



И.Ю. Якупов 
С.И. Кулешова  
Е.П. Симонова 
А.С. Демидов 

Применение ион-парной хроматографии для определения компонентов и родственных примесей капреомицина сульфата

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

✉ Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Хроматографические методы определения продуктов деструкции антибиотиков широко внедрены в практику оценки качества лекарственных средств. Наиболее сложными соединениями для разработки методик определения родственных примесей являются природные многокомпонентные антибиотики, например капреомицин. В монографиях ведущих фармакопей на капреомицин сульфат нормирование примесей не предусмотрено. Основное требование предъявлено к сумме основных компонентов капреомицина, содержание которых рассчитывают методом нормализации по хроматограмме испытуемого раствора. В этой связи актуальна разработка методики определения не только компонентов капреомицина, но и его родственных примесей.

Цель работы: разработка методики одновременного определения содержания основных компонентов капреомицина (IA, IB, IIA, IIB) и его родственных примесей с применением ион-парной ультраэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы: в качестве объекта исследований использовали субстанцию — порошок капреомицина сульфата. Для подтверждения селективности и эффективности разделения экспериментальной хроматографической системы выполнено хроматографирование растворов капреомицина сульфата после искусственной деструкции (щелочной и кислотный гидролиз). Испытание проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с использованием хроматографических колонок Kinetex C18, YMC-Triart C18, ACQUITY UPLC BEH C18, ACQUITY UPLC BEH C8, ACQUITY UPLC BEH Phenyl, ACQUITY UPLC CSH C18; анализ по методике Международной фармакопеи — на колонках Acclaim C18, Zorbax SB-C18 и XBridge BEH130 C18.

Результаты: подобранные условия хроматографирования позволяют одновременно определить компонентный состав субстанции капреомицина и родственные примеси капреомицина, в отличие от фармакопейных методик, оценивающих только компонентный состав. Результат был достигнут за счет использования хроматографической колонки с размером частиц 1,7 мкм вместо колонок с размером частиц 5 мкм, предусмотренных фармакопейными методиками. Разработанная методика сохраняет возможность проведения испытания на жидкостном хроматографе с ограничением давления ≤400 бар в режиме двухфазного градиентного элюирования. Оптимальные результаты по оценке разделительной способности и эффективности были получены при использовании хроматографической колонки ACQUITY UPLC BEH C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм), обеспечивающей наилучшее разделение пиков изоформ капреомицина и пиков примесей, образующихся при искусственной деструкции капреомицина.

Вывод: разработанная методика на основе ион-парной ультравысокоэффективной хроматографии позволяет проводить оценку качества субстанции капреомицина по содержанию основных компонентов и примесных соединений как при производстве, так и при контроле стабильности лекарственных средств капреомицина.

Ключевые слова: ион-парная ультравысокоэффективная жидкостная хроматография; капреомицин; компонентный состав; родственные примеси; контроль качества

Для цитирования: Якупов И.Ю., Кулешова С.И., Симонова Е.П., Демидов А.С. Применение ион-парной хроматографии для определения компонентов и родственных примесей капреомицина сульфата. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2-1):271–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-451>

I.Yu. Yakupov 
S.I. Kuleshova 
E.P. Simonova 
A.S. Demidov 

Ion-Pair Chromatography for the Determination of Capreomycin Sulfate Components and Related Substances

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

✉ **Svetlana I. Kuleshova;** Kuleshova@expmed.ru

ABSTRACT

Chromatographic methods for the analysis of antibiotic degradation products are widely used to evaluate the quality of medicines. Natural multicomponent antibiotics, such as capreomycin, are the most challenging compounds in terms of developing analytical procedures for related substances. Capreomycin sulfate monographs of the leading pharmacopoeias do not contain specifications for related substances. The key requirement concerns the sum of the main components of capreomycin calculated by normalising the peak areas in the test solution chromatogram. Therefore, it is important to develop an analytical procedure for determining not only the main components but also related substances of capreomycin.

The aim of the study was to develop an analytical procedure for determining both the main components (IA, IB, IIA, and IIB) and related substances of capreomycin by ion-pair ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).

Materials and methods. This study examined capreomycin sulfate powder, an active pharmaceutical ingredient (API). Capreomycin sulfate solutions were analysed after artificial degradation (alkaline or acid hydrolysis) to demonstrate the resolution, selectivity, and efficiency of the experimental chromatographic system. The authors used an Agilent 1100 liquid chromatography instrument (Agilent Technologies) and chromatographic columns: Kinetex C18, YMC-Triart C18, ACQUITY UPLC BEH C18, ACQUITY UPLC BEH C8, ACQUITY UPLC BEH Phenyl, and ACQUITY UPLC CSH C18 (experimental procedure) or Acclaim C18, Zorbax SB-C18, and XBridge BEH130 C18 (The International Pharmacopoeia procedure).

Results. In contrast to pharmacopoeial procedures, which evaluate only the component composition, the experimental procedure under the selected chromatography conditions can determine both the component composition and related substances of capreomycin. This advantage results from substituting a column packed with 1.7 μm particles for a 5 μm column required for pharmacopoeial procedures. The experimental procedure remains suitable for liquid chromatography instruments with a pressure limit of no more than 400 bar in the gradient elution mode with two mobile phases. According to the efficiency and selectivity evaluation, ACQUITY UPLC BEH C18 columns (150 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) provide optimal peak resolution for capreomycin isoforms and related substances after artificial degradation of capreomycin.

Conclusions. This experimental procedure based on ion-pair UHPLC may be used in the production and stability testing of capreomycin medicines to evaluate the API quality by the content of its main components and related substances.

