

Разработка методик подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат методом ЯМР-спектроскопии

С. В. Моисеев*, Н. Е. Кузьмина, А. И. Лутцева

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

Резюме. Работа является продолжением исследования по внедрению метода ЯМР-спектроскопии в контроль качества фармацевтических субстанций природных пептидных гормонов и их синтетических аналогов. **Цель работы:** разработка методик подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат методом ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов для их дальнейшего использования в фармакопейном анализе. **Материалы и методы:** при разработке методики были использованы методы двумерной ЯМР-спектроскопии (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC). **Результаты:** в процессе исследования проведено отнесение сигналов ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров к конкретному структурному фрагменту молекулы, определен аминокислотный состав и установлена аминокислотная последовательность каждого олигопептида. **Выводы:** составлена таблица структурного соотношения сигналов спектров ЯМР, позволяющая использовать метод ЯМР для подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат без использования фармакопейных стандартных образцов. Подобраны оптимальные температурные условия для регистрации ^{13}C ЯМР-спектров (27 и 50 °C для трипторелина ацетата и гозерелина ацетата соответственно). Показана целесообразность использования в фармакопейном анализе методики подтверждения подлинности, основанной на методе ^{13}C ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: трипторелина ацетат; гозерелина ацетат; ЯМР-спектроскопия; подлинность; внутримолекулярное взаимодействие

Для цитирования: Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Разработка методик подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат методом ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(1):54–63. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-1-54-63>
***Контактное лицо:** Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmed.ru

Development of Identification Test Methods for Triptorelin Acetate and Goserelin Acetate Substances using NMR spectroscopy

S. V. Moiseev*, N. E. Kuz'mina, A. I. Luttseva

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

Abstract. The work is a continuation of the research on the use of NMR spectroscopy in the quality control of natural peptide hormone-based active substances and their synthetic analogues. **The aim** of the paper was to develop identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using NMR spectroscopy that does not require reference standards — with the aim of using the newly developed test methods in pharmacopoeial analysis. **Materials and methods:** the procedure was developed using two-dimensional NMR spectroscopy (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC). **Results:** the study made it possible to assign ^1H and ^{13}C NMR signals to a specific molecular fragment, and to determine the amino acid composition of each oligopeptide. **Conclusions:** the authors drew up a table showing structural assignment of NMR signals, which makes it possible to use the NMR method for identification testing of triptorelin acetate and goserelin acetate substances without the use of pharmacopoeial reference standards. The study helped to determine the optimal temperature conditions for recording ^{13}C NMR spectra (27 °C and 50 °C for triptorelin acetate and goserelin acetate, respectively). It was demonstrated that ^{13}C NMR spectroscopy could be used for identification testing in pharmacopoeial analysis.

Key words: triptorelin acetate; goserelin acetate; NMR spectroscopy; identification; intramolecular interaction

For citation: Moiseev SV, Kuz'mina NE, Luttseva AI. Development of identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using NMR spectroscopy. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(1):54–63. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-1-54-63>

***Corresponding author:** Sergey V. Moiseev; MoiseevSV@expmed.ru

Настоящая работа является продолжением систематического исследования по внедрению метода ЯМР-спектроскопии в контроль качества фармацевтических субстанций природных пептидных гормонов и их синтетических аналогов [1, 2]. При анализе отечественных пептидов этот метод в настоящее время используют только для идентификации стандартных образцов (например, даларгина, имунофана, пептида дельта-сна). При оценке качества фармацевтических субстанций как отечественного, так и зарубежного производства применяют преимущественно методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [3]. Основным ограничением хроматографических методов является необходимость использования соответствующих фармакопейных стандартных образцов, которые в нашей стране, к сожалению, не производятся. Метод ЯМР-спектроскопии не требует использования стандартных образцов, поэтому его применение в фармакопейном анализе так актуально.

Типичными представителями лекарственных субстанций пептидной природы являются синтетические аналоги гонадолиберина — трипторелина ацетат (ТА) и гозерелина ацетат (ГА) (рис. 1). Они активно применяются при лечении злокачественных новообразований в области репродуктивной системы и гинекологических заболеваний, связанных с нарушением эндокринной регуляции [4–9].

Цель работы — разработать методики подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетата и гозерелина ацетата методом ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов для их дальнейшего использования в фармакопейном анализе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали образцы лекарственных субстанций трипторелина ацетата, предоставленные ЗАО «Ф-Синтез», и гозерелина ацетата производства ООО «Нати-

