

Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии

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

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

Статья поступила 29.03.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: Описана процедура валидации методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии, которая позволяет измерять мольное отношение аминокислот, входящих в состав глатирамера ацетата, без использования соответствующих стандартных образцов. Проведена оценка правильности, линейности, сходимости, внутрилабораторной прецизионности, и специфичности валидируемой методики. На основе измеренных коэффициентов «найденно : введено» для L-Glu, L-Ala, L-Tyr и L-Lys были рассчитаны систематические погрешности, стандартные отклонения, доверительные интервалы, коэффициенты вариации, F-критерии Фишера и t-критерии Стьюдента результатов измерения мольного отношения аминокислот. Показано, что полученные статистические характеристики удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров, представленным в отечественной и зарубежной нормативной документации.

Ключевые слова: глатирамера ацетат; метод ^{13}C ЯМР-спектроскопии; аминокислотный состав; валидация аналитической методики; линейность; правильность; сходимость; прецизионность.

Библиографическое описание: Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Жуков ЕА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 175–181.

Глатирамера ацетат (ГА) является одним из базовых препаратов терапии ремиттирующего рассеянного склероза [1] и представляет собой смесь ацетатных солей, не имеющих одинаковой аминокислотной последовательности, синтетических сополимеров L-тирозина (L-Tyr), L-лизина (L-Lys), L-аланина (L-Ala) и L-глутаминовой кислоты (L-Glu) со средней молекулярной массой 5–9 кДа. 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.

Важным этапом контроля качества фармацевтических субстанций ГА является анализ его аминокислотного состава. В рамках применяемой в фармакопейном анализе методики определение относительного молярного содержания аминокислотных остатков в субстанции ГА проводят методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС), используя продукт полного гидролиза ГА и набор стандартных образцов аминокислот, входящих в его состав. Нами была разработана методика количественного определения аминокислотного состава ГА методом ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , которая характеризуется меньшими трудовыми и временными затратами, чем фармакопейная методика [2]. Метод ЯМР-спектроскопии является абсолютным методом измерения мольного отношения анализируемых компонентов смеси и не нуждается в использовании стандартных образцов и построении градуировочной функции [3, 4].

Цель данной работы – валидация разработанной методики для ее применения в фармакопейном анализе при контроле качества субстанций ГА по показателю «аминокислотный состав». Мы ограничились ЯМР-спектроскопией на ядрах ^{13}C , так как она характеризуется большей селективностью: в спектрах ^{13}C меньше вероятность перекрывания сигналов основных и примесных компонентов по сравнению со спектром ^1H .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Валидацию методики проводили на образцах лекарственных субстанций «Глатирамера ацетат» производства «Teva», Израиль, серии 242900515 (I), 242965714 (II) и модельных смесях III–VI с мольным процентным соотношением аминокислот L-Glu:L-Ala:L-Tyr:L-Lys 14,1:39,8:9,5:36,6 (I); 15,0:40,5:9,9:33,5 (II); 15,4:45,1:9,3:30,1 (III); 12,4:53,5:5,9:28,2 (IV); 19,9:48,0:9,1:23,1 (V); 16,4:52,5:8,5:22,9 (VI) и 10,2:34,14:10,73:44,92 (VII). Мольное процентное соотношение аминокислот в модельных смесях подбирали с учетом требований к диапазону применения методик количественного определения активного компонента субстанции или готового лекарственного препарата [5–7] (80±120 % от номинального содержания аминокислоты в ГА). 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») в D_2O («Cambridge Isotope Laboratories, Inc.») и доводили pH растворов соляной кислотой до двух. Регистрацию спектров ^{13}C исследуемых образцов проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США).

Расчетный спектр ^{13}C смеси продуктов гидролиза ГА и родственных примесных соединений смоделирован с использованием программного обеспечения ACD/Lab Release 2012 (лиценз. № 55576).

