

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

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ “ГЛАТИРАМЕРА АЦЕТАТ” МЕТОДОМ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8; e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

Модифицирована процедура кислотного гидролиза глатирамера ацетата и определены характеристичные сигналы в спектрах ^1H и ^{13}C , позволяющие оценивать его аминокислотный состав. Показано, что величины относительного молярного содержания аминокислот, входящих в состав глатирамера ацетата, измеренные методами ВЭЖХ-МС, ^{13}C и ^1H ЯМР, имеют близкие значения. Установлено, что ^{13}C ЯМР является более прецизионным методом количественной оценки аминокислотного состава глатирамера ацетата по сравнению с методом ^1H ЯМР.

Ключевые слова: глатирамера ацетат; аминокислотный состав; кислотный гидролиз; ЯМР спектроскопия.

Глатирамера ацетат (ГА) относится к базовым препаратам терапии ремиттирующего рассеянного склероза [1]. Он представляет собой смесь ацетатных солей синтетических сополимеров L-аланина (L-Ala), L-лизина (L-Lys), L-глутаминовой кислоты (L-Glu) и L-тирозина (L-Tyr), не имеющих одинаковой аминокислотной последовательности (рис. 1), со средней молекулярной массой 5 – 9 кДа. Не являясь по определению единой молекулой как таковой, ГА характеризуется воспроизводимым составом комплекса аминокислотных последовательностей: молярное процентное содержание каждой аминокислоты составляет 13 – 15, 39 – 46, 8,6 – 10, 30 – 37 % для L-Glu, L-Ala, L-Tyr и L-Lys соответственно. Аминокислотный состав ГА зависит от оригинального процесса производства. Даже незначительные изменения в условиях технологического процесса приводят к образованию конечного продукта с иным аминокислотным составом и, как следствие, с иными биологическими свойствами, другой терапевтической эффективностью, другим спектром побочного действия и переносимостью [2]. Поэтому анализ аминокислотного состава является важным этапом контроля качества фармацевтических субстанций ГА.

В рамках методики, применяемой в фармакопейном анализе, определение относительного молярного содержания аминокислотных остатков в субстанции ГА проводят методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС), используя продукт полного гидролиза ГА. Хроматографические методы количественного анализа являются относительными, так как они используют образцы сравнения для построения градуировочной функции между измеряемой величиной (площадью пика хроматограммы) и количественной характеристикой анализируемого вещества. Неопределенность результата измерения относительным методом включает в себя неопределенности, связанные с приготовлением растворов испытуемого образца и об-

разцов сравнения, с построением градуировочной функции. Поэтому актуальна разработка методики определения аминокислотного состава ГА на основе абсолютного метода измерения мольного отношения анализируемых компонентов смеси. К таким методам относится метод ЯМР спектроскопии, для которого суммарная неопределенность измерения мольного отношения анализируемых компонентов смеси определяется исключительно неопределенностью этапа определения измеряемой величины [3, 4]. Цель данного исследования — разработать не требующую использования фармакопейных стандартных образцов методику определения аминокислотного состава фармацевтических субстанций ГА методом ЯМР спектроскопии.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали образцы лекарственных субстанций “глатирамера ацетат” I и II производства Teva, Израиль, модельные смеси с мольным соотношением аминокислот L-Glu — L-Ala — L-Tyr — L-Lys 0,154:0,451:0,093:0,301 (III); 0,124:0,535:0,059:0,282 (IV) и 0,199:0,480:0,091:0,231 (V). Модельные смеси готовили из фармакопейных стандартных образцов (USP reference standard) гидрохлорида L-Glu (кат. № 1294987), гидрохлорида L-Lys (кат. № 1372005), L-Tyr (кат. № 1705006), L-Ala (кат. № 1012509). Модельные смеси растворяли в 0,5 мл 5 % раствора фенола (Sigma-Aldrich, кат. № P5566) в D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., кат. № DLM-4-99.9-1000) и доводили pH растворов соляной кислотой до 2. Фенол использовали в качестве водорастворимого стандарта для калибровки шкалы химических сдвигов для спектров ЯМР ^1H и ^{13}C .

