



Перспективы применения метода ионной хроматографии в оценке качества биологических лекарственных препаратов

А.С. Минеро , О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц

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

✉ Минеро Анастасия Сальвадоровна; minero@expmed.ru

Резюме

Количественная характеристика вспомогательных веществ, входящих в состав биологических лекарственных препаратов (БЛП), является важной составляющей процесса подтверждения качества как на уровне готового продукта, так и на стадиях промежуточных продуктов, в том числе фармацевтических субстанций. Метод ионной хроматографии с амперометрическим и кондуктометрическим способами детектирования продуктов разделения обладает рядом достоинств, основным из которых является возможность прямого определения малолетучих соединений, не имеющих хромофорных групп и не обладающих собственной флуоресценцией. Цель работы – на основании сравнительного анализа метода ионной хроматографии и альтернативных методов определить перспективные области применения метода ионной хроматографии в оценке качества БЛП. На основании результатов проведенного анализа нормативной документации и данных литературы обобщены методы количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой в БЛП. Рассмотрены возможности применения метода ионной хроматографии для определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в БЛП. Показана целесообразность применения метода ионной хроматографии для одновременного количественного определения катионов (аммоний, кальций, магний) и анионов (хлориды, сульфаты, нитраты) в растворителе для лиофилизированных БЛП, для оценки качества действующего вещества БЛП (количественное определение полисахарида в полисахаридных вакцинах, гликопрофиль гликозилированных протеинов и т.д.), а также при определении нескольких стабилизаторов углеводной природы БЛП одной методикой. Сделан вывод, что ионообменная хроматография с кондуктометрическим и амперометрическим детектированием при оценке качества БЛП в ближайшей перспективе может занять лидирующие позиции в количественной оценке вспомогательных веществ с ионной структурой, стабилизаторов углеводной природы и основного действующего вещества – полисахарида в полисахаридных вакцинах, в том числе вакцинах национального календаря профилактических прививок.

Ключевые слова: ионная хроматография; ионообменная ВЭЖХ; биологические лекарственные препараты; полисахаридные вакцины; углеводы; кондуктометрическое и амперометрическое детектирование

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Устинникова О.Б., Мовсесянц А.А. Перспективы применения метода ионной хроматографии в оценке качества биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(2):154–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-154-169>

Prospects for ion chromatography in quality assessment of biologicals

A.S. Minero ✉, O.B. Runova, O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants

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

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

Abstract

Quantitative characterisation of excipients in biologicals is an important part of the quality assurance process both at the level of finished products and intermediates, as well as active pharmaceutical ingredients. Ion chromatography with amperometric and conductometric detection of separation products has a number of advantages. The main of the advantages is the possibility of direct determination of semivolatile compounds that have neither chromophoric groups, nor intrinsic fluorescence. The aim of this study was to compare ion chromatography with alternative methods in order to identify promising areas for its use in assessing the quality of biologicals. The authors analysed regulatory documents and literature and summarised the methods applied for quantitative determination of ionic excipients in biological medicinal products. The authors investigated the possibility of using ion chromatography for determination of the main active pharmaceutical ingredient in polysaccharide vaccines and excipients in biologicals. The study demonstrated the feasibility of ion chromatography for simultaneous quantitation of cations (ammonium, calcium, magnesium) and anions (chlorides, sulfates, nitrates) in reconstitution solvents for lyophilised biologicals; quality assessment of active pharmaceutical ingredients in biologicals (quantitative analysis of polysaccharides in polysaccharide vaccines, profiling of glycosylated proteins, etc.); and determination of several carbohydrate stabilisers in biologicals with the same analytical procedure. According to the conclusions, ion-exchange chromatography with conductometric and amperometric detection, aimed at quality assessment of biological products, can shortly take a leading position in quantitation of ionic excipients, carbohydrate stabilisers, and main active ingredients (polysaccharides) in polysaccharide vaccines, including the vaccines in the immunisation schedule.

Key words: ion chromatography; ion-exchange HPLC; biologicals; polysaccharide vaccines; carbohydrates; conductometric and amperometric detection

For citation: Minero A.S., Runova O.B., Ustinnikova O.B., Movsesyants A.A. Prospects for ion chromatography in quality assessment of biologicals. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):154–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-154-169>

Введение

Метод ионной хроматографии был разработан в 1975 г. [1] и за короткое время из способа детектирования небольшого числа ионов превратился в самостоятельный вид анализа [2]. Ион-парная ВЭЖХ, ион-эксклюзионная ВЭЖХ, ионообменная ВЭЖХ с последующим УФ- или флуориметрическим детектированием продуктов разделения применяется при оценке качества биологических лекарственных препаратов (БЛП) достаточно давно [3–16]. Также в последние годы в нормативной документации на БЛП представлены методики ионной хроматографии с кондуктометрическим или амперометрическим детектированием.

Достоинством кондуктометрического и амперометрического детекторов в хроматографи-

ческом анализе является возможность их использования для прямого высокоселективного определения малолетучих соединений, не имеющих хромофорных групп и не обладающих собственной флуоресценцией.