Key words: ion-pair ultra-high-performance liquid chromatography; capreomycin; component composition; related substances; quality control

For citation: Yakupov I.Yu., Kuleshova S.I., Simonova E.P., Demidov A.S. Ion-pair chromatography for the determination of capreomycin sulfate components and related substances. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(2-1):271–282. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-451>

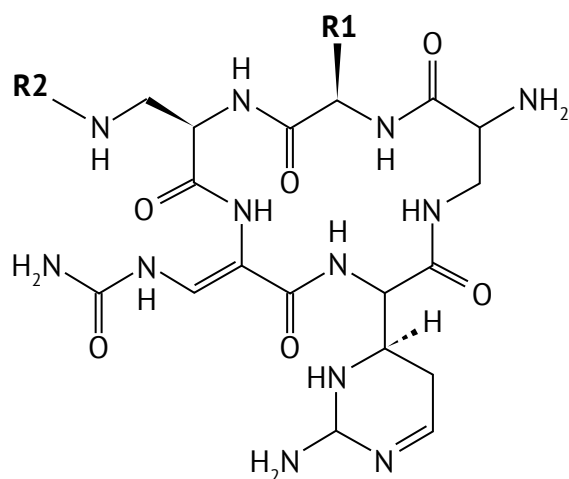
Введение

Хроматографические методы определения продуктов деструкции антибиотиков широко внедрены в практику оценки качества лекарственных средств. В настоящее время наиболее распространен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Активно ведется разработка методик с применением ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), при использовании которых требуется более современное оборудование в связи с необходимостью поддержания высокого давления в системе из-за мелких частиц сорбента, но обеспечивается большая эффективность разделения.

Наиболее сложными соединениями для разработки методик определения родственных примесей являются природные многокомпонентные антибиотики, например капреомицин. Монографии на капреомицина сульфат представлены в Фармакопее США (USP)¹ и Международной фармакопее (IP)², однако ни в USP, ни в IP не предусмотрено нормирование содержания примесей. Основное требование предъявляют к сумме компонентов капреомицина, содержание которых рассчитывают методом нормализации по хроматограмме испытуемого раствора. В этой связи актуальна разработка аналитической методики, позволяющей проводить одновременное определение не только компонентов капреомицина, но и его родственных примесей.

Полипептидный антибиотик капреомицин, продуцируемый *Streptomyces capreolus*, выделен в 1960 г. [1]. Капреомицин представляет собой смесь четырех компонентов: IA, IB, IIA и IIB в соотношении ~25, 67, 3 и 6% соответственно³. Молекула капреомицина состоит из циклического пентапептида, содержащего два остатка 2,3-диаминопропионовой кислоты, один остаток уреидодегидроаланина, один остаток L-капреомицидина, один остаток серина (IA и IIA) или аланина (IB и IIB), а также остаток лизина в боковой цепи (IA и IB), которые проявляют сильные основные свойства и характеризуются высокой полярностью (рис. 1). Например, циклический гуанидин, расположенный на боковой цепи L-капреомицидина, является одним из самых сильных известных органических оснований ($pK_a \approx 14$) [2].

Лекарственные препараты капреомицина преимущественно используют для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Несмотря на высокие показатели эффективности, капреомицин считают препаратом второй линии⁴ из-за его серьезных нежелательных эффектов, таких как гепатотоксичность и нефротоксичность, потеря слуха и аллергическая реакция [3]. Согласно литературным данным, токсичность препаратов капреомицина в значительной степени зависит от содержащихся родственных примесей. При сравнении острой токсичности и фармакокинетических



Компонент <i>Component</i>	R1	R2
Капреомицин IA <i>Capreomycin IA</i>	OH	β -Lysyl
Капреомицин IB <i>Capreomycin IB</i>	H	β -Lysyl
Капреомицин IIA <i>Capreomycin IIA</i>	OH	H
Капреомицин IIB <i>Capreomycin IIB</i>	H	H

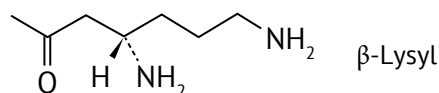


Рис. 1. Структура компонентов капреомицина

Fig. 1. Structure of capreomycin components

¹ Capreomycin sulfate. United States Pharmacopeia. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

² Capreomycin sulfate. The International Pharmacopoeia. 11th ed. WHO; 2022.

³ The Merck Index. 14th ed. Merck Research Laboratories, USA; 2006.

⁴ Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. НИИХА СГМА; 2000–2007.

профилей двух препаратов капреомицина с различным содержанием примесей показано, что лекарственное средство с меньшим количеством примесей проявляло гораздо меньшую токсичность [4].

Из-за сильных основных свойств и высокой полярности капреомицина определение примесей в содержащих его препаратах в значительной степени затруднено. Основными примесями капреомицина являются стерео- и цис-/транс-изомеры его изоформ [5], в молекулах других примесей капреомицина может наблюдаться изменение положения структурных элементов, замена аминокислотных остатков и добавление функциональных групп [6].

Вследствие особенности химической природы данного антибиотика хроматографическое разделение компонентов и примесей капреомицина является сложной задачей. S. Mallampati и соавт. [7] разработана методика на основе ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии, в качестве ион-парного реагента использован натрия 1-гексансульфонат. В результате было получено хорошее разделение четырех активных компонентов капреомицина и обнаружено одиннадцать неизвестных примесей. Аналогичная методика приведена в монографии на капреомицин сульфат в Международной фармакопее.