Методика определения аминокислотного состава методом ВЭЖХ-МС (референсная). Гидролиз ГА проводили, растворяя 10 мг субстанции (точная навеска) в 5 мл 6 М раствора HCl и нагревая реакционную смесь при температуре 105 °C в течение 1 сут [5]. Оп-

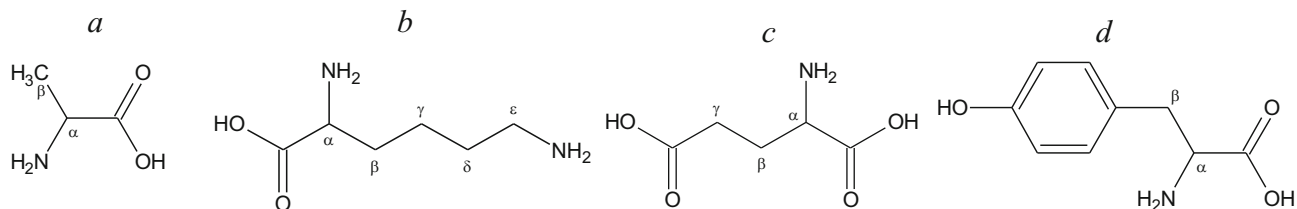


Рис. 1. Аминокислоты, входящие в состав ГА: L-Ala (a); L-Lys (b); L-Glu (c); L-Tyr (d).

ределение аминокислотного состава модельных смесей аминокислот и продуктов гидролиза субстанций ГА проводили с использованием жидкостного хроматографа с масс-детектором Waters Acquity QToF на капиллярной колонке Sielc (подвижная фаза — смесь воды, ацетонитрила и трифторуксусной кислоты в соотношении 70:30:0,25; скорость потока — 0,5 мл/мин; температура колонки — 30 °С; температура пробоотборника — 20 °С; время хроматографирования — 12 мин; объем вводимой пробы — 7,5 мкл; способ ионизации — электрораспыление). Регистрацию масс-спектров проводили в режиме мониторинга избранных положительных ионов: 148 (L-Glu), 90 (L-Ala), 182 (L-Tyr), 147 (L-Lys · HCl).

Методика определения аминокислотного состава методом ЯМР (альтернативная). Гидролиз ГА проводили в реакционной виале емкостью 1 мл. 10 мг субстанции ГА (точная навеска не обязательна) растворяли в 0,1 мл концентрированной HCl (Sigma-Aldrich). Раствор нагревали при 105 °С в течение 5 ч, охлаждали до комнатной температуры, затем удаляли избыток HCl под вакуумом. Остаток растворяли в 0,5 мл 5 % раствора фенола в D₂O. Регистрацию спектров ¹H и ¹³C исследуемых образцов проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) при температуре 27 °С (угол поворота намагниченности 45°, время релаксации 25 с (¹H) и 1 с (¹³C), число накоплений 128 (¹H) и 10000 (¹³C), число точек аналого-цифрового преобразования 64к, экспоненциальное умножение 0,3 Гц (¹H) и 1 Гц (¹³C), автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная

настройка фазы). Химические сдвиги измеряли относительно внутреннего стандарта — фенола (δ, м.д.: ¹H 7,00, τ; ¹³C 123,29 для *n*-СН соответственно). Структурную интерпретацию спектров ¹H и ¹³C осуществляли с учетом значений химических сдвигов сигналов, их мультиплетности и данных 2D экспериментов (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBSC). Относительное мольное содержание аминокислоты в исследуемом образце (*X_i*) определяли как долю компонента в смеси *i* компонентов по формуле: $X_{i, \text{мол}} = S'_i / \sum S'_i$, где *S'_i* — измеренное значение нормированных интегральных интенсивностей сигналов этих компонентов [3, 6]. Алгоритм прецизионного интегрирования описан в работе [7]. Для каждого образца рассчитывали 3 значения аминокислотного состава, варьируя настройку фазы сигналов и корректировку базовой линии Фурье-преобразованного спектра, так как эти процедуры вносят максимальный вклад в неопределенность результата количественного измерения методом ЯМР спектроскопии [3, 4, 7]. Итоговые величины определяли как среднее арифметическое измеренных значений.