Цель работы – на основании сравнительного анализа метода ионной хроматографии и альтернативных методов определить перспективные области применения данного метода ионной хроматографии в оценке качества БЛП.

Важным аспектом разработки современных лекарственных препаратов является не только изучение свойств основного действующего компонента, но и научно обоснованный выбор вспомогательных веществ, предназначенных для формирования, конструирования

лекарственных форм и терапевтических систем, а также для обеспечения стабильности. Вспомогательные вещества должны обеспечивать надлежащий фармакологический эффект и фармакокинетические параметры лекарственного препарата [17, 18].

В статье представлены результаты проведенного анализа нормативной документации и данных литературы.

Применение метода ионной хроматографии для определения вспомогательных веществ с ионной структурой

В настоящее время метод ионной хроматографии с подавлением фоновой проводимости и последующим кондуктометрическим детектированием используется рядом зарубежных производителей БЛП для количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой, таких как натрия хлорид, каприловая кислота, а также катионы и анионы в растворителе для лиофилизированных препаратов. Однако количественная оценка вспомогательных веществ с ионной структурой отличается большим методическим разнообразием и метод ионной хроматографии – пока не самое распространенное решение (табл. 1).

На основе информации, представленной в таблице 1, можно предположить, что методическое разнообразие оценки количественного содержания вспомогательных веществ с ионной структурой обусловлено отсутствием фармакопейных методик и необходимостью использования высокотехнологичного оборудования, уже имеющегося на предприятии.

Инструментальные достоинства метода ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием очевидны: небольшой расход анализируемого соединения (около 0,3 мл); простая пробоподготовка, предполагающая разведение испытуемого образца и при необходимости исключение белка; короткое время анализа (около 10 мин); возможность использования подвижных фаз, не требующих доведения pH; автоматизированный процесс всей последовательности анализа, что обеспечивает полную прослеживаемость результатов. Кроме того, существенным конструктивным достоинством современных ионных хроматографов является возможность одновременного детектирования анионов и катионов, а также автоматизированного генерирования элюентов, что исключает стадию приготовления подвижной фазы и работу с концентрированными едкими растворами.

Таким образом, использование метода ионной хроматографии для определения вспомогательных веществ с ионной структурой, в силу высокой стоимости оборудования и необходимости наличия высококвалифицированных кадров, экономически целесообразно для крупномасштабных производств, имеющих широкую линейку продукции, где затраты на закупку, обслуживание и персонал окупаются поточной загрузкой оборудования.

Применение метода ионной хроматографии для определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Метод ионной хроматографии с последующим амперометрическим детектированием применяют для определения так называемых электроактивных веществ, обладающих низкой проводимостью, но способных окисляться или восстанавливаться на поверхности электрода. К таким соединениям относятся, например, аминокислоты, углеводы, амины, полиолы. Впервые амперометрический детектор для ВЭЖХ был предложен в 1973 г. для определения катехоламинов в биологических жидкостях [19]. Но, несмотря на длительную историю применения, данный метод не стал самым распространенным в оценке качества лекарственных средств. Максимально полная спецификация на готовый продукт, включающая количественное определение вспомогательных веществ, – сравнительно новая тенденция в контроле качества БЛП. Кроме того, в прошлом данный метод анализа характеризовался плохой воспроизводимостью, поскольку на поверхности электрода оставались продукты окисления аналитов, которые приходилось удалять вручную после каждой инъекции. Современная конструкция детекторов позволяет автоматически чередовать напряжение на электроде, предполагает автоматическую его очистку и восстановление, что существенно повышает воспроизводимость методик.

Также следует отметить, что для анализа состава углеводных смесей существует много других методов, например газовая хроматография с пламенно-ионизационной детекцией [20, 21], ВЭЖХ с флуориметрическим и УФ-детектированием, капиллярный электрофорез. В сравнении с данными методами ионообменная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием является менее трудозатратной. В данном методе применяется стандартная пробоподготовка

Таблица 1. Методы количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой в биологических лекарственных препаратах
Table 1. Methods for quantitative determination of excipients with ionic structure in biological medicinal products

