

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

УДК 544.08; 54:062; 547.466

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-152-161>

Поступила в редакцию 16.03.2021

Received 16.03.2021

Л. А. Водопьянова, З. И. Куваева, Е. Г. Каранкевич, Е. Б. Корзюк*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь***ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ОРИГИНАЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ ДИПЕПТИДА ТРЕОНИЛТРЕОНИНА**

Аннотация. Валидация количественного определения субстанции треонилтреонина проведена по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность, включая повторяемость и воспроизводимость. Коэффициент корреляции линейности методики составил 0,99998 в диапазоне применения 80–120 % от нормируемого значения. Рассчитанные коэффициенты Стьюдента для диапазона 80, 100, 120 % соответственно равны 1,32; 0,31; 0,55 и не превышают допустимые предельные значения. Коэффициент открываемости составил 100,07 %; предел повторяемости для одной группы измерений – 0,20; для двух – 0,366 в соответствии с критериями приемлемости. Рассчитанные критерии Стьюдента ($t = 1,34$) и Фишера ($F = 2,00$) для двух групп измерений не превышали допустимых значений. Разработанная методика потенциометрического титрования субстанции треонилтреонина в неводной среде валидна.

Ключевые слова: дипептид, субстанция треонилтреонин, валидация, неводное титрование, потенциометрия

Для цитирования. Валидация методики количественного определения оригинальной субстанции дипептида треонилтреонина / Л. А. Водопьянова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 152–161. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-152-161>

L. A. Vodopyanova, Z. I. Kuvaeva, E. G. Karankevich, E. B. Korzyuk*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***VALIDATION OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORIGINAL SUBSTANCE
OF DIPEPTIDE THREONYLTHREONINE**

Abstract. Validation of the quantitative determination of the threonylthreonine substance was carried out in terms of specificity, linearity, correctness, precision, including repeatability and reproducibility. The linearity correlation coefficient of the method was 0.99998 in the range of 80–120 % of the standardized value. The calculated Student's coefficients for the range 80, 100, 120 % are respectively equal to 1.32; 0.31; 0.55 and do not exceed the permissible limit values. The open rate was 100.07 %. The repeatability limit for one measurement group was – 0.20; for two – 0.366 in accordance with the eligibility criteria. The calculated Student's ($t = 1.34$) and Fisher's ($F = 2.00$) criteria for two groups of measurements did not exceed the permissible values. The developed technique for potentiometric titration of the threonylthreonine substance in a non-aqueous medium is valid.

Keywords: dipeptide, substance of threonylthreonine, validation, non-aqueous titration, potentiometry

For citation. Vodopyanova L. A., Kuvaeva Z. I., Karankevich E. G., Korzyuk E. B. Validation of quantitative determination of original substance of dipeptide threonylthreonine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnyh navuk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2021, vol. 57, no. 2, pp. 152–161. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-152-161>

Введение. В настоящее время значительное внимание уделяется разработке лекарственных средств на основе короткоцепочечных пептидов, содержащих 2–5 аминокислотных фрагмента [1, 2]. Подобные лекарственные препараты обладают высокой эффективностью ввиду хорошей проницаемости через клеточные мембраны и биодоступностью, отличительной чертой пептидных лекарственных препаратов является их низкая токсичность [3, 4]. В Институте физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси разработана субстанция дипептида треонилтреонина (Thr-Thr), которая может быть использована в качестве действующего вещества для лекарственных препаратов цитопротективного действия. Подобные лекарственные средства используются для улучшения или нормализации функционального состояния слизистой оболочки кишечника, препятствуют развитию воспалительных процессов и онкозаболеваний [5, 6].

Процесс создания субстанции лекарственного препарата сложный и многоступенчатый, включающий несколько основных этапов: разработку методики синтеза, методик выделения и очистки

вещества для получения субстанции [7] и разработку методик анализа полученной субстанции, на основании которых подтверждается ее качество и возможность ее использования в медицинских целях.

Предъявляемые высокие требования к качеству оригинальных субстанций в Республике Беларусь, предполагают обязательную валидацию методик количественного контроля с целью получения достоверных результатов о качестве полученной продукции [8]. Часто для количественного анализа субстанций используются косвенные методики, основанные на спектроскопических (ИК-, УФ-спектроскопия) или хроматографических (ВЭЖХ, ГХ, ТСХ) методах [9], которые предполагают наличие вещества-сравнения, стандартного образца. В случае разработки методов анализа для оригинальных субстанций необходимо учитывать отсутствие стандартных образцов [10, 11], в данном случае необходимо использовать прямые методы анализа [12, 13].

