. Nesterkina
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4102-4394
catherinenesterkina@gmail.com
Aisylu A. Kamaletdinova
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0807-6953
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru
Marsel F. Lutfullin
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1484-6587
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Поступила 21.02.2023
После доработки 28.04.2023
Принята к публикации 22.05.2023
Online first 04.07.2023

Received 21 February 2023
Revised 28 April 2023
Accepted 22 May 2023
Online first 4 July 2023

УДК 615.076
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-543
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

О.В. Гунар ✉, **Н.Г. Сахно**

Микробиологический анализ качества лекарственных препаратов в формах аэрозолей и спреев

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Гунар Ольга Викторовна***; *gunar@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Лекарственные препараты в форме аэрозолей и спреев все более активно применяются в медицинской практике, в связи с чем актуальным оказывается вопрос контроля их качества, в частности по микробиологическим показателям. В действующей нормативной документации рекомендации по проведению микробиологических испытаний дозированных аэрозольных препаратов представлены в недостаточном объеме. Форма первичной упаковки затрудняет извлечение необходимого для анализа количества образца. Методики испытания, описанные в зарубежной документации, требуют апробации и стандартизации. Лекарственные препараты (ЛП) в форме спреев лишены недостатков аэрозольных форм, но более подвержены риску микробной контаминации.

Цель. Описание методики пробоподготовки образцов, анализ результатов микробиологического испытания лекарственных препаратов в формах аэрозолей и спреев, определение спектра микроорганизмов-контаминантов данных лекарственных форм.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ данных микробиологических испытаний образцов ЛП, выполненных в 2020–2022 гг. в лаборатории микробиологии ИЦЭКЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Исследованы образцы 181 серии ЛП в форме спреев, аэрозолей и других лекарственных форм для ингаляций по показателям «Микробиологическая чистота» и «Стерильность». Испытания проведены в соответствии с нормативной документацией производителей по утвержденным методикам согласно Государственной фармакопее Российской Федерации и Фармакопее Евразийского экономического союза текущего издания.

Результаты. 2,8% серий проанализированных ЛП содержали микроорганизмы в количестве, превышающем допустимые значения. Установлен видовой состав контаминантов ЛП, не соответствующих нормативным требованиям по изученным показателям. Из большинства спреев, содержащих бензалкония хлорид в качестве консерванта, были выделены бактерии *Burkholderia cepacia* complex.

Выводы. Представляется актуальным проведение исследований по усовершенствованию имеющихся методик микробиологического анализа аэрозолей и спреев с учетом данных о потенциально нежелательных контаминантах.

Ключевые слова: аэрозоли; спреи; качество; микробиологическая чистота; *Burkholderia cepacia* complex

Для цитирования: Гунар О.В., Сахно Н.Г. Микробиологический анализ качества лекарственных препаратов в формах аэрозолей и спреев. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):464–472. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-543

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© О.В. Гунар, Н.Г. Сахно, 2023

Olga V. Gunar ✉, **Nadezhda G. Sakhno**

Microbiological Examination of Aerosols and Sprays

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Olga V. Gunar***; *gunar@expmed.ru*

ABSTRACT

Scientific relevance. Medicinal products formulated as aerosols and sprays are increasingly used in clinical practice, which makes the control of their quality, including microbiological testing, a highly topical issue. The current regulatory standards for microbiological testing of medicines provide little information on the quality control of metered-dose aerosols. Proper microbiological sampling of these medicinal products can be difficult because of their primary packaging. The specialised analytical procedures set forth in international standards require verification and standardisation before use. Medicinal products in the form of sprays, despite being free from the disadvantages of aerosols, are more susceptible to the risk of microbial contamination.
Aim. The study aimed to describe specific aspects of sampling, to analyse the results of microbiological testing of aerosols and sprays, and to study the spectrum of microbial contaminants in these dosage forms.
Materials and methods. The authors retrospectively analysed the microbiological quality and sterility data for 181 batches of sprays, aerosols, and other inhalation dosage forms. The data were obtained at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of Russia in 2020–2022. The Microbiology Laboratory tested the dosage forms according to the specifications provided by the manufacturers. The analysts used well-established testing procedures outlined in the current pharmacopoeias of the Russian Federation and the Eurasian Economic Union.
Results. The microbial counts exceeded the acceptable limits in 2.8% of the batches tested. The authors identified the microbial species that contaminated the medicinal products found to be non-compliant with regulatory requirements. Most of the non-compliant sprays that contained benzalkonium chloride as an antibacterial preservative were contaminated with *Burkholderia cepacia* complex species.
Conclusions. The authors consider it relevant to conduct research aiming at using the findings on potential contaminants to improve microbiological testing procedures for aerosols and sprays.

Key words: aerosols; sprays; quality; microbiological quality; *Burkholderia cepacia* complex

For citation: Gunar O.V., Sakhno N.G. Microbiological examination of aerosols and sprays. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):464–472. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-543

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Применение аэрозолей в лечебных целях имеет богатую историю, насчитывающую более 3500 лет. Первое известное упоминание об этом содержится в древнеегипетском свитке (папирусе Эберса), датированном 1554 г. до н.э. В Индии, Египте, Греции, Риме, Китае применялись пары горячих минеральных вод, ароматических веществ, курение лекарственных трав (*Hyoscyamus niger*, *Atropa belladonna*, *Ephedrus durus*). Постепенное развитие производственных мощностей привело к появлению во второй половине XIX в. инноваций в области технологии ингаляционных систем доставки лекарственных средств (ЛС). Эта тенденция продолжилась и ускорилась в XX в. Внедрение небулайзеров, дозированных порошковых ингаляторов, сигарет от астмы и ряда других технологий радикально изменило практику доставки ЛС в дыхательные пути. Важной вехой в развитии ингаляционных систем доставки ЛС стало создание Ч. Тилем и соавт. дозированного

аэрозольного ингалятора, изобретение которого позволило пациентам с бронхиальной астмой получать дозы ЛС без сложных процедур повторного заполнения ингалятора и произвело революцию в области респираторной доставки ЛС [1]. С тех пор фармацевтическими компаниями было разработано множество конструкций ингаляторов, поскольку стало очевидным, что используемое устройство является ключевым фактором успеха лечения[1].

На данный момент наибольшее распространение получили три вида систем доставки ингаляционных препаратов: дозированные аэрозольные ингаляторы, дозированные порошковые ингаляторы и небулайзеры[2] [2].

Спреи являются сравнительно новой аэрозольной лекарственной формой в фармацевтической технологии. Принципиальное различие аэрозолей и спреев заключается в способе подачи лекарственного препарата (ЛП). Из аэрозольного баллона препарат подается за счет создания в нем избыточного давления, а извлечение происходит посредством открывания клапана. При использовании спрея подача препарата осуществляется за счет его механического выдавливания поршнем микронасоса, при этом давление во флаконе равно атмосферному. ЛС в форме спрея используются для местного, наружного, интраназального применения при лечении простудных заболеваний, воспалительных процессов ротовой и носовой полости, кожи и приходят на смену аэрозолю. Это связано с разработкой эффективных и качественных микроспреев, обеспечивающих создание газожидкостной струи с определенными параметрами. Проникающая способность аэрозолей, которая напрямую зависит от дисперсности частиц, делает такие лекарственные препараты практически безальтернативными средствами для лечения бронхиальной астмы и хронических обструктивных болезней легких [3–6].

Задача ингаляционного способа доставки — создать максимально высокую терапевтическую концентрацию препарата в дыхательных путях при минимальной концентрации в общем кровотоке, исключающей активный метаболизм и инактивацию препарата. Для спреев характерно равномерное распределение по слизистой оболочке и быстрое попадание действующего вещества в кровоток[3] [7].