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
1	Сепротин® (протеин С человеческого) <i>Serprotin® (Human protein C)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
2	Антитромбин III человеческого (анти-тромбин III) <i>Antithrombin III, human (Antithrombin III)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
3	Протромплекс 600 (Факторы свертывания крови II, VII, IX и X в комбинации [Протромбиновый комплекс]) <i>Prothromplex 600 (Coagulation factors II, VII, IX and X in combination [Prothrombin complex])</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
4	Идельвион® (Албутрепонаког альфа) <i>Idelvion® (Albutreponacog-alfa)</i>	СиЭл Беринг ГмБХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
			Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i>	
			Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i>	
			Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i>	
			Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	
5	Фейба® (Антиингибиторный коагулянтный комплекс) <i>Feiba® (Anti-inhibitor coagulant complex)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия цитрат <i>Sodium citrate</i>	Фотометрический <i>Photometry</i>
6	Альбумин человеческого (альбумин человека) <i>Human albumin (Human albumin)</i>	Бакстер АГ <i>Baxter, AG</i>	Каприловая кислота <i>Caprylic acid</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
7	Коаглекс (Факторы свертывания крови II, VII, IX и X в комбинации) [Протромбиновый комплекс] <i>Coaglex (Coagulation factors II, VII, IX and X in combination [Prothrombin complex])</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i> Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i> Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i> Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i> Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i> Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	Аргентометрический <i>Argentometry</i> Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
8	Полисахаридная менингококковая вакцина А+С <i>Meningococcal polysaccharide vaccine, groups A and C combined</i>	Санofi Пастер С.А. <i>Sanoofi Pasteur, S.A.</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Титриметрический <i>Titrimetry</i>
9	Вилате® Нео (Фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда) <i>Wilate® Neo (Coagulation factor VIII + von Willebrand factor)</i>	Октафарма Фармацевтика Продукт-онгес мбХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i> Цитрат <i>Citrate</i>	Атомно-эмиссионная спектрометрия <i>Atomic emission spectrometry</i> Абсорбционная спектрофотометрия в УФ и видимой области <i>UV-visible absorption spectrophotometry</i>
10	АФСТИЛА® (Лонноктоког альфа) <i>AFSTYLA® (Lanocostocog alfa)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Хлориды <i>Chlorides</i> Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i>	ВЭЖХ <i>HPLC</i> Потенциметрическое титрование <i>Potentiometric titration</i> Атомно-абсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
11	Габриглобин (Имуноглобулин человека нормальный) <i>Gabriglobine (Human normal immunoglobulin)</i>	ГУЗ «Ивановская областная станция переливания крови» <i>Ivanovo Regional Blood Transfusion Station</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
12	Октагам (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Octagam (Human normal immunoglobulin)</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктионгес мБХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Натрий <i>Sodium</i> Калий <i>Potassium</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i>
13	Флебогамма® 5% ДИФ (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Flebogamma® DIF, 5% (Human normal immunoglobulin)</i>	Институт Грифолз, С.А. <i>Instituto Grifols, S.A.</i>	Алюминий <i>Aluminium</i> Хлориды <i>Chlorides</i>	Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i> Потенциометрическое титрование <i>Potentiometric titration</i>
14	Хиберикс® (Вакцина для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип b гемофильной) <i>Hiberix® (Prophylactic vaccine against Haemophilus influenzae type b)</i>	АО «ГлаксосмитКлайн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Хлориды ^a <i>Chlorides^a</i>	Аргентометрическое титрование (обратный способ) <i>Argentometric titration (back titration)</i>
15	Адвейт® (Октоког альфа) <i>Advate® (Octocog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i>	Атомная эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>
16	НовоСэвен® (Эптаког альфа [активированный]) <i>NovoSeven® (Eptacog alfa [activated])</i>	Ново Нордиск А/С <i>Novo Nordisk, A/S</i>	Кальций <i>Calcium</i>	Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
17	Когенэйт ФС (Октоког альфа) <i>Kogenate FS (Octocog alfa)</i>	Байер Хелскаэр ЛЛС <i>Bayer HealthCare, LLC</i>	Натрий <i>Sodium</i> Хлориды <i>Chlorides</i> Кальций <i>Calcium</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i> Титриметрия <i>Titrimetry</i> Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
18	Октофактор® (Мороктоког альфа) <i>Octofactor® (Morococog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Кальция хлорид <i>Calcium chloride</i> Натрия хлорид ^a <i>Sodium chloride^a</i>	Спектрофотометрия атомно-адсорбционная <i>Atomic absorption spectrophotometry</i> Титриметрический <i>Titrimetry</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
19	Рефакто АФ (Мороктоког альфа) <i>ReFacto AF (Moroctocog alfa)</i>	Пфайзер Инк <i>Pfizer, Inc.</i>	Кальция хлорида дигидрат <i>Calcium chloride dihydrate</i>	Атомно-абсорбционная спектроскопия <i>Atomic absorption spectroscopy</i>
20	Нувик (Симоктоког альфа (фактор свертывания крови VIII) человеческий рекомбинантный) <i>Nuvik (Simoctocog alfa (recombinant human coagulation factor VIII))</i>	Октафарма АВ <i>Ostarpharma, AB</i>	Цитрат <i>Citrate</i> Натрий <i>Sodium</i>	ВЭЖХ <i>HPLC</i> Атомно-эмиссионная спектрофотометрия <i>Atomic emission spectrophotometry</i>
			Кальций <i>Calcium</i>	Спектрофотометрический <i>Spectrophotometry</i>
			Хлорид <i>Chloride</i>	Потенциометрическое титрование <i>Potentiometric titration</i>
			Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
			Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i>	Колориметрический <i>Colourimetry</i>
			Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
			Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i>	Колориметрический <i>Colourimetry</i>
			Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
21	Бенефикс® (Нонаког альфа) <i>BeneFix® (Nonacog alfa)</i>	ООО «Вайет» <i>Wyeth, OOO</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>

Примечание. БЛП – биологический лекарственный препарат; МНН – международное непатентованное наименование.