Цель данной работы – валидация прямого метода анализа фармацевтической субстанции дипептида треонилтреонина.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования является субстанция дипептида треонилтреонина (Thr-Thr) (рис. 1).

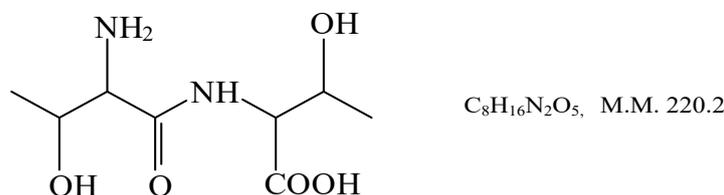


Рис. 1. Структурная формула Thr-Thr

Fig. 1. Structural formula of Thr-Thr

При разработке методики использовали 3 опытно-промышленные серии субстанции в соответствии с требованиями [14], однородность образцов была подтверждена методом ВЭЖХ и ИК-спектроскопии [7]. Содержание треонилтреонина в субстанции нормировано в диапазоне от 98 до 101 %. Влагосодержание образцов определяли согласно [8] по потере в массе при высушивании.

Треонилтреонин имеет ковалентную амидную связь, гидроксид-, амино- и карбоксильные группы. Подобно аминокислотам, пептиды в нейтральных растворах существуют в виде цвиттерионов. Равновесие ионных форм пептида в зависимости от pH среды можно представить схемой:



Одним из приемлемых методов количественного определения основного компонента в субстанции является титрование, точность метода возрастает с использованием потенциометрического определения точки эквивалентности [13]. На основании физико-химических свойств субстанции Thr-Thr титрование необходимо проводить в неводных средах [15, 16]. Общий вид кривой потенциометрического титрования приведен на рис. 2.

Используемые реактивы – уксусная, ледяная, муравьиная и хлорная кислоты соответствовали квалификации, рекомендуемой в работе [8]. Использованное оборудование: весы аналитические ОНАУС AR-0640, pH-метр Hanna pH 221, сушильный шкаф ГП-20-3 имели сертификаты поверки и калибровки. Для титрования использовали бюретку номинальной вместимости 10 мл первого класса точности, цена деления 0,02 мл.

Методика выполнения эксперимента: 200,0 мг субстанции взвешивали в стакане вместимостью 50 мл, растворяли в 3 мл муравьиной кислоты безводной и добавляли 30 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор титровали потенциометрически 0,1 М раствором хлорной кислоты. Параллельно проводили контрольный опыт. Расчет точки эквивалентности осуществляли по второй производной. Абсолютное значение отношения изменения э.д.с. (ΔE) к приращению объема прибавляемого титранта (ΔV) в этой точке будет максимальным (рис. 3).

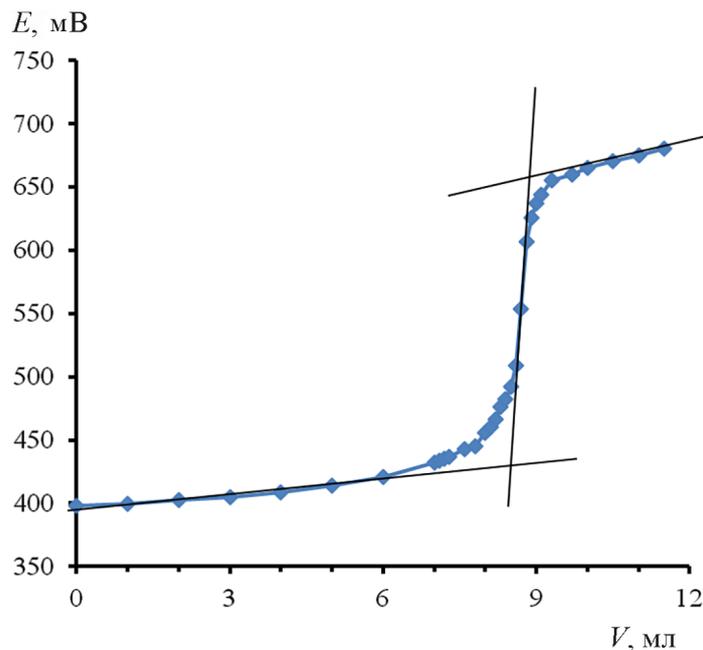


Рис. 2. Кривая неводного потенциометрического титрования субстанции треонилтреонина раствором 0,1 М HClO_4
 Fig. 2. Curve of non-aqueous potentiometric titration of the threonylthreonine substance with 0,1 M HClO_4 solution