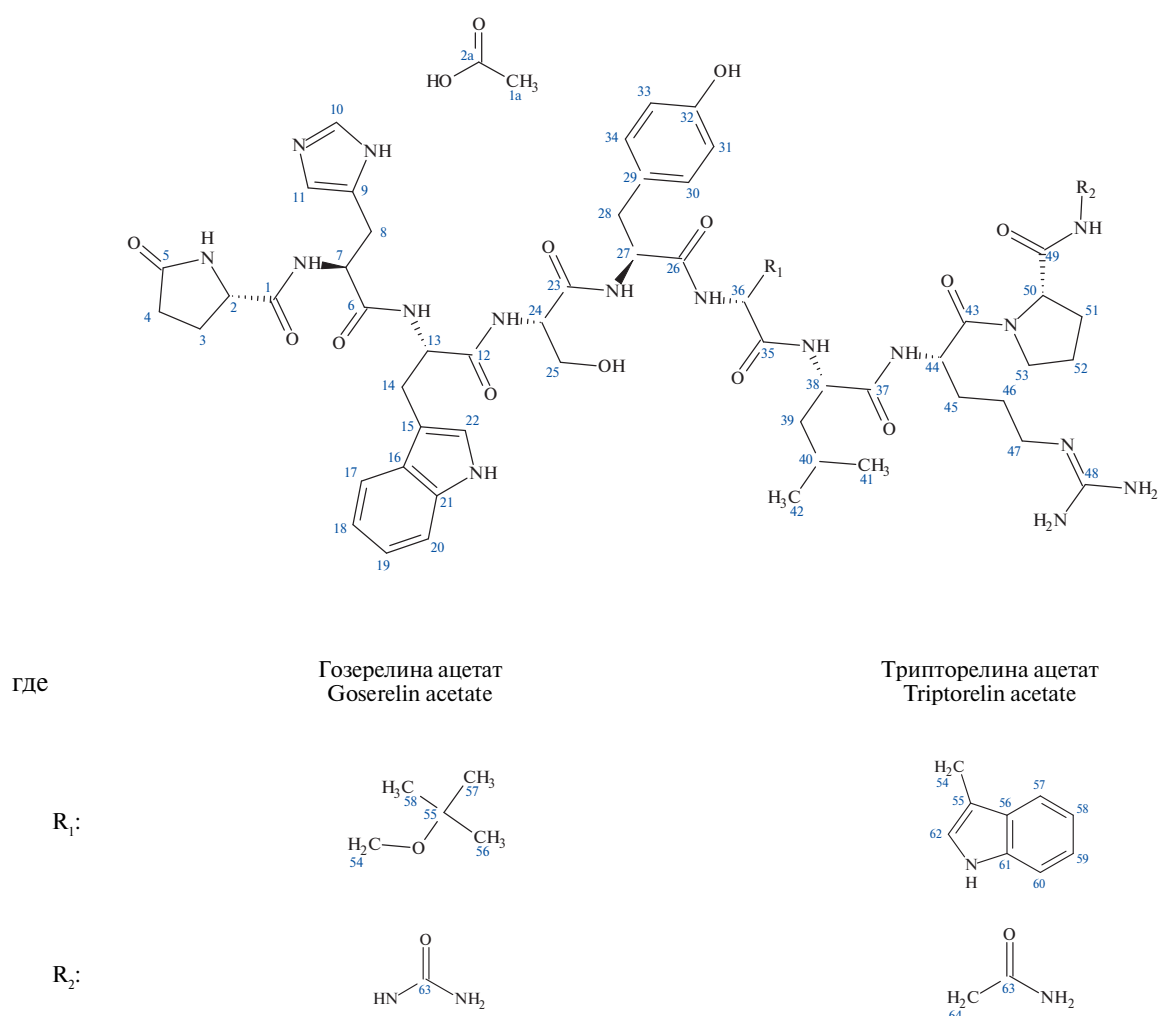


Рис. 1. Нумерация структурных фрагментов в молекулах гозерелина ацетата и трипторелина ацетата
Fig. 1. Structural fragments numbering in goserelin acetate and triptorelin acetate molecules

ва». 10 мг анализируемого образца (точная навеска необязательна) растворяли в 0,5 мл дейтерированной воды (D_2O) производства Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Для калибровки шкалы химических сдвигов (δ) в раствор добавляли 10 мкл аналитического стандарта 1,4-диоксана производства Fluka (полученные растворы имеют pH 6). Регистрацию спектров 1H , ^{13}C , градиентных 1H - 1H COSY (Correlation Spectroscopy) (gCOSY), 1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (gHSQC), 1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) (gHMBC) проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) с 5-мм мультядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой. Параметры 1D экспериментов: температура — 27 и 50 °C (^{13}C для гозерелина ацетата), ширина спектра — 12 (1H) и 200 (^{13}C) ppm, угол поворота намагниченности — 45°, время релаксации — 5 (1H) и 1 (^{13}C) с, количество накоплений сигнала свободной индукции — 8 (1H) и не менее 2000 (^{13}C), число точек аналого-цифрового преобразования — 64 К, экспоненциальное умножение — 0,3 (1H) и 3,0 (^{13}C) Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы, калибровка шкалы δ под диоксан (3,75 (1H) и 67,15 (^{13}C) ppm) [10]. 2D спектры были получены с использованием стандартных импульсных последовательностей в рамках программного обеспечения VnmrJ (версия 4.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика идентификации олигопептидов методом ЯМР-спектроскопии без использования фармакопейных стандартных образцов основана на самостоятельной структурной интерпретации спектральных данных, осуществляемой по определенному алгоритму [1]. Соотнесение сигналов спектров 1H и ^{13}C с конкретными углеводородными фрагментами (метильными, метиленовыми, метиновыми группами) проводили на основе данных 1H - ^{13}C gHSQC. Анализируя спектры 1H - 1H gCOSY, определяли соседние водородсодержащие фрагменты, связанные ковалентной связью, и составляли из них последовательности в цикле или алифатической цепочке. Углеводородные фрагменты и амидные группы объединяли в конкретную аминокислоту, используя данные 1H - ^{13}C gHMBC. По наличию кросс-пиков между сигналами α -CH и C=O групп соседних аминокислот в спектрах 1H - ^{13}C gHMBC устанавливали аминокислотную последовательность.