Цель работы — разработка методики одновременного определения содержания основных компонентов капреомицина (IA, IB, IIA, IIB) и его родственных примесей с применением ион-парной ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали субстанцию-порошок капреомицина сульфата (стандартизован по монографии USP⁵, степень чистоты более 96,0%). Поскольку препараты капреомицина не содержат вспомогательных веществ и представляют собой порошок или лиофилизат субстанции, то любой такой препарат может быть проанализирован по методике анализа субстанции. Испытания проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies). За основу при разработке методики были выбраны условия хроматографирования, приведенные в монографии на капреомицин сульфат в IP.

Выбранные условия проведения анализа существенно отличались от условий хроматографи-

рования IP. Хроматографические условия, приведенные в IP:

- буферный раствор pH 2,3, представляющий собой 54,4 г (0,4 моль) дигидрофосфата калия и 9,4 г (50 ммоль) гексансульфоната натрия, растворенные в 1500 мл воды очищенной. pH раствора доведен до значения 2,3 с помощью концентрированной фосфорной кислоты (85%, Sigma-Aldrich, кат. № 695017), объем раствора доведен до 2000 мл;
- подвижная фаза А (ПФ А): смесь ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific, кат. № 325730025) и буферного раствора pH 2,3 в соотношении 5:95 (об.:об.);
- подвижная фаза В (ПФ В): смесь ацетонитрила и буферного раствора pH 2,3 в соотношении 15:85 (об.:об.);
- хроматографическая колонка: C18, 250×4,6 мм, 5 мкм;
- скорость потока: 1 мл/мин;
- УФ-детектирование при длине волны 268 нм;
- объем вкола: 20 мкл (при концентрации испытуемого раствора 2 мг/мл, растворение в ПФ А).

Программа градиентного режима элюирования представлена в *таблице 1*. В методике IP не указаны стадии 2.1 и 3.1, но они были добавлены, поскольку программное обеспечение используемого хроматографа не позволяет менять состав подвижной фазы скачкообразно, а плавное его изменение позволяет избежать появления системных пиков, характерных для изменения состава подвижной фазы.

Для выбора хроматографической колонки применен изократический режим с использованием элюента, состоящего из смеси ПФ А и ПФ В (методика по IP), соотношение которых изменяли в зависимости от температуры термостатирования колонки. Интервал температур термостатирования колонок был выбран от 30 до 70 °С для ВЭЖХ колонок Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies) и XBridge BEH130 C18 (Waters) и от 30 до 60 °С для колонки Acclaim C18 (Thermo Scientific). Подробные характеристики колонок приведены в *таблице 2*. При использовании ВЭЖХ колонок BEH C18, CSH C18, BEH C8, BEH Phenyl (Waters), YMC-Triart C18 (YMC Inc.) и Kinetex C18 (Phenomenex) устанавливали температуру термостатирования 70 °С. При этой температуре основными составами подвижной фазы являлись состав 1 (ПФ А : ПФ В 90:10) и состав 2 (ПФ А : ПФ В 80:20). При использовании ВЭЖХ колонок скорость потока составляла 1 мл/мин, ВЭЖХ колонок — 0,2 мл/мин. Объем

⁵ Capreomycin sulfate. United States Pharmacopeia. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

Таблица 1. Программа градиентного режима элюирования методики Международной фармакопеи

Table 1. Gradient elution programme for the analytical procedure of The International Pharmacopoeia

Стадии <i>Stages</i>	Время, мин <i>Time, min</i>	Подвижная фаза А, % <i>Mobile phase A, %</i>	Подвижная фаза В, % <i>Mobile phase B, %</i>
1	0–25	55 → 52	45 → 48
2	25–40	52	48
2.1	40–41	52 → 30	48 → 70
3	41–60	30	70
3.1	60–61	30 → 55	70 → 45
4	61–70	55	45

Таблица 2. Основные характеристики использованных колонок

Table 2. Main characteristics of the columns used

Колонка <i>Column</i>	Привитая фаза <i>Ligand type</i>	Длина, мм <i>Length, mm</i>	Внутренний диаметр, мм <i>Inner diameter, mm</i>	Размер частиц, мкм <i>Particle size, µm</i>	Степень покрытия (доля углерода), % <i>Carbon load, %</i>	Площадь поверхности, м²/г <i>Surface area, m²/g</i>	Диаметр пор, Å <i>Pore size, Å</i>
Колонки ВЭЖХ <i>HPLC columns</i>							
Acclaim	C18	250	4,6	5	18	300	120
XBridge	C18	250	4,6	5	18	185	130
Zorbax SB	C18	250	4,6	5	10	180	80
Колонки УВЭЖХ <i>UHPLC columns</i>							
BEH	C18	150	2,1	1,7	17,7	185	130
Kinetex	C18	150	2,0	1,7	10	200	100
CSH	C18	100	2,1	1,7	15	185	130
YMC Triart	C18	150	2,0	1,9	20	360	120
BEH	C8	150	2,1	1,7	12,8	185	130
BEH	Phenyl	150	2,1	1,7	14,5	185	130

вкола при использовании ВЭЖХ колонок – 20 мкл (согласно методике IP), при использовании УВЭЖХ колонок – 5 мкл.

