



Обзор методов определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах

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

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

Соединения углеводной природы широко используются в качестве наполнителей и стабилизаторов в биологических лекарственных препаратах (БЛП). Наличие данных соединений в составе лекарственного препарата гарантирует стабильность действующего вещества в процессе производства, транспортирования и хранения. При этом нормирование содержания вспомогательных веществ и их количественное определение является фармакопейным требованием к оценке качества БЛП.

Цель работы — выявление перспективных методов для разработки методик количественного определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах.

Проведен анализ нормативных документов зарегистрированных в Российской Федерации БЛП. Показано, что наиболее часто в качестве вспомогательных веществ используются полиолы (сорбитол и маннитол), моносахариды (глюкоза), дисахариды (трегалоза, сахароза, лактоза, мальтоза) как по отдельности, так и в смесях различного состава. На основании данных научной литературы рассмотрены методы количественного определения полиолов, моно- и дисахаридов, применяемые при оценке качества БЛП. Для количественного определения стабилизаторов углеводной природы применяют титриметрические, спектрофотометрические, ферментативные, хроматографические методы. Представлен анализ достоинств и недостатков данных методов. Показаны преимущества метода ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрическим детектированием и метода гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и испарительным детектором светорассеяния, обладающих достаточной селективностью и способностью идентификации исходных веществ без дериватизации. Сделан вывод о перспективности разработки методик определения стабилизаторов углеводной природы на основе методов ионообменной и гидрофильной ВЭЖХ.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты; вспомогательные вещества; сорбитол; маннитол; глюкоза; трегалоза; лактоза; сахароза; мальтоза; ВЭЖХ

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Устинникова О.Б. Обзор методов определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):194–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-442>

Quantification methods for carbohydrate compounds in biologicals: a review

A.S. Minero ✉, O.B. Rounova, O.B. Ustinnikova

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

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

Abstract

Carbohydrate compounds are widely used as fillers and stabilisers in biological products. When present, these compounds guarantee that the active pharmaceutical ingredient will remain stable during production, transportation, and storage. At the same time, pharmacopoeias standardise the excipient content and require that excipients should be quantified for assessing the quality of biological products.

The aim of the study was to identify promising methods for the development of quantification procedures for carbohydrate compounds in biological products.

The authors analysed regulatory documents for biological products approved in the Russian Federation. The most widely used excipients, both individually and in combinations, are polyols (sorbitol and mannitol), monosaccharides (glucose), and disaccharides (trehalose, sucrose, lactose, and maltose). Using literature data, the authors reviewed the methods used for quantifying polyols, monosaccharides, and disaccharides to assess the quality of biological products. Quantitative determination of carbohydrate stabilisers employs titrimetric, spectrophotometric, enzymatic, and chromatographic methods. This review presents an analysis of the advantages and disadvantages of these methods. It highlights the advantages of ionic HPLC with amperometric detection and hydrophilic HPLC with refractometric and evaporative light scattering detection, which are sufficiently selective and can identify substances without prior derivatisation. In conclusion, ionic and hydrophilic HPLC methods are a promising base for the development of quantification procedures for carbohydrate stabilisers.

Key words:

biological products; excipients; sorbitol; mannitol; glucose; trehalose; lactose; sucrose; maltose; HPLC

For citation:

Minero A.S., Rounova O.B., Ustinnikova O.B. Quantification methods for carbohydrate compounds in biologicals: a review. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):194–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-442>

Введение

Большинство биологических лекарственных препаратов (БЛП), основным действующим веществом которых является терапевтически активный белок (моноклональные антитела, факторы свертываемости крови, цитокины, субъединичные вакцины и т.д.), из-за недостаточной стабильности активных компонентов в растворе производят в лиофилизированной форме. Для сохранения структурной стабильности

и активности действующего вещества в процессе лиофилизации применяют криопротекторы и лиопротекторы [1–3], в качестве которых часто используют соединения углеводной природы (полиолы, моносахариды, дисахариды и др.). Те же соединения выполняют функции стабилизаторов и модификаторов тоничности в составе БЛП, имеющих форму растворов. Количественное определение веществ, вносимых в лекарственный препарат, является фармакопейным требованием¹.