Ранее на примере бусерелина ацетата (БА) мы показали, что использование D_2O в качестве растворителя обеспечивает лучшую селективность методики подтверждения подлинности олигопептида методом ЯМР на ядрах 1H и ^{13}C [2]. Кроме того, было обнаружено, что при использовании в каче-

стве растворителя дейтерированного диметилсульфоксида наблюдается побочный эффект прототропной таутомерии замещенного имидазольного фрагмента гистидина, входящего в состав молекул БА, ТА и ГА. Из-за протонного обмена в 4-замещенном имидазоле, который замедляется под действием диметилсульфоксида, происходит усиление неэквивалентности электронного окружения углеродных ядер в позициях 4 и 5 имидазольного цикла и, как следствие, уширение соответствующих сигналов до критического соотношения сигнал/шум (их видимое отсутствие) [1]. Необходимо отметить, что 1H ЯМР-спектр в D_2O не содержит сигналы гидроксильных и амидных протонов, что существенно упрощает его интерпретацию. Поэтому при получении спектральных данных для ТА и ГА в качестве растворителя была выбрана дейтерированная вода. Результат соотнесения сигналов 1H и ^{13}C ЯМР-спектров (рис. 2, 3) конкретному структурному фрагменту молекул ТА и ГА представлен в таблице 1 (нумерация атомов в таблице соответствует нумерации атомов на рисунке 1). Следует подчеркнуть, что химические сдвиги 1H и ^{13}C сигналов имидазольного цикла остатка гистидина соответствуют pH анализируемого раствора, равному 6. При ином pH раствора его доводят до требуемого значения дейтерированной уксусной кислотой или буферным раствором фосфата натрия в дейтерированной воде.

Из рисунка 2 и данных таблицы 1 хорошо видно, что в 1H спектрах, как и в случае с БА [1, 2], наблюдается частичное или полное перекрытие ряда сигналов некоторых аминокислот, входящих в состав молекул ГА и ТА. Напротив, в спектрах ^{13}C (рис. 3) сигналы практически не перекрываются и характеризуются большей разрешенностью и информативностью, поэтому их целесообразно использовать для идентификации аминокислотного состава и определения аминокислотной последовательности при подтверждении подлинности олигопептидов в ходе фармакопейного анализа.

Следует отметить, что в ^{13}C спектре гозерелина ацетата, полученном при 27 °C, наблюдается значительное уширение сигнала карбонильной группы 2-(аминокарбонил)гидразида в положении C(63) с интенсивностью, сравнимой с уровнем шума (рис. 4а). Данное явление, вероятнее всего, связано с наличием внутримолекулярного взаимодействия карбонильного атома углерода с окружающими его азотсодержащими заместителями, которое и замедляет скорость прототропной таутомерии и, как следствие, приводит к уширению соответствующего сигнала. С повышением температуры до 50 °C внутримолекулярное взаимодействие ослабевает и увеличивается скорость протонного обмена, что приводит к появлению четкого сигнала карбонильного атома углерода (рис. 4б). Поэтому наиболее опти-

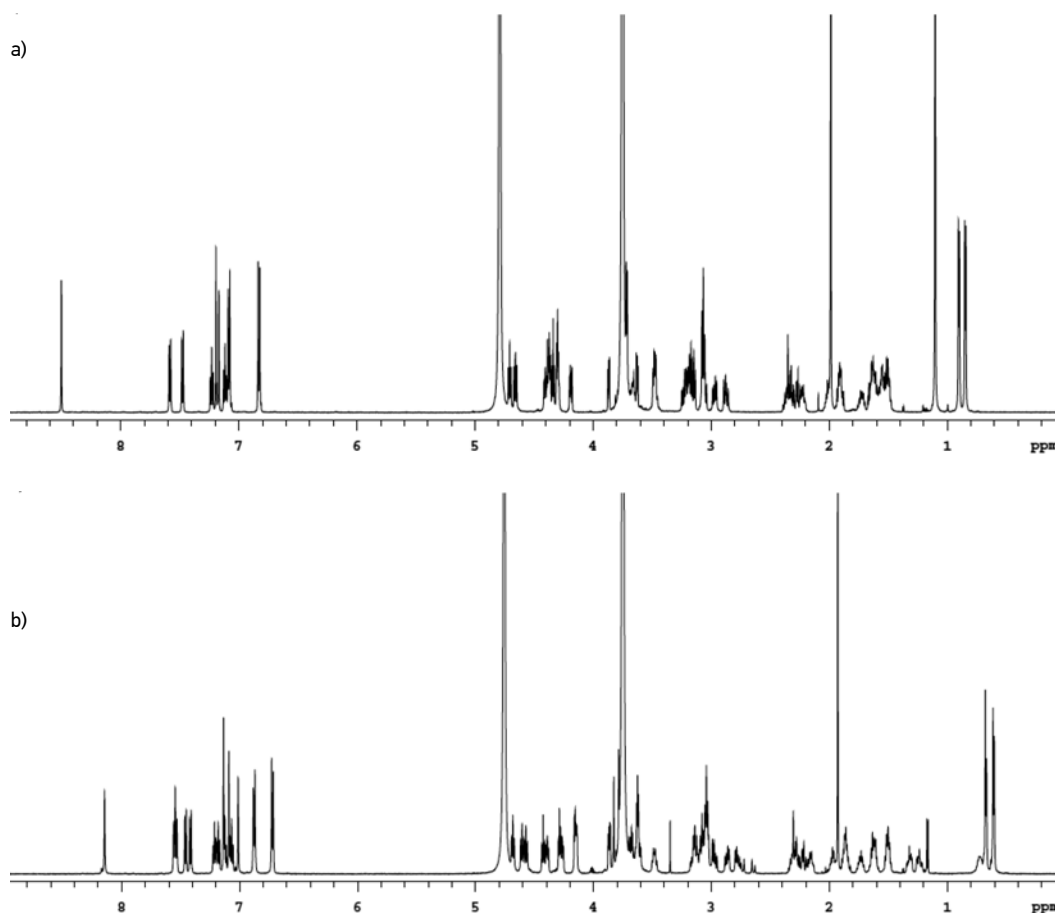


Рис. 2. Спектры ^1H ЯМР растворов гозерелина ацетата (а) и трипторелина ацетата (б)
Fig. 2. Spectra ^1H NMR of goserelin acetate (a) and triptorelin acetate (b) solutions

мальной температурой при идентификации трипторелина ацетата методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии является 50°C .