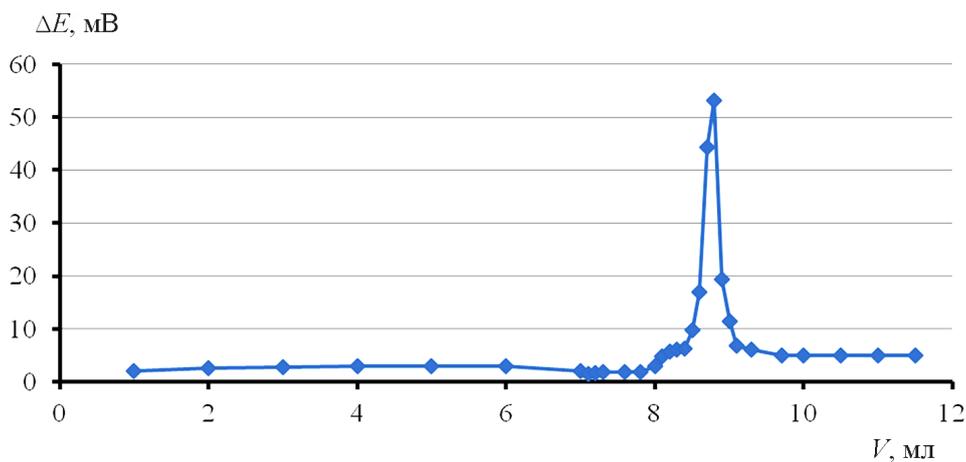


Рис. 3. Дифференциальная кривая неводного потенциометрического титрования субстанции треонилтреонин
 Fig. 3. Differential curve of non-aqueous potentiometric titration of the threonylthreonine substance

Содержание треонилтреонина (X , %) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_0)k22,0225 \cdot 100 \cdot 100}{m(100 - W)}, \quad (2)$$

где V – объем 0,1 М раствора хлорной кислоты, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл; V_0 – объем 0,1 М раствора хлорной кислоты, израсходованный на титрование контрольного раствора, мл; k – поправочный коэффициент к молярности 0,1 М раствора хлорной кислоты; 22,0225 – количество треонилтреонина, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты, мг; W – потеря в массе при высушивании, %; m – масса навески субстанции, мг.

Содержание треонилтреонина должно быть не менее 98,0 % и не более 101,0 % в пересчете на сухое вещество.

Основное требование при валидации методик – достоверность получаемых результатов, что подтверждается испытанием пригодности системы. Система считается пригодной, если выполняется следующее условие: объем титранта (0,1 М раствор хлорной кислоты), израсходованный для достижения точки эквивалентности, должен соответствовать объему 0,1 М раствора треонилтреонина, взятого для анализа, что было подтверждено экспериментально.

Результаты и их обсуждение. Валидацию методики проводили по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, включая повторяемость и внутрилабораторную воспроизводимость [14].

Основная характеристика методики количественного определения фармацевтической субстанции – ее специфичность, т. е. возможность определять компонент в присутствии других компонентов, имеющих в выбранной системе. **Специфичность** методики подтверждена отсутствием влияния растворителя [10, 17], смеси муравьиной и уксусной кислот на результаты титрования испытуемого раствора (табл. 1).

Таблица 1. Результаты испытаний по показателю специфичность методики количественного определения Thr-Thr

Table 1. Test results in terms of the specificity of the method for the quantitative determination of Thr-Thr

<i>m</i> , мг	<i>V</i> _{титранта} , мл	<i>X</i> , %	Статистическая обработка данных
Контрольный опыт (титрование смеси растворителей)			
0	0,01	–	<i>V</i> = 0,013±0,004 мл
0	0,02	–	
0	0,01	–	
Титрование субстанции Thr-Thr			
200	8,55	99,17	<i>X</i> = 99,16±0,042 % Дисперсия: <i>S</i> ² = 3,65·10 ⁻³ Стандартное среднеквадратичное отклонение (далее – <i>S</i>) <i>S</i> = 0,06 Относительное стандартное отклонение (далее – <i>RSD</i>): <i>RSD</i> = 0,06 %
206	8,80	99,10	
195	8,34	99,22	

Линейность методики изучали на 5 уровнях концентрации треонилтреонина в диапазоне 80–120 % от нормируемого значения. График сохраняет линейную зависимость во всем интервале исследуемых концентраций (рис. 4).