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0012.18 Интерфероны. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0014.18 Моноклональные антитела для медицинского применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0015.18 Филграстимы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0016.18 Эритропоэтины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0017.18 Генно-инженерные препараты инсулина человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Для каждого препарата белковой природы оптимальное соотношение белок/углевод(ы), а также состав стабилизирующей углеводной смеси будут индивидуальными [3]. При этом выбор метода количественной оценки углеводных стабилизаторов может зависеть как от структурных особенностей углевода и состава смеси, так и от технических возможностей производителя. Данные факторы при отсутствии фармакопейных требований и методических рекомендаций приводят к большому разнообразию решений со стороны производителей, что, в свою очередь, затрудняет экспертизу качества как на этапах регистрации, так и на этапах введения в гражданский оборот большой группы БЛП.

Цель работы – выявление перспективных методов для разработки методик количественного определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах.

Основная часть

На основании анализа состава БЛП, зарегистрированных в Российской Федерации, были

определены часто используемые в качестве вспомогательных веществ соединения углеводной природы: полиолы (сорбитол и маннитол [4]), моносахариды (глюкоза²), дисахариды (трегало-за [5], сахароза [6], лактоза³, мальтоза⁴) (рис. 1).

В оценке качества БЛП с целью количественного определения стабилизаторов углеводной природы применяют методы спектрофотометрии, титриметрии, поляриметрии, рефрактометрии и хроматографии.

Спектрофотометрические и титриметрические методы используют для определения восстанавливающих углеводов, которые могут вступать в окислительно-восстановительные химические реакции с образованием осадков или цветных комплексов⁵ [7]. При этом невосстанавливающие сахара (сахароза и трегалоза) предварительно подвергают инверсии. Например, метод с антроновым реактивом⁶ основан на химическом разрушении углеводов до фурфуrolа или гидроксиметилфурфуrolа, который при реакции с антроном образует комплексное соединение синевато-зеленого цвета,

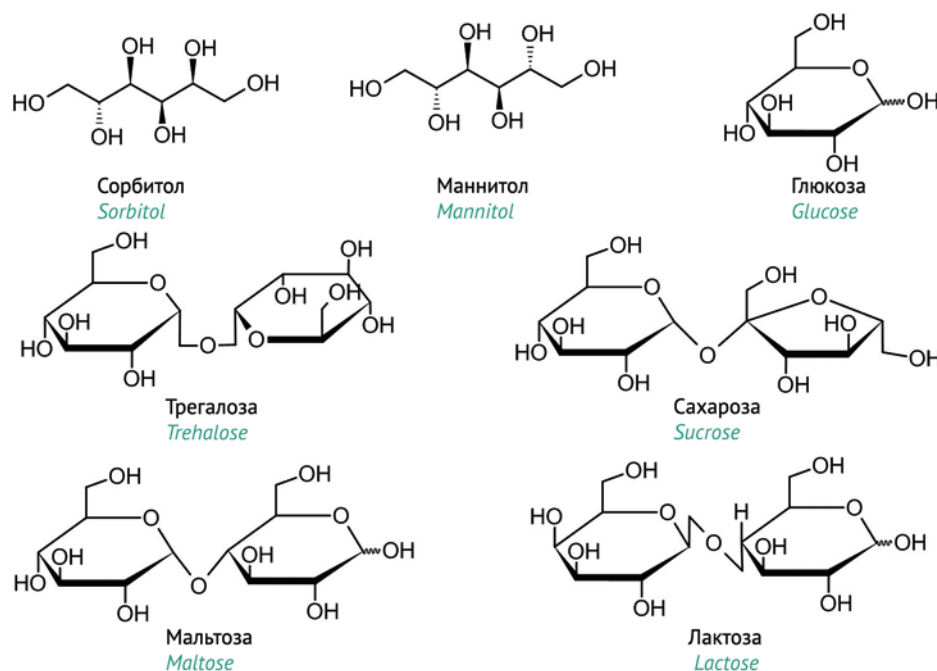


Рис. 1. Структурные формулы стабилизаторов углеводной природы.

Fig. 1. Structural formulas of carbohydrate stabilisers.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/monosaccharides>

³ <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/disaccharide>

⁴ Там же.

⁵ ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию углевода в реакционной среде [8]. Антроновый и другие спектрофотометрические и титриметрические методы используют в оценке качества некоторых БЛП, например для определения декстрозы и мальтозы в некоторых препаратах иммуноглобулинов.

