

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ СПЕЦИАЛИСТА

По результатам химического исследования

№280414/1Э

от «04» июня 2014 г.

«29» апреля 2014 г., 10 час. 00 мин.  
(дата, время начала производства экспертизы)

«04» июня 2014 г., 17 час. 00 мин.  
(дата, время окончания производства экспертизы)

г. Москва  
(место производства экспертизы)

### Основание производства исследования:

Договор на проведение химического исследования № 280414/1Э от «28» апреля 2014 г. между Черкасовым Романом Ивановичем и ООО «Центр химических исследований».

### Специалист, выполнивший исследование:

Топилин Сергей Васильевич

## ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1. «28» апреля 2014 года в ООО «Центр химических исследований» поступил запрос Черкасова Романа Ивановича на проведение химического исследования лекарственного препарата, содержащего активное действующее вещество - соматропин.

**2. При запросе на исследование представлены материалы:**

1. Гормон роста «Somatropin 191 AA, 10 IU» Canadapeptides, в количестве 2 флакона.

**3. При проведении физико-химического исследования были поставлены следующие задачи:**

1. Определение подлинности соматропина.
2. Определение содержания родственных белков.
3. Количественное определение содержания белка (соматропина).

**4. Проведение исследования поручено Топилину Сергею Васильевичу.**

Сведения о специалисте: химик – судебный эксперт, имеющий высшее химическое образование (Диплом Ростовского государственного университета ДВС №0886528, 2001 г), сертифицирован в качестве негосударственного судебного эксперта (Сертификат соответствия №003558 Палаты судебных экспертов по специальности: «Основы судебной экспертизы», 2012г.), свидетельство о повышении квалификации по программе «Повышение квалификации специалистов, ответственных за качество, упаковку и маркировку лекарственных средств, в т.ч. уполномоченных лиц», прошедшему стажировку на кафедре организации производства и реализации лекарственных средств фармацевтического факультета Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова, стаж работы по специальности – 11 лет;

**5. Сведения об организации:**

Общество с ограниченной ответственностью «Центр химических исследований» (ООО «ЦХИ») зарегистрировано в установленном порядке. Свидетельство о государственной регистрации организации выдано Межрайонной инспекцией Федеральной налоговой службы №46 по г. Москве Москве (ОГРН 1137746231314).

ООО «Центр химических исследований» осуществляет деятельность на основании Устава и действующего законодательства Российской Федерации.

Проведение химических исследований (экспертиз) является уставной деятельностью организации.

Юридический адрес: 115172, г. Москва, ул. М. Каменщики, д. 18, стр. 16

Телефон: 8(499)390-40-13. Интернет-сайт: центр-химических-исследований.рф. Адрес электронной почты: ckkls@yandex.ru

**6. Перечень использованной литературы:**

При исследовании и разработке методик использовались методы изложенный в следующей специальной литературе:

1. База данных Mascot, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)
2. USP 29 Monograph. Somatropin.

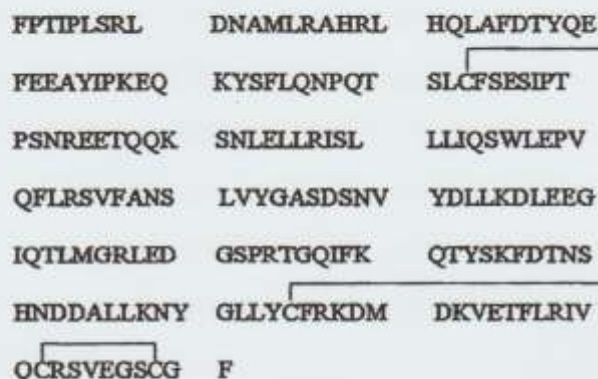
**7. Перечень оборудования:**

- MALDI-времяпролетный масс-спектрометр Ultraflexxtreme BRUKER (Германия)
- ВЭЖХ / хроматомасс спектрометр Agilent 1200 Series.
- УФ-ВИД Спектрофотометр Varian «Cary-100».
- Весы лабораторные Ohaus RV 313.
- pH-метр METROHM «827 pH lab»



## ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

Соматропин (гормон роста человека) - одноцепочечный полипептид, состоящий из 191 аминокислотного остатка. Имеет следующее химическое строение:



Эмпирическая формула соматропина:  $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ . Молекулярная масса: 22125 Да.

