

Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения

А. М. Полуянов^{1,2}✉, А. Кочуг³, Л. С. Митрофанова³, И. Д. Никитин², О. Ю. Вергасов²,
И. Е. Шохин¹, Е. Н. Фишер^{2,3}

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ ООО «Лаборатория фармацевтических исследований», 121205, г. Москва, тер. Сколково Инновационного Центра, Большой б-р, д. 42, стр. 1

✉ Контактное лицо: Полуянов Андрей Михайлович. E-mail: a.polyanov@cpha.ru

ORCID: А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>; А. Кочуг – <https://orcid.org/0000-0003-1370-5846>; Л. С. Митрофанова – <https://orcid.org/0000-0002-1844-1344>;

И. Д. Никитин – <https://orcid.org/0000-0001-8044-0548>; О. Ю. Вергасов – <https://orcid.org/0000-0003-2511-3418>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Е. Н. Фишер – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>.

Статья поступила: 01.02.2023

Статья принята в печать: 02.03.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

Резюме

Введение. Таурин является непротеиногенной аминокислотой. Молекула участвует в липидном обмене, адсорбирует жирорастворимые витамины, а его конъюгаты с желчными кислотами способствуют эмульгированию жиров в кишечнике. Лекарственные препараты, в состав которых входит молекула таурина обладают антикатарактным, кардиотоническим, метаболическим действием, а также стимулируют регенерацию. Среди лекарственных форм, где в качестве действующего вещества выступает таурин есть твердая лекарственная форма – таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Одним из методов оценки качества твердых лекарственных форм является тест сравнительной кинетики растворения. Широко распространенным методом количественного определения в рамках теста растворения является высокоэффективная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, однако для таурина, не содержащего хромофорных групп в своей структуре, этот метод на прямую не применим. Для решения данной проблемы можно применить метод предколонной дериватизации, в результате которой в структуру вводится фрагмент, обеспечивающий батохромный сдвиг в УФ-спектре исходного соединения.

Цель. Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом высокоэффективной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения таблеток таурина дозировкой 250 и 500 мг.

Материалы и методы. Для анализа использовались препараты: таурин таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг и 500 мг, отечественного производства с действующим сроком годности. Тест сравнительной кинетики растворения проводили на приборе для теста «Растворение» DT 126 Light (ERWEKA GmbH, Германия). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенный термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Детектирование проводилось при длине волны 254 нм после дериватизации молекулы таурина 4-толуолсульфонилхлоридом. Использовали колонку Shim-pack Velox C18 5 µm 4.6 × 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония) и предколонку Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 µm 4.6 × 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

Результаты и обсуждение. Подобраны оптимальные условия дериватизации таурина, разработана и валидирована методика количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках теста сравнительной кинетики растворения в трёх средах растворения: 0,1М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости во всех средах растворения. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл и позволяет применять разработанную методику для количественного определения в рамках теста сравнительной кинетики растворения таблеток с дозировкой 250 мг и 500 мг.

Заключение. Методика была апробирована в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Во всех средах наблюдалось полное высвобождение у обеих дозировок (более 85 % к 30 минуте).

Ключевые слова: тест сравнительной кинетики растворения, ВЭЖХ-УФ, таурин, 4-толуолсульфонилхлорид, дериватизация, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. М. Полуянов и И. Е. Шохин придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А. Кочуг и Л. С. Митрофанова провели исследование методом ВЭЖХ-УФ. А. М. Полуянов, А. Кочуг и Л. С. Митрофанова провели тест сравнительной кинетики растворения. А. М. Полуянов, О. Ю. Вергасов, И. Д. Никитин участвовали в обработке данных. А. М. Полуянов, И. Д. Никитин и О. Ю. Вергасов участвовали в написании текста статьи. Е. Н. Фишер была руководителем данного исследования. В обсуждении результатов участвовали все авторы.

Для цитирования: Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., Фишер Е. Н. Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):62–72. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72>

Development, Validation and Approbation Analytical Method for the Quantitative Determination of Taurine by HPLC-UV Method in the Test of Comparative Dissolution Kinetics

Andrey M. Poluyanov^{1,2}✉, Adrian Kochug³, Lidia S. Mitrofanova³, Ilya D. Nikitin², Oleg Yu. Vergasov², Igor E. Shohin¹, Elizaveta N. Fisher^{2, 3}

¹ LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ LLC "Laboratory of Pharmaceutical Research", 42/1, Bolshoi Boulevard, ter. Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

✉ Corresponding author: Andrey M. Poluyanov. E-mail: a.poluyanov@cpha.ru

ORCID: Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>; Adrian Kochug – <https://orcid.org/0000-0003-1370-5846>; Lidia S. Mitrofanova – <https://orcid.org/0000-0002-1844-1344>; Ilya D. Nikitin – <https://orcid.org/0000-0001-8044-0548>; Oleg Yu. Vergasov – <https://orcid.org/0000-0003-2511-3418>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Elizaveta N. Fisher – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>.

Received: 01.02.2023

Revised: 02.03.2023

Published: 25.05.2023

Abstract

Introduction. Taurine is a non-proteinogenic amino acid. The molecule is involved in lipid metabolism, adsorbs fat-soluble vitamins, and its conjugates with bile acids contribute to the emulsification of fats in the intestine. Drugs, which include a taurine molecule, have anti-cataract, cardiostimulant, metabolic effects, and also stimulate regeneration. Among the dosage forms, where taurine acts as an active substance, there is a solid dosage form – film-coated tablets. One of the methods for assessing the quality of solid dosage forms is a comparative dissolution kinetics test. High-performance chromatography with ultraviolet detection is a widely used method for quantification within the dissolution test, however, for taurine, which does not contain chromophore groups in its structure, this method is not directly applicable. To solve this problem, one can apply the method of pre-column derivatization, because of which an fragment is introduced into the structure, providing a bathochromic shift in the UV spectrum of the starting compound.