К достоинствам спектрофотометрических и титриметрических методов можно отнести сравнительно невысокую стоимость, к недостаткам — невозможность их применения для оценки качества БЛП, в составе которых присутствуют два и более углевода, так как эти методы не обладают достаточной селективностью.

С использованием спектрофотометрического метода проводят определение глюкозы и маннитола, основанное на химических реакциях, катализируемых ферментами, например окисление маннитола до фруктозы, а глюкозы до глюконолактона⁷. Концентрация восстановленного при этом никотинамидадениндинуклеотида пропорциональна концентрации исходного углевода и определяется спектрофотометрически при длине волны (340±30) нм. Ферментативный метод определения глюкозы также можно применить для количественного определения дисахаридов (лактоза, мальтоза, сахароза, трегалоза), в составе которых есть глюкоза. Для этого дисахариды предварительно ферментативно гидролизуют до моносахаридов. Так, например, ферментативный спектрофотометрический метод определения глюкозы используют для определения содержания сахарозы в оценке качества некоторых препаратов факторов свертываемости крови, для определения лактозы в менингококковых вакцинах.

К достоинствам ферментативных методов определения относят селективность, чувствительность, наличие готовых коммерческих наборов, включающих практически все необходимые реактивы для определения того или иного углевода. Недостатком данной группы методов является невозможность применения одной унифицированной методики для количественного определения разных классов углеводов, так как для каждого углевода применяется свой уникальный фермент, невозможность автоматизации метода и возможное влияние действующего вещества и других вспомогательных веществ, входящих в состав БЛП.

Рефрактометрический и поляриметрический⁸ методы, основанные на измерении коэффициента преломления и угла вращения плоскости

поляризации монохроматического света соответственно, применяются в оценке качества некоторых препаратов вакцин, содержащих в качестве вспомогательного вещества только одно соединение углеводной природы. Существенным недостатком этих методов является отсутствие селективности и возможное влияние действующего вещества и других соединений, входящих в состав лекарственного препарата.

В случае применения хроматографических методов количественного определения полиолов, незамещенных моно- и дисахаридов следует учитывать особенности строения углеводов (рис. 1). Так, например, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в tandem с флуориметрическим и спектрофотометрическим детектированием не могут быть использованы для определения перечисленных углеводных соединений в интактной форме, так как их молекулы не обладают собственной флуоресценцией и не имеют хромофорных групп. Газовая хроматография (ГХ) также не может быть использована, так как перечисленные соединения в интактной форме не являются летучими.

Решением проблемы может быть дериватизация исходного анализа с получением производных соединений, пригодных для соответствующего хроматографического разделения и детектирования [9]. Известно множество дериватизирующих реагентов, используемых в ВЭЖХ для определения углеводов в ультрафиолетовом и видимом диапазоне, например 2,4-динитрофенил гидразин [10], 1-фенил-3-метил-5-пиразолон [11], этиловый эфир п-аминобензойной кислоты [12]. Перечисленные реактивы не только позволяют детектировать углеводы, но также придают исходным соединениям новые свойства. Так, например, при дериватизации глюкозы 2,4-динитрофенилгидразином полученное производное становится более гидрофобным, что позволяет использовать сорбенты для обращенно-фазовой хроматографии [10]. Классические методы дериватизации, применяемые в ГХ, основаны на замещении полярных групп углеводов для повышения их летучести. Метилловые эфиры, ацетаты, трифторацетаты, метилоксимы и триметилсилиловые эфиры являются наиболее распространенными производными, используемыми для определения углеводов. Хорошие характеристики летучести и стабильности образующихся производных делают триметилсилиловые эфиры наиболее популярными производными, применяемыми для ГХ-анализа

⁷ <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.118>

⁸ ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров.

сахаридов и многоатомных спиртов [13–15]. В литературе [16] описан метод определения восстанавливающих моно- и дисахаридов (глюкоза, лактоза и мальтоза) с помощью постколоночной дериватизации с реактивом неокупроин (2,9-диметил-1,10-фенантролин). Метод основан на восстановлении ионов меди с помощью восстанавливающих сахаров в присутствии неокупроина в щелочной среде с последующим измерением оптической плотности желтого хелата $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ при длине волны 450 нм. При этом для разделения углеводов используется метод гидрофильной ВЭЖХ на аминопропил-модифицированной неподвижной фазе.