^а В растворителе для лиофилизированных БЛП.

Note: INN – international proprietary name.

^о The parameter is for solvents for lyophilised biologicals.

образца (гидролиз, твердофазная экстракция, разведение и т.д.), в то время как все вышеперечисленные техники требуют дополнительной стадии, а именно предварительной дериватизации углеводов [22]. Так, например, поскольку моносахариды являются нелетучими соединениями, разделение их смесей методом газожидкостной хроматографии возможно после получения летучих триметилсилильных производных [20, 21].

Известно, что в основном растворе углеводы способны ионизироваться [23]. Внедрение стационарных фаз на основе полимеров, обеспечивающих стабильность в широком диапазоне pH, способствовало разработке универсального и эффективного метода разделения углеводов и родственных соединений. Так, в 1988 г. ионная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием была впервые применена для определения содержания моносахаридов в гликозилированных белках [24]. Было отмечено основное достоинство метода: хорошая чувствительность без использования пред- и постколоночной дериватизации. Сегодня ионную хроматографию с пульсирующим амперометрическим детектированием используют для анализа углеводной части гликопротеинов наряду с гидрофильной ВЭЖХ и капиллярным электрофорезом, при этом капиллярный электрофорез предполагает флуориметрическое детектирование олигосахаридов, предварительно дериватизированных флуорофором [25].

В оценке качества БЛП ионообменную хроматографию с амперометрическим детектированием применяют наряду с другими методами количественного определения вспомогательных веществ (аминокислот, углеводов, полиолов) и основного действующего вещества – полисахарида в полисахаридных поливалентных вакцинах (табл. 2).

Для определения таких вспомогательных веществ БЛП, как аминокислоты, моно- и дисахаридные стабилизаторы (табл. 2), чаще используют альтернативные методы, чем ионную ВЭЖХ. Анионообменная ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием в основном используется только зарубежными производителями.

Особое значение ионообменная хроматография приобретает в оценке качества полисахаридных вакцин. Количественное определение основного действующего вещества на стадии готового продукта является обязательным для всех БЛП, к которым относятся вакцины, созданные на основе очищенных бактериальных полисахаридов. Такие вакцины могут быть моно- и поливалентными, т.е. содержать полисахарид одного или нескольких серотипов.

Моновалентные вакцины можно отнести к полисахаридным вакцинам первого поколения, количественная оценка действующего вещества которых проводилась расчетным методом по структурным элементам. Так, например, в менингококковой вакцине, содержащей полисахарид серотипа А, количественная оценка возможна по содержанию фосфора, а в менингококковой вакцине, содержащей полисахариды серотипов А и С, – по фосфору и сиаловой кислоте соответственно. Однако с появлением четырехвалентной менингококковой вакцины, состоящей из серотипов А, С, Y и W-135, данный подход перестает быть селективным, поскольку в состав полисахаридов Y и W-135 также входит сиаловая кислота.

Кроме того, количественное определение полисахарида расчетными методами имеет еще один существенный недостаток: длительная и трудоемкая стадия пробоподготовки, в некоторых случаях включающая препаративное хроматографическое разделение полисахаридов и обессоливание.

Альтернативной расчетному методу может служить иммунохимическое количественное определение полисахаридов в составе поливалентных вакцин. Метод иммунохимической нефелометрии отличается высокой селективностью и точностью, единственным недостатком которого является необходимость наличия специфических иммунохимических реагентов: иммунохимических антисывороток и стандартов, индивидуальных для полисахарида каждого серотипа. Этот метод применяют для количественной оценки полисахаридов каждого серотипа в поливалентных пневмококковых вакцинах, содержащих 13 или 23 серотипа пневмококкового полисахарида [26].

Метод ионной хроматографии с амперометрическим детектированием позволяет количественно определить полисахарид каждой серогруппы в четырехвалентной менингококковой вакцине благодаря относительно простой структуре каждого полисахарида – либо гомополимер: полисахарид серогруппы А (состоит из повторяющихся фрагментов N-ацетилманнозамина, связанных $1\alpha\rightarrow6$ фосфодиэфирными связями) и полисахарид серогруппы С (состоит из повторяющихся фрагментов сиаловой кислоты, связанных $2\alpha\rightarrow9$ гликозидными связями), либо дисахарид из повторяющихся единиц: полисахарид серогруппы Y (состоит из чередующихся фрагментов сиаловой кислоты и D-глюкозы, связанных $2\alpha\rightarrow6$ и $1\alpha\rightarrow4$ гликозидными связями) и полисахарид серогруппы W-135 (состоит из чередующихся фрагментов сиаловой кислоты

Таблица 2. Методы определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах
Table 2. Methods for the determination of the main active ingredient in polysaccharide vaccines and excipients in biologicals