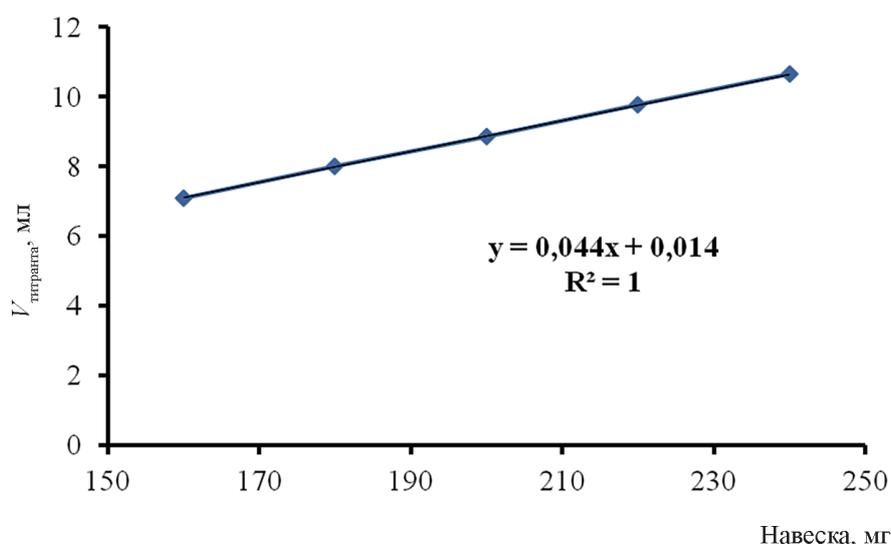


Рис. 4. График линейной зависимости потенциметрического неводного титрования субстанции Thr-Thr

Fig. 4. Graph of the linear dependence of the potentiometric non-aqueous titration of Thr-Thr substance

Корректность данной линейной зависимости подтверждается коэффициентом корреляции $r = \sqrt{R^2} = 1 > 0,98$, что удовлетворяет критерию приемлемости. Коэффициент корреляции составил 0,99998. Пересечение с осью Y составляет 0,16 % отклика номинальной концентрации и соответствует критериям приемлемости [8].

Правильность методики проверена на трех уровнях концентрации, соответствующих 80, 100, 120 % от номинального содержания. Полученные данные приведены в табл. 2.

Смещение результатов измерения в диапазоне 80, 100, 120 % от номинального значения, определяемое значением коэффициента Стьюдента, соответственно равно 1,33; 0,31; 0,55. Полученные результаты не превышают табличного предельного значения коэффициента Стьюдента $t(0,95; 5) = 2,28$ для доверительной вероятности $P = 95$ % и заданного числа измерений (число степеней свободы 5), что подтверждает правильность методики.

Т а б л и ц а 2. Оценка правильности методики количественного анализа Thr-Thr для диапазона концентраций 80, 100 и 120 % от номинальной

Table 2. Correctness evaluation of the quantitative Thr-Thr analysis method for the concentration range of 80, 100 and 120% of the nominal

Найдено, мг	Метрологические характеристики количественного анализа	Коэффициент открываемости	Коэффициент восстановления	Метрологические характеристики коэффициента открываемости
Введено 160 мг				
159,6 160,0 160,0 160,5 160,5 160,7	$m_{cp} = 160,2$ мг $S^2 = 0,18$ $S = 0,42$ $RSD = 0,26$ % Коэффициент Стьюдента $t(0,95; 5) = 1,33$	99,7 100,0 100,3 100,3 100,3 100,4	100,17 %	$X_{cp} = 100,17$ $S^2 = 0,08$ $S = 0,28$ Ошибка выборочного среднего 0,11 Доверительный интервал $100,18 \pm 0,26$ % Относительная погрешность 0,21 %
Введено 200 мг				
200,0 200,1 199,9 200,0 200,1 199,9	$m_{cp} = 200,0$ мг $S^2 = 0,006$ $S = 0,08$ $RSD = 0,04$ % Коэффициент Стьюдента $t(0,95; 5) = 0,31$	100,0 100,0 99,9 100,2 100,0 99,9	100,02 %	$X_{cp} = 100,02$ $S^2 = 0,009$ $S = 0,09$ Ошибка выборочного среднего 0,04 Доверительный интервал $100,02 \pm 0,09$ % Относительная погрешность 0,06 %
Введено 240 мг				
239,5 239,9 239,9 240,2 240,4 240,6	$m_{cp} = 240,1$ мг $S^2 = 0,16$ $S = 0,40$ $RSD = 0,17$ % Коэффициент Стьюдента $t(0,95; 5) = 0,55$	99,8 99,9 100,0 100,1 100,2 100,3	100,04 %	$X_{cp} = 100,04$ $S^2 = 0,03$ $S = 0,17$ Ошибка выборочного среднего 0,07 Доверительный интервал $100,04 \pm 0,16$ % Относительная погрешность 0,13 %