Недостатком использования процедуры дериватизации является усложнение методики из-за дополнительных стадий пробоподготовки, а также влияние на воспроизводимость методики и точность полученного результата. Кроме того, среди зарегистрированных в Российской Федерации БЛП найден только один пример применения предколоночной дериватизации для определения сахарозы методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором в препарате фактора свертываемости крови. Примеры применения постколоночной дериватизации для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы в производстве/контроле БЛП не найдены.

Для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют методы жидкостной хроматографии, совместимые с такими способами детекции, которые не требуют дополнительных стадий пред- или постколоночной дериватизации. К таким детекторам относятся: детектор заряженных аэрозолей, испарительный детектор светорассеяния, масс-спектрометрический, амперометрический и рефрактометрический детекторы. При этом последний совместим с несколькими техниками хроматографического разделения: гидрофильная, лигандообменная/ион-эксклюзионная и ионообменная ВЭЖХ [17–21].

Большое разнообразие сорбентов с различными привитыми фазами позволяет без особых трудностей количественно определять маннитол, сорбитол, глюкозу, трегалозу, лактозу, сахарозу и мальтозу по отдельности или в смесях определенного состава, например только дисахариды или полиолы и моносахариды. Однако перечисленные соединения углеводной природы (рис. 1) обладают похожими химическими структурами. В связи с этим хроматографическое разделение смеси этих углеводов в изократических условиях может быть затруднительным, что уменьшает вероятность использования рефрактометрического детектирования в ВЭЖХ методиках одновремен-

ного определения полиолов, моно- и дисахаридов, так как такой способ детекции не совместим с градиентными режимами элюирования.

Детектор заряженных аэрозолей [22–24] и испарительный детектор светорассеяния [20, 25, 26] совместимы с градиентным режимом элюирования, что в теории может позволить разделить смесь углеводов с похожим химическим составом. Однако данные способы детекции требуют подведения инертного газа стабильного давления, что, в свою очередь, требует дополнительных затрат. В настоящее время вышеуказанные способы детектирования постепенно внедряются в практику экспертизы качества БЛП, но пока их сложно рассматривать в качестве базового оснащения лабораторий.

Масс-спектрометрический способ детектирования в тандеме с жидкостной или газовой хроматографией [27] обладает большей чувствительностью, однако не является оптимальным с экономической точки зрения и не встречается в оценке качества БЛП для определения вспомогательных веществ углеводной природы, зарегистрированных в Российской Федерации.

Основным недостатком гидрофильной ВЭЖХ углеводов является применение высококонцентрированных растворов органических растворителей, во-первых, из-за низкой растворимости аналитов в таких подвижных фазах, а во-вторых, из-за токсичности этих растворителей.

Применение в качестве неподвижных фаз сорбентов на основе сульфированного сшитого сополимера стирола с дивинилбензолом в кальциевой, натриевой, калиевой или другой формах в методах ион-эксклюзионной/лигандообменной ВЭЖХ исключает необходимость применения органических растворителей. Однако в связи с тем, что глюкоза, мальтоза и лактоза в водных растворах существуют в виде α - и β -изомеров, хроматографическое разделение этих углеводов на таких колонках следует проводить при высоких температурах (40–85 °C), чтобы пики аналитов не раздваивались. Такие условия могут быть затруднительными для некоторых моделей хроматографического оборудования.

Кроме перечисленных методов в литературе встречается применение жидкостной хроматографии с повышенной текучестью на гидрофильной неподвижной фазе для определения углеводов [28]. В качестве подвижной фазы в методе используются органические или водно-органические растворители в смеси с большим количеством сжатых газов, например диоксида углерода. Такая подвижная фаза обеспечивает высокую скорость диффузии, низкую вязкость и высокую растворяющую способность, кроме того, использование

подвижных фаз с меньшим содержанием органических растворителей делает этот метод более экологичным по сравнению с другими хроматографическими методами. К недостаткам жидкостной хроматографии с повышенной текучестью можно отнести высокую стоимость оборудования.