Для подтверждения эффективности разделительной способности экспериментальной хроматографической системы было проведено хроматографирование растворов капуреомидина сульфата после искусственной деструкции. Исходный раствор субстанции капуреомидина сульфата приготовлен при растворении 500 мг в 250 мл воды (раствор 1). Для проведения разложения в щелочной среде к 25 мл исходного раствора было добавлено 75 мкл 32% (50 мМ) раствора аммиака, полученные растворы выдерживали в течение 24 ч при температуре 60 °С (раствор 2) или 80 °С (раствор 3). Искусственное разложение в кислотной среде проводили

следующим образом: к 25 мл исходного раствора было добавлено 95 мкл раствора (50 мМ) трифторуксусной кислоты, затем полученные растворы выдерживали в течение 24 ч при температуре 60 °С (раствор 4) или 80 °С (раствор 5). Для проверки разрешающей способности был использован раствор, полученный при смешивании растворов 3 и 5 в пропорции 1:1 и дальнейшем 5-кратном разведении водой (раствор 6).

Для оценки влияния различных катионов дигидрофосфата (реактива, который используют в качестве основного компонента буферного раствора) были приготовлены подвижные фазы на основе дигидрофосфата калия, натрия и аммония. Концентрации исходных буферных растворов были одинаковы (200 мМ по катиону, при доведении pH до 2,3 ортофосфорной

кислотой). К растворам солей добавляли 1-гексансульфонат натрия в таком количестве, чтобы его конечная концентрация составляла 25 мМ, затем буферный раствор смешивали с ацетонитрилом в соотношении 94:6 (аналогично составу 1).

Характеристики пиков, используемые как показатели эффективности разделения, рассчитывали как среднее значение показателя для 5 вколов проб растворов капреомицина.

После анализа влияния различных факторов на эффективность разделения компонентов и примесей фармакопейный метод анализа компонентов капреомицина был модифицирован и доработан.

Экспериментальные условия хроматографирования:

- буферный раствор pH 2,3, представляющий собой 48 г (0,4 моль) дигидрофосфата натрия и 9,4 г (50 ммоль) гексансульфоната натрия, растворенные в 1500 мл воды очищенной. pH раствора доведен до значения 2,3 с помощью концентрированной фосфорной кислоты (85%, Sigma-Aldrich), и объем доведен до 2000 мл;
- подвижная фаза А: смесь 5 объемов ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific) и 95 объемов буферного раствора pH 2,3;
- подвижная фаза В: смесь 10 объемов ацетонитрила (99,9%, Thermo Fisher Scientific) и 90 объемов буферного раствора pH 2,3;
- хроматографическая колонка: C18, 150×2,1 мм, 1,7 мкм (BEH C18, Waters);
- температура колонки: 70 °С, нагрев колонки при потоке элюента (~0,1–0,125 мл/мин);
- скорость потока: 0,2 мл/мин;
- УФ-детектирование при длине волны 268 нм;
- объем вкола: 5 мкл (при концентрации испытуемого раствора 0,4 мг/мл, растворение в подвижной фазе А);
- давление системы: ~300 бар.

Таблица 3. Программа градиентного режима элюирования разработанной методики

Table 3. Gradient elution programme for the experimental analytical procedure

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0–80	100 → 20	0 → 80
80–81	20 → 0	80 → 100
81–95	0	100

Программа градиентного режима элюирования представлена в *таблице 3*.

Результаты и обсуждение

Препараты капреомицина представляют собой лиофилизат или порошок субстанции капреомицина сульфата без добавления вспомогательных веществ. Все пики, идентифицированные на хроматограммах, кроме пиков четырех компонентов капреомицина и системных пиков, можно считать пиками примесей.

Для проверки возможности определения примесей, являющихся продуктами разложения капреомицина, по фармакопейной методике хроматографировали растворы 1 и 6. Типичные хроматограммы данных растворов приведены на *рисунке 2* (опубликован на сайте журнала⁶).

По данным хроматограмм, полученным по методике ИР, были рассчитаны основные характеристики (количество теоретических тарелок, фактор асимметрии и разрешение) пиков капреомицина и пиков примесей. В *таблице 4* приведены усредненные результаты хроматографирования растворов 1 и 6.

При увеличении температуры термостатирования колонки на хроматограммах раствора 3 наблюдается разделение пика компонента капреомицина IB и пика неизвестной примеси, обозначенной A1. Площадь пика данной примеси сопоставима с площадью пика компонента IB. На *рисунке 3* (опубликован на сайте журнала⁷) приведена типичная хроматограмма, полученная на колонке, соответствующей требованиям ИР (XBridge BEH C18), при увеличении температуры термостатирования колонки до 70 °С. Характеристики пиков, полученные в данных условиях, приведены в *таблице 5*.

Одинаковые спектры поглощения элюата, полученного при временах удерживания максимумов пиков (*рис. 4*, опубликован на сайте журнала⁸), указывают на одинаковую основную хроматофорную группу у компонентов капреомицина IA и IB и примесей A1 и A2, а длина волны детектора 268 нм соответствует максимуму поглощения для этих пиков.

Увеличение температуры термостатирования колонки до 70 °С приводит к значительному уменьшению давления в хроматографической системе, что позволяет осуществить переход с колонок ВЭЖХ на колонки УВЭЖХ на приборе с ограничением давления не более 400 бар.

⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig2>

⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig3>

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig4>

Таблица 4. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками по методике IP**Table 4.** Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained according to The International Pharmacopoeia

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Исходный раствор субстанции капреомицина сульфата <i>Stock solution of capreomycin sulfate</i>					
25,8	0,59	IIA	15176±245	1,0	2,4/2,3
30,4	0,70	IIB	15762±318	1,0	1,1/4,1
43,5	1,00	IB	14851±301	1,1	1,7/3,4
48,6	1,12	IIA	15588±212	1,1	3,4/1,9
Раствор субстанции капреомицина сульфата после щелочного гидролиза <i>Capreomycin sulfate solution after alkaline hydrolysis</i>					
28,4	0,60	IIA	15512±255	1,0	1,4/1,4
35,0	0,74	IIB	20766±332	0,9	1,2/1,7
47,4	1,00	IA	15583±285	1,0	1,9/1,6
51,7	1,09	IB	28480±365	1,1	1,5/1,6

Таблица 5. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками на хроматограмме, полученной при использовании колонки XBridge BEH C18, при составе 1 подвижной фазы (буферный раствор pH 2,3 и ацетонитрил в соотношении 94:6) и температуре термостатирования колонки 70 °С**Table 5.** Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained on an XBridge BEH C18 column with mobile phase 1 (pH 2.3 phosphate buffer and acetonitrile (94:6)) at an oven temperature of 70 °C

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Раствор субстанции капреомицина сульфата после щелочного гидролиза <i>Capreomycin sulfate solution after alkaline hydrolysis</i>					
44,2	0,60	IA	15892	1,17	3,0/4,2
50,9	0,74	IB	15261	1,16	1,0/1,5
53,4	1,00	A1	15539	1,07	1,5/2,5
93,6	1,09	A2	16230	1,12	11,9/н.о.*

* пик отсутствует.

* no peak detected.

Данный переход позволил увеличить эффективность при уменьшении расхода подвижной фазы. Температура хроматографической колонки была установлена на 70 °С, нагревание колонок до указанной температуры проводили при скорости потока элюента (~0,1–0,125 мл/мин), что позволяло не превышать предельное давление в системе. В дальнейшем при анализе скорость потока увеличили до 0,2 мл/мин.

Работа при температуре 70 °С существенно ограничила перечень хроматографических колонок, которые можно использовать при анализе. Тем не менее для подбора оптимальной хроматогра-

фической колонки с наилучшей селективностью было выбрано несколько колонок, в том числе колонки с привитой фазой, отличной от C18 (октилсилильной (BEH C8) и фенилсилильной (BEH Phenyl)). Рассчитанное относительное содержание компонентов капреомицина по отношению к сумме компонентов без учета примесей, время удерживания пиков капреомицина IB и близлежащей к нему примеси, обозначенной как A1, и разрешение между ними приведены в таблице 6. Компонентный состав рассчитан как отношение площадей пиков четырех компонентов капреомицина.

При хроматографировании раствора 6 по экспериментальной методике с использованием подвижной фазы (состав 1; 6% ацетонитрила) в качестве основного показателя эффективности колонки была выбрана оценка разрешения пиков капреомицина IB и примеси A1 (обозначение примеси произвольное, выбранное авторами). В случае, когда время удерживания пика примеси A1 превышало 80 мин, дополнительно проводили анализ с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе (состав 2; 7% ацетонитрила). Это позволило уменьшить время удерживания компонента IB и примеси A1 почти в 2 раза. Исходя из полученных результатов, наиболее эффективной оказалась колонка ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм). Интересно отметить, что примесь A1, вероятно, является производным компонента IB, о чем свидетельствует

относительное содержание этого компонента капреомицина. При использовании колонки ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм) оно составило 47,5%, при использовании колонки ВЕН C8 (150×2,1 мм, 1,7 мкм) – 60,6%, в последнем случае пик примеси A1 на хроматограмме не обнаружен.

Следующий этап работы был подбор оптимального состава элюента, в частности выбор катиона дигидрофосфата, составляющего основу буферного раствора в составе гидрофильного компонента подвижной фазы. Все три подвижные фазы имели одинаковые молярные концентрации по катиону дигидрофосфата, значение pH, содержание 1-гексансульфоната натрия и долю ацетонитрила. Хроматограммы раствора 6, полученные на колонке ВЕН C18 (150×2,1 мм, 1,7 мкм), представлены на рисунке 5

Таблица 6. Сравнение эффективности колонок при определении компонентного состава капреомицина

Table 6. Comparative performance of columns in determining the component composition of capreomycin

Колонка <i>Column</i>	Привитая фаза <i>Ligand type</i>	Относительный компонентный состав, % <i>Relative component composition, %</i>				Разделение пиков IB и A1 <i>IB and A1 peak resolution</i>			Число теоретических тарелок пика IB <i>Number of theoretical plates for the IB peak</i>
						Время удерживания мин <i>Retention time, min</i>		Разрешение <i>Peak resolution</i>	
		IIA	IIB	IA	IB	IB	A1		
Колонки ВЭЖХ <i>HPLC columns</i>									
Методика по Международной фармакопее <i>The International Pharmacopoeia procedure</i>									
Acclaim	C18	1,3±0,1	1,5±0,1	35,6±1,1	61,6±1,3	51,71±0,2	–	0	14843±125
Xbridge	C18	1,2±0,1	1,4±0,1	34,9±0,9	62,5±1,3	53,24±0,2	–	0	15321±101
Zorbax SB	C18	1,4±0,1	1,6±0,1	35,8±1,3	61,2±1,4	52,18±0,2	–	0	15110±96
Изократический режим при увеличении температуры <i>Isocratic mode with increasing temperature</i>									
Acclaim	C18	1,3±0,1	1,5±0,1	35,6±1,1	61,6±1,3	52,4±0,2	54,1±0,2	1,20±0,07	25534±225
Xbridge	C18	1,2±0,1	1,4±0,1	34,9±0,9	62,5±1,3	50,9±0,2	53,4±0,2	1,50± 0,06	29534±116
Zorbax SB	C18	1,4±0,1	1,6±0,1	35,8±1,3	61,2±1,4	49,3±0,2	51,3±0,2	1,43± 0,04	27534±102
Колонки УВЭЖХ <i>UHPLC columns</i>									
BEH	C18	1,6±0,1	0,7±0,1	50,2±1,2	47,5±1,3	85,7±0,2	91,3±0,2	2,07±0,07	17028±296
Kinetex	C18	1,6±0,1	0,9±0,1	51,5±1,3	46±1,5	75±0,1	79,5±0,1	1,43±0,02	10345±76
CSH	C18	1,5±0,1	1,6±0,1	45,4±1,9	51,4±1,6	40,7±0,1	43,2±0,1	1,12±0,01	13800±68
YMC Triart	C18	1,9±0,1	1,8±0,1	52,2±1,8	44±1,2	73,1±0,2	74,8±0,2	0,7±0,02	15528±241
BEH 7%	C18	1,7±0,1	1,6±0,1	49,9±1,3	46,3±0,6	45,5±0,1	49,2±0,1	1,66±0,03	18377±210
BEH	C8	0,9±0,1	0,6±0,1	37,8±1,6	60,6±1,2	53,4±0,1	–	0	14943±192
BEH	Phenyl	1,7±0,1	1±0,1	50,3±0,5	47±1,9	20,9±0,1	21,9±0,2	1,46±0,03	17124±214