Aim. Development, validation and approbation analytical method for the quantitative determination of taurine by high-performance chromatography with ultraviolet detection as part of a test comparative kinetics dissolution of taurine tablets with a dosage of 250 and 500 mg.

Materials and methods. The following preparations were used for the analysis: taurine tablets, film-coated 250 mg and 500 mg, domestic production with a valid expiration date. The comparative dissolution kinetics test was carried out on a DT 126 Light instrument for the "Dissolution" test (ERWEKA GmbH, Germany). Chromatographic separation and detection were performed on a Nexera-i LC-2040 high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a column and sample thermostat, a degasser, an autosampler, and an ultraviolet detector. Detection was carried out at a wavelength of 254 nm after derivatization of the taurine molecule with 4-toluenesulfonyl chloride. Were used a Shim-pack Velox C18 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm column (Shimadzu Corporation, Japan) and a Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μ m 4.6 $\times$ 5 mm (Shimadzu Corporation, Japan). Primary data were processed using LabSolutions Single LC software (Shimadzu Corporation, Japan).

Results and discussion. The optimal conditions for taurine derivatization have been selected, and a method for the quantitative determination of taurine by HPLC-UV in test comparative kinetics dissolution in three dissolution media: 0.1M hydrochloric acid solution with pH 1.2, acetate buffer solution with pH 4.5, phosphate buffer solution with pH 6.8, as well as in the quality control medium – purified water has been developed and validated. During the validation of the developed methodology, it was found that the validation characteristics are within the acceptance criteria in 4 dissolution media. The analytical range of the method was 0.05–1.2 mg/mL and allows the developed method to be used for the quantitative determination of tablets with a dosage of 250 mg and 500 mg as part of the test comparative kinetics dissolution. The method was tested in 4 dissolution media, in all media, there was a complete release in both dosages (more than 85 % by 30 minutes).

Conclusion. The method was tested in three dissolution media: 0.1 M hydrochloric acid solution with pH 1.2, acetate buffer solution with pH 4.5, phosphate buffer solution with pH 6.8, as well as in the quality control medium – purified water. In all media, there was a complete release in both dosages (more than 85 % by 30 minutes).

Keywords: comparative dissolution kinetics test, HPLC-UV, taurine, 4-toluenesulfonyl chloride, derivatization, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Andrey M. Poluyanov and Igor E. Shohin invented and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug and Lidia S. Mitrofanova analyze on HPLC-UV. Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug and Lidia S. Mitrofanova performed a comparative dissolution kinetics test. Andrey M. Poluyanov, Oleg Yu. Vergasov, Ilya D. Nikitin participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Ilya D. Nikitin and Oleg Yu. Vergasov participated in writing the text of the article. Elizaveta N. Fisher was the leader of this study. All authors participated in discussion of the results.

For citation: Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., Fisher E. N. Development, validation and approbation analytical method for the quantitative determination of taurine by HPLC-UV method in the test of comparative dissolution kinetics. *Drug development & registration*. 2023;12(2):62–72. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лекарственные препараты на основе аминокислот и их производных имеют большую распространенность, что связано с их широким диапазоном фармакологической активности. В клинической практике препараты данной группы назначаются при комплексной терапии атеросклероза

за (гистидин), цирроза печени (метионин), инфаркта миокарда и инсульта (L-аргинин), болезни Паркинсона (бенсаразид, L-DOPA) и ряде других патологических состояний¹.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/> Ссылка активна на 21.02.2023.

Одним из представителей упомянутого класса является таурин – β-аминосulьфоная кислота (рисунок 1). Данное вещество участвует в ряде физиологических процессов в организме человека: от регуляции пищеварения до передачи нервного импульса. Таурин участвует в липидном обмене, адсорбирует жирорастворимые витамины, входит в состав парных желчных кислот (таурохолевой, тауродезоксихолевой), способствующих эмульгированию жиров в кишечнике [1]. Отмечено действие таурина на нервную систему. Являясь агонистом глицина таурин снижает судорожную активность, связываясь с глициновыми рецепторами, т.е. является потенциальным антиконвульсантом [2]. В период развития мозга таурин влияет на клеточную миграцию, модулирует нейротрансдукцию в синапсах и может ускорять развитие мозга, в противоположность глутаминовой кислоте, ГАМК и аспарагиновой кислоте, повышенные уровни которых замедляют развитие мозга [3, 4]. На данный момент обсуждаемая аминосulьфоная кислота применяется в терапии сахарного диабета 1-го и 2-го типов, сердечной недостаточности, катаракте и прочих заболеваниях.