Соединения углеводной природы кроме ранее перечисленных недостатков обладают свойством окисляться на поверхности электрода при приложении определенного потенциала. К тому же при высоких значениях pH они ионизируются с образованием отрицательно заряженных ионов, что позволяет применять анионообменную хроматографию для количественной оценки углеводов [29, 30]. В качестве подвижных фаз используются водные растворы гидроксидов, ацетатов и других соединений щелочных металлов. Основными достоинствами метода ионной хроматографии с амперометрическим детектированием являются высокая чувствительность, минимизация возможного влияния других вспомогательных веществ в анализируемом БЛП (например, аминокислот) за счет программируемого изменения потенциалов на электродах, а также возможность использования автоматического генератора элюентов, который позволяет исключить ручное приготовление растворов подвижных фаз. К недостаткам метода можно отнести необходимость коррозионностойкого исполнения жидкостных трактов хроматографической системы и колонки, а также чувствительность растворов подвижной фазы к углекислому газу воздуха, что требует подведения инертного газа.

В настоящее время метод анионообменной ВЭЖХ применяется в оценке качества препаратов факторов свертывания крови для определения маннитола и сахарозы, препаратов иммуноглобулинов для определения мальтозы.

Таким образом, для количественного определения стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют как сравнительно простые методы, например титриметрические, так и высокотехнологичные, требующие наличия дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, например методы ВЭЖХ. При этом и те, и другие методы имеют свои достоинства и недостатки (табл. 1).

На основании представленных данных можно сделать вывод о преимуществе метода ионообменной ВЭЖХ с амперометрическим детектированием и метода гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и испарительным детектором светорассеяния, обладающих достаточной селективностью и способностью идентификации исходных веществ без дериватизации.

Заключение

Рассмотрены методы определения стабилизаторов углеводной природы в составе биологических лекарственных препаратов (сорбитол, маннитол, моно- и дисахариды) как в модельных растворах, так и в сложных смесях, содержащих различные сопутствующие компоненты. Показано, что для количественной оценки содержания соединений углеводной природы

Таблица 1. Преимущества и недостатки методов определения стабилизаторов углеводной природы, применяемых в оценке качества биологических лекарственных препаратов (БЛП)

Table 1. Advantages and disadvantages of methods used for quantifying carbohydrate stabilisers to assess the quality of biological products

Метод <i>Method</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
Спектрофотометрический и титриметрический <i>Spectrophotometry and titrimetry</i>	Сравнительно невысокая стоимость реактивов и оборудования <i>Relatively low cost of reagents and equipment</i>	– Трудоемкость. – Возможное неспецифическое влияние действующего вещества или других вспомогательных веществ БЛП. – Невозможность определения индивидуальных углеводов в смеси <i>– High labour input.</i> <i>– Possible non-specific effects of an active ingredient or other excipients in the biological product.</i> <i>– Inability to quantify individual carbohydrates in a mixture</i>
Поляриметрический и рефрактометрический <i>Polarimetry and refractometry</i>	– Сравнительно невысокая стоимость реактивов и оборудования. – Простота и быстрота анализа <i>– Relatively low cost of reagents and equipment.</i> <i>– Simplicity and speed of analysis</i>	– Возможное неспецифическое влияние действующего вещества или других вспомогательных веществ БЛП. – Невозможность определения индивидуальных углеводов в смеси <i>– Possible non-specific effects of an active ingredient or other excipients in the biological product.</i> <i>– Inability to quantify individual carbohydrates in a mixture</i>
Ферментативный <i>Enzymatic method</i>	Высокая специфичность <i>High specificity</i>	– Необходимость применения уникального фермента для каждого углевода. – Необходимость использования коммерческих наборов/тест-систем <i>– Need for a unique enzyme for each carbohydrate.</i> <i>– Need for commercial kits / test-systems</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Метод <i>Method</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
Метод газовой хроматографии <i>Gas chromatography</i>	– Чувствительность. – Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа – <i>Sensitivity.</i> – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Необходимость предколоночной дериватизации – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for pre-column derivatisation</i>
Метод гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>Hydrophilic HPLC with refractive index detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Большое разнообразие неподвижных фаз – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Wide variety of stationary phases available</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Применение токсичных растворителей. – Низкая чувствительность по сравнению с другими хроматографическими методами. – Несовместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Toxic solvents.</i> – <i>Low sensitivity compared to other chromatographic methods.</i> – <i>Incompatibility with gradient elution</i>
Метод гидрофильной ВЭЖХ с детектором светорассеяния <i>Hydrophilic HPLC with light scattering detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Большое разнообразие неподвижных фаз. – Совместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Wide variety of stationary phases available.</i> – <i>Compatibility with gradient elution</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Применение токсичных растворителей – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Toxic solvents</i>
Метод ион-эксклюзионной ВЭЖХ <i>Ion-exclusion HPLC</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Не используются токсичные растворители – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Non-toxic solvents</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Как правило, существует необходимость проводить разделение при высоких температурах (около 70 °C). – Несовместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for high-temperature (~70 °C) separation (generally).</i> – <i>Incompatibility with gradient elution mode</i>
Метод ионообменной ВЭЖХ с амперометрическим детектированием <i>Ion-exchange HPLC with amperometric detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Чувствительность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Возможность автоматического генерирования элюента – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Sensitivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Possibility of automatic eluent generation</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Необходимость защиты растворов подвижных фаз от углекислого газа воздуха – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for protecting mobile phase solutions from atmospheric carbon dioxide</i>