#### 1. Определение подлинности соматропина.

Для подтверждения подлинности соматропина исследуемый объект сравнивался по таким параметрам как время удерживания и результаты деконволюции со стандартным (эталонным) образцом соматропина, который исследовался ранее с целью подтверждения его подлинности методом триптического гидролиза и последующего анализа полученных продуктов гидролиза (пептидов) методом MALDI с последующим поиском полученных молекулярных масс в базе данных Mascot.

**Триптический гидролиз :** К 2 мкл раствора белка прибавляли 10 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) с концентрацией 25 мкг/мл в 0.05 М  $NH_4HCO_3$ . Гидролиз проводили в течение 30 мин при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5 % ТФУ в 50 % растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

**Подготовка образцов для масс-спектрометрии.** На мишени смешивали по 2 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-



дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 10 мг/мл в 20 % водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

**Масс-спектры** были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex-treme BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007 % (70 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500-4500 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения.

**Идентификация белка.** Осуществляли при помощи программы Mascot. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >88 в базе данных NCBI считали определенными надежно (p<0.05).

**Результаты анализа.** Согласно поиску по базе данных, стандартный (эталонный) образец представляет собой заявленный гормон роста человека (191 аминокислота массой 22125 Да) без примесей других белков. Структура белка набирается полностью.

Препарат «Somatropin 191 AA» Canadapeptides сравнивали со стандартным (эталонным) образцом в нижеприведенных условиях хроматографирования (определение содержания родственных белков), было обнаружено что оба образца имеют одинаковое время удерживания и результаты деконволюции (для образца «Somatropin 191 AA» Canadapeptides – 22143,2), что свидетельствует о том, что данный препарат идентичен стандартному (эталонному) образцу по своему составу.

## 2. **Определение содержания родственных белков.**

Определение проводили методом обращеннофазовой ВЭЖХ.

К содержимому флакона прибавляли 2,5 мл 0.05 М трис-буферного раствора гидрохлорида с pH 7,5 и перемешивали до растворения. Перед началом определения хроматографическую колонку промывали 0,1% раствором трифторуксусной кислоты в 50% растворе ацетонитрила

**Условия хроматографирования.** Колонка из нержавеющей стали - 250 x 4,6 мм, заполненная бутилсилилизированным силикагелем Jupiter 300 C<sub>4</sub>, с диаметром пор 30 нм и размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза – смесь 29 частей пропанола и 71 части 0.05 М трис-буферного раствора гидрохлорида с рН 7,5. Детектор УФ 220 нм. Скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл. Температура термостата колонки – 45 °С.

**Результаты анализа.** На хроматограммах с УФ – детектором наблюдается пик одного вещества, что говорит о высокой степени чистоты и об отсутствии родственных белков в составе продукта. На хроматограммах с ELSD – наблюдается пик второго вещества – являющегося маннитолом.

**3. Количественное определение содержания белка (соматропина).** Готовили 0,025 М раствор одноосновного калия фосфата, доводя рН гидроокисью натрия до 7,0. Образец количественно переносили в мерную колбу на 5 мл и растворяли в приготовленном буферном растворе. Измеряли оптическая плотность при длинах волн 280нм и 320 нм и длине оптического пути 1 см против раствора сравнения (буферный раствор). Расчет проводили по формуле [2]:

$$V(A_{280} - A_{320})/0,82$$

Полученное количество общего белка равняется для препарата «Somatropin 191 AA» Canadapeptides 10 IU – 4,3 мг на флакон.