В связи со спецификой рассматриваемых лекарственных форм актуальной проблемой является вопрос стандартизации и разработки унифицированных подходов к оценке их качества [2]. Требования к качеству ЛС в виде аэрозолей и спреев объединены в ОФС.1.4.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ). Аэрозоли, предназначенные для ингаляций, должны соответствовать ОФС.1.4.1.0006.15 «Лекарственные формы для ингаляций» ГФ РФ. Перечень испытаний, включаемых в спецификацию на препараты для ингаляций и назальные ЛС при их регистрации в соответствии с правилами Евразийского экономического союза (ЕАЭС), приведен в Руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов[4].

Особое значение при определении качества спреев и аэрозолей имеют микробиологические показатели качества. Риски микробной контаминации в процессе производства, хранения или применения ЛС могут значительно снизить его качество, эффективность и безопасность. Жидкие лекарственные формы (в том числе спреи) представляют собой благоприятную среду для роста и размножения микроорганизмов по причине высокого содержания воды и растительных масел[5]. Одним из подходов к решению данной проблемы является включение антимикробных консервантов в состав лекарственного препарата. Другим фактором, позволяющим предотвратить загрязнение ЛП в виде аэрозолей и спреев извне во время хранения и использования, является герметичная первичная упаковка [3]. Однако именно особенности упаковки определяют сложности при асептическом отборе проб таких препаратов для анализа качества по микробиологическим показателям.

Цель работы — описание методики пробоподготовки образцов, анализ результатов микробиологического испытания лекарственных

[1] Терехова ЕП. Ингаляционные системы доставки препаратов, применяемых в терапии бронхиальной астмы: учебное пособие. М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2014.
[2] Копать ТТ. Применение лекарственных средств. Наружный, энтеральный и ингаляционный пути введения лекарственных средств: учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2021.
[3] Там же.
[4] Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 17 «О Руководстве по качеству лекарственных препаратов для ингаляций и назальных лекарственных препаратов».
[5] Колосова ЛВ. Совершенствование метода определения эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах: дис. … канд. фарм. наук. СПб., 2016.
Ленгелер Й, Древс Г, Шлегель У, ред. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 2. М.: Мир; 2005.

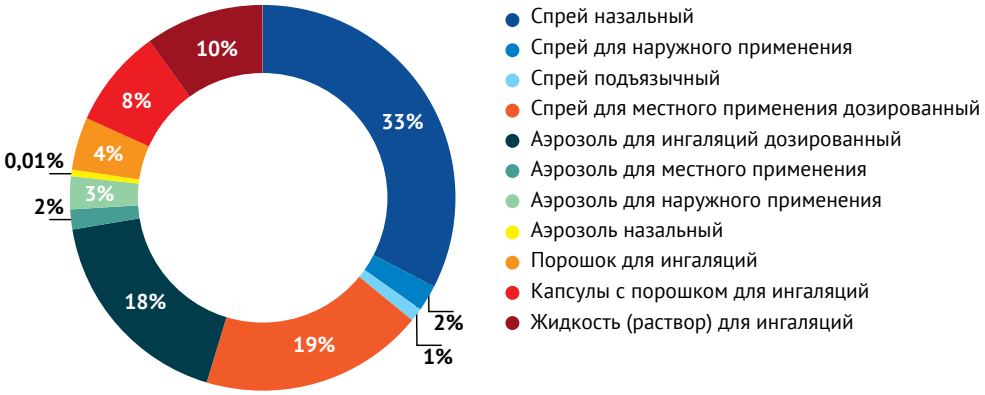


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / Figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. *Лекарственные формы, испытанные по показателю «Микробиологическая чистота» в 2020–2022 гг.*

Fig. 1. *Dosage forms tested for microbiological quality in 2020–2022.*

препаратов в формах аэрозолей и спреев, определение спектра микроорганизмов-контаминантов данных лекарственных форм.

Материалы и методы

В работе проанализированы результаты исследований 181 серии ЛС в форме спреев, аэрозолей и других лекарственных форм для ингаляций *(рис. 1)* по показателям «Микробиологическая чистота» и «Стерильность», выполненных в лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы и контроля качества лекарственных средств» Минздрава России в период с 2020 по 2022 г. в ходе экспертизы ЛС в рамках государственного задания Минздрава России.

66,9% исследованных ЛС были произведены на территории России, 33,1% — ввезены из других стран (всего 11 государств). Спреи и аэрозоли различного способа применения составляли 54,6 и 22,7% соответственно; 22,7% представляли собой иные ЛП для ингаляций.

Испытания проводили в соответствии с нормативной документацией производителей согласно методикам, описанным в ГФ РФ (ОФС.1.2.4.0002.18, ОФС.1.2.4.0003.15) и Фармакопее ЕАЭС (ст. 2.1.6.6, 2.1.6.7, 2.1.6.1).

Изучение тинкториальных свойств выделенных микроорганизмов-контаминантов выполняли методом световой микроскопии, предварительно окрасив приготовленные мазки по Граму. Идентификацию бактерий проводили с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact 30 (BioMerieux, Франция).

Результаты и обсуждение

В настоящее время в ГФ РФ и Фармакопее ЕАЭС описание процедуры отбора проб спреев и аэрозолей ограничено лишь термином «переносят», что в случае анализа других лекарственных форм является достаточным и общепонятным для специалистов, какие действия и в каком порядке необходимо выполнить. Однако особенности конструкции первичной упаковки спреев и аэрозолей, предохраняющей ЛП от загрязнения, ее герметичность и наличие пропеллента затрудняют извлечение необходимого для анализа количества образца описанным в этих документах образом. В отличие от ГФ РФ и Фармакопеи ЕАЭС, в Фармакопее США[6] представлена отдельная статья, посвященная альтернативным методам отбора проб нестерильных ЛП для ингаляций и назальных препаратов для микробиологических испытаний, где приведены методики, позволяющие извлечь содержимое аэрозольных баллонов при различных температурах. Однако указанные методики требуют апробации и стандартизации. При их реализации важно учитывать несколько аспектов:

- технические возможности при прокалывании или вскрытии баллона должны обеспечивать безопасность процедуры отбора проб;
- микробиологическая чистота сухого льда и жидкости, образующей ледяную суспензию, а также состояние используемого оборудования должны соответствовать установленным требованиям;
- содержимое упаковки может быть сразу добавлено в питательную среду, разбавитель или на фильтр только в том случае, если пропеллент не ингибирует рост микроорганизмов.

[6] Monograph 610. Alternative microbiological sampling methods for nonsterile inhaled and nasal products. United States Pharmacopeia. USP42-NF37. Rockville, MD; 2019.