применяют разнообразныe методы: титриметрические, спектрофотометрические, ферментативные, хроматографические. Рассмотрены достоинства и недостатки указанных методов. Сделан вывод, что методы ионообменной и гидрофильной ВЭЖХ являются перспективными

для разработки методик количественной оценки стабилизаторов углеводной природы в силу их селективности и способности прямого определения аналита.

Литература/References

1. Tonnis WF, Mensink MA, De Jager A, Van der Voort Maarschalk K, Frijlink HW, Hinrichs WL. Size and molecular flexibility of sugars determine the dosage stability of freeze-dried proteins. *Mol Pharm.* 2015;12(3):684–94. <https://doi.org/10.1021/mp500423z>
2. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, Минаев СВ. Создание лиофилизата ГК-2 для приготовления раствора для инъекций с применением полиолов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018;2:26–31. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Minaev SV. Creation of liophilisate of GK-2 for preparation of solution for injections with use of polyols. *Drug Development & Registration.* 2018;(2):26–31 (In Russ.).
3. Chang L, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang XC, Pikal MJ. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *J Pharm Sci.* 2005;94(7):1427–44. <https://doi.org/10.1002/jps.20364>
4. Manas MG, Campos J, Sharninghausen LS, Lin E, Crabtree RH. Selective catalytic oxidation of sugar alcohols to lactic acid. *Green Chemistry.* 2015;17(1):594–600. <https://doi.org/10.1039/C4GC01694G>
5. Tarpan MA, De Cooman H, Sagstuen E, Waroquier M, Callens F. Identification of primary free radicals in trehalose dihydrate single crystals X-irradiated at 10 K. *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(23):11294–302. <https://doi.org/10.1039/c0cp02616f>
6. Amchara FZ, Faiz C, Chaouqi S, Khiraoui A, Benhmimou A, Guedira M, Guedira T. Effect of *Stevia rebaudiana*, sucrose and aspartame on human health: a comprehensive review. *J Med Plants Stud.* 2018;102(61):102–8.
7. Hernández-López A, Sánchez Félix DA, Zuñiga Sierra Z, García Bravo I, Dinkova TD, Avila-Alejandre AX. Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict. *ACS Omega.* 2020;5(50):32403–10. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>
8. Pons A, Roca P, Aguiló C, Garcia FJ, Alemany M, Palou A. A method for the simultaneous determinations of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the antrone reagent. *J Biochem Biophys Methods.* 1981;4(3–4):227–31. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(81\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0165-022x(81)90060-9)
9. 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>
10. Alzweiri M, Al-Marabeh S, Bardaweel SK, Alfar R, Al-Hiari YM. Stability determination for cyclized 2,4-dinitrophenyl hydrazone derivative of glucose. *J Anal Sci Technol.* 2017;8:9. <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0117-x>
11. Gonzalez NM, Fitch A, Al-Bazi J. Development of a RP-HPLC method for determination of glucose in *Shewanella oneidensis* cultures utilizing 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229990>
12. Debebe A, Temesgen S, Redi-Abshiro M, Chandranshi BS, Ele E. Improvement in analytical methods for determination of sugars in fermented alcoholic beverages. *J Anal Methods Chem.* 2018;4010298. <https://doi.org/10.1155/2018/4010298>
13. 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>
14. Ruiz-Matutea AI, Hernández-Hernández O, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Martínez-Castro I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(17–18):1226–40. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>
15. Mechri B, Tekaya M, Cheheb H, Hammami M. Determination of mannitol sorbitol and myo-inositol in olive tree roots and rhizospheric soil by gas chromatography and effect of severe drought conditions on their profiles. *J Chromatogr Sci.* 2015;53(10):1631–8. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv066>
16. Akyüza E, Başkan KS, Tütem E, Apak R. High performance liquid chromatographic method with post-column detection for quantification of reducing sugars in foods. *J Chromatogr A.* 2021;1660:462664. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462664>
17. Hadjikinova R, Petkova N, Hadjikinov D, Denev P, Hrusavov D. Development and validation of HPLC–RID method for determination of sugars and polyols. *J Pharm Sci Research.* 2017;9(8):1263–9.
18. Liu W, Xiao X, Song Z, Cheng X, Wei F, Liu Y, Zhang Y. Research on determination of mannitol in Bailing capsules by HPLC–RID instead of titration. *Chin J Pharm Anal.* 2014;34(1):159–62.
19. Forget R, Spagnoli S. Excipient quantitation and drug distribution during formulation optimization. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(3):1051–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.039>
20. Simonzadeh N, Ronsen B. An isocratic HPLC method for the determination of sorbitol and glycerol in pharmaceutical formulations. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(7):644–7. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms044>