Валидируемая методика

Гидролиз ГА проводят в реакционной виае емкостью 1 мл. 10 мг субстанции ГА (точная навеска не обязательна) растворяют в 0,1 мл концентрированной HCl («Sigma-Aldrich»). Раствор нагревают при 105 °C в течение 5 часов, охлаждают до комнатной температуры, затем удаляют избыток HCl под вакуумом. Остаток растворяют в 0,5 мл 5 % раствора фенола в D_2O . Спектры ^{13}C регистрируют при температуре 27 °C (угол поворота намагниченности 45 °, время релаксации 1 с, число накоплений 10000, число точек аналого-цифрового преобразования 64 к, экспоненциальное умножение 1 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы). Калибровку шкалы химических сдвигов осуществляют относительно внутреннего стандарта — фенола (δ , м.д.: 123,29 для p-CH). Измеряют нормированные интегральные интенсивности (S'_i) сигналов α -CH-групп аминокислот: 51,36 (L-Ala), 54,69 (L-Glu), 55,26 (L-Lys), 56,79 м.д. (L-Tyr). Нормировку проводят, принимая суммарную интегральную интенсивность сигналов α -CH-групп аминокислот за 100 %. Относительное молярное содержание аминокислоты в исследуемом образце (X_i) равно измеренной нормированной интегральной интенсивности сигнала ее α -CH-группы. В рамках одного эксперимента рассчитывают три значения аминокислотного состава, варьируя настройку фазы сигналов и корректировку базовой линии Фурье-преобразованного спектра. Итоговые величины определяют как среднее арифметическое измеренных значений.

В качестве референтной использовали методику определения аминокислотного состава ГА методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии [2]. Определение 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 °C; температура пробоотборника — 20 °C; время хроматографирования — 12 мин; объем вводимой пробы — 10 мкл; способ ионизации — распыление в электрическом поле). Регистрацию масс-спектров проводили в режиме мониторинга избранных положительных ионов: 148 (L-Glu), 90 (L-Ala), 182 (L-Tyr), 147 (L-Lys, HCl).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ЯМР-спектроскопии проводили согласно требованиям отечественных и зарубежных руководств по валидации методик анализа

[5–8]. Робастность была изучена при разработке методики [2]. В процессе валидации проведена оценка следующих валидационных параметров: диапазон применения, линейность, правильность, прецизионность, специфичность. Расчет статистических характеристик валидационных параметров проводили в соответствии с требованиями нормативных документов [9, 10]. Для оценки валидационных параметров в качестве истинных значений аминокислотного состава ГА и модельных смесей были использованы результаты, полученные с помощью референтной фармакопейной методики ВЭЖХ-МС.

Диапазон применения

Согласно литературным источникам [5–8], диапазон применения методики количественного определения активного компонента в лекарственной субстанции или готовом лекарственном препарате составляет 80÷120 % от предписанного нормативной документацией номинального содержания. Это требование невыполнимо применительно к отдельно взятой аминокислоте, так как функция концентрации, выраженная в молярных процентах, является зависимой от концентрации других компонентов. Невозможно изменить долю каждой из четырех аминокислот на ± 20 %, так как сумма долей всех аминокислот остается неизменной (100 %). Аминокислотный состав модельных смесей подобран таким образом, чтобы усредненный по четырем аминокислотам диапазон варьирования аминокислотного состава ($-28,8 \div +27,9$) превышает требуемые ± 20 % от номинального значения. За номинальное значение содержания для каждой аминокислоты принимали среднее значение допустимого диапазона варьирования молярных долей по спецификации. В рамках этого диапазона доказаны приемлемые линейность, правильность и прецизионность.

Линейность

При определении линейности изучали зависимость среднего значения измеряемой на ЯМР-спектрометре нормированной интегральной интенсивности сигнала S'_i α -CH группы аминокислоты от ее относительного молярного содержания (доли в смеси аминокислот) в валидируемых образцах. Усреднение проводили по трем измерениям. На основании полученных данных, представленных в таблице 1, были методом наименьших квадратов рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида $y = bx + a$, где y — среднее значение измеренной величины S'_i , x — значение относительного молярного содержания аминокислоты в валидируемом образце, полученное по референтной методике, остаточная сумма квадратов отклонений полученных значений от регрессионной прямой $S_{\text{ост}}$. График и уравнение регрессионной прямой приведены на рисунке 1. Критериями приемлемости линейной зависимости являются статистическая незначимость отрезка, отсекаемого на оси ординат (свободного члена a для рассчитанной регрессионной прямой) и коэффициент корреляции $r \geq 0,990$ [5–8]. Величина a характеризует систематическую погрешность и считается статистически незначимо отличающейся от нуля, если она не превышает свой доверительный интервал (Δ). Как следует из данных, приведенных в таблице 1, валидируемая