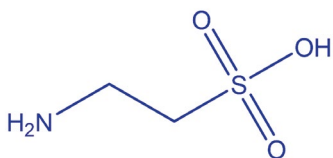


Рисунок 1. Структурная формула таурина

Figure 1. Structural formula of taurine

На российском рынке представлены лекарственные препараты в пяти лекарственных формах, действующим веществом которых является таурин. Одной из них является твердая лекарственная форма: таблетки, покрытые пленочной оболочкой. В число испытаний контроля качества данной лекарственной формы входит тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), позволяющий оценить качество производимых серий лекарственных препаратов. В соответствии с нормативной документацией¹ количественное определение субстанции таурина проводится алкалиметрическим титрованием, однако этот метод неприменим для ТСКР по ряду причин. Во-первых, растворение проводится в средах, значение pH которых смещено от нейтрального. Во-вторых, титрование не поддается автоматизации и масштабированию в промышленных условиях.

Современным методом количественного определения малых молекул является ВЭЖХ-УФ, однако УФ-детектирование возможно только для молекул,

содержащие хромофорные группы. Таурин не относится к их числу, однако эта проблема может быть решена путем дериватизации исходного вещества. Для молекул, содержащих аминогруппу, возможна реакция тозилрования, при которой в структуру вводится арилсульфоновый фрагмент, обеспечивающий bathochromic сдвиг в УФ-спектре исходного соединения (рисунок 2).

Целью исследования является разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения таблеток таурина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: хлористоводородная кислота концентрированная, класс «х.ч.» (ООО «Сигма Тек», Россия); уксусная кислота ледяная, класс «RFE, USP, BP, Ph. Eur.» (PanReac AppliChem, США); ортофосфорная кислота концентрированная, класс «х.ч.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия гидроксид, класс «ч.д.а.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия ацетат тригидрат, класс «х.ч.» (АО «ЛенРеактив», Россия); ацетонитрил, класс «HPLC-S gradient grade» (Biosolve Chimie, Франция); калия дигидрофосфат б/в, класс «ч.д.а.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия дигидрофосфат моногидрат, класс «х.ч.» (Scharlab, Испания); натрия гидрофосфат б/в, класс «ч.д.а.» (АО «ЛенРеактив», Россия); борная кислота, класс «х.ч.» (АО «ЛенРеактив», Россия).

Вспомогательные вещества для приготовления раствора плацебо были предоставлены производителем таблеток.

Объектами анализа выступали препараты: таурин таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг и 500 мг, отечественного производства с действующим сроком годности.

В качестве стандартного образца использовался таурин, субстанция-порошок, содержание таурина 99,3 %, Россия, серия XP19053171, годен до 07.05.2022.

Дериватизатором выступал 4-толуосulьфонилхлорид, субстанция-порошок, содержание 4-толуосulьфонилхлорида 99,9 % (ООО «МНПК «Биотики», Россия, серия S7240326, годен до 10.10.2023).

Среды растворения готовили согласно Фармакопее Евразийского экономического союза. В качестве среды контроля качества (КК) выступала вода очищенная. Все полученные среды растворения фильтровали с помощью системы вакуумной фильтрации жидкостей и дегазировали с помощью вакуумного насоса.

Оборудование

Тест сравнительной кинетики растворения проводили на приборе для теста «Растворение» DT 126 Light (ERWEKA GmbH, Германия).

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание ФС.2.1.0039.15 «Таурин». Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol3/1593/> Ссылка активна на 21.02.2023.

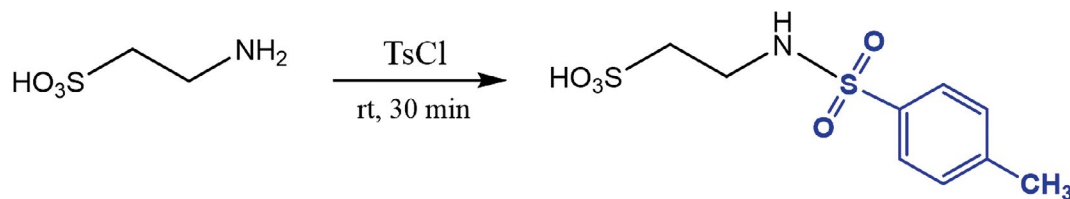


Рисунок 2. Схема дериватизации таурина 4-толуолсульфонилхлорид

Figure 2. Scheme of taurine derivatization with tosyl chloride

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Использовали колонку Shim-pack Velox C18 5 μm 4.6 $\times$ 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония) и предколонку Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μm 4.6 $\times$ 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония).

Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическая колонка: Shim-pack Velox C18 5 μm 4.6 $\times$ 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония)

Предколонка: Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μm 4.6 $\times$ 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония).

Температура термостата: 40 $^{\circ}\text{C}$.

Подвижная фаза: буферный раствор pH 5,5 (элюент А); ацетонитрил (элюент В).

Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.

Градиент состава подвижной среды представлен на рисунке 3.

Объем вводимой пробы: 5 мкл.

Время удерживания деривата таурина: 3,3 мин.

Время регистрации хроматограммы: 7 минут.

Детектирование: УФ-детектор с длиной волны поглощения 254 ± 2 нм

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пробоподготовка

В качестве потенциальных дериватизаторов рассматривались вещества, взаимодействующие с аминокислотами с образованием хромофорсодержащих продуктов. К их числу относятся 4-толуолсульфонилхлорид, *o*-фталевый альдегид и нингидрин (рисунок 4). Применение *o*-фталевого альдегида требует наличия в качестве реагентов также 3-меркаптопропионовой кислоты и дорогостоящего флуоренилметоксикарбонилхлорида [5]. Ключевым минусом использования в качестве дериватизатора нингидрина является длительность протекания процесса. К тому же данную реакцию проводят при нагревании [6]. В данном исследовании дериватизатором был выбран 4-толуолсульфонилхлорид ввиду его высокой реакционной способности, низкой цены и способности образовывать устойчивые комплексы с молекулой таурина [7].