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^а <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
Определение основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах <i>Determination of the main active ingredient in polysaccharide vaccines</i>				
1	Пентаксим® (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомелита инактивированная и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> тип b, конъюгированная) <i>Pentaxim® (Diphtheria and tetanus (adsorbed), pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated) and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine)</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Свободный полисахарид полирибозил-рибитол-фосфат <i>Free polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
2	Инфанрикс® Гекса (Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомелита (инактивированная), гепатита В комбинационная, адсорбированная в комплексе с вакциной для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип b конъюгированной, адсорбированной) <i>Infanrix® Hexa (Diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated), hepatitis B (combined, adsorbed) and Haemophilus influenzae type b (adsorbed) conjugate vaccine)</i>	АО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Полисахарид <i>Haemophilus influenzae</i> тип b <i>Haemophilus influenzae type b polysaccharide</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
3	МЕНАКТРА® [вакцина менингококковая полисахаридная (серогрупп А, С, Y и W-135), конъюгированная с дифтерийным анатоксином] <i>MENACTRA® [Meningococcal (serogroups A, C, Y and W-135) polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine]</i>	Санофи Пастер Инк. <i>Sanofi Pasteur, Inc.</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогрупп А, С, W-135, Y <i>Neisseria meningitidis serogroup A, C, W-135, Y polysaccharide</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
4	МЕНВЕО (Вакцина менингококковая олигосахаридная конъюгированная серогрупп А, С, W-135, Y) <i>MENVEO (Meningococcal (serogroups A, C, W-135, and Y) oligosaccharide conjugate vaccine)</i>	АО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Сахарид (маннозамин-6-фосфат) <i>Saccharide (mannosamine-6-phosphate)</i> Олигосахариды <i>Neisseria meningitidis</i> серогрупп С, W-135, Y <i>Neisseria Meningitidis serogroup C, W-135, Y oligosaccharides</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

5	Полисахаридная менингококковая вакцина А+С <i>Polysaccharide meningococcal vaccine A+C</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогруппы А <i>Neisseria meningitidis serogroup A polysaccharide</i>	Расчетный метод по содержанию фосфора <i>Phosphorus assay</i>
6	МенингоВак А+С (вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная) <i>MeningoVac A + C (Meningococcal (serogroups A and C) polysaccharide vaccine)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогруппы С <i>Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide</i>	Расчетный метод по содержанию сиаловой кислоты <i>Sialic acid assay</i>
7	Превенар® 13 (Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная тринадцативалентная) <i>Prevenar® 13 (13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, adsorbed)</i>	ООО «Вайет» <i>Wyeth, OOO</i>	Полисахариды <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae polysaccharides</i>	Нефелометрия <i>Nephelometry</i>
8	Синфлорикс (Вакцина 10-валентная пневмококковая полисахаридная, конъюгированная с D-протеином нетипируемой <i>Haemophilus influenzae</i> , столбнячным и дифтерийным анатоксинами, адсорбированная) <i>Synflorix (10-valent pneumococcal conjugate vaccine (non-typable Haemophilus influenzae protein D, diphtheria and tetanus toxoid conjugates), adsorbed)</i>	АО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Полисахариды <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae polysaccharides</i>	Кинетическая нефелометрия <i>Kinetic nephelometry</i>
9	Пневмовакс® 23 (Вакцина пневмококковая, поливалентная) <i>Pneumovax® 23 (Polyvalent pneumococcal vaccine)</i>	Мерк Шарп и Доум Б.В. <i>Merck Sharp and Dohme, B.V.</i>	Полисахариды <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae polysaccharides</i>	Кинетическая нефелометрия <i>Kinetic nephelometry</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^a <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
Определение вспомогательных веществ <i>Determination of excipients</i>				
1	АФСТИЛА® (Лонотокког альфа) <i>AFSTYLA® (Lonotocog alfa)</i>	СхЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
2	Вилате® Нео (Фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда) <i>Wilate® Neo Coagulation factor VIII + von Willebrand factor</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктионстес мБХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Фотометрический <i>Photometry</i>
3	Идельвион® (Албутрепонаког альфа) <i>Idelvion® (Albutreponacog-alfa)</i>	СхЭсЭл Беринг ГмбХ CSL <i>CSL Behring, GmbH</i>	Маннитол <i>Mannitol</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
4	Октагам (Имуноглобулин человека нормальный) <i>Octagam (Human normal immunoglobulin)</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктионстес м.б.Х. <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Фотометрический <i>Photometry</i>
5	Пентаксим® (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомелита инактивированная и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> тип b, конъюгированная) <i>Pentaxim® (Diphtheria and tetanus (adsorbed), pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated) and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine)</i>	Санofi Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Поляриметрический <i>Polarimetry</i>
6	МЕНВЕО (Вакцина менингококковая олигосахаридная конъюгированная серогрупп АСW135Y) <i>MENVEO (Meningococcal (serogroups A, C, W-135, and Y) oligosaccharide conjugate vaccine)</i>	АО «ГлаксoСмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Спектрофотометрический <i>Spectrophotometry</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