Расхождение значений δ сигналов метильной группы ацетат-аниона в спектрах ЯМР трипторелина ацетата и гозерелина ацетата на $0,5$ (^1H) и $\sim 1,0$ (^{13}C) ppm подтверждает выдвинутое нами утверждение о некорректности использования ацетат-аниона в качестве эталона для калибровки шкалы химических сдвигов [1], как это рекомендует Европейская фармакопея¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методики идентификации фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат без использования фармакопейных стандартных образцов методом ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C в растворе D_2O . Определен аминокислотный состав и установлена аминокислотная последовательность этих олигопептидов. Составлена таблица структурного соотнесения сиг-

налов спектров ЯМР конкретному структурному фрагменту молекул, которая позволяет подтверждать подлинность трипторелина ацетата и гозерелина ацетата без использования фармакопейных стандартных образцов. Установлено, что наиболее разрешенный спектр, где сигналы структурных фрагментов аминокислот олигопептида практически не перекрываются, получается на ядрах ^{13}C для трипторелина ацетата при 27°C , а для гозерелина ацетата при 50°C . Предложено рекомендовать разработанные методики на основе метода ^{13}C ЯМР-спектроскопии для использования в фармакопейном анализе.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

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

¹ General monograph 2.2.64 Peptide identification by nuclear magnetic resonance. In: European Pharmacopoeia, 9th ed. V. 1. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines & Health Care; 2016. P. 112.

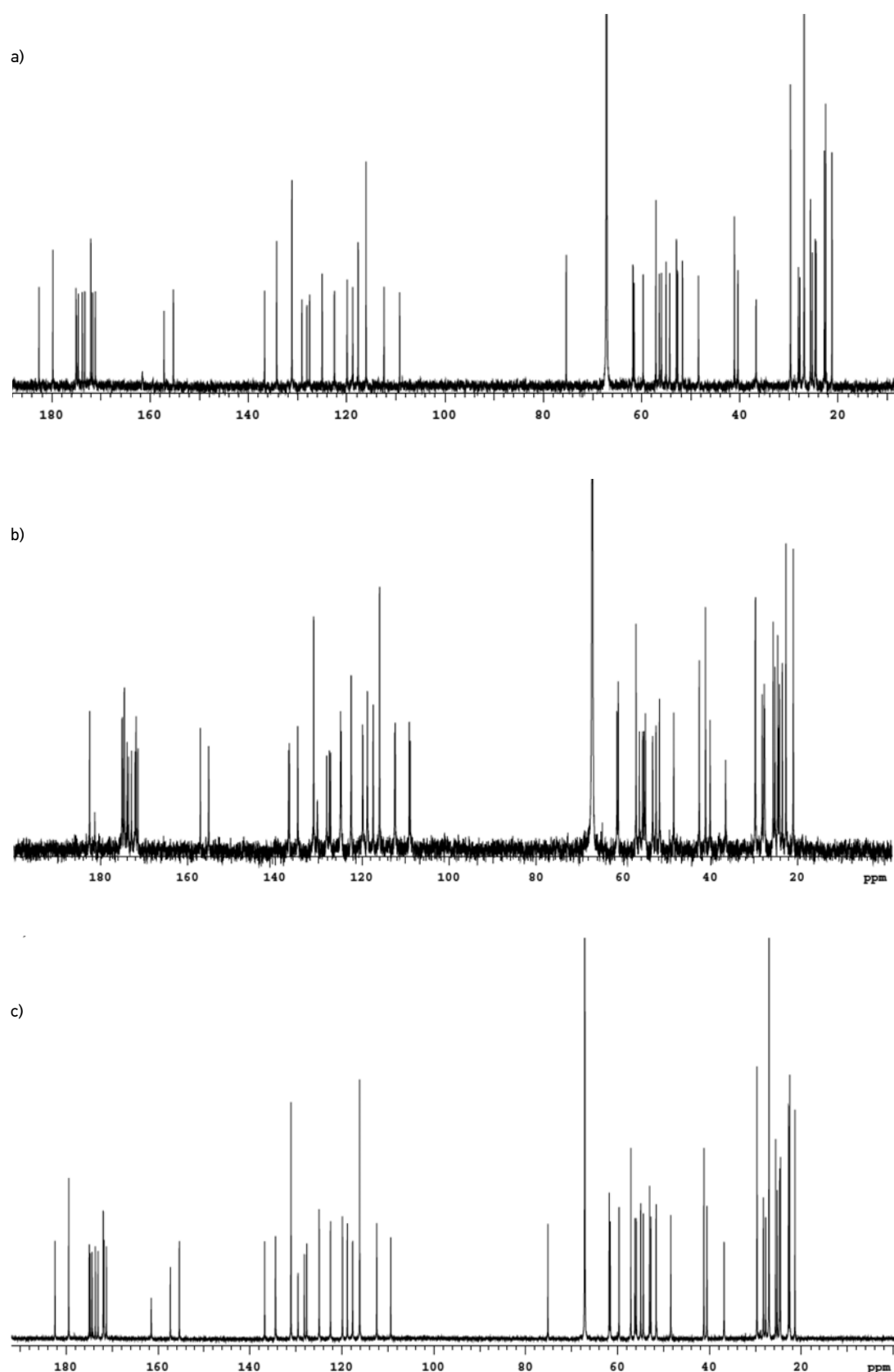


Рис. 3. Спектры ^{13}C ЯМР растворов гозерелина ацетата (a) и трипторелина ацетата (b) при 27 °C, гозерелина ацетата (c) при 50 °C