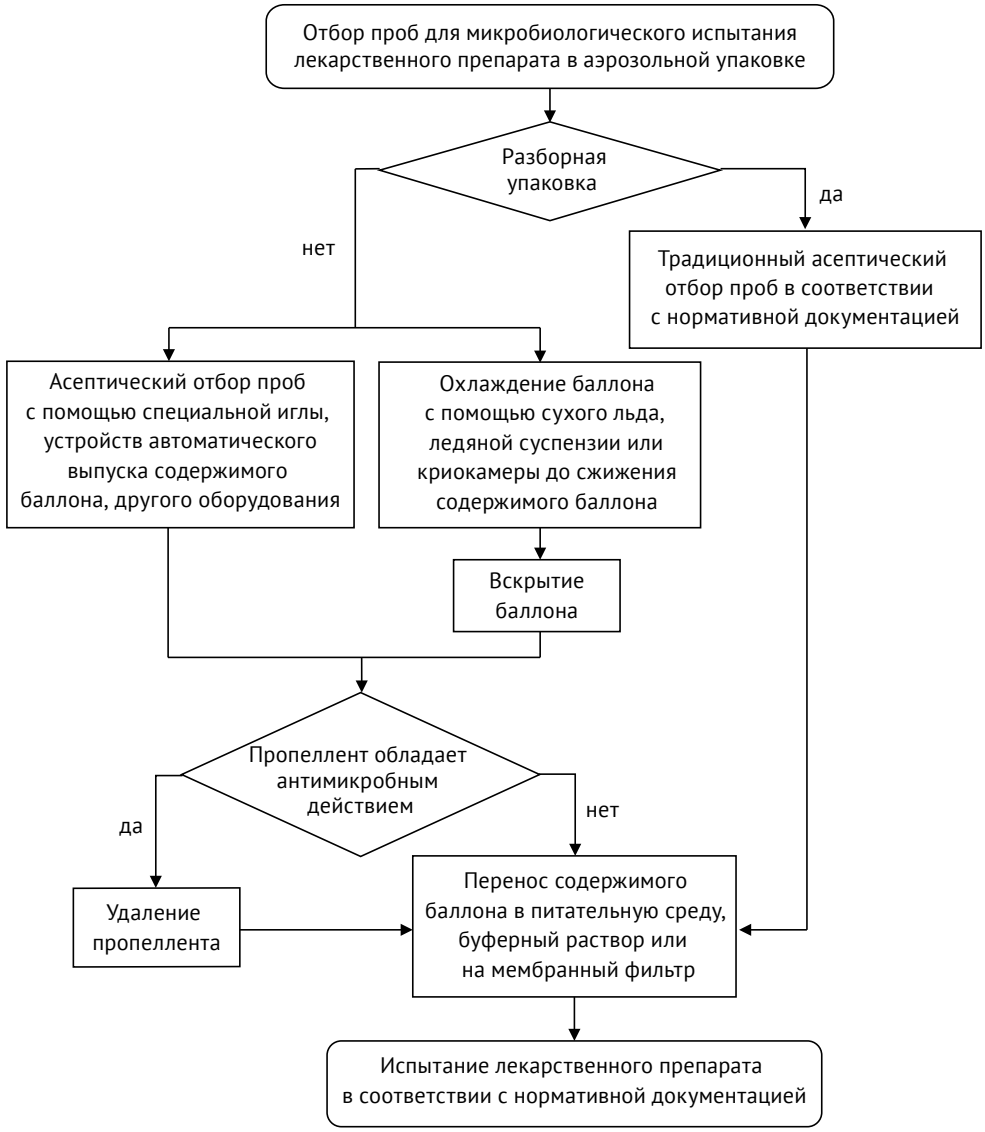


Рисунок подготовлен авторами / Figure is prepared by the authors

Рис. 2. *Алгоритм отбора проб лекарственного препарата в аэрозольной упаковке для микробиологического испытания*

Fig. 2. *Sampling of aerosols for microbiological examination*

В общем виде процедуру отбора проб аэрозолей и спреев для микробиологического испытания можно представить как алгоритм *(рис. 2)*, где ключевой стадией является вскрытие первичной упаковки.

В соответствии с ГФ РФ и Фармакопеей ЕАЭС спреи, как правило, относятся к категории 2 лекарственных препаратов и должны соответствовать следующим требованиям: общее число аэробных микроорганизмов (ОЧМ) не должно превышать 10^2 КОЕ в 1 г (мл), общее число дрожжевых и плесневых грибов (ОЧГ) — 10^1 КОЕ в 1 г (мл) при отсутствии в 1 г (мл) бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. При испытании аэрозольных препаратов, применяемых респираторно, дополнительно контролируют наличие в 1 г (мл) энтеробактерий, устойчивых к желчи.

В ряде случаев к спреям и ЛП для ингаляций предъявляются требования стерильности. Как правило, схема производства таких препаратов включает стадии стерилизующей фильтрации и асептического розлива в стерильную первичную упаковку. Среди ЛС, для которых была проведена экспертиза качества по заданию Минздрава России в период 2020–2022 гг., 7 серий (3,8%) представляли собой стерильные препараты зарубежного производства: 5 серий спреев назальных и 2 серии растворов для ингаляций.

Проведенный в рамках настоящего исследования ретроспективный анализ качества

аэрозолей, спреев и других ЛП для ингаляций показал, что подавляющее большинство препаратов соответствовало требованиям ГФ РФ и Фармакопеи ЕАЭС. В 3 сериях (1,7%) были обнаружены бактерии, общее число которых соответствовало установленным нормам, 2,8% серий (отечественного производства в форме спреев назальных) содержали микроорганизмы в количестве, превышающем допустимые значения *(табл. 1)*. Согласно результатам проведенной идентификации контаминанты представляли собой грамотрицательные бактерии семейства *Burkholderiaceae* (*Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia pseudomallei, Ralstonia pickettii*).

В последние годы контаминация стерильных и нестерильных ЛП бактериями *Burkholderia cepacia* complex *(BCC)* стала причиной отзыва с рынка препаратов и вспышек внутрибольничных инфекций. Так, 3,5% всех отзывов, осуществленных в период 2017–2022 гг. Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA), обусловлено контаминацией *Burkholderia spp.*, в том числе *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. lata*[7].

Первоначально считалось, что *Burkholderia cepacia* — один вид бактерий (до 1992 г. классифицированный как *Pseudomonas cepacia*), однако в настоящее время в *BCC* включают не менее 20 близкородственных видов *Burkholderia*, широко распространенных в окружающей среде [8–12]. Они представляют собой неферментирующие грамотрицательные бактерии и имеют доказанное клиническое значение для развития инфекционно-воспалительных процессов у пациентов с муковисцидозом, хроническим гранулематозом и некоторыми иммунодефицитными состояниями. Помимо этого, в группу риска входят пожилые люди, дети, пациенты с онкологическими заболеваниями, беременные женщины и другие группы пациентов [8, 9, 13]. *BCC* являются причиной развития некротизирующих пневмоний, абсцессов легких, послеоперационных раневых инфекций и септицемий, инфекций мочевого тракта, возникающих при использовании контаминированных микроорганизмами дезинфектантов, растворов и систем для внутривенного введения ЛП, а также тяжелого осложнения («*cepacia*-синдрома») [14, 15]. Лечение пациентов с заболеваниями, вызванными *B. cepacia*, усложняется высокой устойчивостью этого микроорганизма к большинству современных антибиотиков, причем в ходе лечения возможно появление полирезистентных клонов[8].

Как правило, загрязнению *BCC* наиболее подвержены жидкие и мягкие лекарственные формы (растворы, капли глазные, спреи, гели и др.) [8–10, 13], представляющие собой благоприятную среду для роста и размножения бактерий, несмотря на присутствие противомикробных консервантов[9] [16–18]. Для большинства многодозовых водных назальных, офтальмологических

Таблица 1. *Лекарственные препараты, не соответствующие нормативным требованиям по результатам микробиологического анализа, проведенного в 2020–2022 гг.*

Table 1. *Medicinal products found non-compliant with the regulatory requirements for microbiological quality in 2020–2022*

Международное непатентованное наименование	Результат, не соответствующий нормативным требованиям, КОЕ/мл		Выделенный микроорганизм	Консервант
	ОЧМ	ОЧГ		
Оксиметазолин	$6,5\times10^5$	$3,1\times10^5$	*Burkholderia cepacia* complex	Бензалкония хлорид
Морская вода	$6,0\times10^2$	< 10	Не идентифицирован	Отсутствует
Ксилометазолин+Декспантенол	$6,0\times10^2$	30	*Burkholderia cepacia* complex	Бензалкония хлорид
Оксиметазолин	$3,7\times10^3$	< 10	*Burkholderia pseudomallei*	Бензалкония хлорид
Ксилометазолин	$3,6\times10^4$	< 10	*Ralstonia pickettii*	Отсутствует

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание: *ОЧМ — общее число аэробных микроорганизмов, ОЧГ — общее число дрожжевых и плесневых грибов.*
Note: *ОЧМ, total aerobic microbial count; ОЧГ, total combined yeasts/moulds count.*

[7] Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts
[8] Лобойко АД. Биологические свойства и принципы идентификации культур группы *Burkholderia cepacia*: дис. … канд. мед. наук. Ставрополь, 2009.
[9] Колосова ЛВ. Совершенствование метода определения эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах: дис. … канд. фарм. наук. СПб., 2016.