7	Бериате® (Фактор свертывания крови VIII) <i>Beriate® (Coagulation factor VIII)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмБХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Глицин <i>Glycine</i>	Метод Кьельдала <i>Kjeldahl method</i>
8	Иммуновенин® (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Immunoventin® (Human normal immunoglobulin)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ферментативный <i>Photometry</i>
9	Пентаглобин (Иммуноглобулин человека нормальный [IgG+IgM+IgGA]) <i>Pentaglobin (Human normal immunoglobulin [IgG+IgM+IgGA])</i>	Биотест Фарма ГмБХ <i>Biotest Pharma, GmbH</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
10	Полисахаридная менингококковая вакцина А+С <i>Polysaccharide meningococcal vaccine A+C</i>	Санofi Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Лактоза <i>Lactose</i>	ВЭЖХ с постолонной дериватизацией и спектрофотометрическим детектированием <i>HPLC with post-column derivatisation and spectrophotometric detection</i>
11	МенингоВак А+С (Вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная) <i>MeningoVac A+C (Meningococcal serogroups A and C polysaccharide vaccine)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Лактоза <i>Lactose</i>	Спектрофотометрический метод с антроновым реактивом или ферментативный метод <i>Spectrophotometry with anthrone reagent or enzymatic determination</i>
12	Имбиглобулин (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Imbiglobulin (Human normal immunoglobulin)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Мальтоза <i>Maltose</i>	Спектрофотометрический ферментативный метод <i>Spectrophotometry Enzymatic determination</i>
13	Монолайн® (Фактор свертывания крови IX) <i>Monoline® (Coagulation factor IX)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмБХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	Рефрактометрический <i>Refractometry</i>
14	Инфликсимаб (Инфликсимаб) <i>Infliximab (Infliximab)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Титриметрический (модифицированный метод Хагедорна—Йенсена) <i>Titrimetry (modified Hagedorn—Jensen method)</i>
15	Лейцита® (Филграстим) <i>Leicita® (Filgrastim)</i>	ООО «Сигардис Рус» <i>Sigardis Rus, OOO</i>	Сорбитол <i>Sorbitol</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
16	Эмплицити® (Элотузумаб) <i>Empliciti® (Elotuzumab)</i>	Бристол-Майерс Сквибб Компани <i>Bristol-Myers Squibb Company</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^a <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
17	Далибра® (АдалIMUMaB) <i>Dalibra® (Adalimumab)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Маннитол <i>Mannitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
18	Экстимия® (Эмпрегфилграстим) <i>Extimia® (Empregfilgrastim)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Маннитол <i>Mannitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
19	Иммуноглобулин Сигардис (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Immunoglobulin-Sigardis (Human normal immunoglobulin)</i>	ООО «Сигардис Рус» <i>Sigardis Rus, OOO</i>	Декстроза <i>Dextrose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором <i>HPLC with refractive index detection</i>
20	Антитромбин III человеческого (антитромбин II) <i>Antithrombin III, human (Antithrombin II)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	Ферментативный метод с УФ детекцией <i>Enzymatic determination with UV detection</i>
21	Флебогамма® 5% ДИФ (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Flebogamma® DIF, 5% (Human normal immunoglobulin)</i>	Институт Грифолз С.А. <i>Instituto Grifols, S.A.</i>	Сорбитол <i>Sorbitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
22	Адвейт® (Октоког альфа) <i>Advate® (Octocog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	ВЭЖХ с дериватизацией образцов <i>HPLC with sample derivatisation</i>
23	Когенэйт ФС (Октоког альфа) <i>Kogenate FS (Octocog alfa)</i>	Байер Хелскэр ЛЛС <i>Bayer Healthcare LLC</i>	Маннитол Трегалоза дигидрат <i>Mannitol Trehalose dihydrate</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
24	РефактоАФ (Мороктоког альфа) <i>ReFacto AF (Morococog alfa)</i>	Пфайзер Инк <i>Pfizer, Inc.</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
25	Нувиак (Симоктоког альфа (фактор свертывания крови VIII человеческого рекомбинантный)) <i>Nuviaq (Simococog alfa (recombinant human coagulation factor VIII))</i>	Октафарма АБ <i>Octapharma, AB</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>

Примечание. БЛП – биологический лекарственный препарат. МНН – международное непатентованное наименование.

^a Для вакцин МНН или группировочное (химическое) наименование не указано.

Note. INN – international nonproprietary name.

^a INNs or generic (chemical) names are not specified for vaccines.

и D-галактозы, связанных $2\alpha\rightarrow 6$ и $1\alpha\rightarrow 4$ гликозидными связями).

Хроматографической стадии анализа предшествует пробоподготовка в виде гидролиза испытуемого препарата и стандартных образцов полисахаридов с образованием манноза-6-фосфата – для полисахарида серогруппы А, галактозы и N-ацетилнейраминовой кислоты – для полисахарида серогруппы W-135, глюкозы и N-ацетилнейраминовой кислоты – для полисахарида серогруппы Y и N-ацетилнейраминовой кислоты – для полисахарида С. Количество полисахарида С определяют с учетом вклада в площадь пика N-ацетилнейраминовой кислоты полисахаридов серогрупп Y и W-135, долю которых определяют по хроматограммам гидролизатов индивидуальных образцов соответствующих полисахаридов [27].