21. Fang T, Cai Y, Yang Q, Ogutu CO, Liao L, Han Y Analysis of sorbitol content variation in wild and cultivated apples. *J Sci Food Agric*. 2020;100(1):139–44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10005>
22. Sławińska A, Jabłońska-Ryś E, Stachniuk A. High-performance liquid chromatography determination of free sugars and mannitol in mushrooms using corona charged aerosol detection. *Food Anal Meth*. 2021;14:209–16. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01863-8>
23. Pitsch J, Weghuber J. Hydrophilic interaction chromatography coupled with charged aerosol detection for simultaneous quantitation of carbohydrates, polyols and ions in food and beverages. *Molecules*. 2019;24(23):4333. <https://doi.org/10.3390/molecules24234333>
24. Cintrón JM, Risley DS. Hydrophilic interaction chromatography with aerosol-based detectors (ELSD, CAD, NQAD) for polar compounds lacking a UV chromophore in an intravenous formulation. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;78–79:14–8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.022>
25. Koh DW, Park JW, Lim JH, Yea MJ, Bang DY. A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD. *Food Chem*. 2018;240:694–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.142>
26. Risley DS, Yang WQ, Peterson JA. Analysis of mannitol in pharmaceutical formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J Sep Sci*. 2006;29(2):256–64. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500253>
27. Pissmannöi D, Kiritsenko V, Marhivka J, Kütt ML, Vilu R. Development and optimisation of HILIC-LC-MS method for determination of carbohydrates in fermentation samples. *Molecules*. 2021;26(12):3669. <https://doi.org/10.3390/molecules26123669>
28. Bennett R, Olesik SV. Gradient separation of oligosaccharides and suppressing anomeric mutarotation with enhance-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta*. 2017;960:151–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.006>
29. Chen H, Chen W, Hong B, Zhang Y, Hong Z, Yi R. Determination of trehalose by ion chromatography and its application to a pharmacokinetic study in rats after intramuscular injection. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(12):e4355. <https://doi.org/10.1002/bmc.4355>
30. Pico J, Martínez MM, Martín MT, Gómez M. Quantification of sugars in wheat flours with an HPAEC-PAD method. *Food Chem*. 2015;173:674–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.103>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Минеро** — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах и научной литературе, написание текста рукописи; **О.Б. Рунова** — редактирование текста рукописи; **О.Б. Устинникова** — концепция и дизайн исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Minero** analysed and summarised literature and regulatory data and drafted the manuscript. **O.B. Rounova** edited the manuscript. **O.B. Ustinnikova** conceptualised and designed the study, edited the manuscript, and approved the final version for publication.

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 121022000147-4).

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

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

Anastasia S. Minero

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

Olga B. Rounova, 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

Поступила 05.07.2022

После доработки 14.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Online first 04.04.2023

Received 5 July 2022

Revised 14 February 2023

Accepted 13 March 2023

Online first 4 April 2023