#### **ВЫВОД**

По результатам проведенного исследования специалист приходит к следующему заключению:

1. Представленный на исследование препарат «Somatropin 191 AA» Canadapeptides 10 IU содержат в своем составе заявленный гормон роста человека – соматропин.
2. Представленный на исследование препарат «Somatropin 191 AA» Canadapeptides 10 IU не содержит примесей других белков.
3. Количественное содержания белка (соматропина) в препарате «Somatropin 191 AA» Canadapeptides 10 IU» составляет 4,3 мг на флакон.

Специалист



С.В. Топилин

Стр. 6

**Приложения:**

Приложение 1. Внешний вид объекта исследования.

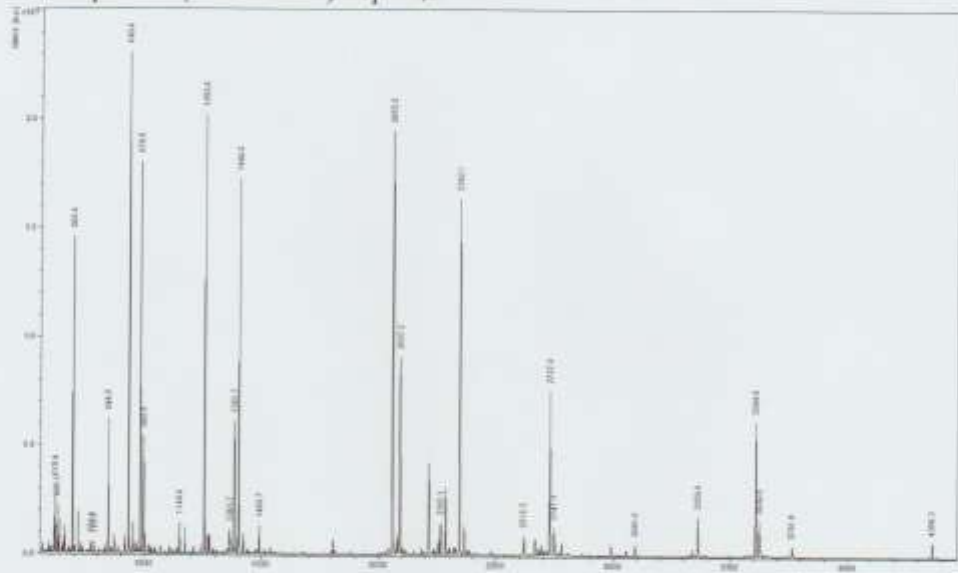








Приложение 2. Масс-спектр трипсического гидролизата выделенного белка стандартного (эталонного) образца.



Приложение 2. Сопоставление стандартного (эталонного) образца с базой данных Mascot.

**MATRIX SCIENCE Mascot Search Results**

Database : NCBI nr 20140220 (36984152 sequences; 13075283088 residues)  
 Timestamp : 27 February 2014 at 09:06:05 GMT  
 Top Score : 369 for [gi|2781338](#), Chain A, 1:2 Complex Of Human Growth Hormone With Its Soluble Binding Protein

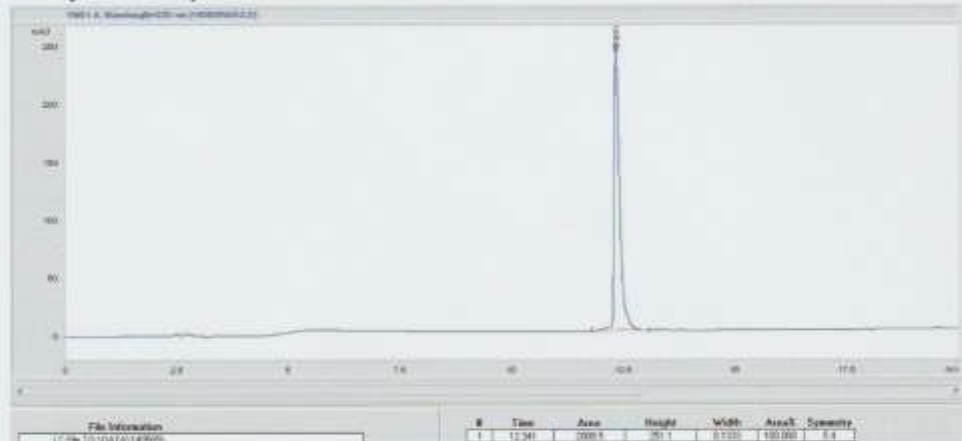
	NCBI nr	Decoy
Protein hits above identity threshold	52	0
Highest scoring protein hit	369	85