и глазных ЛП в качестве консерванта используется бензалкония хлорид [17], который входит и в состав некоторых назальных спреев, исследованных в настоящей работе *(табл. 1)*. Бактерии *BCC* обладают высоким потенциалом развития резистентности к данному соединению[10] [16, 18, 19] за счет следующих механизмов:

1) энзиматическая инактивация биоцида с помощью конститутивных катаболических ферментов;

2) активное выведение бензалкония хлорида из микробной клетки за счет увеличения активности эффлюксного насоса;

3) изменение свойств внешней мембраны за счет изменения ее химического состава, приводящего к снижению проницаемости мембраны для консерванта [16, 19, 20].

Последние два механизма часто действуют синергетически и корегулируют друг друга.

При фармацевтическом производстве микроорганизмы подвергаются многочисленным стрессам, связанным с технологическими процессами и режимами хранения, недостатком питательных веществ, температурным и химическим воздействием и др. Под воздействием этих факторов бактерии *BCC* могут переходить в некультивируемое состояние и не демонстрируют видимый рост на питательных средах, сохраняя метаболическую активность и жизнеспособность. Наблюдается уменьшение размера колоний [8, 21] (в ряде случаев настолько значительное, что малые формы могут проходить через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм [22]), замедление скорости их роста (до 9 раз по сравнению с клетками-предшественниками). Учитывая эти особенности, а также выраженный полиморфизм фенотипических признаков, обнаружение и идентификация микроорганизмов *BCC* стандартными методами микробиологического анализа представляют собой сложности[11] [9, 10, 15, 22]. Многие ошибки идентификации возникают из-за фенотипического сходства между *Burkholderia* spp. и другими родами бактерий, такими как *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Pandoraea* и *Delfia* [8, 15, 22].

Правильное определение бактерий *BCC* имеет большое значение в фармацевтической промышленности, позволяя установить источники загрязнения и своевременно принять надлежащие корректирующие меры. Учитывая клиническую значимость *BCC* и необходимость обеспечения качества и безопасности ЛС, важную роль играет метод обнаружения, который должен быть быстрым и воспроизводимым. На сегодняшний день в действующих на территории Российской Федерации фармакопеях способы выделения и идентификации *BCC* из ЛП не указаны. Подробное описание методики определения *BCC* в нестерильных ЛС присутствует лишь в Фармакопее США (ст. 60)[12], хотя исследования на эту тему ведутся специалистами по всему миру[13] [10, 21, 23].

Заключение

В действующей нормативной документации, регламентирующей проведение микробиологических испытаний ЛС, представлены ограниченные сведения по проведению контроля качества дозированных аэрозольных препаратов, несмотря на то, что они являются широко применяемой лекарственной формой. Ключевую роль при этом играет способ вскрытия первичной упаковки и дальнейшая процедура микробиологической оценки качества аэрозолей и спреев.

Анализ полученных результатов показывает, что спреи более подвержены микробной контаминации, чем аэрозоли, несмотря на этап стерилизации перед упаковкой или наличие в составе препарата консервантов. Согласно данным выполненной идентификации, изученные препараты были контаминированы грамотрицательными бактериями семейства *Burkholderiaceae*, поэтому представляется актуальным дополнительное проведение исследований по усовершенствованию методик микробиологического анализа аэрозолей и спреев с учетом данных о потенциально нежелательных контаминантах.

---

[10] Колосова ЛВ. Совершенствование метода определения эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах: дис. … канд. фарм. наук. СПб., 2016.

[11] Лобойко АД. Биологические свойства и принципы идентификации культур группы *Burkholderia cepacia*: дис. … канд. мед. наук. Ставрополь, 2009.

[12] Monograph 60. Microbiological Examination of Nonsterile Product Testing for *Burkholderia Cepacia* Complex (BCC) PT. United States Pharmacopeia. USP42-NF37. Rockville, MD; 2019.

[13] Колосова ЛВ. Совершенствование метода определения эффективности антимикробных консервантов лекарственных препаратов в жидких лекарственных формах: дис. … канд. фарм. наук. СПб., 2016.
Лобойко АД. Биологические свойства и принципы идентификации культур группы *Burkholderia cepacia*: дис. … канд. мед. наук. Ставрополь, 2009.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stein SW, Thiel CG. The history of therapeutic aerosols: a chronological review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2017;30(1):20–41. https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1297
2. Победин ОА, Трухачева ЛА, Нечаева ЕБ. Анализ критериев оценки качества дозированных аэрозольных ингаляторов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2014;(2):20–5.
Pobedin OA, Trukhacheva LA, Nechayeva EB. Quality assessment criteria for inhalation dosage forms. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2014;(2):20–5 (In Russ.).
EDN: SIOVDF
3. Гобызов ОА, Рябов МН, Янкова ВГ, Грибанова СВ, Удянская ИЛ, Григорьева ВЮ, Сазонова ОП. Сравнительный анализ показателей распыления препаратов Каметон разных производителей. *Вестник оториноларингологии.* 2019;84(1):72–7.
Gobyzov OA, Ryabov MN, Yankova VG, Gribanova SV, Udyanskaya IL, Grigorieva VYu, Sazonova OP. Comparative analysis of Kameton spraying parameters of different manufacturers. *Bulletin of Otorhinolaryngology.* 2019;84(1):72–7 (In Russ.).
EDN: MBGGIK
4. Сушинская ОА, Голяк НС. Анализ ассортимента лекарственных средств в виде спреев в Республике Беларусь. *Инновации в медицине и фармации* – 2016: материалы дистанцион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. Минск: БГМУ; 2016. С. 814–8.
Sushinskaya OA, Golyak NS. Analysis of the range of medicines in the form of sprays in the Republic of Belarus. *Innovations in medicine and pharmacy* – 2016: materials of remote scientific-practical conference of students and young scientists. Minsk: BSMU; 2016. P. 814–8 (In Russ.).
5. Абдыкадырова МК, Жетерова СК. Разработка современной лекарственной формы – спрея, противогрибкового действия. *Вестник КазНМУ.* 2015;(1):377–9.
Abdykadyrova MK, Zheterova SK. The development of modern pharmaceutical form—spray, antifungal action. *Bulletin of KazNMU.* 2015;(1):377–9 (In Russ.).
EDN: ZVICFX
6. Чекман ИС, Сыровая АО, Андреева СВ, Макаров ВА. *Аэрозоли – дисперсные системы.* Киев-Харьков: Цифрова друкарня № 1; 2013.
Chekman IS, Syrovaja AO, Andreeva SV, Makarov VA. *Aerosols—dispersed systems.* Kiev-Kharkiv: Digital Printing House No. 1; 2013 (In Russ.).
7. Кинев МЮ, Петров АЮ. Сравнительный анализ отечественного и зарубежного фармацевтических рынков спреев для носа с целью поиска перспектив дальнейшей их разработки. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018;(1):216–24.
Kinev MYu, Petrov AYu. Comparative analysis of the domestic and foreign pharmaceutical markets for the nose with the purpose of searching for future development prospects. *Drug Development and Registration.* 2018;(1):216–24 (In Russ.).
EDN: YRTLFK
8. Tavares M, Kozak M, Balola A, Sá-Correia I. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: a feared contamination risk in water-based pharmaceutical products. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):e00139-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00139-19
9. Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL, Hussong D. *Burkholderia cepacia*: this decision is overdue. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2011;65(5):535–43. https://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.00793
10. Ali M. *Burkholderia* cepacia in pharmaceutical industries. *Int J Vaccines Vaccin.* 2016;3(2):11–2. https://doi.org/10.15406/ijvv.2016.03.00064
11. Carson L, Favero MS, Bond WW, Peterson NJ. Morphological, biochemical, and growth characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water. *Appl Microbiol.* 1973;25(3):476–83. https://doi.org/10.1128/am.25.3.476-483.1973
12. Seelman SL, Bazaco MC, Wellman A, Hardy C, Fatica MK, Huang MJ, et al. *Burkholderia cepacia* complex outbreak linked to a no-rinse cleansing foam product, United States—2017–2018. *Epidemiology and Infection.* 2022;150:e154. https://doi.org/10.1017/S0950268822000668
13. Колосова ЛВ, Рощина МВ, Гунар ОВ. Контаминация лекарственных препаратов бактериями *Burkholderia cepacia*. *Фармация.* 2017;66(7):8–10.
Kolosova LV, Roshchina MV, Gunar OV. Drug contamination with the bacteria *Burkholderia cepacia*. *Pharmacy.* 2017;66(7):8–10 (In Russ.).
EDN: ZQNWQH
14. Lord R, Jones AM, Horsley A. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;4(4):CD009529. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009529.pub4
15. Незнамова АВ, Лопастейская ЯА, Молчанова ЕВ, Агеева НП, Викторов ДВ. Особенности идентификации микроорганизмов комплекса *Burkholderia cepacia* и рода *Pseudomonas* с помощью биохимического автоматического анализатора VITEK 2. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* 2016;(3):109–12.
Neznamova AV, Lopasteiskaya YaA, Molchanova EV, Ageeva NP, Viktorov DV. Identification of *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas spp.* using Vitek 2, an automated biochemical analyzer. *Journal of VolgSMU,* 2016;(3):109–12.
EDN: WMIEBH
16. Kampf G. Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *J Hosp Infect.* 2018;100(3):e1–22. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.05.019
17. Marple B, Roland P, Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(1):131–41. https://doi.org/10.1016/j.otohns.2003.07.005