Fig. 3. Spectra ^{13}C NMR of goserelin acetate (a) and triptorelin acetate (b) solutions at 27 °C, of goserelin acetate (c) solution at 50 °C

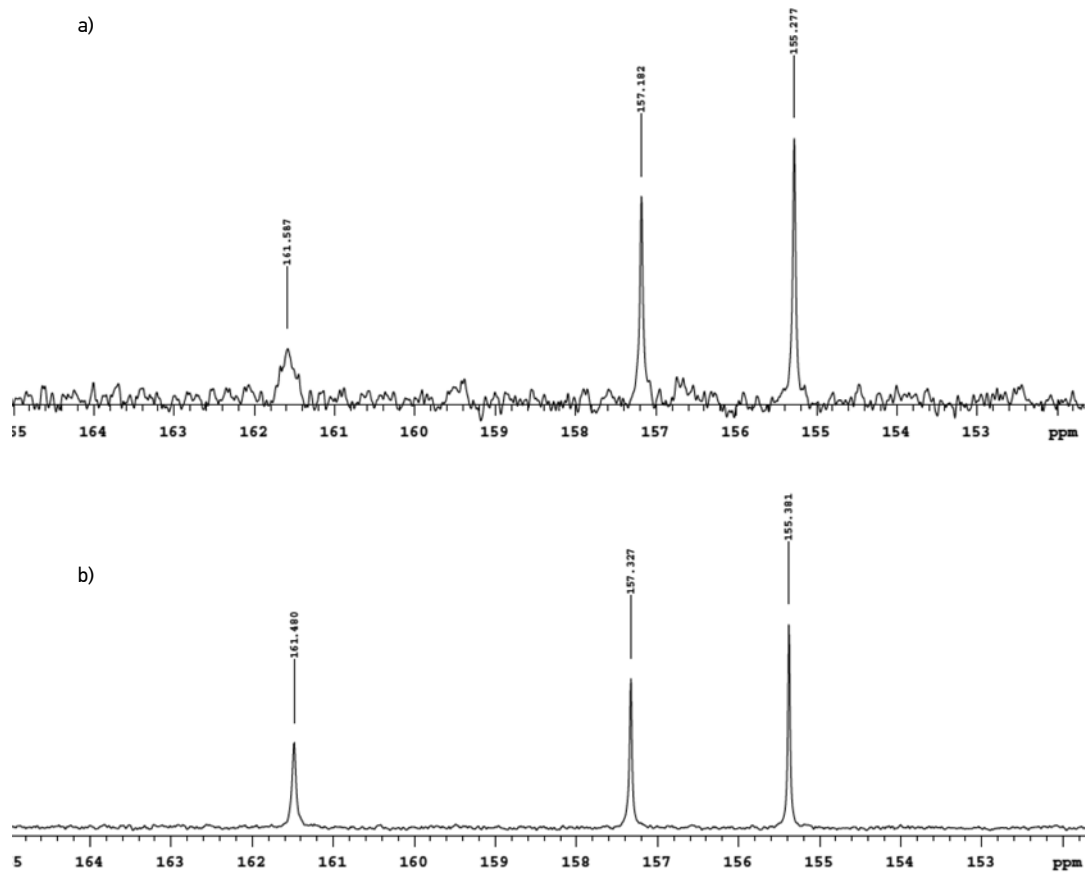


Рис. 4. Фрагменты спектров ¹³C ЯМР растворов гозерелина ацетата при 27 °C (a) и 50 °C (b)
Fig. 4. Fragments of the spectrums ¹³C NMR of goserelin acetate solutions at 27 °C (a) and 50 °C (b)

Таблица 1. Спектральные характеристики гозерелина ацетата и трипторелина ацетата
Table 1. Goserelin acetate and triptorelin acetate spectral characteristics

№ атома Atom number	Гозерелина ацетат Goserelin acetate			Трипторелина ацетат Triptorelin acetate	
	Химический сдвиг Chemical shift			Химический сдвиг Chemical shift	
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
27 °C		50 °C			
5-оксо-L-Пролин 5-oxo-L-Proline					
1	—	175,09	174,99	—	173,66
2	4,19 dd (J = 7,9; 4,9)	57,11	57,11	4,15 m	57,11
3	1,65 m; 2,35 m	25,66	25,61	1,62 m; 2,31 m	25,63
4	2,27 m; 2,31 m	29,72	29,67	2,29 m; 2,23 m	29,68
5	—	182,63	182,43	—	182,58
L-Гистидин L-Histidine					
6	—	171,72	171,78	—	172,14
7	4,66 dd (J = 8,2; 6,7)	52,93	53,05	4,61 dd (J = 8,3; 7,0)	53,30
8	3,06 dd (J = 15,3; 8,2) 3,15 dd (J = 15,3; 6,7)	26,91	27,08	2,97 dd (J = 15,3; 8,3) 3,03 dd (J = 15,3; 7,0)	27,58
9	—	129,14	129,55	—	130,29
10	8,50 d (J = 1,3)	134,27	134,45	8,15 s	134,81
11	7,17 br.s	117,69	117,66	7,01 s	117,46
L-Триптофан L-Tryptophan					