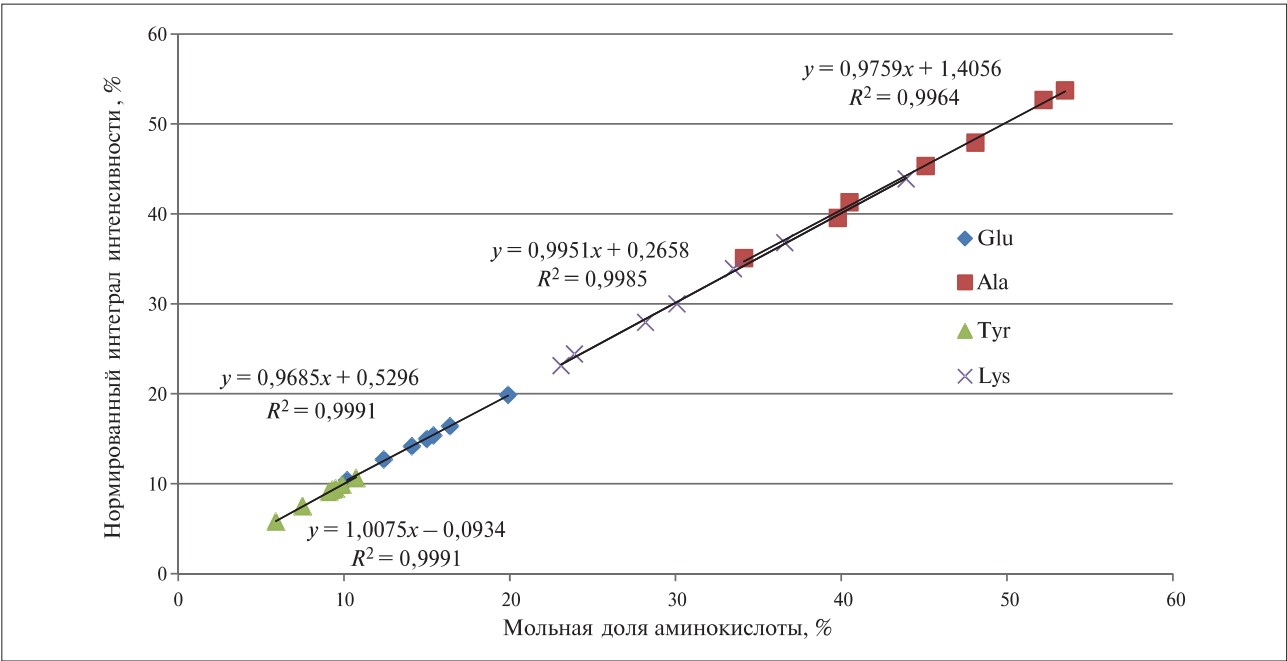


Рис. 1. График зависимости нормированной интегральной интенсивности сигналов от относительного молярного содержания аминокислот

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЛИНЕЙНОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Аминокислота	L-Glu		L-Ala		L-Tyr		L-Lys	
Образец	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %	Молярная доля, %	S, %
I	14,1	14,17	39,8	39,57	9,5	9,47	36,6	36,80
II	15,0	14,97	40,5	41,30	9,9	9,90	33,5	33,90
III	15,4	15,37	45,1	45,33	9,3	9,33	30,1	30,00
IV	12,4	12,70	53,5	53,73	5,9	5,80	28,2	27,93
V	19,9	19,87	48,0	47,93	9,1	9,10	23,1	23,13
VI	16,4	16,40	52,5	52,67	8,5	7,50	22,9	23,43
VII*	10,20	10,38	34,14	35,08	10,73	10,64	44,92	43,90
$\Delta (p = 95 \%)$	0,04÷1,02		-1,63÷4,45		-0,40÷0,22		-1,14÷1,67	
r	0,9996		0,9982		0,9996		0,9993	
S _{ост}	0,0455		1,0203		0,0142		0,4723	

* Данные гравиметрии

методика характеризуется приемлемой линейностью для четырех анализируемых аминокислот.

Правильность

Для оценки правильности валидируемой методики рассчитывали коэффициент извлечения — отношение «найдено : введено» (Z_i), для которого определяли стандартное отклонение (s), коэффициент вариации (RSD), доверительный интервал (Δ) и систематическую погрешность (δ) (табл. 2). Использовали критерии приемлемости правильности валидируемой методики, описанные в руководствах по валидации:

1) Δ должен включать 100 % значение коэффициента извлечения [6];

2) величина δ не должна превышать свой доверительный интервал (критерий статистической незначимости) [5].

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 2, оба требования выполняются, следовательно, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью для всех аминокислот, входящих в состав ГА.