**Mascot Score Histogram**

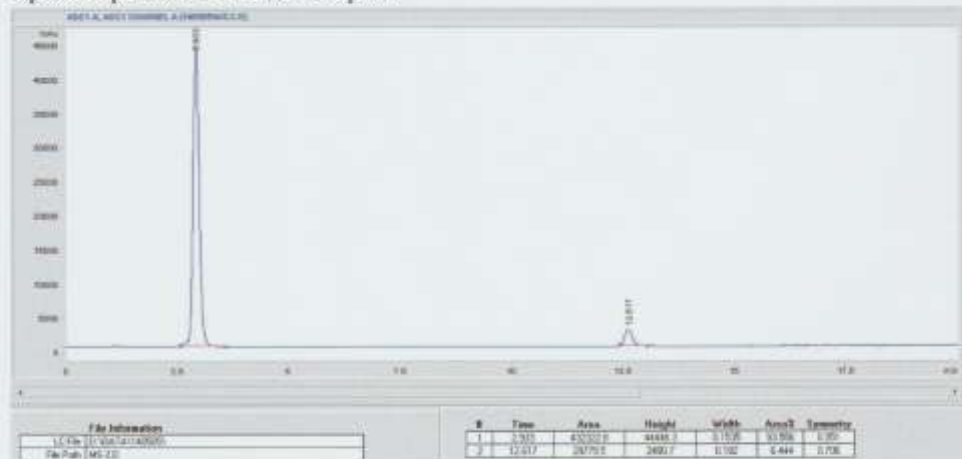
Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 88 are significant ( $p < 0.05$ ).

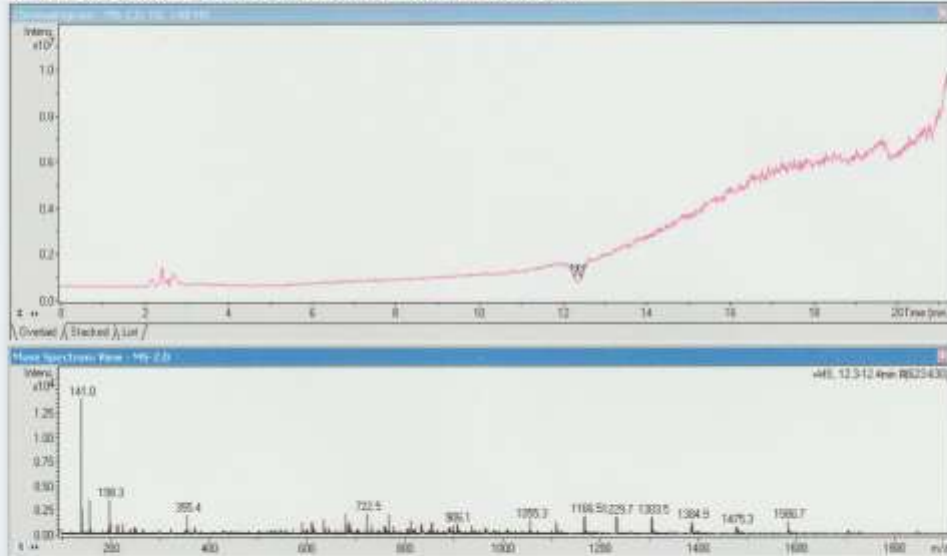
Приложение 3. Хроматограммы с УФ, ELSD и масс стандартного (эталонного) образца соматропина. Результаты деконволюции.