18. Лучинин ДН, Молчанова ЕВ, Захарова ИБ, Викторов ДВ. Анализ резистентности у *Burkholderia pseudomallei* к бензалкония хлориду и антибиотикам. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022;(3):115–19. Luchinin DN, Molchanova EV, Zakharova IB, Viktorov DV. Assessment of resistance in *Burkholderia pseudomallei* to benzalkonium chloride and antibiotics. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2022;(3):115–9 (In Russ.). https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-3-115-119
19. Ahn Y, Kim JM, Kweon O, Kim SJ, Jones RC, Woodling K, et al. Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride. *mBio*. 2016;7(6):e01716-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01716-16
20. Tavares M, Kozak M, Balola A, Coutinho CP, Godinho CP, Hassan AA, et al. Adaptation and survival of *Burkholderia cepacia* and *B. contaminans* during long-term incubation in saline solutions containing benzalkonium chloride. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2020;(8):630. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00630
21. Johns BE, Purdy KJ, Tucker NP, Maddocks SE. Phenotypic and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic infection. *Microbiol Insights*. 2015;8:15–23. https://doi.org/10.4137/MBI.S25800
22. Jimenez L. *Microbial contamination control in the pharmaceutical industry*. New York: Marcel Dekker; 2004.
23. Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019;18(1):7. https://doi.org/10.1186/s12941-019-0306-0

Вклад авторов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *О.В. Гунар* — идея выполнения исследования, редактирование текста рукописи, критический пересмотр содержания рукописи; *Н.Г. Сахно* — подбор и анализ литературы, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Olga V. Gunar* elaborated the study idea, edited and critically reviewed the manuscript. *Nadezhda G. Sakhno* selected and analysed literature, and drafted the manuscript.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4825-8356
gunar@expmed.ru
Сахно Надежда Геннадьевна, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1773-7423
sakhno@expmed.ru

Olga V. Gunar, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4825-8356
gunar@expmed.ru
Nadezhda G. Sakhno, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1773-7423
sakhno@expmed.ru

Поступила 20.03.2023
После доработки 16.05.2023
Принята к публикации 22.05.2023
Online first 22.08.2023

Received 20 March 2023
Revised 16 May 2023
Accepted 22 May 2023
Online first 22 August 2023

УДК 615.072:543.544.5.068.7
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-473-480
Методические материалы | Methodical approaches

Check for updates
CC BY 4.0

О.А. Ваганова ✉, **А.А. Натыкан**

Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: родственные примеси (для метода ВЭЖХ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ ***Ваганова Ольга Александровна;*** *vaganova@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

Предложены рекомендации изложения в нормативной документации методики оценки качества лекарственных средств по показателю «Родственные примеси» при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Рассмотрены особенности и предложена типовая схема редакционного оформления раздела «Родственные примеси». Унификация изложения и оформления текста нормативной документации позволит безошибочно выполнять испытание, получать достоверный результат и упростит экспертизу лекарственных средств.

Ключевые слова: родственные примеси; качество лекарственных средств; нормативный документ; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ

Для цитирования: Ваганова О.А., Натыкан А.А. Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: родственные примеси (для метода ВЭЖХ). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(3):473–480. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-473-480

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Olga A. Vaganova ✉, **Alexey A. Natykan**

Recommendations for the Contents of a Product Specification File: Related Substances (HPLC)

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ ***Olga A. Vaganova;*** *vaganova@expmed.ru*

ABSTRACT

This article provides recommendations for documenting an analytical procedure for the determination of related substances by high-performance liquid chromatography in a product specification file (PSF). The article contains a description of specific aspects and a template for the typical contents and layout of the PSF section dedicated to related substances. A unified approach to the PSF content and layout will ensure error-free testing, reliable results, and streamlined regulatory assessments.

Key words: related substances; quality of medicinal products; product specification file; high-performance liquid chromatography; HPLC

For citation: Vaganova O.A., Natykan A.A. Recommendations for the contents of a product specification file: related substances (HPLC). *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(3):473–480. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-473-480

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

© О.А. Ваганова, А.А. Натыкан, 2023

Для исключения возможности двоякого толкования текстов методик согласно требованиям Евразийского экономического союза (ЕАЭС)[1], Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) и рекомендациям Руководства по экспертизе лекарственных средств[2] оформление разделов нормативного документа / нормативной документации (НД) на лекарственное средство следует унифицировать.

Раздел «Родственные примеси» проекта НД в случае, если предусмотрено использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), рекомендуется составлять в виде блока подразделов, которые для удобства можно нумеровать: «1. Нормы», «2. Метод», «3. Информация о примесях», «4. Оборудование», «5. Материалы», «6. Реактивы», «7. Стандартные образцы», «8. Приготовление растворов», «9. Условия хроматографирования», «10. Идентификация пиков», «11. Проведение испытания / Последовательность хроматографирования», «12. Проверка пригодности хроматографической системы», «13. Оценка результата», «14. Рисунки хроматограмм», «15. Дополнительная информация». Нумерация позволит лучше структурировать текст, облегчит восприятие и обеспечит возможность расстановки внутренних ссылок в разделе при необходимости. В подразделе возможно приведение ссылки на другую часть НД, где расположена необходимая информация или указание «Не применимо».

Примеры оформления раздела «Родственные примеси» для метода ВЭЖХ опубликованы на сайте журнала[3].

1. Нормы. В данном подразделе указывают допустимые нормы содержания примесей в соответствии со спецификацией на лекарственное средство.

2. Метод. Указывают метод и приводят ссылку на соответствующую общую фармакопейную статью (ОФС) ГФ РФ и (или) Фармакопеи ЕАЭС (ФЕАЭС). Допускается в сокращенной форме указывать тип хроматографии и используемого детектора. Например, «ВЭЖХ-УФ», «Ионная ВЭЖХ», «Эксклюзионная ВЭЖХ», «СВЭЖХ»[4] и т.д.

3. Информация о примесях. Указывают наименование и приводят структурные формулы нормируемых примесей. Также рекомендуется приводить структурные формулы веществ, указанных в методике в качестве референсных, а также для неспецифицированных примесей. Такой примесью может быть вещество, которое используется для проверки разделяющей способности системы, но не является примесью основного вещества, или является примесью синтеза и не подлежит учету в конечный результат. В этом случае в таблице указывают источник примеси.