«–» – пик отсутствует.

–, no peak detected.

(опубликован на сайте журнала⁹). Для подвижных фаз с использованием дигидрофосфата калия и дигидрофосфата натрия были получены схожие профили хроматограмм (рис. 5а, б, опубликован на сайте журнала¹⁰). В случае применения дигидрофосфата натрия обнаружено незначительное увеличение времени удерживания при увеличении эффективности разделения основных пиков. При применении дигидрофосфата аммония (рис. 5с, опубликован на сайте журнала¹¹) обнаружено значительное изменение профиля хроматограммы с изменением порядка выхода пиков, меньшая разрешающая способность для основных пиков и меньшее общее количество детектируемых минорных пиков, а также увеличение времени удерживания всех пиков. После анализа полученных данных было принято решение использовать в составе подвижной фазы дигидрофосфат натрия.

Для увеличения эффективности и сокращения времени проведения анализа был произведен переход от изократического к градиентному режиму. Согласно программе градиента содержание ацетонитрила в подвижной фазе увеличивалось с 5% в начальных условиях с клиренсом содержания ацетонитрила 0,05%/мин. В таком режиме наибольшее время выхода всех пиков, ассоциированных с капреомицином, составляло около 80 мин (при достижении содержания ацетонитрила 9%). Были получены хроматограммы исходного раствора капреомицина (раствор 1) и растворов 2–5. На их основе проведен качественный и количественный анализ обнаруживаемых продуктов деструкции капреомицина (рис. 6, опубликован на сайте журнала¹²). В зависимости от выявленного содержания были выделены две группы примесей: более 1,0% (А1–А14) и 0,1–1% (В1–В24). Максимальное число пиков