Хроматограмма с ELSD-детектором:



Масспектр пика с временем удерживания 12,4 минуты.



Результаты деконволюции

Component	Molecular Mass	Average Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative
A	22144.2	22144.2	[M + H] <sup>+</sup>	9384	100.00
B	22121.1	22121.1	[M + H] <sup>+</sup>	7169	76.40

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1055.3	21+	22141.8	1055.4
1108.1	20+	22143.8	1108.2
1166.5	19+	22145.7	1166.5
1231.2	18+	22144.7	1231.2
1303.5	17+	22143.8	1303.5
1384.9	16+	22143.0	1385.0
1477.5	15+	22148.0	1477.5
1582.8	14+	22145.6	1582.7
1704.5	13+	22146.5	1704.5

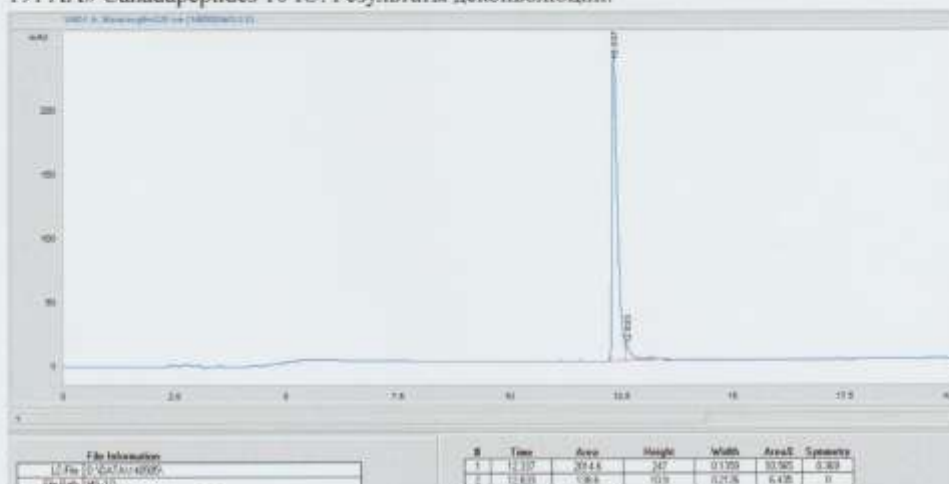
Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22144.2 Std. Deviation: 0.727955  
 Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22144.2

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1054.2	21+	22117.7	1054.2
1107.2	20+	22123.9	1107.2
1165.2	19+	22120.2	1165.2
1229.9	18+	22121.2	1229.9
1302.2	17+	22121.1	1302.2
1383.4	16+	22120.1	1383.5
1475.7	15+	22120.9	1475.7

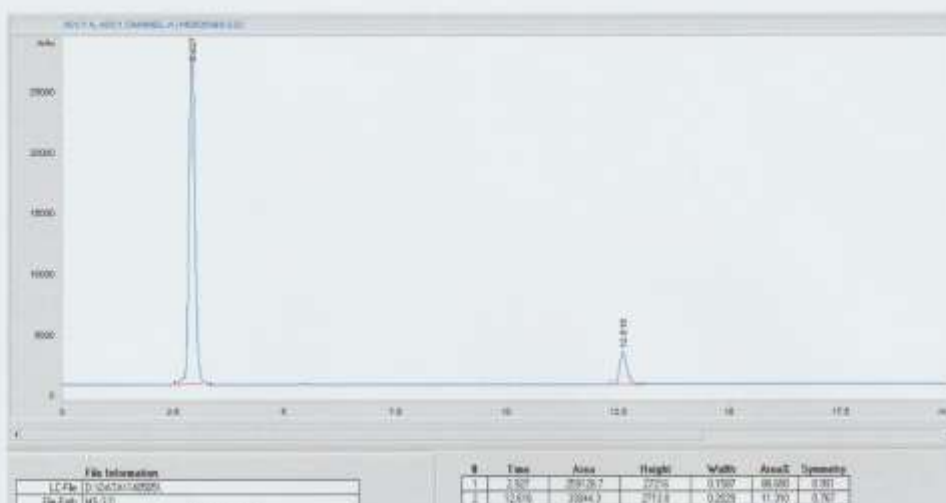
Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22121.1 Std. Deviation: 0.754707  
 Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22121.1

Приложение 4. Хроматограммы с УФ и ELSD и масс-детекторами препарата «Somatropin 191 AA» Somadareptides 10 IU. Результаты деконволюции.