Аналогичным образом количественно определяют полисахарид в вакцине против инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b, подвергая полисахарид полирибозилрибитол фосфат, состоящий из повторяющихся единиц 3- β -D-рибофуранозил-(1 \rightarrow 1)-рибитол-5-фосфат, гидролизу с образованием дисахарида рибозилрибитолфосфата, который количественно определяют ионообменной хроматографией с амперометрическим детектированием [28].

Данный подход к количественной оценке является высокоселективным и обладает хорошими точностными характеристиками: правильностью и прецизионностью. К недостаткам метода можно отнести необходимость регулярной промывки хроматографической системы при работе с низкоконцентрированными (микрограммы) анализируемыми растворами [28].

Тем не менее метод ионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием был одним из основных при разработке международных стандартных образцов полисахаридов *Neisseria meningitidis* серогрупп A¹, C², W³, Y⁴.

В Европейской фармакопее количественное определение полисахаридов в менингококковых вакцинах⁵ и вакцинах против инфекций, вызы-

ваемых *Haemophilus influenzae* тип b⁶, методом ионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием предложен как альтернативный наряду с расчетными методами определения по фосфору, сиаловой кислоте и рибозе.

Таким образом, метод ионной хроматографии с амперометрическим детектированием является востребованным при количественном определении полисахаридов в менингококковых вакцинах и в вакцинах против инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b. Также можно предположить, что ионной хроматографии отдается предпочтение при одновременном определении нескольких вспомогательных веществ БЛП, а также при наличии в составе БЛП соединений, мешающих определению альтернативными методами.

Можно предположить, что метод ионной хроматографии за счет высокой чувствительности и селективности целесообразно применять для одновременного количественного определения катионов (аммоний, кальций, магний) и анионов (хлориды, сульфаты, нитраты) в растворителе для лиофилизированных БЛП; для оценки качества действующего вещества БЛП (количественное определение полисахарида в полисахаридных вакцинах, гликофиль гликозилированных протеинов и т.д.), а также при определении нескольких стабилизаторов углеводной природы БЛП одной методикой.

Заключение

Сравнительный анализ метода ионной хроматографии и альтернативных методов при оценке качества БЛП показал, что к существенным преимуществам метода можно отнести его селективность, относительную быстроту анализа, возможность использования небольших количеств анализируемого соединения, прямое детектирование анализируемых соединений без необходимости пред- и постколоночной дериватизации, максимальную автоматизацию процесса.

Таким образом, в ближайшей перспективе при оценке качества БЛП ионообменная хроматография с кондуктометрическим

¹ 1st WHO International Standard for Meningococcal Group A Polysaccharide. NIBSC code: 13/246. Instructions for use (Version 2.0, Dated 01/05/2019). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/13-246.pdf>

² 1st WHO International Standard for Meningococcal Serogroup C Polysaccharide. NIBSC code: 08/214. Instructions for use (Version 5.0, Dated 05/03/2021). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/08-214.pdf>

³ 1st International Standard for Meningococcal Capsular Group W Polysaccharide. NIBSC code: 16/152. Instructions for use (Version 1.0, Dated 12/11/2019). <https://nibsc.org/documents/ifu/16-152.pdf>

⁴ WHO International Standard, 1st International Standard for Meningococcal Capsular Group Y Polysaccharide. NIBSC code: 16/206, Instructions for use (Version 1.0, Dated 11/11/2019). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-206.pdf>

⁵ Monograph 3066 Meningococcal group A, C, W135 and Y conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2019.

⁶ Monograph 2622 Haemophilus type b and Meningococcal group C conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2016.

и амперометрическим детектированием может занять лидирующие позиции в количественной оценке вспомогательных веществ с ионной

структурой, стабилизаторов углеводной природы и основного действующего вещества – полисахарида в полисахаридных вакцинах.