Для поддержания оптимального значения pH использовался боратный буферный раствор с pH 9,0. Экспериментально было подтверждено, что данный буфер сохранял значение pH после добавления каждой из используемых сред растворения.



Рисунок 3. Градиент состава подвижной фазы

Figure 3. Gradient of the composition of the mobile phase

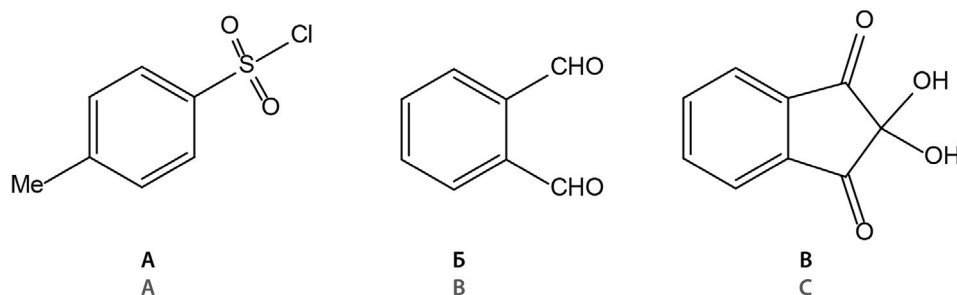


Рисунок 4. Структурные формулы дериватизаторов.

A – 4-толуолсульфонилхлорид; **Б** – о-фталевый альдегид; **В** – нингидрин

Figure 4. Structural formulas of derivatizers.

A – 4-toluenesulfonyl chloride; **Б** – o-phthalaldehyde; **C** – ninhydrin

В качестве стоп-реактива была выбран 42,5%-й раствор ортофосфорной кислоты, для него подобран оптимальный объем, добавляемый к пробе [8]. Концентрация раствора была выбрана таким образом, что смещение значения pH в кислую сторону до значения pH 2,0 происходило при добавлении в смесь: боратный буферный раствор – любая из используемых сред растворения.

Были определены время и скорость центрифугирования растворов после добавления боратного буферного раствора, после добавления дериватизатора, а также после добавления стоп-реактива [9].

Разработка хроматографической методики

Определения подлинности и количественного содержания осуществлялось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для детектирования исследуемого вещества применялся ультрафиолетовый детектор с предварительным проведением предколоночной дериватизации, что позволило детектировать пики производного таурина за счет наличия хромофорных групп в строении дериватизатора.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, была выбрана хроматографическая колонка Shim-pack Velox C18 5 µm 150 × 4,6 мм (таблица 1).

Условия хроматографического разделения были подобраны экспериментально, опираясь на статьи [10], затем доработаны под необходимые требования, из-за ряда особенностей: низкое разрешение между пиками дериватизатора и деривата из-за близкого значения липофильности, сходные времена удерживания определяемого вещества с несорбируемыми компонентами вспомогательных веществ лекарственной формы, а также низкая элирующая сила подвижной фазы в изократическом режиме, приводящая к постепенному накоплению вещества в хроматографической колонке, что негативно сказывалось на чувствительности и точности при рутинном анализе большого количества проб в рамках ТСКР.

Таблица 1. Физико-химические свойства

Table 1. Physical and chemical properties

Свойства Properties	Значения Values
Растворимость в воде, мг/мл Solubility in water, mg/ml	105
Log P (вода – октанол) Log P (water – octanol)	–3,36
pKa (наиболее выраженного кислотного центра) pKa (the most pronounced acid center)	1,5
pKa (наиболее выраженного основного центра) pKa (the most pronounced main center)	9,34
pI (изоэлектрическая точка в растворе) pI (isoelectric point in solution)	5,12
Значение pH водного раствора таурина The pH value of an aqueous solution of taurine	4,8–6,0

Валидация методики

Валидацию методики проводили согласно Решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» приложение 7, раздел 2, пункт 20, валидация методик ТСКР по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, точность и прецизионность, робастность, стабильность; а также Решению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

Специфичность

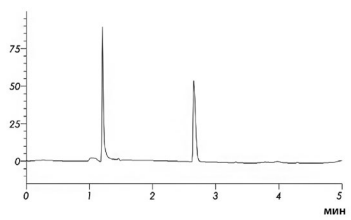
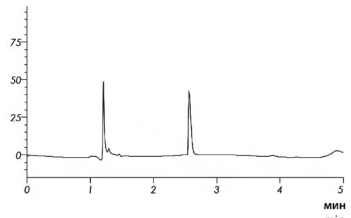
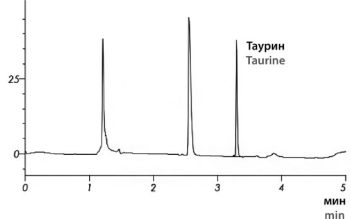
Для оценки специфичности изучали модельные растворы, раствор плацебо, раствор дериватизатора, раствор стоп-реактива, раствор АФИ таурина. Для каждой среды растворения были приготовлены перечисленные растворы.