Продолжение таблицы 1

Table 1 continued

№ атома Atom number	Гозерелина ацетат Goserelin acetate			Трипторелина ацетат Triptorelin acetate	
	Химический сдвиг Chemical shift			Химический сдвиг Chemical shift	
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
		27 °C	50 °C		
12	—	173,81	173,65	—	174,01
13	4,71 dd (J = 7,8; 6,8)	55,04	54,98	4,68 dd (J = 7,2; 6,6)	54,95
14	3,17 dd (J = 14,8; 7,8) 3,23 dd (J = 14,8; 6,8)	27,81	27,79	3,13 dd (J = 14,9; 7,2) 3,16 dd (J = 14,9; 6,6)	27,67
15	—	109,24	109,37	—	109,18
16	—	127,56	127,64	—	127,53
17	7,58 br. d (J = 8,0)	118,79	118,82	7,55 d (J = 8,1)	118,80
18	7,12 br. dd (J = 8,0; 7,0)	119,94	119,88	7,13 dd (J = 8,1; 7,0)	119,83
19	7,23 br. dd (J = 8,2; 7,0)	122,52	122,48	7,21 dd (J = 8,1; 7,0)	122,53
20	7,48 br. d (J = 8,2)	112,42	112,41	7,46 d (J = 8,1)	112,51
21	—	136,72	136,80	—	136,88
22	7,19 s	125,01	124,95	7,14 s	124,97
L-Серин L-Serine					
23	—	171,17	17,24	—	171,52
24	4,34 t (J = 5,4)	55,97	55,93	4,29 dd (5,5; 4,7)	56,34
25	3,72 d (J = 5,4)	61,77	61,83	3,61 dd (J = 11,8; 4,7) 3,68 dd (J = 11,8; 5,5)	61,51
L-Тирозин L-Tyrosine					
26	—	173,31	173,07	—	172,97
27	4,37 dd (J = 8,9; 6,9)	56,42	56,25	4,43 dd (J = 7,3; 6,9)	55,62
28	2,97 dd (J = 13,6; 6,9)	36,72	36,82	2,78 dd (J = 14,0; 7,3) 2,86 dd (J = 14,0; 6,9)	36,54
29	—	128,11	128,18	—	128,14
30,34	7,09 d (J = 8,6)	131,16	131,08	6,88 d (J = 8,5)	131,14
31,33	6,83 d (J = 8,6)	116,08	116,14	6,72 d (J = 8,5)	116,01
32	—	155,28	155,38	—	155,25
R ₁	D-Серин-O-tert-Bu D-Serine-O-tert-Bu			D-Триптофан D-Tryptophan	
35	—	172,08	171,95	—	173,66
36	4,30 m	54,29	54,40	4,57 dd (J = 8,3; 7,1)	55,30
54	3,19 m; 3,48 m	61,54	61,62	3,08 m; 3,10 m	27,73
55	—	75,35	75,17	—	108,97
56	1,10 s	26,95	27,04	—	127,25
57	1,10 s	26,95	27,04	7,54 d (J = 8,1)	118,80
58	1,10 s	26,95	27,04	7,05 dd (J = 8,1; 7,0)	119,91
59	—	—	—	7,18 dd (J = 8,1; 7,0)	122,53
60	—	—	—	7,42 d (J = 8,1)	112,40
61	—	—	—	—	136,71
62	—	—	—	7,09 s	124,83
L-Лейцин L-Leucine					
37	—	174,62	174,35	—	174,65
38	4,38 m	52,68	52,76	4,15 m	52,52
39	1,55 m; 1,63 m	40,42	40,55	1,24 m; 1,32 m	40,10
40	1,56 m	24,69	24,73	0,73 m	24,18
41	0,85 d (J = 6,3)	21,27	21,40	0,61 d (J = 6,3)	21,00
42	0,90 d (J = 6,3)	22,82	22,82	0,67 d (J = 6,3)	22,69
L-Аргинин L-Arginine					
43	—	172,07	171,93	—	171,93
44	4,41 dd (J = 7,6; 6,2)	51,70	51,61	4,39 dd (J = 7,9; 5,9)	51,73

Продолжение таблицы 1
Table 1 continued

№ атома Atom number	Гозерелина ацетат Goserelin acetate			Трипторелина ацетат Triptorelin acetate	
	Химический сдвиг Chemical shift			Химический сдвиг Chemical shift	
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
		27 °C	50 °C		
45	1,62 m; 1,72 m	28,11	28,29	1,64 m; 1,74 m	28,14
46	1,51 m	24,53	24,57	1,51 m	24,56
47	3,07 m	41,13	41,22	3,05 m	41,15
48	—	157,18	157,33	—	157,15
L-Пролин L-Proline					
49	—	174,96	174,76	—	175,15
50	4,30 m	59,69	59,69	4,27 dd (J = 8,0; 5,9)	61,20
51	1,91 m; 2,24 m	29,72	29,67	1,86 m; 2,16 m	29,74
52	1,92 m; 2,01 m	25,30	25,25	1,87 m; 1,97 m	25,19
53	3,48 m; 3,66 m	48,45	48,42	3,48 m; 3,63 m	48,45
R ₂	2-(Аминокарбонил)гидразид 2-(Aminocarbonyl) hydrazide			Глицинамид Glycinamide	
63	—	161,59 (br. s)	161,48	—	174,65
64	—	—	—	3,77 d (J = 17,3) 3,85 d (J = 17,3)	42,59
Уксусная кислота Acetic acid					
1a	1,98 s	22,56	22,57	1,93 s	23,53
2a	—	179,81	179,44	—	181,42

The present work is a continuation of a systematic study on the introduction of NMR spectroscopy in the quality control of natural peptide hormone-based active substances and their synthetic analogues [1, 2]. In the case of domestically-produced peptides this method is currently used only for identification testing of reference standards (e.g., dalargin, imunofan, delta sleep-inducing peptide). Quality evaluation of both domestic and foreign-made active ingredients is mainly performed with the help of high-performance liquid chromatography [3]. The main limitation of chromatographic methods is the need for appropriate pharmacopoeial reference standards which, unfortunately, are not produced in Russia. The NMR spectroscopy method does not require the use of reference standards, which accounts for its relevance for the pharmacopoeial analysis.