Корректность информации в данном разделе позволяет выявить ошибки, связанные с предоставлением не тех стандартных образцов, которые нужны для проведения экспертизы.

4. Оборудование. Указывают необходимое для проведения испытания оборудование. В ряде случаев целесообразно указывать конкретную модель прибора и информацию о допустимости или недопустимости замены. Это позволяет предупредить невоспроизводимость методики, связанную с различиями в работе оборудования разных производителей.

Например, существуют отличия в формировании фактического градиента растворителей по одной и той же градиентной программе элюирования для ВЭЖХ-систем разных производителей. В ряде случаев это приводит к невозможности проведения испытания на приборах других марок. Пики, разделяющиеся с требуемым разрешением на хроматографе системы «В», элюируются совместно при применении хроматографа системы «А» при использовании одной и той же колонки и одних и тех же растворителей.

Однако рекомендуется не злоупотреблять указанием о недопустимости замены и приводить его только в тех случаях, когда это действительно необходимо.

5. Материалы. Указывают необходимые для проведения анализа хроматографические колонки, предколонки и держатели предколонок, мембранные фильтры с указанием материала мембраны и диаметра пор, картриджи для твердофазной экстракции или обессоливания, микроцентрифужные концентраторы, планшеты для концентрирования, диализные мешки.

При использовании предколонок следует указывать держатели для них. Держатели

[1] Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».
[2] Миронов АН, ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 2. М.: Гриф и К; 2013.
[3] https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-3-168-173-suppl
[4] ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием; СВЭЖХ — сверхпроизводительная высокоэффективная (сверхэффективная) жидкостная хроматография.

не взаимозаменяемы у разных производителей. Также у колонок некоторых марок отсутствует резьбовое соединение и требуется использование адаптера для подключения к капиллярам. Соответственно, если на стадии запроса материалов адаптеры и держатели могут быть пропущены, то это приведет к невоспроизводимости методики и увеличению сроков проведения экспертизы.

Чем реже используется в практике материал, тем подробнее следует описать все связанные с его использованием части и также включить их в список. Например, при использовании диализных мешков могут потребоваться специальные зажимы, информацию о которых следует указать.

6. Реактивы. При описании используемых реактивов указывают:

- наименование реактива;
- литеру *Р* для фармакопейных реактивов (в случае оформления проекта НД в рамках подачи по правилам ЕАЭС);
- квалификацию (если для воспроизводимости методики необходим реактив определенной квалификации);
- производителя и каталожный номер;
- CAS-номер (целесообразно указывать для веществ, не входящих в перечень фармакопейных реактивов).

Указание квалификации, производителя и прочей дополнительной информации необходимо в случае реактивов, не описанных в фармакопее, а также если для выполнения испытания требуется использовать реактив конкретной марки конкретного производителя. В этой ситуации следует дополнительно указывать, что реактив замене не подлежит. В иных случаях добавляют указание о возможности проведения испытания с реактивами аналогичного качества.

Если производитель и квалификация реактива не указаны, то для проведения испытаний будут использованы реактивы в соответствии с требованиями ГФ РФ или ФЕАЭС. Согласно требованиям ФЕАЭС используют реактивы аналитической степени чистоты (analytical grade).

Неправильное или неполное указание сведений о реактивах может привести к невоспроизводимости методики. Особенно это касается веществ, химическое и фармакопейное наименования которых различаются. Например, «ацетат натрия», согласно ГФ РФ, это «натрия ацетата тригидрат».

7. Стандартные образцы. В данном подразделе указывают наименование и квалификацию стандартных образцов (СО), веществ-свидетелей, веществ-маркеров. Для нефармакопейных СО и плацебо (при использовании готовой смеси) указывают производителя и каталожный номер. Если используют СО, аттестованный производителем лекарственного средства, то добавляют обозначение «стандартный образец предприятия». Для СО, представляющих собой смесь нескольких веществ, необходимо приводить информацию об их составе.

Если СО предназначен для количественного анализа (показатели «Количественное определение», «Растворение», «Однородность дозирования»), следует убедиться, что данные сопроводительного документа (сертификата) содержат всю необходимую для расчетов информацию. Как правило, должно быть указано содержание основного вещества «как есть» (as is) в материале СО. В случае, если указано содержание в пересчете на сухое вещество, то в методике проведения анализа должны быть предусмотрены стадия определения остаточной влаги в материале СО или его предварительное высушивание непосредственно после вскрытия упаковки перед проведением испытания с использованием данного СО. В любом случае в сертификате на СО должна быть однозначно указана величина, которую далее используют в расчетах. Наименования величины в документе и в тексте методики испытания лекарственного средства должны соответствовать друг другу.

8. Приготовление растворов. Подробно описывают порядок приготовления всех используемых растворов с указанием навесок, объемов разведения, требуемых манипуляций. Для каждого раствора указывают условия хранения и срок годности. Для растворов, описанных в ГФ РФ или ФЕАЭС и перечисленных в подразделе «Реактивы», методику приготовления не приводят, но проверяют правильность указанного наименования раствора. Обращаем внимание, что в наименованиях реактивов и растворов по ГФ РФ и ФЕАЭС имеются расхождения.

Следует убедиться, что используемые в тексте методики наименования растворов унифицированы. Нередко описанный на этапе приготовления «стандартный раствор» далее по тексту упоминается как «раствор стандарта», или «раствор сравнения», или «контрольный раствор». В некоторых случаях достоверно сопоставить наименование и раствор не удается, в частности,

если в качестве «контрольного» предусмотрено использование иного образца, отличного от стандартного.

Методику приготовления стандартного раствора следует проверить на соответствие требованиям, указанным в сертификате на СО. Например, если СО охарактеризован по содержанию вещества в одной упаковке (количество миллиграммов во флаконе или в ампуле) и предназначен для полного использования одной упаковки, то в методике не следует указывать процедуру взятия навески. Если же возможно использование разных образцов, охарактеризованных по содержанию вещества как на одну упаковку, так и на единицу массы или объема, то следует привести методику приготовления растворов для каждого из случаев, а также привести соответствующие расчетные формулы.

При необходимости указывают дополнительные манипуляции с материалами, которые требуется провести, например предварительное высушивание, одновременное определение влаги или плотности. Если требуется учесть особенности работы с приготовляемыми растворами, то на этом следует сделать акцент, например сделав указание о недопустимости встряхивания при работе с растворами поверхностно-активных веществ.

Если условия хранения растворов не оговорены, то подразумевается возможность хранения в закрытом сосуде при комнатной температуре.

9. Условия хроматографирования. Указывают:
- условия элюирования;
- скорость потока;
- состав подвижной фазы;
- температурный режим колонки и образцов;
- объем ввода пробы;
- время хроматографирования и время регистрации хроматограммы (при необходимости);
- условия детектирования;
- параметры интегрирования (при необходимости).

Полное наименование и характеристики колонки и предколонки должны быть указаны в разделе «Материалы», в данном разделе их указание остается на усмотрение заявителя.

В некоторых случаях может требоваться указание дополнительных параметров, например объема задержки градиента (dwell volume) или описание инжекционной программы для проведения дериватизации в игле автосемплера. Следует проверить, что для описания условий хроматографирования использованы корректные общепринятые термины, а не результат автоперевода. Также при необходимости указывают условия кондиционирования и промывки колонки, если они существенно отличаются от указанных в инструкции производителя. Все растворы, перечисленные в подразделе «Условия хроматографирования» (подвижная фаза, промывочные растворы), растворитель, должны быть описаны в подразделе «Приготовление растворов».

Те параметры, которые относятся только к конкретной модели прибора или версии программного обеспечения, следует снабжать соответствующим примечанием. Например, параметры усилителя сигнала для рефрактометрического детектора Shimadzu не могут быть напрямую применены для детектора Agilent.