Было установлено, что на хроматограммах растворов: плацебо, сред растворения, стоп-реактива, дериватизатора и их смеси, а также раствора стандарт-

ного образца таурина отсутствуют пики со временем удерживания продукта дериватизации таурина, и как следствие – методика является специфичной. Полученные хроматограммы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Вид хроматограмм стандартных образцов с указанием времени удерживания компонентов

Table 2. Type of chromatogram of standard samples indicating the retention time of components

Образец Sample	Хроматограмма Chromatogramm
Раствор плацебо, дериватизатора и стоп-реактива Solution of placebo, derivatizer and stop reagent	
Раствор дериватизатора и стоп-реактива Solution of derivatizer and stop reagent	
Испытуемый раствор с добавлением дериватизатора и стоп-реактива Test solution with added derivatizer and stop reagent	

Линейность

Калибровочные и тестовые растворы готовили в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной, в трех повторностях для 9 калибровочных уровней, охватывающих диапазон для двух дозровок лекарственных препаратов на уровне 10, 20, 40, 100 и 120 % от номинального содержания таурина в таблетке дозировкой 250 и 500 мг.

В каждый раствор добавлялся боратный буферный раствор, образцы центрифугировали в течение 3 минут при скорости 3000 об/мин, затем вносили дериватизатор в количестве, указанном в таблице 3. Через равные промежутки времени после добавления дериватизатора в каждый образец добавлялся раствор стоп-реактива, чтобы остановить реакцию.

В ходе валидации было выполнено 4 аналитических цикла. В состав аналитического цикла включались калибровочные растворы и исследуемые растворы. Для каждого была построена линейная зависимость (рисунок 5).

Расчет относительной погрешности (E , %) проводили при помощи валидированного программного обеспечения для работы на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-2040C Plus с УФ-детектором (Shimadzu OpenLab, Япония). Относительная погрешность (E , %) концентраций калибровочных растворов должна укладываться в диапазон от -15 до $+15$ % на нижнем уровне, в диапазон от -10 до $+10$ % – для остальных точек. Полученные данные представлены в таблице 4.

Таблица 3. Приготовление калибровочных растворов и тест-растворов таурина

Table 3. Preparation of calibration solutions and test solutions of taurine

Калибровочный уровень Calibration level	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$V_{\text{иск}}$, мл V_{ref} , ml	1	2	4	8	10	12	16	20	24
Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,2
Концентрация, % от номинала дозировки 250 мг Concentration, % of nominal dosage 250 mg	10	20	40	80	100	120	–		
Концентрация, % от номинала дозировки 500 мг Concentration, % of nominal dosage 500 mg	–	10	20	40	50	60	80	100	120
Объем боратного буферного раствора pH 9,0, мкл Volume of borate buffer pH 9.0, μl	900								
Объем модифицирующего раствора, мкл Volume of modifying solution, μl	30								
Объем стоп-реактива, мкл Stop reagent volume, μl	15								
Масса плацебо, мг Placebo weight, mg	10	–	20	10/20	10	–	20	–	20
№ тест раствора № test solution	1	–	2	3/4	5	–	6	–	6

Таблица 4. Калибровочные растворы для оценки линейности
Table 4. Calibration solutions for linearity estimation

Калибровочный уровень Calibration level	% от номинала дозировки 250 мг % of nominal dosage 250 mg	% от номинала дозировки 500 мг % of nominal dosage 500 mg	Концентрация номинальная, мг/мл Nominal concentration, mg/ml	Концентрация рассчитанная, мг/мл Calculated concentration, mg/ml				E, %				Критерий приемлемости Acceptability criteria
				КК (QC)	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	КК (QC)	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	
1	10	–	0,05	0,049	0,045	0,047	0,05	–2,7	–9,7	–5,7	–0,2	Не более 15 % No more than 15 %
2	20	10	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	–2,8	0,3	3,6	–4,1	Не более 10 % No more than 10 %
3	40	20	0,2	0,20	0,21	0,20	0,20	1	2,9	1,6	–4,8	
4	80	40	0,4	0,42	0,41	0,41	0,41	4,7	2	2,7	3,4	
5	100	–	0,5	0,48	0,51	0,52	0,51	–4,8	2	4,1	1,7	
6	120	–	0,6	0,62	0,58	0,56	0,57	4	–3,6	–0,5	–4,5	
7	–	80	0,8	0,79	0,82	0,78	0,83	–1,1	2,3	–2,9	3,3	Не более 15 % No more than 15 %
8	–	100	1	0,98	0,96	0,98	1,02	–3,3	–4,1	–2	1,7	
9	–	120	1,2	1,23	1,23	1,22	1,18	2,1	2,1	1,8	–2	Не более 15 % No more than 15 %

Примечание. E, % – относительная ошибка определения. E, % – relative error of determination.
Note. E, % – relative error of determination. E, % – relative error of determination.

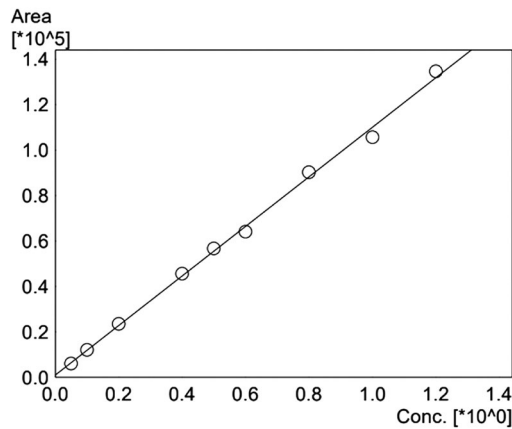


Рисунок 5. Калибровочный график зависимости отношения площади пика таурина к концентрации
Figure 5. Calibration graph of the ratio of the area of the taurine peak to the concentration

Дополнительно были рассчитаны концентрации таурина в калибровочных растворах при помощи таблиц Excel, построены уравнения линейных зависимостей площадей пика таурина от концентрации его растворов, определены значения коэффициентов корреляции этих зависимостей, тангенса угла наклона градуировочной кривой, длина отрезка по оси y, а также отклонения рассчитанных по уравнениям значений концентраций от введенных в эти растворы, проведенные расчеты приведены в таблице 5.