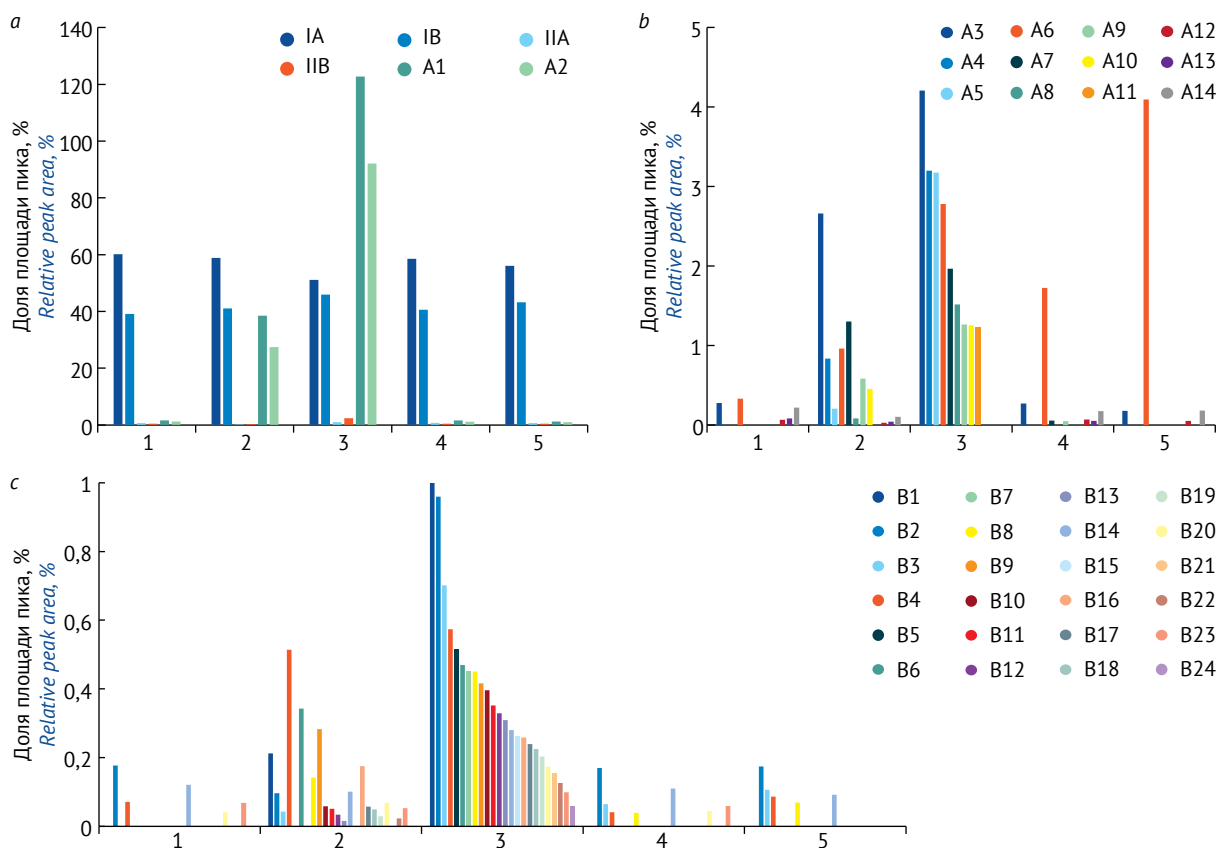


Рис. 7. Относительное содержание основных компонентов капреомицина и примесей А1 и А2 (а), примесей А3–А14 (б) и минорных примесей (с) в растворах в пересчете на сумму компонентов IA, IB, IIA, IIB (1 – исходный раствор, 2 – щелочной гидролиз при 60 °С, 3 – щелочной гидролиз при 80 °С, 4 – кислотный гидролиз при 60 °С, 5 – кислотный гидролиз при 80 °С).

Fig. 7. Relative content of the main components and impurities A1 and A2 (a), impurities A3–A14 (b), and minor impurities (c) in capreomycin solutions expressed as the sum of components IA, IB, IIA, and IIB (1, stock solution; 2, solution after alkaline hydrolysis at 60 °C; 3, solution after alkaline hydrolysis at 80 °C; 4, solution after acid hydrolysis at 60 °C; 5, solution after acid hydrolysis at 80 °C).

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig5>

¹⁰ Там же.

¹¹ Там же.

¹² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig6>

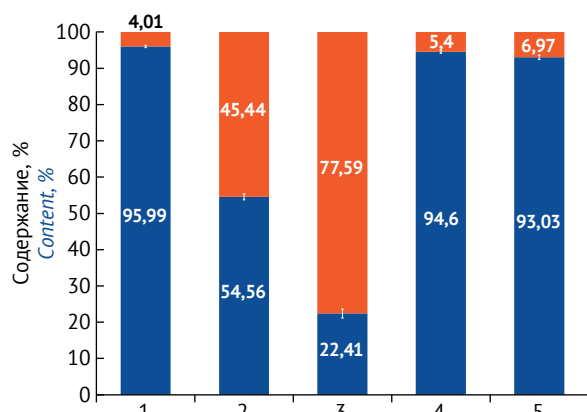


Рис. 8. Относительное суммарное содержание компонентов капреомицина (синий цвет) и примесей (оранжевый цвет), образовавшихся в ходе гидролиза субстанции (1 – исходный раствор, 2 – щелочной гидролиз при 60 °С, 3 – щелочной гидролиз при 80 °С, 4 – кислотный гидролиз при 60 °С, 5 – кислотный гидролиз при 80 °С)

Fig. 8. Relative total content of capreomycin components (red) and impurities (orange) formed during artificial degradation of the active pharmaceutical ingredient (1, stock solution; 2, solution after alkaline hydrolysis at 60 °C; 3, solution after alkaline hydrolysis at 80 °C; 4, solution after acid hydrolysis at 60 °C; 5, solution after acid hydrolysis at 80 °C)

примесей А (11) и примесей В (24) обнаружено на хроматограмме раствора 3 (щелочной гидролиз, 80 °С, рис. 6с, опубликован на сайте журнала¹³), что характерно для пептидных соединений, которые легко разрушаются в щелочной среде. При кислотном гидролизе количество

образующихся примесей значительно меньше, при этом пики продуктов разложения, характерные только для кислотного гидролиза, не обнаружены. Относительное содержание основных компонентов и примесей представлено на рисунке 7.

Примеси А1 и А2 являются основными продуктами щелочного гидролиза капреомицина (рис. 6с, опубликован на сайте журнала¹⁴). В водном растворе аммиака капреомицин при 60 °С разлагается с образованием примесей А1 и А2 в количестве, сравнимом с содержанием основных компонентов капреомицина IА и IВ, при 80 °С содержание примесей А1 и А2 превосходит суммарное содержание основных компонентов капреомицина. Содержание каждой из примесей А1 и А2 в исходном растворе больше, чем содержание минорных компонентов капреомицина IIA и IIB. На хроматограмме раствора 1 наблюдались несколько пиков (А12, А13 и А14), площади которых уменьшаются при разложении независимо от способа деструкции. Возможно, эти пики обусловлены неидентифицированными компонентами капреомицина. Учитывая, что капреомицин образуется путем биосинтеза, такое предположение может быть правомерным. Сравнение суммарного содержания компонентов капреомицина относительно содержания примесей в растворах 1–5 дает возможность оценить степень разложения капреомицина (рис. 8).