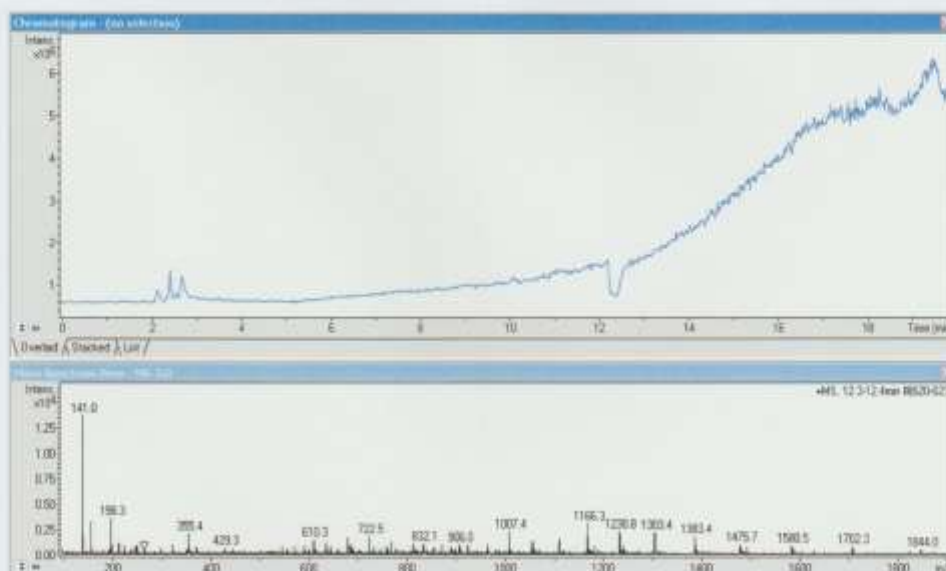


Хроматограмма с УФ детектором.





Хроматограмма с ELSD детектором.



Масспектр пика с временем удерживания 12.4 минуты.

Результаты деконволюции

Component	Molecular Mass	Average Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative
A	22143.2	22143.2	[M + H] <sup>+</sup>	12665	100.00
B	22148.3	22148.3	[M + H] <sup>+</sup>	7608	60.07

C	22120.9	22120.9	[M + H] <sup>+</sup>	8740	69.01
D	22113.6	22113.6	[M + H] <sup>+</sup>	3439	27.15
E	22123.8	22123.8	[M + H] <sup>+</sup>	5145	40.62

Component A Detail

Actual Charge Isotopic Peak	Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1166.4 19+	22142.6	1166.4
1231.2 18+	22143.7	1231.2
1303.5 17+	22142.6	1303.5
1385.0 16+	22144.1	1385.0
1477.2 15+	22143.2	1477.2

Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22143.2    Std. Deviation: 0.407439  
 Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22143.2

Component B Detail

Actual Charge Isotopic Peak	Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1055.7 21+	22149.0	1055.7
1108.4 20+	22148.0	1108.4
1166.6 19+	22147.4	1166.7

Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22148.3    Std. Deviation: 0.572468  
 Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22148.3

Component C Detail

Actual Charge Isotopic Peak	Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1229.8 18+	22120.0	1229.9
1302.2 17+	22122.1	1302.2
1383.4 16+	22120.0	1383.5
1475.7 15+	22121.9	1475.7

Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22120.9    Std. Deviation: 0.605044  
 Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22120.9