Для всех изученных циклов линейность методики является удовлетворительной, так как величина коэффициента корреляции полученных зависимостей больше 0,99, а рассчитанные по уравнениям количества таурина отличаются от введенных менее, чем на 10 % (менее, чем на 15 % для нижнего предела линейности).

Точность и прецизионность

Точность методики оценивали по результатам анализа тест-растворов, содержащих определенные (введенные) количества таурина и плацебо препарата. В каждый тест-раствор добавляли одинаковое количество плацебо, в расчете на номинальную концентрацию таурина в 1 таблетке. Плацебо таблеток готовили в соответствии с составом препарата, растирая смесь вспомогательных компонентов в указанном в таблице 6 соотношении в фарфоровой ступке.

Готовили по три серии тест-растворов для каждой дозировки, последовательно используя в качестве растворителя одну из 4 сред растворения.

Анализ валидационных образцов проводили в рамках 4 последовательностей по 6 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1) и между двумя циклами (последовательности 1 и 2). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения.

Таблица 5. Оценка линейности

Table 5. Linearity estimation

Среда растворения Dissolution medium		Коэффициент корреляции (R) Correlation coefficient (R)	Тангенс угла наклона градуировочной кривой (k) Tangent of the slope of the calibration curve (k)	Длина отрезка по оси y (b) The length of the segment along the y-axis (b)	Уравнение линейной зависимости $y = kx + b$ Linear equation $y = kx + b$
КК QC	Среднее значение Average value	0,9987	96121	5377	$y = 96121x + 5377$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9986	95557	5595	$y = 95557x + 5595$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9985	96425	5107	$y = 96425x + 5107$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9985	96380	5429	$y = 96380x + 5429$
pH 1,2	Среднее значение Average value	0,9988	102339	-476	$y = 102339x - 476$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9970	101448	-441	$y = 101448x - 476$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9994	100992	-211	$y = 100992x - 211$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9983	104577	-777	$y = 102339x - 777$
pH 4,5	Среднее значение Average value	0,9997	89172	3946	$y = 89172x + 3946$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9994	88570	4351	$y = 88570x + 4351$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9998	89017	3868	$y = 89017x + 3868$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9996	89931	3618	$y = 89931x + 3618$
pH 6,8	Среднее значение Average value	0,9992	99698	4438	$y = 99698x + 4438$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9989	99140	4483	$y = 99140x + 4483$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9991	100008	4540	$y = 100008x + 4540$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9994	99945	4291	$y = 99945x + 4291$

ния (RSD, %) и средний процент открываемости методики (Z_{cp} , %), приведенные в таблице 7.

Полученные результаты позволяют судить, что прецизионность и точность методики анализа удовлетворительна, поскольку относительное стандартное отклонение для каждой из изученных концентраций таурина не превышает установленное значение 4 %, а открываемость содержания деривата таурина не выходит за пределы интервала 98,0–102,0 %.

Робастность

Робастность аналитической методики оценивается путем сравнения растворов известной концентрации, проанализированных при преднамеренном малом изменении трех разных параметров анализа. В таблице 8 представлен расчет влияния колебания таких параметров, как: скорость потока, температура колоночного термостата и длина волны УФ-детектора.

Таблица 6. Состав таблеток таурина

Table 6. Composition of taurine tablets

Наименование компонента Component name	Количество, мг Quantity, mg	
	На 1 таблетку дозировкой 250 мг For 1 tablet with a dosage of 250 mg	На 1 таблетку дозировкой 500 мг For 1 tablet with a dosage of 500 mg
Таурин Taurine	250	500
Целлюлоза микрокристаллическая Cellulose microcrystalline	23	46
Крахмал картофельный Potato starch	18	36
Желатин Gelatin	6	12
Кремния диоксид коллоидный (аэросил) Silicon dioxide colloidal (aerosil)	0,3	0,6
Кальция стеарат calcium stearate	2,7	5,4
Итого, мг Total, mg	300	600
Итого, мг плацебо Total, mg placebo	50	100

Согласно результатам, робастность методики анализа удовлетворительна, поскольку относительное стандартное отклонение для каждого из изученных параметров не превышает установленное значение 4 %.

Стабильность

Стабильность растворов оценивали по изменению концентраций анализируемых растворов (или соответствующих площадей пиков), используя для сравнения образцы 100 % уровня концентрации от номинала для дозировки 250 мг через 24 часа после их приготовления при комнатной температуре и при нагревании при 37 °С в сушильном шкафу, что моделирует условия термостатирования стаканов в тестере растворения. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Относительное стандартное отклонение для растворов не превышало 5 %. Согласно полученным результатам, тест-растворы стабильны в течение 24 часов после их приготовления в условиях при комнатной температуре и при температуре 37 °С в сушильном шкафу, что имитирует нагревание в тестере растворения.