Необходимо убедиться, что условия анализа не содержат противоречий между ожидаемым временем выхода целевых компонентов, временем хроматографирования, указанной продолжительностью градиентного элюирования или временем регистрации хроматограммы. Если требуемое время регистрации хроматограммы меньше времени хроматографирования, это должно быть изложено четко, без возможности двоякого толкования. В любом случае общее время регистрации хроматограммы должно быть не менее времени выхода последнего из ожидаемых пиков.

Если используют продолжительные градиентные программы для полного элюирования компонентов плацебо или примесей, время удерживания которых значительно превышает время удерживания основного вещества, то для стандартных растворов, содержащих только быстро элюирующиеся компоненты, допустимо отдельно указать вариант сокращенной программы элюирования (в градиентном или изократическом режиме) или сокращенное время хроматографирования.

В некоторых случаях изократическое элюирование можно проводить, используя смешение элюентов из разных каналов градиентного насоса для получения подвижной фазы требуемого состава. Если такой вариант предусмотрен методикой, то воспроизводимость и точность смешивания должны быть подтверждены валидационными материалами, представленными в досье. При отсутствии иных указаний считается, что раствор подвижной фазы требуемого состава (например, смесь воды и ацетонитрила) готовят перед началом анализа вне хроматографа.

При указании температуры колонки не рекомендуется ограничиваться общей характеристикой «комнатная», лучше указать конкретное значение, например «23 °С». Согласно ГФ РФ понятие «при комнатной температуре» подразумевает интервал от 15 до 25 °С. Различия температуры в границах этого интервала могут повлиять на результаты анализа. ФЕАЭС не содержит понятия «комнатная температура».

Все указанные параметры испытания должны быть обоснованы. Не следует указывать в качестве условий проведения анализа те параметры, которые фактически не влияют на получение результата, но повышают требования к приборному обеспечению. Например, указание спектральной ширины и длины волны коррекции в большинстве случаев не требуется.

При описании условий детектирования рекомендуется указывать частоту дискретизации сигнала (частота сбора данных, sampling rate). Для детекторов с термостатируемой ячейкой следует указывать температуру ячейки.

10. Идентификация пиков. Приводят информацию, необходимую для соотнесения пиков на хроматограммах с определяемыми веществами. В простейшем случае указывают ориентировочное время удерживания основного вещества в минутах и относительные времена удерживания пиков идентифицированных примесей и (при необходимости) пиков, по которым проводят проверку разделяющей способности системы, если они не идентифицированы.

В более сложных случаях представляют информацию в виде таблицы с временами удерживания примесей. При необходимости в таблице также указывают относительный фактор отклика примеси, используемый в расчетах. Если примесь не подлежит учету, то вместо фактора отклика указывают «–». Для многокомпонентных препаратов таблицу дополняют рисунками участков хроматограмм и спектров, зарегистрированных в максимумах пиков, позволяющих однозначно соотнести пики с веществами.

11. Проведение испытания / Последовательность хроматографирования. Описывают ход проведения испытания, указывают количество инжекций для каждого вводимого раствора и последовательность их ввода. Количество инжекций позволяет понять, какое время необходимо для выполнения всей хроматографической последовательности, рассчитать объемы всех приготовляемых растворов с учетом вводимой пробы и оценить возможность запуска автосемплера с учетом срока годности анализируемых растворов. Например, при указании, что стандартный раствор инжектируют сразу (то есть в течение 30 с) после приготовления, не следует указывать 6 последовательных инжекций данного раствора, если время хроматографирования составляет 60 мин. При приготовлении параллельных растворов из отдельных навесок указывают количество инжекций для каждого такого раствора.

В более сложных случаях последовательность хроматографирования может быть представлена в виде таблицы с указанием дополнительной информации, например назначение инжекции, объем ввода (если они различаются для разных растворов), время регистрации хроматограммы.

Следует обратить внимание, что введение раствора с меньшей концентрацией вещества не должно выполняться сразу после введения раствора с большей концентрацией без подтверждения отсутствия «переноса» путем дополнительного введения одной или более инжекций холостого раствора или иного раствора, предназначенного для этих целей. Необходимый раствор должен быть указан в таблице последовательности, и его приготовление должно быть описано в разделе «Приготовление растворов». В частности, инжекция раствора для проверки чувствительности после раствора для проверки пригодности хроматографической системы может приводить к завышению отношения «сигнал/шум» для пика основного вещества.

При необходимости в этом же подразделе указывают порядок кондиционирования колонки перед испытанием и ее промывку после, если это требует специальных условий. Сами условия описывают в разделе «Условия хроматографирования».

12. Проверка пригодности хроматографической системы. Критерии пригодности хроматографической системы указывают в соответствии с положениями ОФС «Хроматография»[5]. Однако при анализе лекарственных средств по показателю «Родственные примеси» оценка пригодности системы имеет ряд особенностей, которые необходимо учитывать.

Для оценки чувствительности системы указывают требование к величине отношения сигнал/шум для целевого пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (ПЧХС). Как правило,

[5] ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

оценку проводят по пику основного вещества. В случае если в методике указаны идентифицированные примеси, имеющие более слабый отклик детектора по сравнению с откликом основного вещества, то содержание основного вещества в растворе ПЧХС корректируют с учетом фактора отклика примесей.

В тех случаях, когда корректная оценка отношения сигнал/шум на хроматограмме раствора соответствующей концентрации невозможна вследствие сорбции или нестабильности целевого вещества при низких уровнях концентраций или, наоборот, выраженном «переносе», допускается использование для оценки чувствительности системы раствора большей концентрации (как правило, в пределах 2–5 раз от требуемой концентрации раствора ПЧХС) с пропорционально бóльшим требованием к значению сигнал/шум (например, с требованием «не менее 20:1» для раствора 0,1% при невозможности корректной оценки отношения сигнал/шум для раствора ПЧХС с концентрацией 0,05%, соответствующей заявленному пределу количественного определения). Альтернативно в таких случаях вместо оценки отношения сигнал/шум возможна оценка расчетного значения предела количественного определения (в процентах), исходя из фактического значения сигнал/шум, рассчитанного для пика целевого вещества, и фактической относительной концентрации раствора ПЧХС. Например, если раствору с относительной концентрацией 0,1% соответствует фактическое значение отношения сигнал/шум = 25, то расчетное значение предела количественного определения (сигнал/шум = 10) составляет 0,04% при норме «не более 0,05%».

Оценку разделительной способности хроматографической системы проводят, определяя разрешение или отношение пик/долина между критическими пиками. Корректной является оценка разделительной способности по хроматограммам раствора с концентрацией основного вещества, близкой к таковой в испытуемом растворе. Достаточно часто оказывается, что методикой предусмотрена оценка разделительной способности по хроматограммам разбавленных растворов, на которых разрешение между пиками достаточное. Однако ширина пика основного компонента на хроматограмме испытуемого раствора при его номинальной концентрации значительно больше, и примеси полностью или частично скрываются под основным пиком. Это следует учитывать еще на стадии разработки методики.

Оценку воспроизводимости площади пика и коэффициента (фактора) симметрии пика проводят по величинам относительного стандартного отклонения площади пиков и коэффициента симметрии для пиков, по которым проводят учет результатов:

- основного пика на хроматограмме раствора сравнения;
- пика идентифицированной примеси на хроматограмме соответствующего стандартного раствора, если площадь этого пика используется для оценки содержания примеси в лекарственном средстве;
- основного пика на хроматограмме стандартного раствора с содержанием действующего вещества, приблизительно равным содержанию примеси в испытуемом растворе, если для расчетов используется метод нормализации.

При необходимости дополнительно могут быть использованы и иные критерии оценки пригодности системы, например:

- правильность приготовления стандартного раствора;
- линейность отклика детектора;
- чистота базовой линии / отсутствие мешающего влияния компонентов плацебо;
- стабильность результата при продолжительной последовательности хроматографирования.