Таблица 7. Характеристики пиков компонентов капреомицина и разрешение с ближайшими пиками по экспериментальной методике

Table 7. Characteristics of major capreomycin peaks and their resolution with the nearest peaks obtained according to the experimental analytical procedure

Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	Относительное время удерживания <i>Relative retention time, min</i>	Название пика <i>Peak name</i>	Число теоретических тарелок <i>Number of theoretical plates</i>	Фактор асимметрии <i>Tailing factor</i>	Разрешение с ближайшими пиками (до/после) <i>Resolution between the closest peaks (preceding/ following)</i>
Исходный раствор <i>Stock solution</i>					
31,5	0,60	IIA	62682	1	7,9/7,8
35,7	0,68	IIB	61041	1,2	7,8/20,4
52,1	1,00	IA	67421	1,4	1,9/4,6
55,7	1,07	IB	88986	1,4	4,6/2,2
Раствор после щелочного гидролиза (раствор 3) <i>Solution after alkaline hydrolysis (solution 3)</i>					
31,3	0,60	IIA	60957	1,7	0,8/2,7
35,8	0,69	IIB	26288	0,8	2,5/1,1
52,2	1,00	IA	105558	1,1	1,7/2,6
55,6	1,06	IB	94651	1,1	0,7/1,9

¹³ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-451-fig6>

¹⁴ Там же.

На основе полученных в ходе градиентного элюирования хроматограмм рассчитаны характеристики пиков компонентов капреомицина и продуктов деградации: количество теоретических тарелок, фактор асимметрии, разрешение между близлежащими пиками. В *таблице 7* приведены результаты, рассчитанные по хроматограмме раствора 1 и раствора 3. Показатель эффективности свидетельствует о достаточно высокой емкости выбранной для анализа колонки. Факторы асимметрии 0,8–1,4 основных пиков и разрешение между соседними пиками позволяют адекватно рассчитывать их площади на хроматограммах, получаемых в предлагаемых условиях хроматографирования, как для растворов препарата, так и для растворов после искусственного разложения.

Заключение

Разработанная методика на основе ион-парной ультраэффективной хроматографии по эффек-

тивности не уступает методике Международной фармакопеи и позволяет обнаружить больше примесей капреомицина, чем фармакопейная методика. Пики основных компонентов капреомицина четко разделены, что позволяет адекватно рассчитывать сумму компонентов. При этом на хроматограммах было зафиксировано большее количество пиков неизвестных соединений, чем на хроматограммах, полученных по фармакопейной методике, что позволяет более качественно оценивать препараты капреомицина по содержанию примесей.

Разработанная методика позволяет одновременно оценивать субстанции капреомицина по содержанию как основных компонентов, так и примесных соединений. Методика может быть использована для стандартизации конечного продукта, изучения фармацевтических свойств и стабильности лекарственных средств капреомицина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shiba T, Nomoto S, Wakamiya T. The chemical structure of capreomycin. *Experientia*. 1976;32(9):1109–11. <https://doi.org/10.1007/BF01927571>
2. Gobbi A, Frenking G. Y-conjugated compounds: the equilibrium geometries and electronic structures of guanidine, guanidinium cation, urea, and 1,1-diaminoethylene. *J Am Chem Soc*. 1993;115(6):2362–72. <https://doi.org/10.1021/ja00059a035>
3. Browning RH, Donnerberg RL. Capreomycin – experiences in patient acceptance and toxicity. *Ann NY Acad Sci*. 1966;135(2):1057–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb45546.x>
4. Lee SH, Shin J, Choi JM, Lee EY, Kim DH, Suh JW, Chang JH. The impurities of capreomycin make a difference in the safety and pharmacokinetic profiles. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(1):81–3. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00124-9)
5. Liu G, Luan B, Liang G, Xing L, Huang L, Wang C, Xu Y. Isolation and identification of four major impurities in capreomycin sulfate. *J Chromatogr A*. 2018;1571:155–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.015>
6. Chopra S, Pendela M, Hoogmartens J, Van Schepdael A, Adams E. Impurity profiling of capreomycin using dual liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Talanta*. 2012;100:113–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.090>
7. Mallampati S, Huang S, Ashenafi D, Van Hemelrijck E, Hoogmartens J, Adams E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the analysis of capreomycin sulfate and its related substances. *J Chromatogr A*. 2009;1216(12):2449–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.031>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.Ю. Якупов — идея, разработка условий проведения испытаний, проведение испытаний по экспериментальной методике и интерпретация полученных результатов, анализ и подбор литературы, написание текста рукописи, графическое оформление; С.И. Кулешова — идея, общая концепция исследования, написание текста рукописи, анализ результатов; Е.П. Симонова — консультации при подборе хроматографических колонок, анализ и интерпретация полученных результатов; А.С. Демидов — проведение испытаний по фармакопейной методике и интерпретация полученных результатов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya Yu. Yakupov elaborated the study idea and testing conditions, conducted tests according to the experimental analytical procedure and interpreted the results, analysed and selected literature, and prepared the graphical material. Svetlana I. Kuleshova elaborated the study idea and general concept, drafted the manuscript, and analysed the results. Elena P. Simonova advised the team on column selection, analysed and interpreted the results obtained. Alexander S. Demidov conducted tests according to the pharmacopoeial analytical procedure and interpreted the results obtained.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

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

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

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

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Якупов Илья Юрьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>
yakupoviy@expmed.ru

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>
Kuleshova@expmed.ru

Симонова Елена Павловна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
simonovae@expmed.ru

Демидов Александр Сергеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7061-2123>
demidovas@expmed.ru

Ilya Yu. Yakupov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>
yakupoviy@expmed.ru

Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>
Kuleshova@expmed.ru

Elena P. Simonova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
simonovae@expmed.ru

Alexander S. Demidov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7061-2123>
demidovas@expmed.ru

Поступила 28.04.2022

После доработки 27.01.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Online first 16.05.2023

Received 28 April 2022

Revised 27 January 2023

Accepted 7 March 2023

Online first 16 May 2023