Таблица 7. Точность и прецизионность методики (inter-day, intra-day)

Table 7. Accuracy and precision of the methodology (inter-day, intra-day)

Введено мг/мл Introduced mg/ml	Найдено (мг/мл), среднее значение Found (mg/ml), mean		Z _{ср.} , % Z _{ав.} , %	RSD, %	
	inter-day	intra-day		inter-day	intra-day
Среда контроля качества (вода очищенная) Quality control medium (purified water)					
0,05	0,05	0,05	97,87	0,90	0,83
0,40	0,40	0,38	98,42	1,31	1,64
0,50	0,51	0,51	102,13	1,14	0,55
0,50	0,51	0,51	101,93	0,88	0,43
0,60	0,58	0,58	97,33	0,43	1,64
1,20	1,19	1,15	99,36	1,73	2,01
Раствор хлористоводородной кислоты pH 1,2 Hydrochloric acid solution pH 1.2					
0,05	0,05	0,05	102,00	0,73	2,90
0,40	0,41	0,42	101,92	0,90	2,03
0,50	0,51	0,51	102,07	0,54	0,24
0,50	0,49	0,47	97,80	0,65	1,85
0,60	0,59	0,58	98,39	2,03	1,81
1,20	1,20	1,19	100,28	0,80	1,54
Ацетатный буферный раствор pH 4,5 Acetate buffer pH 4.5					
0,05	0,05	0,05	100,00	0,91	0,15
0,40	0,41	0,39	101,92	2,10	3,53
0,50	0,52	0,50	103,73	2,14	1,34
0,50	0,53	0,49	104,27	2,23	1,05
0,60	0,61	0,59	102,50	1,31	1,57
1,20	1,21	1,20	100,83	1,94	0,98
Фосфатный буферный раствор pH 6,8 Phosphate buffer solution pH 6.8					
0,05	0,05	0,05	96,67	1,18	2,01
0,40	0,39	0,38	96,92	1,31	1,60
0,50	0,49	0,50	97,40	1,78	1,97
0,50	0,49	0,49	96,93	1,00	1,22
0,60	0,60	0,59	100,28	0,79	0,73
1,20	1,20	1,20	100,11	0,94	0,30

Примечание. Z_{ср.}, % – открываемость. RSD, % – относительное стандартное отклонение.

Note. Z_{av.}, % – openness. RSD, % – relative standard deviation.

Таблица 8. Расчет робастности

Table 8. Calculation of robustness

Параметры анализа Analysis parameters		Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml			
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	КК
Скорость потока, мл/мин Flow rate ml/min	0,9	0,511	0,518	0,509	0,510
	1	0,501	0,503	0,507	0,502
	1,1	0,507	0,502	0,509	0,501
RSD, %		0,99	1,77	0,23	0,98
Температура колоночного термостата, °C Column oven temperature, °C	38	0,503	0,506	0,501	0,499
	40	0,507	0,514	0,507	0,502
	41	0,519	0,518	0,509	0,511
RSD, %		1,63	1,19	0,82	1,24
Длина волны детектора, нм Detector wavelength, nm	253	0,511	0,510	0,502	0,502
	254	0,507	0,503	0,501	0,506
	255	0,506	0,502	0,507	0,501
RSD, %		0,52	0,86	0,64	0,53

Таблица 9. Расчет стабильности

Table 9. Stability calculation

Условия хранения Storage terms	Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	RSD, %
Среда растворения вода очищенная (среда контроля качества) Dissolution medium purified water (quality control medium)		
Хранение при температуре 37 °C Storage at 37 °C	0,515	0,4
	0,515	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,504	0,6
	0,505	
Среда растворения 0,1 М хлористоводородная кислота pH 1,2 Dissolution medium 0.1 M hydrochloric acid pH 1.2		
Хранение при температуре 37 °C Storage at 37 °C	0,518	0,7
	0,507	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,501	1,0
	0,499	
Среда растворения ацетатный буферный раствор pH 4,5 Dissolution medium Acetate buffer pH 4.5		
Хранение при температуре 37 °C Storage at 37 °C	0,493	2,2
	0,499	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,501	1,6
	0,504	
Среда растворения фосфатный буферный раствор pH 6,8 Dissolution medium Phosphate buffer pH 6.8		
Хранение при температуре 37 °C Storage at 37 °C	0,501	2,2
	0,507	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,489	1,4
	0,49	

Результаты валидации подтверждают пригодность методики для поставленных аналитических задач, а именно: проведение ТСКР в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный бу-

ферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл.

Применение разработанной методики

На основе разработанной методики был проведен ТСКР таблеток таурина дозировкой 250 и 500 мг. Полученные профили представлены на рисунках 6–9.

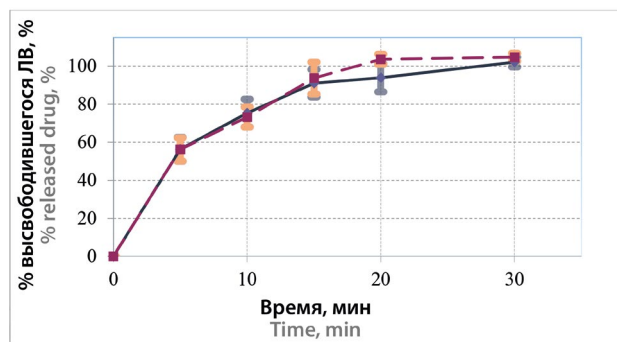


Рисунок 6. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде вода очищенная (среда контроля качества).

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 6. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in purified water (quality control medium).