Таблица 2
Сравнение аминокислотного состава субстанций ГА и модельных смесей, измеренного методами ВЭЖХ-МС, ¹H и ¹³C ЯМР

Аминокислота	Образец	ВЭЖХ-МС, мол. доля	ЯМР ¹³ C, мол. доля	δ, %	ЯМР ¹ H, мол. доля	δ*, %
L-Glu	I	0,141	0,135	4,3	0,135	4,3
	II	0,150	0,148	1,3	0,143	4,7
	III	0,154	0,152	1,3	0,146	5,2
	IV	0,124	0,127	2,4	0,132	6,5
	V	0,199	0,199	0,0	0,192	3,5
L-Ala	I	0,398	0,412	3,5	0,446	12,1
	II	0,405	0,419	3,5	0,415	2,5
	III	0,451	0,455	0,9	0,481	6,7
	IV	0,535	0,555	3,7	0,556	3,9
	V	0,480	0,473	1,5	0,507	5,6
L-Tyr	I	0,095	0,091	4,2	0,090	5,3
	II	0,099	0,094	5,1	0,095	4,0
	III	0,093	0,095	2,2	0,098	5,4
	IV	0,059	0,059	0,0	0,056	5,1
	V	0,091	0,097	6,6	0,098	7,7
L-Lys	I	0,366	0,362	1,1	0,330	9,8
	II	0,335	0,338	0,9	0,347	3,6
	III	0,301	0,299	0,7	0,277	8,0
	IV	0,282	0,259	8,2	0,256	9,2
	V	0,241	0,230	4,6	0,203	15,8

* δ = |(C_{ВЭЖХ-МС}-C_{ЯМР})/C_{ВЭЖХ-МС}| · 100 %.

Таблица 1
Характеристичные сигналы аминокислот, входящих в состав ГА

Аминокислота	Характеристичные сигналы, δ, м.д.
L-Tyr	¹ H: 7,23 (д, J 8,5 Гц, 2H, Ar), 4,36 (дд, J 5,7 и 7,4 Гц, 1H, α-CH), 3,30 (дд, J 14,8 и 5,7 Гц, 1H, β-CH ₂), 3,20 (дд, J 14,8 и 7,4 Гц, 1H, β-CH ₂), ¹³ C: 56,79 (α-CH)
L-Glu	2,30 (м, 1H, β-CH ₂), 2,24 (м, 1H, β-CH ₂), 2,68 (м, 2H, γ-CH ₂), ¹³ C: 54,69 (α-CH)
L-Lys	2,06 (м, 1H, β-CH ₂), 1,99 (м, 1H, β-CH ₂), 1,76 (м, 2H, δ-CH ₂), 3,06 (т, J 7,3 Гц, 2H, ε-CH ₂) ¹³ C: 55,26 (α-CH)
L-Ala	¹³ C: 51,36 (α-CH)