Прецизионность

Прецизионность определяли на уровнях сходимости и внутрилабораторной прецизионности, которые оценивали по результатам трех определений для субстанции II, модельных смесей IV и V. Полученные результаты измерения отношения «найдено : введено» и их статистической обработки представлены в

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Образец	Молярное содержание, %											
	L-Glu			L-Ala			L-Tyr			L-Lys		
	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i
I	14,1	14,2	100,71	39,8	39,6	99,50	9,5	9,4	98,95	36,6	36,9	100,82
		14,1	100,00		39,5	99,25		9,4	98,95		36,9	100,82
		14,2	100,71		39,6	99,50		9,6	101,05		36,6	100,00
II	15,0	14,8	98,67	40,5	41,3	101,98	9,9	9,9	100,00	33,5	34,0	101,49
		15,2	101,33		41,2	101,73		9,9	100,00		33,8	100,90
		14,9	99,33		41,4	102,22		9,9	100,00		33,9	101,19
III	15,4	15,3	99,35	45,1	45,5	100,89	9,3	9,3	100,00	30,1	30,0	99,67
		15,3	99,35		45,3	100,44		9,3	100,00		30,1	100,00
		15,5	100,65		45,2	100,22		9,4	101,08		29,9	99,34
IV	12,4	12,7	102,42	53,5	52,8	98,69	5,9	5,7	96,61	28,2	28,3	100,36
		12,6	101,61		54,0	100,94		5,8	98,31		27,7	98,23
		12,8	103,23		54,4	101,68		5,9	100,00		27,8	98,58
V	19,9	19,8	99,50	48,0	47,6	99,17	9,1	9,0	98,90	23,1	23,0	99,57
		19,7	99,00		48,4	100,83		9,3	102,20		23,2	100,43
		20,1	101,01		47,8	99,58		9,0	98,90		23,2	100,43
VI	16,4	16,3	99,39	52,2	53,0	101,53	7,5	7,3	97,33	23,9	23,4	97,91
		16,5	100,61		52,5	100,58		7,5	100,00		23,5	98,33
		16,4	100,00		52,5	100,58		7,7	102,67		23,4	97,91
Статистическая характеристика												
Ср. Z , %	100,38			100,52			99,72			99,78		
δ , %	0,38			0,52			0,28			0,22		
s , %	1,32			1,06			1,51			1,16		
RSD, %	1,31			1,06			1,52			1,16		
Δ , %	100,38±0,72			100,52±0,53			99,72±0,75			99,78±0,58		

Таблица 3

ОЦЕНКА СХОДИМОСТИ И ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ

Оператор	Молярное содержание, %											
	L-Glu			L-Ala			L-Tyr			L-Lys		
	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i	Введено	Найдено	Z_i
I	15,0	14,8	98,67	40,5	41,3	101,98	9,9	9,9	100,00	33,5	34,0	101,49
		15,2	101,33		41,2	101,73		9,9	100,00		33,8	100,90
		14,9	99,33		41,4	102,22		9,9	100,00		33,9	101,19
	12,4	12,7	102,42	53,5	52,8	98,69	5,9	5,7	96,61	28,2	28,3	100,36
		12,6	101,61		54,0	100,94		5,8	98,31		27,7	98,23
		12,8	103,23		54,4	101,68		5,9	100,00		27,8	98,58
	19,9	19,8	99,50	48,0	47,6	99,17	9,1	9,0	98,90	23,1	23,0	99,57
		19,7	99,00		48,4	100,83		9,3	102,20		23,2	100,43
		20,1	101,01		47,8	99,58		9,0	98,90		23,2	100,43
II	15,0	15,1	100,67	40,5	41,6	102,72	9,9	9,6	96,97	33,5	33,8	100,90
		15,1	100,67		40,9	100,99		10,0	101,01		34,0	101,49
		14,9	99,33		40,5	100,00		10,1	102,02		34,6	103,28
	12,4	12,4	100,00	53,5	54,1	101,12	5,9	5,9	100,00	28,2	27,7	98,23
		12,4	100,00		54,0	100,94		6,0	101,70		27,6	97,87
		11,9	95,97		54,4	101,68		5,9	100,00		27,9	98,94
	19,9	20,3	102,01	48,0	47,6	99,17	9,1	9,1	100,00	23,1	22,9	99,13
		20,1	101,01		48,4	100,83		8,9	97,80		22,6	97,84
		20,2	101,51		47,8	99,58		9,1	100,00		22,9	99,13

Таблица 4

**СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СХОДИМОСТИ И ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ
ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ**

Аминокислота	L-Glu		L-Ala		L-Tyr		L-Lys	
Оператор	I	II	I	II	I	II	I	II
Средн. Z_i , %	100,67	100,13	100,65	100,78	99,44	99,94	100,13	99,65
s , %	1,62	1,76	1,08	1,08	1,53	1,66	1,13	1,86
RSD, %	1,61	1,76	1,07	1,08	1,54	1,66	1,13	1,87
Δ , %	$\pm 1,25$	$\pm 1,35$	$\pm 0,83$	$\pm 0,83$	$\pm 1,18$	$\pm 1,27$	$\pm 0,87$	$\pm 1,43$
Объедин. Z_i , %	100,40		100,72		99,69		99,89	
Объедин. s , %	1,67		1,05		1,57		1,51	
Объедин. RSD, %	1,66		1,04		1,57		1,51	
Объедин. Δ , %	$\pm 0,83$		$\pm 0,53$		$\pm 0,78$		$\pm 0,76$	
$F(F_{\text{табл}} = 3,44)$	1,18		1,01		1,17		2,73	
$t(t_{\text{табл}} = 2,12)$	0,69		0,15		0,68		0,67	

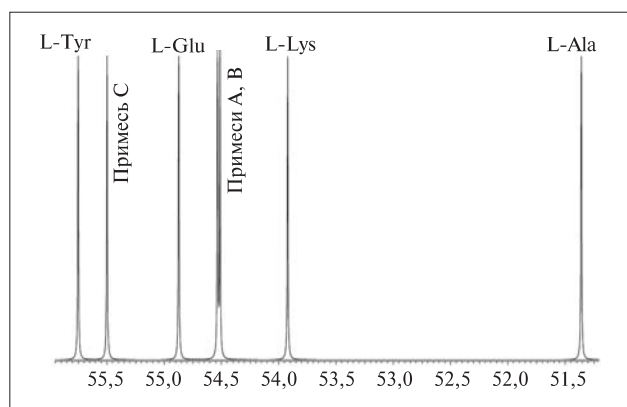


Рис. 2. Область спектра ^{13}C ЯМР, содержащая сигналы α -СН групп L-Ala, L-Tyr, L-Glu, L-Lys и примесных соединений 5-бензил-L-глутамата (А), N6-трифторацетил-L-лизина (В) и 3-Вг-тирозина (С)

таблицах 3 и 4. Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 4, рассчитанные величины RSD для сходимости и внутрилабораторной прецизионности не превышают приемлемый диапазон значений ($\leq 2\%$) [6]. В случае оценки приемлемости внутрилабораторной прецизионности нормативные и методические документы в сфере GMP [6, 7] рекомендуют рассчитывать статистические критерии Фишера (F) и Стьюдента (t) и сравнивать фактические значения $t_{\text{факт}}$ и $F_{\text{факт}}$ с табличными. Как следует из данных, приведенных в таблице 4, табличные значения F и t превосходят фактические значения, что свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений двух операторов при уровне значимости 95 %.

Специфичность

Для подтверждения специфичности валидируемой методики был смоделирован теоретический спектр ^{13}C раствора в D_2O смеси, содержащей аминокислотные остатки ГА и родственные им примеси (5-бензил-L-глутамат, N6-трифторацетил-L-лизин, 3-Вг-тирозин), которые могут присутствовать в субстанции ГА совместно с определяемыми аминокис-

лотами [11] (рис. 2). Как продемонстрировано на рисунке 2, не наблюдается перекрывания сигналов основных и примесных компонентов ГА. Следовательно, вещества, имеющие близкое строение с входящими в состав ГА аминокислотами, не мешают определять аминокислотный состав ГА.

Дополнительным подтверждением специфичности валидируемой методики является высокая степень близости между значениями аминокислотного состава ГА, полученными с использованием валидируемой методики и с использованием референтной методики, специфичность которой доказана [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика определения аминокислотного состава ГА методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии была валидирована по основным параметрам, поэтому она может быть использована в фармакопейном анализе при контроле качества фармацевтических субстанций «Глатирамера ацетат».