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

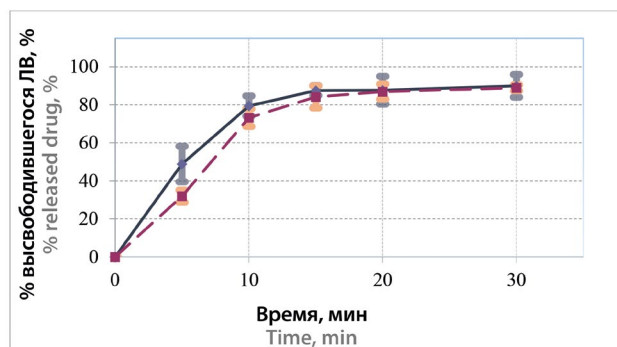


Рисунок 7. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде раствора хлористоводородной кислоты pH 1,2.

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 7. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in the medium of hydrochloric acid solution pH 1.2.

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

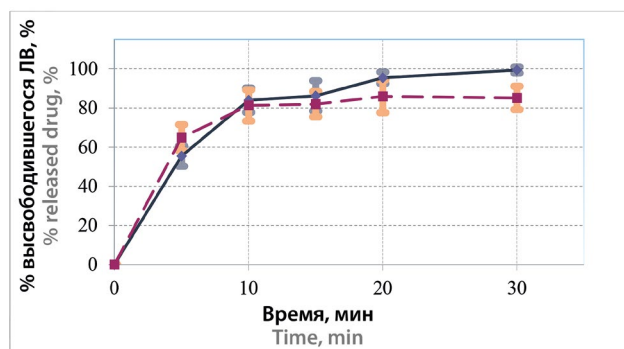


Рисунок 8. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5.

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 8. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in an acetate buffer solution pH 4.5.

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

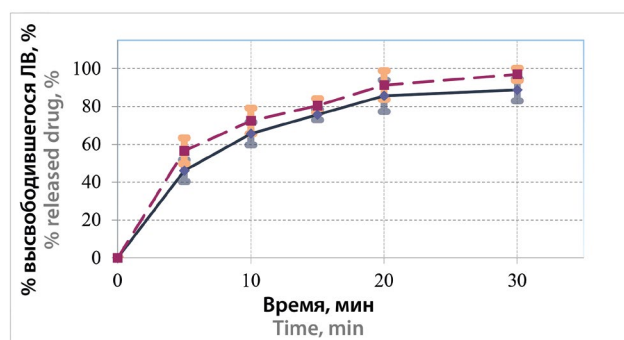


Рисунок 9. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8.

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 9. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in a medium of phosphate buffer solution pH 6.8.

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

Во всех средах наблюдалось полное высвобождение у каждой дозировки (более 85 % к 45 минуте). Профили для дозировки 500 мг и 250 мг имели одинаковую форму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобраны оптимальные условия дериватизации таурина, разработана и валидирована методика количественного определения таурина методом ВЭЖХ-

УФ в рамках ТСРП в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл и позволяет применять разработанную методику для количественного определения в рамках ТСРП таблеток с дозировкой 250 и 500 мг.

Методика была апробирована в рамках ТСРП в трёх средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной, наблюдалось полное высвобождение у обеих дозировок (более 85 % к 30 минуте).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gentile C.L., Nivala A.M., Gonzales J.C., Pfaffenbach K.T., Wang D., Wei Y., Jiang H., Orlicky D.J., Petersen D.R., Pagliasotti M.J., Maclean K.N. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;301(6):1710–1722. DOI: 10.1152/ajpregu.00677.2010.
- Page L.K., Jeffries O., Waldron M. Acute taurine supplementation enhances thermoregulation and endurance cycling performance in the heat. *European journal of sport science*. 2019;19(8):1101–1109. DOI: 10.1080/17461391.2019.1578417.
- Jacobsen J.G., Smith L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological Reviews*. 1968;48(2):424–511. DOI: 10.1152/physrev.1968.48.2.424.
- Xavier J.M., Morgado A.L., Rodrigues C.M., Solá S. Tauroursodeoxycholic acid increases neural stem cell pool and neuronal conversion by regulating mitochondria-cell cycle retrograde signaling. *Cell Cycle*. 2014;13(22):3576–3589. DOI: 10.4161/15384101.2014.962951.
- Plotka-Wasyłka J.M., Morrison C., Biziuk M., Namiesnik J. Chemical derivatization processes applied to amine determination in samples of different matrix composition. *Chemical Reviews*. 2015;115(11):4693–4718. DOI: 10.1021/cr4006999.
- Zaki M.M., Abdel-Al H., Al-Sawi M. Assessment of plasma amino acid profile in autism using cation-exchange chromatography with postcolumn derivatization by ninhydrin. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2017;47(1):260–267. DOI: 10.3906/sag-1506-105.
- Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 2007;103(4):1475–1486. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.
- Lehtonen P., Saarinen M., Vesanto M., Riekkola M.L. Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1992;194(5):434–437. DOI: 10.1007/BF01197724.
- Gomes E.P., Borges C.V., Monteiro G.C., Belin M.A.F., Minatel I.O., Junior A.P., Tecchio M.A., Lima G.P.P. Preharvest salicylic acid treatments improve phenolic compounds and biogenic amines in 'Niagara Rosada' table grape. *Postharvest Biol. Technol.* 2021;176:111–120. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2021.111505.
- Omer M., Omar M., Thiel A., Elbashir A. High Performance Liquid Chromatographic Methods for Analysis of Taurine in Energy Drinks after Pre-column Derivatization. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018;13(5). DOI: 10.29333/ejac/93422.