Component D Detail

Actual Charge Isotopic Peak	Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
1383.1 16+	22114.3	1383.1

1475.2 15+ 22114.1 1475.2  
1580.5 14+ 22113.4 1580.5

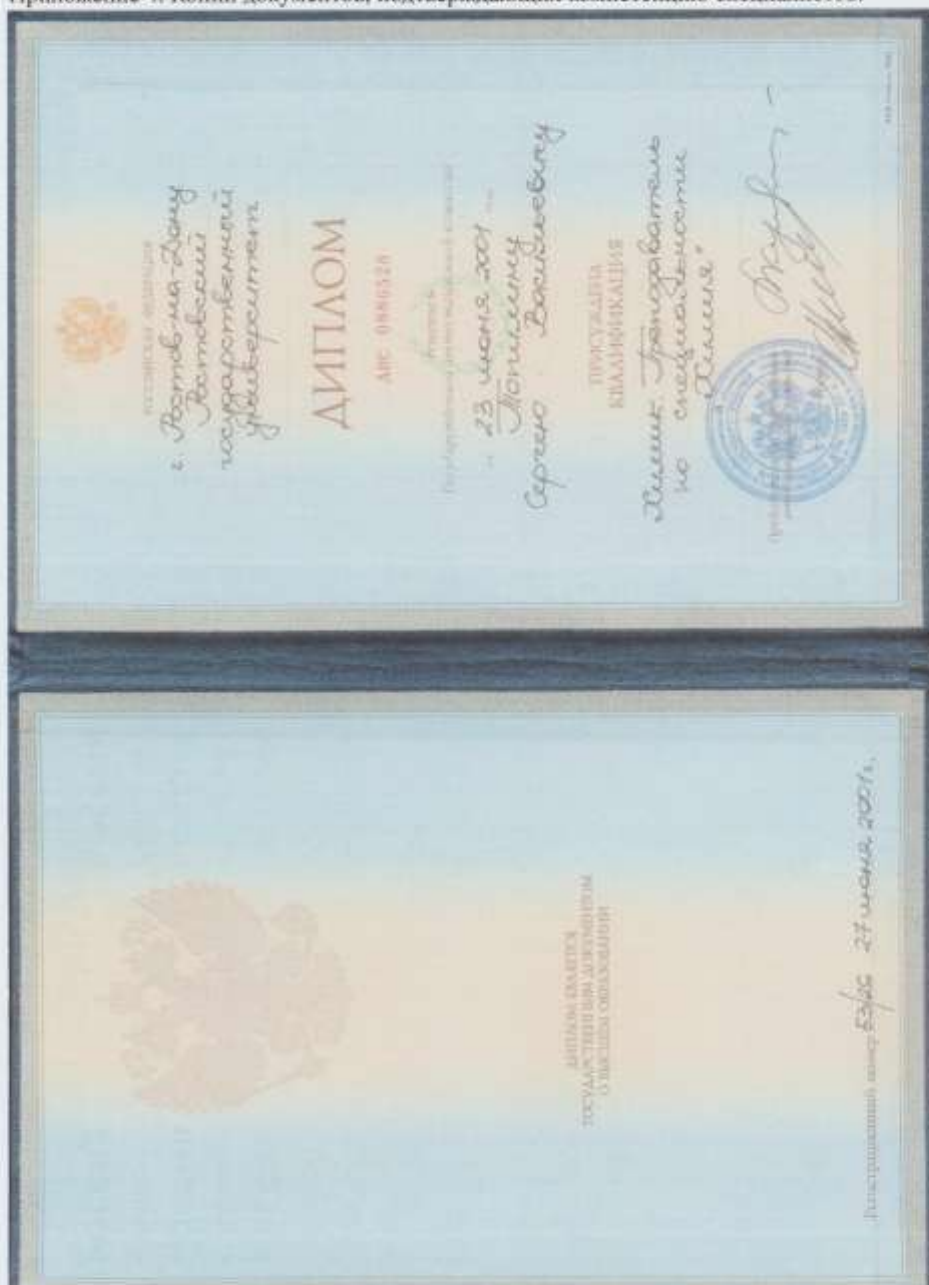
Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22113.6 Std. Deviation: 0.346116  
Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22113.6

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass ([M + H] <sup>+</sup> )	Predicted Peak
962.9	23+	22124.9	962.9
1006.6	22+	22124.3	1006.6
1054.4	21+	22121.5	1054.4
1107.2	20+	22124.0	1107.1

Molecular Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22123.8 Std. Deviation: 0.726288  
Average Mass ([M + H]<sup>+</sup>): 22123.8

Приложение 4. Копии документов, подтверждающих компетенцию специалистов.





НАШЕЮ РАБОТОЮ

## СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ПОДЛИННОСТИ ДОКУМЕНТА

Наименование документа: Поголоному Сергею Васильевичу

в том, что фото: ЗМС, ДМ, с. 04 апреля ЗМС,

подлинности (или копирования) сертификата государственного центра экспертизы средств медицинского назначения не является подлинным документом, составленным на месте, так как на фотографиях отсутствует изображение в виде стилизованной надписи «СЭС МСМ».

За время обучения (каждый месяц в отдельности по состоянию на дату окончания обучения)

Наименование	Количество часов	Дни
Завершение государственного сертификата государственного центра экспертизы средств медицинского назначения (теория)	26	23.05.14
Базовая практическая подготовка (теория)	23	23.05.14
Базовая практическая подготовка (практика)	76	23.05.14
Подготовительный этап, тест, и экзамен	82	23.05.14

Принимая, что на фотографиях отсутствует изображение в виде стилизованной надписи «СЭС МСМ», эксперт приходит к выводу, что фотографии являются не подлинными, а копированными документами.

*С.Е. Семенов*

г. Москва 04.06.2014

Свидетельство является экспертельным документом  
и подлежит охране законом

Формализованный документ - 3054  
Регистрационный номер:

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
(ФГБУ НИЭСМП Минздрава России)

### СВИДЕТЕЛЬСТВО

Выдано Шопилину  
Сергею Васильевичу

в том, что он (а) прошел (ла) обучение к семинару

*«Современные требования к упаковке,  
маркировке и хранению лекарственных  
средств»*

И. о. генерального директора



Миронов А.Н.

г. Москва  
28 сентября 2010 г.

**СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ  
НЕГОСУДАРСТВЕННЫХ СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТОВ**

Волонтерская и добровольная  
активистская система добровольной сертификации  
Федеральное агентство по техническому, интеллектуальному и инновационному  
развитию Российской Федерации

Регистрационный № РОСС.ИД.4597.04Н000 от 16 октября 2009 г.

№ **003558**

Юридическое партнерство  
«НАСТА СЪДЕБНЫХ ЭКСПЕРТОВ»  
ИНН 7704/0100000000  
Адрес: 127043, г. Москва, ул. Кавказская, д. 10, стр. 11

**СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ**

Дан выдан в Ростр - 26 - декабря 2012 г.  
Действителен с 26 декабря 2012 г. по 25 декабря 2015 г.

НАСТОЯЩИЙ СЕРТИФИКАТ УДОСТОВЕРЯЕТ, ЧТО

**ТОПИЛИН СЕРГЕЙ ВАСИЛЬЕВИЧ**

ЯВЛЯЕТСЯ КОМПЕТЕНТНЫМ И СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЮ СИСТЕМЫ  
ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ НЕГОСУДАРСТВЕННЫХ СУДЕБНЫХ  
ЭКСПЕРТОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ

**«ОСНОВЫ СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»**

**«СУДЭКС»**

ОСНОВАНИЕ ДЛЯ ВЫДАЧИ ИЛИ ПРЕДВЕЕНИЯ СРОКА ДЕЙСТВИЯ СЕРТИФИКАТА

Решение Совета Системы от 26.12.2012 г. (Протокол № 82)

 Руководитель центра  
по сертификации

 П.М. Гроука