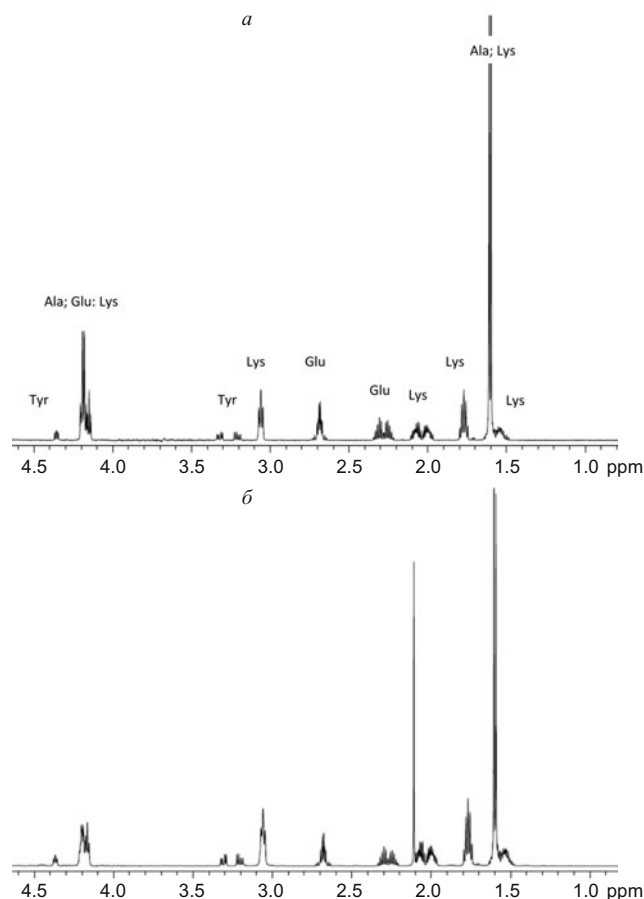


Рис. 2. Спектры ЯМР ^1H в области 0 – 5 м.д. модельной смеси L-Ala; L-Glu; L-Tyr; L-Lys (а) и ГА (б).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе разработки альтернативной методики определения аминокислотного состава ГА методом ЯМР спектроскопии была модифицирована процедура его кислотного гидролиза. Традиционно разрыв пептидных связей ГА проводят в мягких условиях (действие 6 М раствором HCl в течение 1 сут). Так как ГА не содержит триптофан, серин, треонин и цистеин, которые полностью или частично разрушаются при нагревании с концентрированными минеральными кислотами [8], мы проводили кислотный гидролиз в более жестких условиях. Использование концентрированной HCl позволило существенно ускорить данную процедуру, не меняя температурный режим (24 и 5 ч в рамках традиционной и альтернативной методик соответственно). Спектры ^1H и ^{13}C продуктов гидролиза субстанций ГА полностью идентичны спектрам модельных смесей из свободных L-Ala, L-Glu, L-Lys, L-Tyr (рис. 2, 3), что свидетельствует о полноте проведенного гидролиза, который не сопровождается деструкцией аминокислот.

В протонном спектре ГА присутствует ряд характеристичных сигналов аминокислот, которые не перекрываются с другими сигналами и могут быть использованы для определения их относительного содержания (табл. 1, рис. 2). На практике следует усреднять

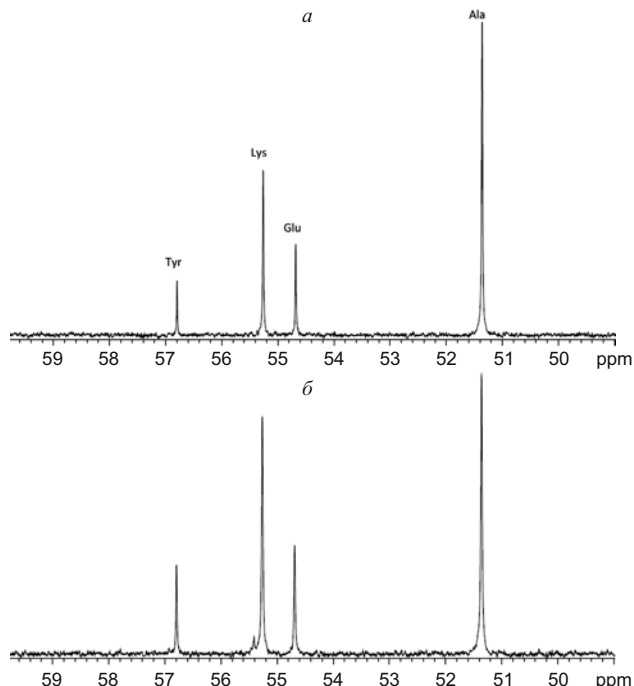


Рис. 3. Спектры ЯМР ^{13}C в области 49 – 60 м.д. модельной смеси L-Ala; L-Glu; L-Tyr; L-Lys (а) и ГА (б).

нормированные интегральные интенсивности характеристичных сигналов каждой аминокислоты. Если в образце присутствуют примеси, сигналы которых налагаются на какой-либо из характеристичных сигналов, то данный сигнал не учитывают при интегрировании. Следует отметить, что ^1H спектр не содержит характеристичных сигналов L-Ala: сигнал $\alpha\text{-CH}$ группы (4,17 м.д., кв) полностью или частично перекрывается с сигналами $\alpha\text{-CH}$ групп L-Glu (4,16 м.д., т) и L-Lys (4,13 м.д., т); сигнал метильной группы (1,59 м.д., д) полностью перекрывается сигналом $\gamma\text{-CH}_2$ группы L-Lys (1,58 м.д., м). Следовательно, возможно только косвенное определение относительного содержания L-Ala в составе ГА методом ^1H ЯМР. Одним способом значение нормированной интегральной интенсивности сигналов L-Ala получают вычитанием из интегральной интенсивности сигнала в области 4,09 – 4,22 м.д. нормированных интегральных интенсивностей L-Lys и L-Glu; другим — вычитанием из интегральной интенсивности сигнала в области 1,45 – 1,64 м.д. интегральной интенсивности сигналов CH_2 групп L-Lys с последующей нормировкой на 3.