Рекомендуется использовать сквозную нумерацию критериев пригодности системы. Это облегчает взаимодействие экспертов и заявителя в процессе экспертизы.

Если при оценке дополнительных критериев требуются расчеты, методики которых не описаны в соответствующих монографиях фармакопеи, то в проекте НД приводят формулы с расшифровкой множителей. Например, в случае проверки правильности приготовления стандартного раствора.

Не рекомендуется использовать в качестве критерия пригодности системы абсолютное время удерживания или иные абсолютные значения для выбранных критериев оценки. Время удерживания является параметром, который значительно зависит от конфигурации конкретного прибора и серии колонки и мало влияет на воспроизводимость результата при выполнении прочих критериев пригодности. Другие абсолютные значения параметров (например, площадь или высота пика) чаще всего напрямую зависят от используемого прибора и его

программного обеспечения и не могут использоваться для проверки пригодности хроматографической системы, если методика испытаний допускает использование хроматографа любой марки, соответствующего параметрам, указанным в разделе «Оборудование» и аналогичным.

Если используется одна та же методика при оценке качества по показателям «Родственные примеси» и «Количественное определение», предпочтительно не описывать все критерии пригодности в одном разделе. Рекомендуется указывать, к какому разделу относится данный критерий и какие критерии относятся к обоим разделам. Например, нецелесообразно проводить оценку чувствительности системы при необходимости выполнить испытание только по показателю «Количественное определение».

Если в качестве основы методики для проекта НД использована методика, заимствованная из зарубежной фармакопеи, то необходимо иметь в виду, что общие критерии пригодности в частной фармакопейной статье могут быть не приведены. Например, в большинстве случаев в монографиях Европейской фармакопеи для субстанций в качестве критерия пригодности указаны только разрешение между критическими пиками (поскольку его невозможно сделать универсальным для разных методик и объектов) и порог игнорирования примесей, на основании которого должна оцениваться чувствительность. Это не значит, что требования к чувствительности системы или воспроизводимости площадей пиков не предъявляются. Оценка этих критериев проводится согласно монографиям 2.2.29 «Liquid Chromatography» и 2.2.46 «Chromatographic Separation Techniques» и поэтому в частных статьях не описана. Аналогичный подход используется в фармакопейных статьях ГФ РФ. В представленном на экспертизу проекте НД должны быть указаны в явном виде все критерии пригодности хроматографической системы.

В некоторых случаях необходимо привести дополнительные методики определения параметров ВЭЖХ-системы. Например, если для проверки пригодности системы используется значение фактора емкости хроматографической колонки, то следует подробно описать процесс определения данной величины для конкретных хроматографических условий. Если методикой предусмотрено детектирование при нескольких длинах волн (например, при одновременном определении нескольких компонентов), то должно быть указано, при каких длинах волн проводят расчет параметров пригодности.

13. Оценка результата. Как правило, для оценки содержания примесей могут быть применены три основных подхода: метод нормализации, использование раствора сравнения, приготовленного из испытуемого раствора, или использование раствора стандартного образца. У каждого подхода есть преимущества и недостатки.

Для оценки содержания примесей рекомендуется использовать расчеты по методу внешнего стандарта. Способ сравнения площадей имеет ограничения в применении, поскольку:
1) предъявляет более строгие требования к методике приготовления растворов (размер навески должен быть близок к указанному в методике);
2) при оценке суммы примесей или при наличии примесей с разными факторами отклика данный способ фактически сводится к словесному описанию расчетной формулы;
3) при наличии отдельных примесей, определяемых методом внешнего стандарта, данным способом невозможно оценить суммарное содержание примесей.

Фактически способ сравнения площадей применим только для подтверждения отсутствия конкретной примеси на уровне выше допустимого.

Если примеси оценивают методом нормализации, но отклик детектора для примесей и для основного вещества различается, то используют поправочные коэффициенты (k). Их значения определяют согласно ОФС «Хроматография»[6] в процессе валидации методики или используют данные научной литературы. k = 1/RRF, где RRF – относительный фактор отклика детектора. Если примесей, для оценки которых необходим поправочный коэффициент, одна-две, то значение коэффициентов указывают в расшифровке множителей расчетной формулы. При большем количестве таких примесей коэффициенты указывают в таблице идентификации пиков или в отдельной таблице.

Для выполнения расчетов следует приводить полную и сокращенную формулы с расшифровкой множителей. В расчетной формуле для оценки содержания примесей должны быть учтены (при необходимости) различия плотности испытуемых растворов и исходного образца или пересчет молекулярных масс при использовании стандартного образца в другой форме вещества.

[6] ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Если методикой предусмотрено детектирование при нескольких длинах волн (например, при одновременном определении нескольких компонентов), то должно быть указано, при какой длине волны проводят расчет содержания примесей.

В данном подразделе также следует указать, какие примеси или пики не учитывают. Например, пики плацебо и пики примесей синтеза при контроле готовой лекарственной формы. Такие указания должны быть подтверждены валидационными материалами в досье. В случае сложной матрицы используют таблицы с указанием пиков, подлежащих исключению, рисунки хроматограмм плацебо или испытуемого раствора с указанием исключаемых пиков или предусматривают получение хроматограммы плацебо непосредственно при проведении испытания.

Указывают порог игнорирования примеси, который не должен быть меньше концентрации вещества в растворе ПЧХС. Однако сравнение площади пика примеси и площади целевого пика на хроматограмме раствора ПЧХС применимо, только если все поправочные коэффициенты ⩽1 и не предусмотрено использование отдельных стандартных растворов примесей.

Указывают особенности разметки пиков и групп пиков на хроматограммах и параметры интегрирования пиков в тех случаях, когда это необходимо, или если возможна неоднозначная разметка пиков. В общем случае пик любой единичной примеси, который не полностью разделяется с основным пиком, предпочтительно размечать пиком-наездником. Выбор разметки не полностью разделенных пиков должен учитывать профиль базовой линии (бланк-хроматограммы подвижной фазы, растворителя образцов, раствора плацебо).

14. Рисунки хроматограмм. Наличие рисунков типичных хроматограмм необходимо для облегчения идентификации пиков, а также для иллюстрации их корректной разметки, например в случае сложной матрицы или для многокомпонентных препаратов. При необходимости часть хроматограммы может быть представлена в увеличенном виде. На хроматограммах размечают и подписывают пики веществ, приводят примеры разметки пиков. В некоторых случаях могут быть представлены фрагменты с разметкой «для проверки пригодности системы» и с разметкой «для получения результата», а также хроматограммы модельных смесей, полученные при валидации методики. Перед представлением проекта НД на экспертизу необходимо удостовериться, что при верстке документа рисунки и подписи на них остаются читабельными.

15. Дополнительная информация. В данном разделе при необходимости помещают сведения, не вошедшие в основные подразделы.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.А. Натыкан* – концепция работы, написание и оформление текста рукописи; *О.А. Ваганова* – утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Alexey A. Natykan* elaborated the study concept, drafted and formatted the manuscript. *Olga V. Vaganova* approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ваганова Ольга Александровна, канд. фарм. наук
ORCID: https://orcid.org/0009-0004-4443-5441
vaganova@expmed.ru
Натыкан Алексей Андреевич, канд. хим. наук
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5904-8357
natykanaa@expmed.ru

Olga A. Vaganova, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: https://orcid.org/0009-0004-4443-5441
vaganova@expmed.ru
Alexey A. Natykan, Cand. Sci. (Chem.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5904-8357
natykanaa@expmed.ru

Поступила 31.05.2023
После доработки 16.08.2023
Принята к публикации 06.09.2023

Received 31 May 2023
Revised 16 August 2023
Accepted 6 September 2023

Ведомости Научного центра экспертизы
средств медицинского применения

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств