

Химия и технология лекарственных препаратов
и биологически активных соединений
Chemistry and technology of medicinal compounds
and biologically active substances

УДК 547.466:543.544

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-2-127-138>



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

One-pot определение аминокислот в лекарственных препаратах методом предколоночной дериватизации с фенилизотиоцианатом

П.А. Калмыков¹, Т.П. Кустова², С.О. Кустов^{1,2},
П.С. Шестаковская^{1,2}, Т.Р. Азметов¹, А.А. Калмыкова¹

¹ Генериум, пос. Вольгинский, Владимирская область, 601125 Россия

² Ивановский государственный университет, Иваново, 153025 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: kustovatp@ivanovo.ac.ru

Аннотация

Цели. Разработать новую методику определения аминокислот в лекарственных препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом (ФИТЦ) с применением *one-pot* пробоподготовки.

Методы. Исходные стандартные растворы аминокислот готовили методом навесок с последующим растворением в воде, после чего готовили рабочие растворы: стандартный, испытуемый и холостой, путем разведения в 20 мМ соляной кислоте. Дальнейшая пробоподготовка осуществлялась в полипропиленовых пробирках Safe-lock (Eppendorf) в реакционном буфере, содержащем подвижную фазу А, ацетонитрил и триэтиламин в соотношении 85 : 10 : 5 с окрашиванием 5% раствором ФИТЦ в ацетонитриле. После тщательного перемешивания в течение 3–5 мин на вортексе пробирки выдерживали в твердотельном термостате с термоизоляционной крышкой в течение 2 ч. Далее пробы охлаждали в течение 10 мин, центрифугировали в течение 1 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в вials и проводили разделение смеси аминокислот методом ОФ ВЭЖХ с использованием в качестве неподвижной фазы гидрофобного силикагеля с привитыми группами C18. Количественное определение дериватов аминокислот проводили с применением диодно-матричного детектора.

Результаты. Разработана и валидирована новая методика разделения и определения аминокислот в лекарственных препаратах, позволяющая на основе простой *one-pot* пробоподготовки с использованием доступных реактивов и оборудования проводить исследования без использования коммерческих наборов, например AccQ×Tag Ultra Derivatization Kit, США. На примере анализа смесей гистидина и глицина показано, что при использовании двух подвижных фаз удается достичь приемлемого разделения дериватов аминокислот в градиентном режиме в течение 20 мин со скоростью потока 1.0 мл/мин. Приготовленные по новой методике пробы продемонстрировали высокую стабильность в применении и хранении. Предложен состав подвижных фаз А и Б, состоящий из 10 мМ ацетатного буфера с рН 3.5 и 80% раствора ацетонитрила. Валидация разработанной методики при анализе лекарственного препарата Иннонафактор[®], содержащего в качестве вспомогательных веществ глицин и гистидин, продемонстрировала высокую сходимость результатов количественного определения данных аминокислот.

Выводы. Новая методика определения аминокислот в лекарственных препаратах методом ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией ФИТЦ обладает широким диапазоном применения, имеет ряд преимуществ по сравнению с импортными коммерческими наборами для определения аминокислот: низкую стоимость реактивов и материалов, высокую точность и повторяемость, в связи с чем она может быть рекомендована к использованию в лабораториях контроля качества фармацевтических предприятий.

Ключевые слова

аминокислоты, глицин, гистидин, ОФ ВЭЖХ, предколоночная дериватизация, ФИТЦ (фенилизотиоцианат), контроль качества лекарственных средств

Поступила: 29.08.2023

Доработана: 07.11.2023

Принята в печать: 06.03.2024

Для цитирования

Калмыков П.А., Кустова Т.П., Кустов С.О., Шестаковская П.С., Азметов Т.Р., Калмыкова А.А. One-pot определение аминокислот в лекарственных препаратах методом предколоночной дериватизации с фенилизотиоцианатом. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(2):127–138. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-2-127-138>

RESEARCH ARTICLE

One-pot determination of amino acids in drugs by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate

Pavel A. Kalmykov¹, Tatyana P. Kustova^{2,✉}, Stanislav O. Kustov^{1,2},
Polina S. Shestakovskaya^{1,2}, Timur R. Azmetov¹, Alyona A. Kalmykova¹

¹ GENERIUM, Volginskiy, Vladimir oblast, 601125 Russia

² Ivanovo State University, Ivanovo, 153025 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: kustovatp@ivanovo.ac.ru

Abstract

Objectives. To develop a new method to determine amino acids in drugs by means of reverse-phase high-performance chromatography (RP HPLC) with pre-column derivatization using phenyl isothiocyanate (PITC) and one-pot sample preparation.

Methods. The initial standard solutions of amino acids were prepared by weighing, followed by dissolution in water. Working solutions were then prepared: standard, test, and blank, by dilution in 20 mM hydrochloric acid. Further sample preparation was carried out in Safe-lock polypropylene tubes (Eppendorf) in a reaction buffer containing mobile phase A, acetonitrile, and triethylamine in a ratio of 85 : 10 : 5, labeled with a 5% PITC solution in acetonitrile. After thorough mixing for 3–5 min on a vortex, the tubes were kept in a solid-state thermostat with a thermally insulating lid for 2 h. The samples were then cooled for 10 min, centrifuged for 1 min at 13000 rpm, the supernatant was transferred into vials, and the mixture of amino acids was separated by RP HPLC using hydrophobic silica gel with grafted C18 groups as a stationary phase. The quantitative determination of amino acid derivatives was carried out using a diode array detector.

Results. A new method for the separation and determination of amino acids in medicinal preparations was developed and validated. Simple one-pot sample preparation using available reagents and equipment enabled studies to be carried out without using commercial kits, for example, the AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit, USA. Using the analysis of mixtures of histidine and glycine as an example, it was shown that when using two mobile phases, an acceptable separation of amino acid derivatives in a gradient mode can be achieved for 20 min at a flow rate of 1.0 mL/min. The samples prepared according to the new method demonstrated a high level of stability in use and storage. A composition of mobile phases A and B consisting of 10 mM acetate buffer pH 3.5 and 80% acetonitrile solution was proposed. Validation of the method hereby developed in the analysis of the drug Innonafactor[®], containing glycine and histidine as excipients, demonstrated high convergence of the results of the quantitative determination of these amino acids.

Conclusions. The new method to determine amino acids in medicinal preparations by RP HPLC with PITC pre-column derivatization has a wide range of applications, has a number of advantages when compared to imported commercial kits for the determination of amino acids. These include: lower cost of reagents and materials, high accuracy and repeatability. Thus, it can be recommended for use in quality control laboratories of pharmaceutical enterprises.

Keywords

amino acids, glycine, histidine, RP HPLC, pre-column derivatization, PITC (phenyl isothiocyanate), quality control of medicines

Submitted: 29.08.2023

Revised: 07.11.2023

Accepted: 06.03.2024

For citation

Kalmykov P.A., Kustova T.P., Kustov S.O., Shestakovskaya P.S., Azmetov T.R., Kalmykova A.A. One-pot determination of amino acids in drugs by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2024;19(2):127–138. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-2-127-138>

ВВЕДЕНИЕ

Начиная со второй половины 2022 г. целый ряд иностранных фармацевтических компаний объявил о приостановке инвестиций в российский рынок,

об отказе от проведения в России клинических исследований, необходимых для регистрации новых препаратов, а некоторые препараты оказались в дефиците из-за проблем с логистикой готовых лекарственных форм или фармацевтических субстанций.

Проблемы с доступностью инновационных зарубежных препаратов наиболее остро стоят в терапии орфанных (редких) заболеваний, но следует отметить, что некоторые российские фармкомпании производят такие лекарства самостоятельно, например, АО «Генериум» выпускает препараты для лечения гемофилии, муковисцидоза и болезни Гоше¹. Это важно, т.к. в 2023 г. в России начался расширенный неонатальный скрининг новорожденных на 36 врожденных заболеваний, к числу которых относятся наследственные болезни обмена аминокислот, органических кислот и жирных кислот.

Анализ фармацевтического рынка России за 2022 г. показал², что производство лекарственных препаратов в стране увеличилось на 8.6% по сравнению с 2021 г. Согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2030 г., принятой Правительством Российской Федерации в июне 2023 г., доля российских препаратов полного цикла на рынке Российской Федерации должна вырасти почти до 70%, а объем производства препаратов в денежном выражении удвоиться и составить 1.4 трлн руб.³

Лекарственные препараты, содержащие аминокислоты и белки, широко применяются в медицинской практике для лечения метаболических нарушений, сердечно-сосудистых, инфекционных и дерматологических заболеваний, рака, болезней желудочно-кишечного тракта, почек и центральной нервной системы, а также болевых синдромов [1]. Сегмент фармацевтического рынка, связанный с производством пептидных препаратов, неуклонно растет, поэтому актуальной задачей для фармпроизводителей является совершенствование аминокислотного анализа для контроля качества таких лекарств. По запросу «amino acid analysis» платформа *sciencedirect.com* в настоящее время выдает более 64000 результатов, из них более 2700 за последние 5 лет [2–5].

Фармакопея Евразийского экономического союза (ЕАЭС) рекомендует 12 методов аминокислотного анализа, из которых 7 методов предполагают проведение предколоночной дериватизации аминокислот⁴. Дериватизация аминокислот необходима из-за отсутствия в структуре большинства их молекул

хромофорных групп, что не позволяет использовать для анализа оптические детекторы. В связи с этим, в профессиональном сообществе много внимания уделяется функционализации аминокислот, в первую очередь, по *N*-концевой аминогруппе [6–8]. Одним из надежных и хорошо зарекомендовавших себя методов определения аминокислот является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом (ФИТЦ). В аминокислотном анализе метод ВЭЖХ используется значительно чаще других, т.к. пептиды представляют собой сложные органические соединения, которые являются термолабильными (разрушаются при нагревании); этот метод характеризуется высокой чувствительностью и селективностью. Дериваты с ФИТЦ по *N*-концевой аминогруппе образуют все аминокислоты, реакция протекает быстро и количественно с образованием стабильных производных аминокислот, при этом другие мешающие определению аминокислот соединения не образуются. Так, в работе [9] был предложен способ количественного определения ряда свободных аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой, серина, глицина, гистидина, пролина, аланина и др.) в образцах мяса телятины, кур-несушек и сухого экстракта мозга коров методом ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией ФИТЦ. Авторы использовали 3 подвижные фазы: 2 ацетатных буфера с pH 4.05 и pH 5.5 и 1%-ный раствор изопропилового спирта в ацетонитриле. Пробоподготовка занимала в среднем около 20 ч и включала кислотный гидролиз белков, экстракцию этанолом свободных аминокислот, отбор и высушивание аликвот, добавление раствора гидроксида натрия, раствора мечения (ФИТЦ), повторное высушивание и растворение сухого остатка в бидистиллированной воде. Известно, что при длительной пробоподготовке в ходе проведения аминокислотного анализа могут происходить потери части аналита. В связи с этим важно ограничить количество манипуляций с образцами, т.к. это увеличит значение выявления аналита и сократит трудозатраты персонала.

Целью настоящей работы стала разработка и валидация новой методики с использованием *one-pot*

¹ <https://www.generium.ru/products/#>. Дата обращения 02.08.2023. Accessed August 02, 2023.

² Фармацевтический рынок России 2022. Аналитический обзор DSM GROUP. https://dsm.ru/docs/analytics/Annual_report_2023_rus.pdf. Дата обращения 02.08.2023. / The pharmaceutical market of Russia for 2022. Analytical review of DSM GROUP. https://dsm.ru/docs/analytics/Annual_report_2023_rus.pdf. Accessed August 02, 2023.

³ Распоряжение Правительства РФ от 7 июня 2023 г. № 1495-р «О Стратегии развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2030 г.». <http://government.ru/docs/48801/>. Дата обращения 02.08.2023. / Decree of the Government of the Russian Federation dated June 7, 2023, No. 1495-r “Strategy for the Development of the Pharmaceutical Industry until 2030.” <http://government.ru/docs/48801/>. Accessed August 02, 2023.

⁴ https://eec.eaunion.org/comission/departement/deptexreg/formirovanie-obshchikh-rynkov/pharmacopoeia/pharmacopoeia_utv.php. Дата обращения 02.08.2023. / Accessed August 02, 2023.

пробоподготовки с применением доступных реактивов и оборудования без использования коммерческих наборов зарубежного производства для определения аминокислот в лекарственных препаратах методом ОФ ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией ФИТЦ. Модельной системой для разработки методики выбрали препарат Иннонафактор[®], относящийся к фармгруппе «Коагулянты» (в т.ч. факторы свертывания крови), гемостатики» [10]. Рекомбинантный фактор свертывания крови IX, представляющий собой однопочечный гликопротеин с молекулярной массой около 55 кДа, состоит из 415 аминокислотных остатков⁵. Для стабилизации гликопротеина в препарате используют смесь аминокислот в достаточном избытке (по глицину в 29 раз, по гистидину в 2.3 раза)⁶. Определение количественного содержания этих аминокислот регламентируется и должно быть проконтролировано при выпускающем контроле. В связи с этим разработка аналитической методики определения аминокислот, дающая воспроизводимые результаты с простой пробоподготовкой в минимальные сроки, является актуальной задачей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все использованные в работе реактивы и растворители имели квалификацию не ниже «ос.ч.»: гистидин (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № А1341), глицин (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № 143040), ацетат натрия (*Sigma-Aldrich*, США, кат. № S2889), концентрированная уксусная кислота (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № 141008), хлористоводородная кислота (*Pallav*, Индия, кат. № 1379В), ФИТЦ (*Sigma-Aldrich*, США, кат. № 78780), натрия гидроксид (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № 141687), натрия хлорид (*Nouryan*, Дания, кат. № 8004337), полисорбат 80 (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № 142050), триэтиламин (*Sigma-Aldrich*, США, кат. № 471283), ацетонитрил (*PanReac AppliChem*, Испания, кат. № 221881). Для приготовления рабочих растворов использовали деионизированную бидистиллированную воду (*Milli-Q, Merck Millipore*, США).

Раствор для мечения готовили в полипропиленовой пробирке *Safe-lock (Eppendorf, Германия)* вместимостью 2 мл смешением 950 мкл ацетонитрила и 50 мкл ФИТЦ.

Для приготовления подвижной фазы А (ПФ А) в химический стакан вместимостью 1 л вносили 0.82 г ацетата натрия, прибавляли около 800 мл воды затем рН раствора доводили уксусной кислотой до 3.5 ± 0.1 с использованием рН-метра (*Seven Easy S20, Mettler Toledo*, Швейцария). Полученный раствор переносили в мерную колбу вместимостью 1 л, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали, отфильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и дегазировали с применением вакуумного насоса.

Для приготовления подвижной фазы Б (ПФ Б) 800 мл ацетонитрила помещали в химический стакан вместимостью 1 л, прибавляли 200 мл воды, перемешивали, отфильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и дегазировали.

Реакционный буфер готовили в пробирке вместимостью 15 мл. В пробирку вносили 8.5 мл ПФ А, 1 мл ацетонитрила и 500 мкл триэтиламина в соотношении 85 : 10 : 5, содержимое пробирки перемешивали.

Исходный испытуемый раствор препарата Иннонафактор[®] 500 МЕ готовили следующим образом. Во флакон с лиофилизатом прибавляли 5.0 мл воды для инъекций, аккуратно перемешивали, избегая вспенивания (согласно инструкции к препарату при таком разведении содержание гистидина — около 1.55 мг/мл (7.76 мг/флакон), глицина — около 19.52 мг/мл (97.6 мг/флакон), что соответствует середине диапазона, указанного в инструкции к препарату).

Исходные стандартные растворы аминокислот готовили методом навесок с последующим растворением в воде, концентрация гистидина составляла 1.55 мг/мл, глицина — 19.52 мг/мл. Затем готовили рабочие растворы: по 100 мкл исходного испытуемого раствора, исходного стандартного раствора и раствора плацебо (без гистидина и глицина) помещали в полипропиленовые пробирки вместимостью 1.5 мл, прибавляли по 400 мкл 20 мМ раствора хлористоводородной кислоты и перемешивали.

Дальнейшая пробоподготовка осуществлялась в полипропиленовых пробирках вместимостью 1.5 мл в реакционном буфере с окрашиванием раствором для мечения. После тщательного перемешивания в течение 3–5 мин пробирки выдерживали в твердотельном термостате с термоизоляционной крышкой «Гном» (*ДНК-Технология, Москва, Россия*) в течение 2 ч при температуре 65°C. Далее пробы охлаждали в холодильнике в течение 10 мин, затем

⁵ Регистр лекарственных средств России: нонаконг альфа. <https://www.rlsnet.ru/active-substance/nonakog-alfa-2595>. Дата обращения 02.08.2023. / Register of medicines of Russia: Nonacogum alfa. <https://www.rlsnet.ru/active-substance/nonakog-alfa-2595>. Accessed August 02, 2023.

⁶ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Иннонафактор[®]. <https://www.generium.ru/upload/preparations/manual/Instruksiya-Innonafaktor.pdf>. Дата обращения 02.08.2023. Instructions for the medical use of the drug Innonafaktor[®]. <https://www.generium.ru/upload/preparations/manual/Instruksiya-Innonafaktor.pdf>. Accessed August 02, 2023.

центрифугировали в течение 1 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в виалы и проводили разделение смеси аминокислот в жидкостном хроматографе высокого давления (Waters e2695 с разделительным модулем «Alliance» с диодно-матричным детектором Waters 2998, США). В качестве неподвижной фазы применяли гидрофобный силикагель⁷ с привитыми группами C18.

Перед началом определения аминокислот хроматографическую колонку уравнивали смесью подвижных фаз в соотношении 97 : 3 до формирования стабильной базовой линии. Далее проводили кондиционирование в градиентном режиме не менее 2 раз.

Хроматографические условия:

- колонка из нержавеющей стали Диасфер-110-C18, 4.6 × 250 мм (размер частиц 5 мкм) (БиохимМак СТ, Россия);
- 2 подвижные фазы — ПФ А и ПФ Б;
- скорость потока ПФ — 1.0 мл/мин;
- температура термостата колонки — 45°C;
- температура образцов — 5 ± 3°C;
- диодно-матричный детектор ($\lambda = 254.0 \pm 4.8$ нм);
- объем инъекции — 5 мкл для оценки содержания глицина, 50 мкл для оценки содержания гистидина;
- время регистрации хроматограммы — 20 мин;
- порядок ввода проб: холостой раствор (1 инъекция, 5 мкл), стандартный раствор (для оценки глицина, 3–5 инъекций, 5 мкл), испытуемый раствор (1–3 инъекции, 5 мкл), стандартный раствор (для оценки гистидина, 3–5 инъекций, 50 мкл), испытуемый раствор (1–3 инъекций, 50 мкл).

Элюирование проводили в градиентном режиме. Пробы хроматографировали согласно порядку ввода проб. Пики холостого раствора при обработке хроматограмм не учитывали.

Хроматографическая система считалась пригодной, если выполнялись следующие критерии приемлемости:

- относительное стандартное отклонение времени удерживания и площади пика деривата должно быть не более 2.0%;
- фактор асимметрии пика деривата должен быть от 0.8 до 1.5;
- эффективность хроматографической колонки для пика деривата должна быть не менее 50000 теоретических тарелок.

Содержание аминокислот (X) в мг/флакон рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{исп}}}{S_{\text{ст}}} \times C \times 5,$$

где $S_{\text{исп}}$ — площадь пика деривата гистидина/глицина на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{\text{ст}}$ — площадь пика деривата гистидина/глицина на хроматограмме стандартного раствора; C — содержание гистидина/глицина в стандартном растворе, мг/мл; 5 — объем воды, добавленный во флакон испытуемого раствора препарата при восстановлении лиофилизата, мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность. Специфичность методики оценивали путем визуального сопоставления хроматограмм холостого раствора, стандартного и испытуемого растворов. На хроматограмме холостого раствора отсутствуют пики со временем удерживания пиков дериватов гистидина (около 8.6 мин) и глицина (около 10.8 мин), присутствующие на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов (рис. 1). Таким образом, специфичность методики доказана по отношению к матрице испытуемого раствора (белок, вспомогательные компоненты плацебо).

Во временной области удерживания дериватов аминокислот обнаружено 4 пика. Один из них присутствует на хроматограмме холостого раствора и принадлежит раствору плацебо. Для идентификации остальных пиков применяли метод единичных стандартов аминокислот, который показал, что пик со временем удерживания около 10.8 мин принадлежит деривату глицина, а пики со временем удерживания около 8.6 мин и 10.4 мин принадлежат деривату гистидина. Согласно литературным данным [2] дериваты аминокислот с несколькими атомами азота в структуре неустойчивы и могут подвергаться деградированию. Для оценки данных пиков и определения их природы было проведено изучение спектров поглощения дериватов в диапазоне длин волн 200–400 нм с использованием диодно-матричного детектора. Для стандартного раствора был определен срез пиков в интервале 6–11 мин на 3D спектре хроматограммы (рис. 2).

Согласно полученным данным, пик деривата глицина имеет спектр с максимумом поглощения около 250 нм (рис. 2d), который согласуется с литературными данными (254 нм). Аналогичный спектр наблюдается для пика со временем удерживания около 8.6 мин (рис. 2b). Пики со временем удерживания около 7.9 мин и 10.4 мин не имеют максимума поглощения около 250 нм. Таким образом, сделано заключение о выборе пика деривата гистидина для оценки количественного содержания гистидина.

Пики со временем удерживания более 12 мин принадлежат пикам красителя ФИТЦ и системным пикам (градиентная область «перемывки» колонки).

⁷ <https://bcmst.ru/kolonki/diaspher/>. Дата обращения 02.08.2024. / Accessed August 02, 2024.

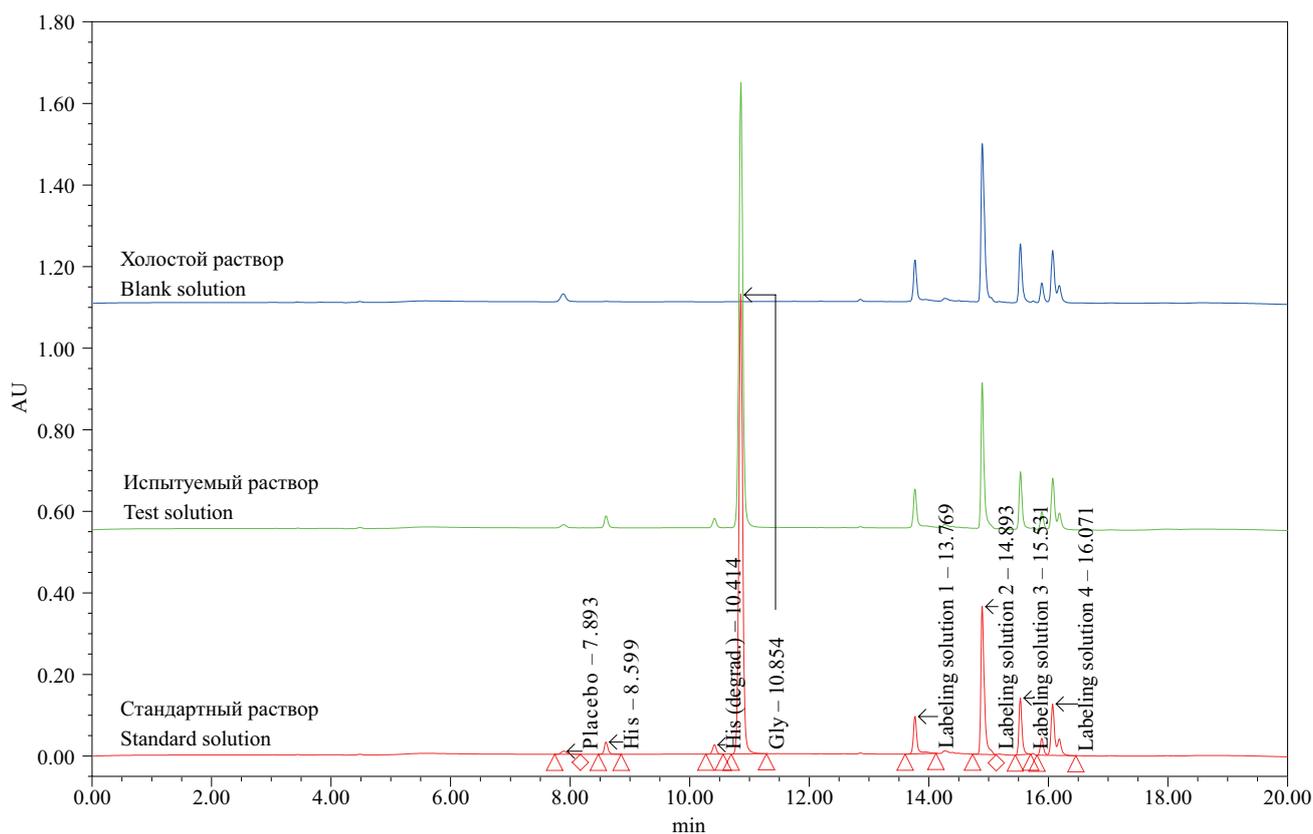


Рис. 1. Хроматограммы холостого, испытуемого и стандартного растворов

Fig. 1. Chromatograms of blank, test, and standard solutions

Линейность, правильность и аналитическая область методики. Для оценки линейности, правильности и аналитической области методики использовали метод калибровочных растворов, для чего готовили модельные растворы (МР) аминокислот в диапазоне 40–140% от номинальной концентрации (середина диапазона содержания в препарате

Иннонафактор®). Приготовление МР для оценки линейности описано в табл. 1.

Далее проводили пробоподготовку согласно методике, описанной выше, каждый МР в трех повторностях. Результаты оценки линейности методики по пику деривата глицина приведены в табл. 2, деривата гистидина — в табл. 3 и на рис. 3.

Таблица 1. Приготовление МР для оценки линейности и аналитической области

Table 1. Preparation of model solutions (MS) for evaluation of linearity and analytical area

№ МР MS No.	1	2	3	4	5	6
Содержание глицина/гистидина, % Glycine/histidine content, %	40	60	80	100	120	140
Содержание глицина, мг/мл Glycine content, mg/mL	7.81	11.71	15.62	19.52	23.42	27.33
Содержание гистидина, мг/мл Histidine content, mg/mL	0.62	0.93	1.24	1.55	1.86	2.17
Исходный стандартный раствор, мкл Initial standard solution, μ L	40	60	80	100	120	140
20 мМ раствор хлористоводородной кислоты, мкл 20 mM hydrochloric solution acids, μ L	460	440	420	400	380	360

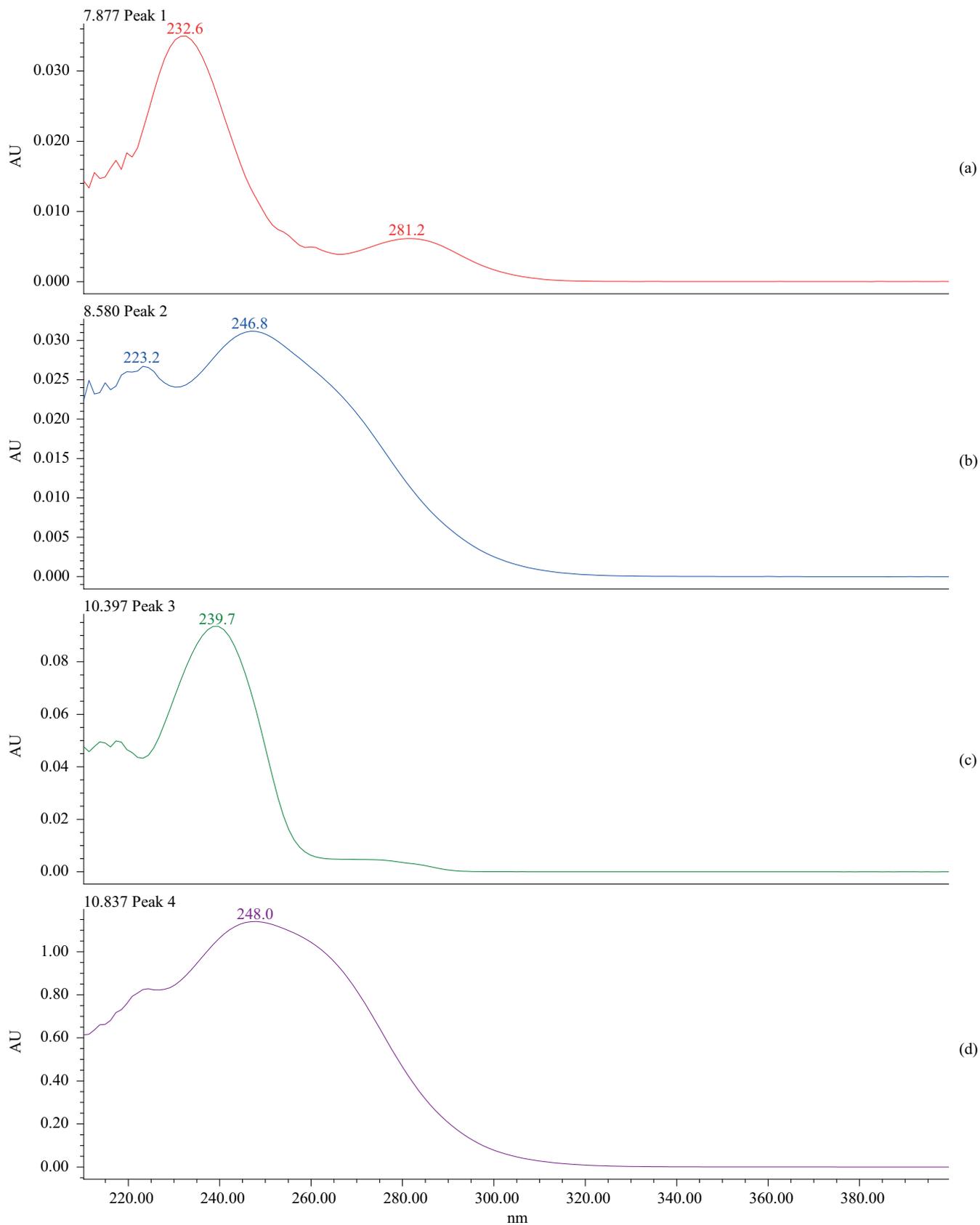


Рис. 2. Спектры поглощения пиков на хроматограмме стандартного раствора со временем удерживания (а) 7.9; (б) 8.6; (в) 10.4; (г) 10.8 мин

Fig. 2. Absorption spectra of peaks on the standard solution chromatogram with a retention time of (a) 7.9; (b) 8.6; (c) 10.4; (d) 10.8 min

Таблица 2. Оценка линейности методики и аналитической области методики определения содержания глицина

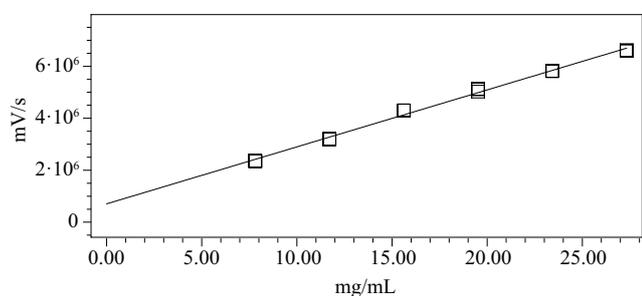
Table 2. Evaluation of the linearity of the method and the analytical area of the method for determining the content of glycine

№ МР MS No.	1	2	3	4	5	6
Рассчитанная концентрация, мг/мл Calculated concentration, mg/mL	7.81	11.71	15.62	19.52	23.42	27.33
Практически определенная концентрация, мг/мл Practical concentration, mg/mL	7.53	11.36	16.41	20.32	23.31	26.88
Процент выявления Detection percent	96.4	97.0	105.0	104.0	99.5	98.4

Таблица 3. Оценка линейности методики и аналитической области методики определения содержания гистидина

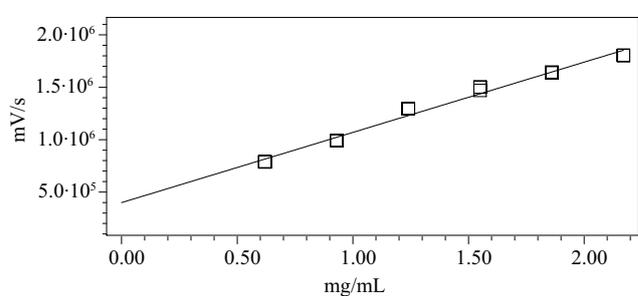
Table 3. Evaluation of the linearity of the method and the analytical area of the method for determining the content of histidine

№ МР MS No.	1	2	3	4	5	6
Рассчитанная концентрация, мг/мл Calculated concentration, mg/mL	0.62	0.93	1.24	1.55	1.86	2.17
Практически определенная концентрация, мг/мл Practical concentration, mg/mL	0.58	0.88	1.34	1.63	1.85	2.10
Процент выявления Detection percent	93.5	94.6	108.0	105.2	99.5	96.8



Name: Gly; Processing Method: Suitability_Gly_lin; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 6888; A: 7.052776e+005; B: 2.193587e+005; R²: 0.995; Equation $Y = 2.19e+005 X + 7.05e+005$

(a)



Name: His; Processing Method: Suitability_His_lin; Fit Type: Linear (1st order); Cal Curve Id: 6967; A: 3.993967e+005; B: 6.700806e+005; R²: 0.986; Equation $Y = 6.70e+005 X + 3.99e+005$

(b)

Рис. 3. Калибровочные графики для определения линейности и аналитической области методики: (а) оценка содержания глицина; (б) оценка содержания гистидина

Fig. 3. Calibration plots for determining the linearity and analytical area of the method: (a) glycine content estimate; (b) histidine content estimate

Показано, что методика обладает линейностью в выбранном диапазоне с коэффициентом корреляции более 0.98. Также показано, что методика обладает приемлемой правильностью для глицина в доверительном интервале 95–105%, гистидина — 90–110% (что связано с достаточно низкой концентрацией гистидина в рабочем испытуемом растворе).

Аналитическая методика обладает приемлемой линейностью и правильностью в диапазоне концентраций 40–140% от номинальной или 0.62–2.17 мг/мл для гистидина и 7.81–27.33 мг/мл для глицина. Следовательно, данный диапазон концентраций является аналитической областью методики.

Предел количественного определения (ПКО). По результатам испытаний был определен предел

количественного определения расчетным методом по формуле:

$$\text{ПКО} = \frac{X \times 10}{S/n},$$

где X — концентрация гистидина/глицина в стандартном растворе, мг/мл; S/n — соотношение сигнал/шум для пика деривата гистидина/глицина на хроматограмме стандартного раствора; 10 — предел соотношения сигнал/шум для оценки ПКО.

Оценка проведена для 6 последовательных инъекций стандартного раствора. Критерии приемлемости системы выполнялись.

Согласно полученным данным, аналитическая методика обладает высокой чувствительностью. Исходная концентрация аминокислот в исходном испытуемом растворе для гистидина составила около 0.01 мг/мл, для глицина около 0.024 мг/мл, что соответствует пределу количественного определения.

Повторяемость. Для оценки повторяемости методики были проведены испытания по оценке количественного содержания гистидина и глицина в препарате Иннонафактор®. Испытуемый раствор готовили в 6 повторностях, каждый раствор инжектировали

дважды. Результаты испытаний представлены в табл. 4. Результаты рассчитаны с использованием двух методов — (1) по калибровочному графику линейности и (2) по 6 последовательным инъекциям стандартного раствора для оценки пригодности системы.

Согласно полученным данным, методика обладает высокой повторяемостью, характерной для методик ВЭЖХ. Так, для 6 пробоподготовок относительное стандартное отклонение определения аминокислот составило около 2–3%. Данные, полученные для двух методов расчета содержания аминокислот, совпадают и находятся в диапазоне $\pm 10\%$ от номинального содержания, согласно инструкции к препарату. Таким образом, достаточным условием пригодности системы для оценки содержания аминокислот будет являться метод расчета (2).

Устойчивость стандартного и испытуемого растворов. Устойчивость аналитической методики в рамках оценки срока годности стандартного и испытуемого растворов была выполнена для свежеприготовленных растворов (А) и после 1 суток хранения в термостате при температуре от 2 до 8°C (Б). Результаты оценки содержания аминокислот представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 4. Оценка повторяемости аналитической методики

Table 4. Assessment of the repeatability of the analytical method

№ инъекции Injection No.	Содержание аминокислоты, мг/флакон Amino acid content, mg/flask			
	Гистидин Histidine		Глицин Glycine	
	(1)	(2)	(1)	(2)
1	7.89	7.73	96.93	96.39
2	7.89	7.73	96.67	96.16
3	7.87	7.72	96.30	95.84
4	7.87	7.72	95.71	95.34
5	7.70	7.60	95.94	95.54
6	7.70	7.60	95.21	94.91
7	7.72	7.61	94.84	94.60
8	7.72	7.62	95.03	94.77
9	8.16	7.93	95.03	94.76
10	8.15	7.92	98.27	97.53
11	8.17	7.93	98.43	97.66
12	8.17	7.93	98.52	97.74
Среднее Average	7.9	7.8	96.6	96.1
SD*	0.2	0.1	1.4	1.2
RSD**, %	2.5	1.8	1.5	1.3

*SD — стандартное отклонение. / SD — standard deviation.

**RSD — относительное стандартное отклонение. / RSD — relative standard deviation.

Таблица 5. Оценка устойчивости испытуемых растворов

Table 5. Evaluation of the stability of the tested solutions

№ инъекции Injection No.	Содержание аминокислоты, мг/флакон Amino acid content, mg/flask			
	Гистидин Histidine		Глицин Glycine	
	(А)	(Б)	(А)	(Б)
1	7.73	7.82	96.39	96.92
2	7.73	7.82	96.16	97.43
3	7.72	7.77	95.84	96.98
4	7.72	7.77	95.34	96.77
5	7.60	7.65	95.54	96.77
6	7.60	7.65	94.91	95.42
7	7.61	7.66	94.60	95.84
8	7.62	7.66	94.77	95.78
9	7.93	7.96	94.76	96.11
10	7.92	7.96	97.53	98.38
11	7.93	7.96	97.66	98.64
12	7.93	7.96	97.74	99.01
Среднее Average	7.8	7.8	96.1	97.1
SD	0.1	0.1	1.2	1.2
RSD, %	1.8	1.7	1.3	1.2
Среднее Average	7.8		96.5	
SD	0.1		1.3	
RSD, %	1.7		1.3	

Таблица 6. Оценка устойчивости стандартного раствора

Table 6. Evaluation of the stability of the standard solution

№ инъекции Injection No.	Площадь пика деривата аминокислоты, мкВ/с Amino acid derivative peak area, $\mu\text{V/s}$			
	Гистидин Histidine		Глицин Glycine	
	(А)	(Б)	(А)	(Б)
1	1457768	1467593	5075402	5112246
2	1460085	1470084	5064962	5098915
3	1460186	1470991	4999555	5121785
4	1460216	1475217	4994879	5140767
5	1460957	1474622	4994327	5139811
6	1461680	1476159	4991779	5138833
Среднее Average	1460149	1472444	5020151	5125393
SD	1317	3390	38975	17389
RSD, %	0.1	0.2	0.8	0.3
Среднее Average	1466297		5072772	
SD	6873		62037	
RSD, %	0.5		1.2	

Подтверждена стабильность стандартного и испытуемых растворов в течение 1 суток хранения в термостате при температуре от 2 до 8°C, что является преимуществом по сравнению с аналогичными методами определения аминокислот, например, дериватами с орто-фталевым альдегидом, срок годности которых составляет около 2–3 мин [11]. Относительное стандартное отклонение составило менее 2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная новая методика разделения и определения аминокислот в лекарственных препаратах на основе простой *one-pot* пробоподготовки с использованием доступных реактивов и оборудования соответствует всем требуемым критериям, представленным к методикам количественного определения ВЭЖХ согласно фармакопеи ЕАЭС и Государственной Фармакопеи Российской Федерации и может быть рекомендована к использованию в лабораториях фармацевтических предприятий. Методика экономически выгоднее по сравнению с импортными

коммерческими наборами для определения аминокислот по стоимости реактивов и материалов, имеет высокую точность и повторяемость. Кроме того, методика является универсальной и обладает широким диапазоном применения, поскольку образование дериватов аминокислот с ФИТЦ по *N*-концевой аминокислотной группе характерно для всех аминокислот. В настоящей работе подтвержден диапазон применения данной методики для определения количественного содержания гистидина 0.62–2.17 мг/мл и глицина 7.81–27.33 мг/мл в исходном испытуемом растворе. Предел количественного определения составил для гистидина около 0.01 мг/мл, для глицина — около 0.024 мг/мл. Повторяемость предлагаемой методики находится на высоком уровне, характерном для ВЭЖХ-методик — в пределах 2.0%.

Вклад авторов

П.А. Калмыков — идея новой методики, общая концепция работы, анализ и интерпретация экспериментальных данных, написание текста статьи.

Т.П. Кустова — общая концепция работы, анализ литературы по теме исследования, анализ и интерпретация экспериментальных данных, написание текста статьи.

С.О. Кустов — экспериментальные исследования, участие в написании текста статьи.

П.С. Шестаковская — экспериментальные исследования, участие в написании текста статьи.

Т.Р. Азметов — экспериментальные исследования, участие в написании текста статьи.

А.А. Калмыкова — экспериментальные исследования, участие в написании текста статьи.

Authors' contributions

P.A. Kalmykov — idea of a new method, concept of the study, analysis and interpretation of experimental data, and writing of the text of the article.

T.P. Kustova — concept of the study, analysis of literature on the research topic, analysis and interpretation of experimental data, and writing of the text of the article.

S.O. Kustov — experimental studies, and participation in writing of the text of the article.

P.S. Shestakovskaya — experimental studies and participation in writing of the text of the article.

T.R. Azmetov — experimental studies and participation in writing of the text of the article.

A.A. Kalmykova — experimental studies and participation in writing of the text of the article.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сломинский П.А., Шадрина М.И. Пептидные лекарственные средства: возможности, перспективы и ограничения. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018;36(1):8–14. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-1-8-14>
2. Wahl O., Holzgrabe U. Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. *Talanta*. 2016;154:150–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.071>
3. Nwachukwu I.D., Aluko R.E. A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chem.* 2019;270:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.054>
4. Lamp A., Kaltschmitt M., Lüdtke O. Improved HPLC-method for estimation and correction of amino acid losses during hydrolysis of unknown samples. *Anal. Biochem.* 2018;543:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.009>
5. Полунин К.Е., Федоткина О.С., Полунина И.А., Буряк А.К. Моделирование хроматографического поведения антибактериальных пептидов в условиях ОФ ВЭЖХ. *Журн. физ. химии*. 2022;96(6):895–903. <https://doi.org/10.31857/S004445372206019X>
6. Кочетова Л.Б., Кустова Т.П., Курицын Л.В. Реакционная способность α -аминокислот при взаимодействии со сложными эфирами в системе вода – 1,4-диоксан. *Журн. общей химии*. 2018;88(1):84–89.
7. Кустова Т.П., Кочетова Л.Б. Кинетика и механизм сульфонилования α -аминокислот и дипептидов. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2019;4:809–816.
8. Кустова Т.П., Кочетова Л.Б., Хачатрян Д.С. Сравнительная реакционная способность в ацилировании дипептидов на основе тирозина и пролина. *Журн. орг. химии*. 2022;58(4):422–429. <https://doi.org/10.31857/S0514749222040073>
9. Захарова А.М., Гринштейн И.Л., Карцова Л.А. Определение аминокислот в сухом экстракте мозга коров, пробах мяса телят и кур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2012;12(6):845–853.
10. Тарасова И.С. Иннонафактор – первый отечественный рекомбинантный фактор свертывания крови IX. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2015;14(5):70–75. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2015-14-3-70-75>
11. Тутельян В.А., Эллер К.И. (ред.). *Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи*. М.: Династия; 2010. 180 с. ISBN 978-5-98125-073-6

REFERENCES

1. Slominsky P.A., Shadrina M.I. Peptide Pharmaceuticals: Opportunities, Prospects and Limitations. *Mol. Genet., Microbiol. Virol.* 2018;33(1):8–14. <https://doi.org/10.3103/S0891416818010123> [Original Russian Text: Slominsky P.A., Shadrina M.I. Peptide Pharmaceuticals: Opportunities, Prospects and Limitations. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2018;36(1):8–14 (in Russ.). <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-1-8-14>]
2. Wahl O., Holzgrabe U. Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. *Talanta*. 2016;154:150–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.071>
3. Nwachukwu I.D., Aluko R.E. A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chem.* 2019;270:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.054>
4. Lamp A., Kaltschmitt M., Lüdtke O. Improved HPLC-method for estimation and correction of amino acid losses during hydrolysis of unknown samples. *Anal. Biochem.* 2018;543:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.009>
5. Polunin K.E., Fedotkina O.S., Polunina I.A., et al. Modeling the chromatographic behavior of antibacterial peptides under conditions of RP HPLS. *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2022;96(6):1314–1321. <https://doi.org/10.1134/S0036024422060188> [Original Russian Text: Polunin K.E., Fedotkina O.S., Polunina I.A., Buryak A.K. Modeling the chromatographic behavior of antibacterial peptides under conditions of RP HPLS. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*. 2022;96(6):895–903 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S004445372206019X>]
6. Kochetova L.B., Kustova T.P., Kuritsyn L.V. Reactivity of α -amino acids in the reaction with esters in aqueous–1,4-dioxane media. *Russ. J. Gen. Chem.* 2018;88(1):80–85. <https://doi.org/10.1134/S1070363218010127> [Original Russian Text: Kochetova L.B., Kustova T.P., Kuritsyn L.V. Reactivity of α -amino acids in the reaction with esters in aqueous–1,4-dioxane media. *Zhurnal Obshchei Khimii*. 2018;88(1):84–89 (in Russ.).]
7. Kustova T.P., Kochetova L.B. Kinetics and mechanism of sulfonylation of α -amino acids and dipeptides. *Russ. Chem. Bull.* 2019;68(4):809–816. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2489-0> [Original Russian Text: Kustova T.P., Kochetova L.B. Kinetics and mechanism of sulfonylation of α -amino acids and dipeptides. *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya khimicheskaya*. 2019;4:809–816 (in Russ.).]
8. Kustova T.P., Kochetova L.B., Khachatryan D.S. Comparison of the reactivities of tyrosine–proline-based dipeptides toward acylation with nitrophenyl benzoates. *Russ. J. Org. Chem.* 2022;58(4):512–517. <https://doi.org/10.1134/S1070428022040078> [Original Russian Text: Kustova T.P., Kochetova L.B., Khachatryan D.S. Comparison of the reactivities of tyrosine–proline-based dipeptides toward acylation with nitrophenyl benzoates. *Zhurnal Organicheskoi Khimii*. 2022;58(4):422–429 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0514749222040073>]
9. Zakharova A.M., Grinshteyn I.L., Kartsova L.A. Determination of amino acids in dry extract of cow brain, meat samples of cow and chicken. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy = Sorption and Chromatography Processes*. 2012;12(6):845–853 (in Russ.).

10. Tarasova I.S. Innonafactor: The first Russian recombinant factor IX. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. 2015;14(5):70–75 (in Russ.). <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2015-14-3-70-75>
11. Tutel'yan V.A., Eller K.I. (Eds.). *Metody analiza minornykh biologicheskii aktivnykh veshchestv pishchi (Methods for Analyzing Minor Biologically Active Substances in Food)*. Moscow: Dinastiya; 2010. 180 p. (in Russ.). ISBN 978-5-98125-073-6

Об авторах

Калмыков Павел Алексеевич, к.х.н., ведущий специалист группы переноса и валидации аналитических методик, АО «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: p.kalmykov@generium.ru. Scopus Author ID 55502543100, ResearcherID M-8148-2014, <https://orcid.org/0000-0003-1358-0334>

Кустова Татьяна Петровна, д.х.н., профессор, директор Института математики, информационных технологий и естественных наук; заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной химии, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет» (153025, Россия, г. Иваново, ул. Ермака, д. 39). E-mail: kustovatp@ivanovo.ac.ru. Scopus Author ID 6603679916, ResearcherID F-9318-2013, SPIN-код РИНЦ 1331-5782, <https://orcid.org/0000-0001-5683-6470>

Кустов Станислав Олегович, студент, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет» (153025, Россия, г. Иваново, ул. Ермака, д. 39); стажер группы переноса и валидации аналитических методик, АО «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: stanislaskustov@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0008-8698-3429>

Шестаковская Полина Сергеевна, студент, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет» (153025, Россия, г. Иваново, ул. Ермака, д. 39); специалист по документации группы переноса и валидации аналитических методик, АО «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: p.shestakovskaya@generium.ru. <https://orcid.org/0009-0008-0453-6335>

Азметов Тимур Рустемович, химик группы переноса и валидации аналитических методик, АО «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: t.azmetov@generium.ru. <https://orcid.org/0009-0002-7666-9870>

Калмыкова Алёна Александровна, старший биохимик группы переноса и валидации аналитических методик, АО «Генериум» (601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д. 14). E-mail: a.kalmykova@generium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-9452-7879>

About the authors

Pavel A. Kalmykov, Cand. Sci. (Chem.), Leading Specialist, Group for Transfer and Validation of Analytical Methods, Generium (14, Vladimirskaia ul., Volginskii, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: p.kalmykov@generium.ru. Scopus Author ID 55502543100, ResearcherID M-8148-2014, <https://orcid.org/0000-0003-1358-0334>

Tatyana P. Kustova, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Director of the Institute of Mathematics, Information Technologies and Natural Sciences; Head of the Department of Fundamental and Applied Chemistry, Ivanovo State University (39, Yermaka ul., Ivanovo, 153025, Russia). E-mail: kustovatp@ivanovo.ac.ru. Scopus Author ID 6603679916, ResearcherID F-9318-2013, RSCI SPIN-code 1331-5782, <https://orcid.org/0000-0001-5683-6470>

Stanislav O. Kustov, Student, Ivanovo State University (39, Yermaka ul., Ivanovo, 153025, Russia); Intern, Group for Transfer and Validation of Analytical Methods, Generium (14, Vladimirskaia ul., Volginskii, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: stanislaskustov@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0008-8698-3429>

Polina S. Shestakovskaya, Student, Ivanovo State University (39, Yermaka ul., Ivanovo, 153025, Russia); Documentation Specialist, Group for Transfer and Validation of Analytical Methods, Generium (14, Vladimirskaia ul., Volginskii, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: p.shestakovskaya@generium.ru. <https://orcid.org/0009-0008-0453-6335>

Timur R. Azmetov, Chemist, Group for Transfer and Validation of Analytical Methods, Generium (14, Vladimirskaia ul., Volginskii, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: t.azmetov@generium.ru. <https://orcid.org/0009-0002-7666-9870>

Alyona A. Kalmykova, Senior Biochemist, Group for Transfer and Validation of Analytical Methods, Generium (14, Vladimirskaia ul., Volginskii, Vladimir oblast, 601125, Russia). E-mail: a.kalmykova@generium.ru. <https://orcid.org/0000-0002-9452-7879>