ЛИТЕРАТУРА

- Шмидт ТЕ. Глатирамера ацетат — препарат первого ряда с двойным действием для лечения ремиттирующего рассеянного склероза. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика 2016; 8(4): 77–80.
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Разработка методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ЯМР-спектроскопии. Химиико-фармацевтический журнал 2017; 51(3): 45–8.
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА, Осинцева ЕВ. Возможности использования метода ЯМР при аттестации стандартных образцов. Стандартные образцы 2014; (2): 19–25.
- Malz F, Jancke H. Validation of quantitative nuclear magnetic resonance. J Pharm Biomed Anal. 2005; 38(5): 813–23.
- 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.: Литтерра; 2008.
- Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
- Nuclear Magnetic Resonance. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 40 — NF 35. Rockville; 2016.

9. РМГ 61–2003 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Издательство стандартов; 2004.
10. ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. М.: Издательство стандартов; 2002.
11. Долитски Б-З. Способ получения смесей полипептидов с использованием очищенной бромистоводородной кислоты. Патент Российской Федерации, № 2388764 С2; 2010.

ОБ АВТОРАХ

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

Кузьмина Наталья Евгеньевна. Главный эксперт лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р хим. наук.

Моисеев Сергей Владимирович. Ведущий эксперт лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук, доцент.

Крылов Владислав Игоревич. Ведущий инженер лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Кутин Александр Аркадьевич. Эксперт 1-й категории лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Жуков Евгений Александрович. Лаборант лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

Яшкир Вадим Анатольевич. Начальник лаборатории нанолечств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук, доцент.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expro.ru

VALIDATION OF THE PROCEDURE FOR DETERMINATION OF AMINO ACIDS COMPOSITION OF GLATIRAMER ACETATE BY C-13 NMR SPECTROSCOPY

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

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article describes validation of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy. The procedure makes it possible to determine the molar ratio of amino acids present in glatiramer acetate with no need for a reference standard. The authors evaluated the accuracy, linearity, repeatability, intermediate precision and specificity of the validated procedure. The analysis of extraction factors for L-Glu, L-Ala, L-Tyr and L-Lys helped to calculate the systematic errors, standard deviations, confidence intervals, variation coefficients, confidence intervals, Fisher's test and Student's t-test for the results of amino acids molar ratio determination. It was shown that the obtained statistical data satisfy the acceptance criteria for validation parameters described in the national and foreign quality standards.

Key words: glatiramer acetate; C-13 NMR spectroscopy; amino acids composition; analytical procedure validation; linearity; accuracy; repeatability; precision.

For citation: Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Kutin AA, Zhukov EA, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(3): 175–181.

REFERENCES

1. Shmidt TE. Glatiramer acetate is a first-line dual-action drug for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics* 2016; 8(4): 77–80 (in Russian).
2. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Kutin AA, Yashkir VA, Merkulov VA. Development of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2017; 51(3): 45–8 (in Russian).
3. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Yashkir VA, Osintseva EV. The possibility of the nuclear magnetic resonance methods using for reference standards certification. *Reference materials* 2014; (2): 19–25 (in Russian).
4. Malz F, Jancke H. Validation of quantitative nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(5): 813–23.
5. Yurgel NV, ed. Guideline for Analytical Methods Validation for Drugs. *Methodological Recommendations*. Moscow: Sport i Kul'tura-2000; 2007 (in Russian).
6. Beregovykh VV, ed. Validation of analytical methods by drug manufacturers. Guiding principles for drug manufacturers. Moscow: Litterra; 2008 (in Russian).
7. General monograph 1.1.0012.15. Validation of analytical procedures. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. I. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
8. Nuclear Magnetic Resonance. United States Pharmacopoeia. National Formulary USP 40 — NF 35. Rockville; 2016.
9. RMG 61–2003 GSI. Accuracy, trueness and precision of quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2004 (in Russian).
10. State Standard R ISO 5725–2–2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard method of measurement. Moscow: Izdatelstvo standartov; 2002 (in Russian).
11. Dolitski B-Z. Method of preparation of polypeptide mixtures using purified hydrobromic acid. Patent RF, № 2388764 C2; 2010 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Kuzmina NE. Chief expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Doctor of Chemical Sciences.

Moiseev SV. Leading expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences, assistant professor.

Krylov VI. Leading engineer of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Kutin AA. 1st professional category expert of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Zhukov EA. Technician of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Yashkir VA. Head of the Laboratory of Nanodrugs, Cell and Gene Therapy Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences, assistant professor.

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

CONTACT E-MAIL

Moiseev Sergey Vladimirovich; MoiseevSV@expmed.ru