Характерная особенность спектров ^{13}C заключается в том, что пропорциональная числу атомов интегральная интенсивность наблюдается только у однотипных атомов C углеводородных фрагментов. Это объясняется тем, что атомы углерода, связанные с одинаковым числом протонов, имеют одинаковый коэффициент усиления сигнала вследствие ядерного эффекта Оверхаузера и незначительные различия во временах релаксации ($T_1 = 1 \div 20$ с для углеродных атомов, связанных с протонами в группах CH, CH_2 и CH_3 [9]). Четвертичные же атомы сильно различаются по временам релаксации (значения T_1 для них лежат в пределах

20 – 100 с) и, как следствие, по интенсивности соответствующих сигналов. Поэтому сигналы четвертичных атомов углерода некорректно использовать при количественных измерениях. В случае ГА характеристичными сигналами, позволяющими оценить относительное содержание каждой аминокислоты, являются сигналы α -СН-групп (табл. 1, рис. 3).

Результаты количественной оценки относительного содержания аминокислот в модельных смесях и продуктах гидролиза субстанций ГА, полученные методами ВЭЖХ-МС, ^1H и ^{13}C спектроскопии, представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что величины относительного молярного содержания аминокислот, измеренные методами ЯМР и ВЭЖХ-МС, имеют близкие значения. При этом ^{13}C ЯМР является более прецизионным методом количественной оценки аминокислотного состава ГА по сравнению с методом ^1H ЯМР: средние значения относительных погрешностей измеренных количеств L-Glu, L-Ala, L-Tyr и L-Lys составляют 1,9; 2,2; 3,6; 3,1 % для ^{13}C и 4,8; 6,2; 5,5; 9,3 % для ^1H соответственно. Это обусловлено тем, что в условиях широкополосной развязки от протонов сигналы ядер ^{13}C имеют меньшую ширину, чем резонансные линии протонов. Как следствие, в спектрах ^{13}C меньше вероятность перекрытия сигналов основных и примесных компонентов по сравнению со спектром ^1H . Кроме того, сигналы примесных соединений могут вообще не проявляться в спектре ^{13}C из-за низкой чувствительности этого метода.

Таким образом, разработана методика количественного определения аминокислотного состава ГА методом ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C . Выбор типа ядра определяется задачами, стоящими перед исследователем. Для предварительной экспрессной оценки аминокислотного состава ГА рекомендуем использовать метод ^1H ЯМР. Применение метода ^{13}C ЯМР позволяет получить более точные результаты, хотя и требует больших временных затрат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. Е. Шмидт, *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*, **8**(4), 77 – 80 (2016).
2. Г. Я. Шварц, Г. В. Раменская, *Хим.-фарм. журн.*, **46**(11), 24 – 29 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(11), 656 – 660 (2012).
3. Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. А. Яшкир и др., *Стандартные образцы*, № 2, 19 – 25 (2014).
4. F. Malz and H. Jancke, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 813 – 823 (2005).
5. Патент России 2388764 С2, *Бюл. изобрет.*, 13 (2010).
6. ОФС 1.2.1.1.0007.15 “Спектроскопия ядерного магнитного резонанса”, ГФ РФ XIII изд., Т. 1, Москва (2015).
7. Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов и др., *Ж. аналит. химии*, **69**(11), 1152 – 1160 (2014); N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev, V. I. Krylov, et al., *J. Anal. Chem.*, **69**(11), 1052 – 1060 (2014).
8. С. Е. Северин, Г. А. Соловьева (ред.), *Практикум по биохимии: Учебное пособие*, Изд-во МГУ, Москва (1989).
9. Х. Гюнтер, *Введение в курс спектроскопии ЯМР*, Пер. с англ., Мир, Москва (1984), с. 412.

Поступила 12.01.17

DEVELOPMENT OF A PROCEDURE FOR DETERMINING THE AMINO ACID COMPOSITION OF GLATIRAMER ACETATE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE BY NMR SPECTROSCOPY

N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev*, V. I. Krylov, A. A. Kutin, V. A. Yashkir, and V. A. Merkulov

Scientific Center for Expertise of Medical Application Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, 127051 Moscow, Russia

* e-mail: MoiseevSV@expmed.ru

A modified procedure for the acid hydrolysis of glatiramer acetate has been developed and characteristic signals in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of this compound have been identified that allow its amino acid composition to be evaluated. It is established that the relative molar content of amino acids in glatiramer acetate, as measured by HPLC-MS, ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectroscopy, have similar values. It is concluded that ^{13}C NMR is more precise method for the amino acid composition quantification in glatiramer acetate in comparison to ^1H NMR.

Keywords: glatiramer acetate; amino acid composition; acid hydrolysis; NMR spectroscopy.