Typical examples of peptide active ingredients are synthetic analogues of gonadoliberein — triptorelin acetate (TA) and goserelin acetate (GA) (Fig. 1). They are widely used in the treatment of malignant tumours of the reproductive system and gynecological diseases associated with endocrine regulation disorders [4–9].

The aim of the paper was to develop identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using NMR spectroscopy that does not require reference standards — with the aim of using the newly developed test methods in pharmacopoeial analysis.

MATERIALS AND METHODS

The test samples were provided by F-Sintez LLC (triptorelin acetate) and Nativa LLC (goserelin acetate). The test sample (10 mg, accurate weight is not required) was dissolved in 0.5 mL deuterated water (D₂O) produced by Cambridge Isotope Laboratories, Inc. To calibrate the chemical shift scale (δ) 10 μl of 1,4-dioxane analytical standard by Fluka were added to the solution (the resulting solutions had pH 6). The registration of the following spectra: ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY (Correlation Spectroscopy) (gCOSY), ¹H-¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (gHSQC), ¹H-¹³C HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) (gHMBC) — was performed using an Agilent DD2 NMR System 600 (USA) with a 5 mm multinuclear probe fitted with a gradient coil. 1D experiment parameters: temperature — 27 and 50 °C (¹³C for goserelin acetate), spectral width — 12 (¹H) and 200 (¹³C) ppm, flip angle — 45°, relaxation time — 5 (¹H) and 1 (¹³C) s, the number of accumulations of free induction decay — 8 (¹H) and minimum 2000 (¹³C), the number of analogue-to-digital conversion points — 64 K, exponential multiplication — 0.3 (¹H) and 3.0 (¹³C) Hz, automatic baseline correction, manual phase correction, calibration of the δ scale for dioxane (3.75 (¹H) and 67.15 (¹³C) ppm) [10]. 2D spectra were obtained using reference pulse sequences with the help of the VnmrJ software (version 4.2).

RESULTS AND DISCUSSION

The identification of oligopeptides by NMR spectroscopy without using pharmacopoeial reference standards is based on independent structural interpretation of the spectral data, carried out according to a certain algorithm [1]. The assignment of signals in ^1H and ^{13}C spectra to specific hydrocarbon fragments (methyl, methylene, methyne groups) was performed on the basis of ^1H - ^{13}C gHSQC data. The analysis of ^1H - ^1H gCOSY spectra helped to determine adjacent hydrogen-containing fragments joined by a covalent bond, and use them to build sequences in a cycle or an aliphatic chain. Hydrocarbon fragments and amide groups were combined into a specific amino acid using the data from ^1H - ^{13}C gHMBC. The amino acid sequence was established by the presence of cross-peaks between α -CH signals and C=O groups of adjacent amino acids in ^1H - ^{13}C gHMBC spectra.

We showed earlier, using the example of buserelin acetate (BA), that using D_2O as a solvent ensures better selectivity of oligopeptide identification testing by ^1H and ^{13}C NMR [2]. In addition, it was determined that when deuterated dimethyl sulfoxide was used as a solvent, there was a side effect of prototropic tautomerism of the substituted imidazole fragment of histidine, which is part of the BA, TA and GA molecules. Due to proton exchange in 4-substituted imidazole, which is slowed down by dimethyl sulfoxide, there is an increase in the non-equivalence of the electronic environment of carbon nuclei in positions 4 and 5 of the imidazole cycle and, as a result, the broadening of the corresponding signals to a critical signal-to-noise ratio (their apparent absence) [1]. It should be noted that the ^1H NMR spectrum in D_2O does not contain signals of hydroxyl and amide protons, which greatly facilitates its interpretation. Therefore, deuterated water was chosen as a solvent when obtaining spectral data for TA and GA. The result of assigning ^1H and ^{13}C signals of the NMR spectra (Fig. 2, 3) to a specific structural fragment of the TA and GA molecules is presented in Table 1 (the numbering of atoms in the table corresponds to the numbering of atoms in Fig. 1). It should be emphasized that chemical shifts of ^1H and ^{13}C signals of the imidazole cycle of histidine residue correspond to the test solution pH equal to 6. If pH of the test solution is different, it is adjusted to the required value with deuterated acetic acid or with a buffer solution of sodium phosphate in deuterated water.

Figure 2 and Table 1 clearly show that ^1H spectra, as in the case of BA [1, 2], demonstrate a partial or complete overlap of a number of signals from some amino acids which form part of the GA and TA molecules. On the contrary, signals in the ^{13}C spectra (Fig. 3) hardly overlap and have better resolution and informative value, therefore they could be used to identify the amino acid composition and determine the amino acid sequence during pharmacopoeial identification testing of oligopeptides.

It should be noted that the ^{13}C spectrum of gosere-lin acetate obtained at 27 °C demonstrates a significant broadening of the signal of 2- (aminocarbonyl)hydrazide carbonyl group at position C(63) with an intensity comparable to the noise level (Fig. 4a). This phenomenon is most likely due to the presence of intramolecular interaction between the carbonyl carbon atom and the adjacent nitrogen-containing substituents, which slows down the rate of prototropic tautomerism and, as a result, leads to the broadening of the corresponding signal. When the temperature is increased to 50 °C the intramolecular interaction gets weaker and the proton exchange rate grows, which results in a clear signal of the carbonyl carbon atom (Fig. 4b). Therefore, 50 °C is the most optimal temperature for identification of triptorelin acetate by ^{13}C NMR spectroscopy.

The difference of 0.5 (^1H) and ~ 1.0 (^{13}C) ppm between δ values of the signals from the methyl group of acetate anion in the NMR spectra of triptorelin acetate and goserelin acetate supports our assertion that acetate anion should not be used as a reference standard for calibration of the chemical shift scale [1], as is prescribed by the European Pharmacopoeia².

CONCLUSION

The authors developed identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using ^1H and ^{13}C NMR in D_2O solution without the use of pharmacopoeial reference standards. They determined the amino acid composition and the amino acid sequence of these oligopeptides. The authors drew up a table showing assignment of NMR spectra signals to a particular structural fragment of the molecules, which makes it possible to perform identification testing of triptorelin acetate and goserelin acetate substances without the use of pharmacopoeial reference standards. It was demonstrated that the better resolved spectrum with almost no overlap between the signals of oligopeptide amino acid structural fragments is obtained by ^{13}C NMR for triptorelin acetate at 27 °C, and for goserelin acetate at 50 °C. The developed ^{13}C NMR spectroscopy test methods may be recommended for use in pharmacopoeial analysis.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Разработка методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат» методом ЯМР-спектроскопии без использования фармакопейного стандартного образца. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017;62(9–10):40–6. [Kuz'mina NE,

² General monograph 2.2.64 Peptide identification by nuclear magnetic resonance. In: European Pharmacopoeia, 9th ed. V. 1. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines & Health Care; 2016. P. 112.

- Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Development of a procedure for the identification of pharmaceutical substance buserelin acetate by NMR spectroscopy without using pharmacopoeia reference standard. *Antibiotics and chemotherapy = Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2017;62(9–10):40–6 (In Russ.))
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Дерябин АС, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции «бусерелина ацетат» методом ЯМР-спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(2):48–53. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-2-48-53> [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Deryabin AS, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of an NMR-spectroscopic method for authenticity confirmation of buserelin acetate pharmaceutical substance. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(2):159–65]. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1783-8>
 - Ковалева СВ, Исаева ИВ, Лутцева АИ, Аладышева ЖИ, Пикhtar' АВ. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы. *Российский химический журнал*. 2005;49(1):135–45. [Kovaleva SV, Isaeva IV, Luttseva AI, Aladysheva Zhi, Pikhtar' AV. Problems for standardization of hormonal preparations of protein-peptide nature. *Rossiyskiy khimicheskij zhurnal = Russian Chemical Journal*. 2005;49(1):135–45 (in Russ.)]
 - Матвеев БП. Роль трипторелина (диферелин) в лечении рака предстательной железы. *Онкоурология*. 2008;(4):53–6. [Matveev BP. The role of triptorelin (diphereline) in the treatment of prostate cancer. *Oncourology = Onkourologiya*. 2008;(4):53–6 (in Russ.)]
 - Frampton JE. Triptorelin: a review of its use as an adjuvant anticancer therapy in early breast cancer. *Drugs*. 2017;77(18):2037–48. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0849-3>
 - Venturelli M, Guaitoli G, Omarini C, Moscetti L. Spotlight on triptorelin in the treatment of premenopausal women with early-stage breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2018;(10):39–49. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S137508>
 - Choktanasi W, Boonkasemsanti W, Sittisomwong T, Kunathikom S, Suksompong S, Udomsubpayakul U, Rojanasakul A. Long-acting triptorelin for the treatment of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 1996;54(3):237–43. PMID: 8889631
 - Высоцкая НВ, Максимов КВ. Адъювантная эндокринотерапия рака молочной железы у группы больных пременопаузального возраста. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2007;(1–2):45–7. [Vysotskaya IV, Maksimov KV. Adjuvant endocrine therapy for breast cancer in a group of premenopausal patients. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System*. 2007;(1–2):45–7 (In Russ.)]
 - Wu S, Li Q, Zhu Y, Sun J, Li F, Lin H, Guan X, He Z. Role of goserelin in combination with endocrine therapy for the treatment of advanced breast cancer in premenopausal women positive for hormone receptor: a retrospective matched case-control study. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28(10):697–702. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1436>
 - Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J Org Chem*. 1997;62(21):7512–5. <https://doi.org/10.1021/jo971176v>

ОБ АВТОРАХ

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доцент, ведущий эксперт сектора спектральных методов анализа лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1310-4477>

Кузьмина Наталья Евгеньевна, д-р хим. наук, начальник сектора спектральных методов анализа лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-9133-0835>

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук, начальник Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

Статья поступила 05.10.2018

После доработки 23.01.2019

Принята к печати 20.02.2019

AUTHORS

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Leading Expert of the Spectral Methods Sector of the Laboratory of Biotechnological Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1310-4477>

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Head of the Spectral Methods Sector of the Laboratory of Biotechnological Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-9133-0835>

Anna I. Luttseva, Cand. Sci. (Pharm.), Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

Article was received 5 October 2018

Revised 23 January 2019

Accepted for publication 20 February 2019