Литература/References

- Small H, Stevens TS, Bauman WC. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Anal Chem.* 1975;47(11):1801–9. <https://doi.org/10.1021/ac60361a017>
- Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза: монография. М.: Техносфера, 2009. [Becker Y. *Chromatography. Instrumental analytics. Methods of chromatography and capillary electrophoresis*: monograph. Moscow: Technosphere, 2009 (In Russ.)]
- Skelly NE. Separation of inorganic and organic anions on reversed-phase liquid chromatography columns. *Anal Chem.* 1982;54(4):712–5. <https://doi.org/10.1021/ac00241a026>
- Miao S, Xie P, Mao Z, Fan L, Liu X, Zhou Y, et al. Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(14):5627–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8301-x>
- Wang G, Tomasella FP. Ion-pairing HPLC methods to determine EDTA and DTPA in small molecule and biological pharmaceutical formulations. *J Pharm Analysis.* 2016;6(3):150–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.002>
- Shibue M, Mant CT, Hodges RS. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1080(1):68–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.035>
- Åsberg D, Langborg Weinmann A, Leek T, Lewis RJ, Klarqvist M, Leško M, et al. The importance of ion-pairing in peptide purification by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2017;1496:80–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.041>
- Leblanc Y, Ramon C, Bihoreau N, Chevreux G. Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: case study after a long-term storage at +5 °C. *J Chromatogr B.* 2017;1048:130–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>
- Hebbi V, Chattopadhyay S, Rathore AS. High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products. *J Chromatogr B.* 2019;1117:118–26. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.022>
- Lodi G, Storti G, Pellegrini LA, Morbidelli M. Ion exclusion chromatography: model development and experimental evaluation. *Ind Eng Chem Res.* 2017;56(6):1621–32. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04475>
- Yan Y, Liu AP, Wang S, Daly TJ, Li N. Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry. *Anal Chem.* 2018;90(21):13013–20. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03773>
- Muneeruddin K, Bobst CE, Frenkel R, Houde D, Turyan I, Sosic Z, Kaltashov IA. Characterization of a PEGylated protein therapeutic by ion exchange chromatography with on-line detection by native ESI MS and MS/MS. *Analyst.* 2017;142(2):336–44. <https://doi.org/10.1039/C6AN02041K>
- Fekete S, Beck A, Fekete J, Guillaume D. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>
- Fekete S, Beck A, Fekete J, Guillaume D. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:282–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.032>
- Spanov B, Olaleye O, Lingg N, Bentlage AEH, Govorukhina N, Hermans J, et al. Change of charge variant composition of trastuzumab upon stressing at physiological conditions. *J Chromatogr A.* 2021;1655:462506. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462506>
- Vlasak J, Bussat MC, Wang S, Wagner-Rousset E, Schaefer M, Klinguer-Hamour C, et al. Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal Biochem.* 2009;392(2):145–54. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.043>
- Faghihi H, Merrikhihaghi S, Najafabadi AR, Ramezani V, Sardari S, Vatanara A. A comparative study to evaluate the effect of different carbohydrates on the stability of Immunoglobulin G during lyophilization and following storage. *Pharm Sci.* 2016;22(4):251–9. <https://doi.org/10.15171/PS.2016.39>
- Włodarczyk SR, Custódio D, Pessoa A Jr, Monteiro G. Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;131:92–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.019>
- Kissinger PT, Refshauge C, Dreiling R, Adams RN. An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Anal Lett.* 1973;6(5):465–77. <https://doi.org/10.1080/00032717308058694>
- Merkle RK, Poppel I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 1994;230:1–15. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)30003-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30003-8)
- Schenk J, Nagy G, Pohl NLB, Leghissa A, Smuts J, Schug KA. Identification and deconvolution of carbohydrates with gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy. *J Chromatogr A.* 2017;1513:210–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.052>

22. Haas M, Lamour S, Trapp O. Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2018;1568:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>
23. Rendleman JA, Jr. In: Isbell HS, ed. Carbohydrates in solution. *Advances in Chemistry Ser ACS*. Washington; 1973;117:51–68.
24. Hardy MR, Townsend RR, Lee YC. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem*. 1988;170(1):54–62. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90089-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90089-9)
25. Rohrer JS, Basumallick L, Hurum DC. Profiling N-linked oligosaccharides from IgG by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology*. 2016;26(6):582–91. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww006>
26. Talaga P, Vialle S, Moreau M. Development of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. *Vaccine*. 2002;20(19–20):2474–84. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00183-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00183-4)
27. Gudlavalleti SK, Crawford EN, Harder JD, Reddy JR. Quantification of each serogroup polysaccharide of *Neisseria meningitidis* in A/C/Y/W-135-DT conjugate vaccine by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection analysis. *Anal Chem*. 2014;86(11):5383–90. <https://doi.org/10.1021/ac5003933>
28. van der Put RM, de Haan A, van den IJssel JG, Hamidi A, Beurret M. HPAEC-PAD quantification of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in upstream and downstream samples. *Vaccine*. 2015;33(48):6908–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.028>

Вклад авторов. А.С. Минеро — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах и научной литературе, составление текста рукописи; О.Б. Рунова — редактирование текста рукописи; О.Б. Устинникова — определение направления исследования, постановка задачи, редактирование текста рукописи; А.А. Мовсесянц — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. А.А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. A.S. Minero—analysis and consolidation of data from literature and regulatory documents, drafting of the text of the manuscript; O.B. Runova—revision of the text; O.B. Ustinnikova—determination of the research direction, setting of objectives, and revision of the text; A.A. Movsesyants—final approval of the version to be published.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Минеро Анастасия Сальвадоровна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
movsesyants@expmed.ru

Anastasia S. Minero. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Olga B. Runova. Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
movsesyants@expmed.ru

Поступила 26.11.2021

После доработки 09.06.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 26 November 2021

Revised 9 June 2022

Accepted 10 June 2022