Коэффициент открываемости (табл. 2) принадлежит диапазону (98,0–102,0 %), что соответствует критериям приемлемости. Полученные относительные погрешности измерений не превышают доверительный интервал, рассчитанный для доверительной вероятности $P = 95$ % и заданного числа измерений. Расчет коэффициента восстановления (K_B) проводят согласно формуле:

$$K_B = m_{cp} \times 100/\mu, \quad (3)$$

где m_{cp} – среднее количество вещества (мг), определенное при анализе; μ – принятое эталонное количество вещества (мг) в навеске.

Сравнивая рассчитанные значения K_B , выбираем наихудшее $K_B = 100,14$ % для установления предварительного норматива контроля правильности:

$$\Delta_{\text{cp}} = |100 - 100,14| = 0,14 \%. \quad (4)$$

Полученные результаты не имеют выбросов – выборки однородны. Средний коэффициент восстановления составил 100,07, что соответствует установленному критерию – 98–102 %.

Прецизионность методики определяли в рамках повторяемости (сходимости) и промежуточной прецизионности (внутрилабораторной) с использованием различных проб одного и того же однородного подлинного образца субстанции Thr-Thr.

Повторяемость оценивали по результатам потенциометрического титрования шести растворов при 100 % номинальной концентрации (разные навески субстанции) при одинаковых условиях в течение одного дня, результаты экспериментов приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Оценка повторяемости измерений
T a b l e 3. Evaluation of repeatability of measurements

Номер пробы	<i>m</i> , мг	<i>V</i> , мл	<i>X</i> , %	Метрологические характеристики
1	199,8	8,54	98,74	$X_{\text{cp}} = 98,84 \%$ $S^2 = 0,02$ $S = 0,15$ $RSD = 0,15 \%$ $\Delta_{\text{cp}} = 0,11$ $Pr = 1,32 \cdot 0,15 = 0,20$
2	199,5	8,52	98,66	
3	200,8	8,60	98,94	
4	200,6	8,58	98,81	
5	200,1	8,56	98,82	
6	201,2	8,65	99,09	

Среднюю погрешность измерений рассчитывали по уравнению:

$$\Delta_{\text{cp}} = \sum_{i=1}^n |X_i - X_{\text{cp}}| / n, \quad (5)$$

где *n* – количество измерений в серии.

Предел повторяемости вычисляли следующим образом:

$$Pr = L(P, m) \cdot S, \quad (6)$$

где *L(P, m)* – коэффициент Пирсона, который для одной группы измерений (*m* = 1) принимается равным 1,32; для двух групп измерений *L*(0,95; 2) = 2,77; *S* – стандартное среднеквадратичное отклонение.

Как видно из полученных результатов (табл. 3), значение средней погрешности не превышает предел повторяемости: $\Delta_{\text{cp}} < Pr$, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Промежуточную прецизионность оценивали так же как и повторяемость, только в разные дни, разными аналитиками в равных условиях. Результаты измерений и их статистическая обработка приведены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Оценка промежуточной прецизионности
T a b l e 4. Evaluation of intermediate precision

Аналитик № 1 (<i>k</i> = 1,025)				
Номер пробы	<i>m</i> , мг	<i>V</i> , мл	<i>X</i> , %	Метрологические характеристики
1	200,7	8,57	98,64	$X_{\text{cp}} = 98,74 \%$ $S^2 = 0,01$ $S = 0,10$ $RSD = 0,10$ $\Delta_{\text{cp}} = 0,08$ $Pr = 1,32 \cdot 0,148 = 0,13$
2	199,6	8,52	98,61	
3	200,3	8,56	98,72	
4	196,8	8,42	98,84	
5	201,1	8,6	98,79	
6	203,6	8,71	98,83	

Аналитик № 1 ($k = 1,025$)				
Номер пробы	m , мг	V , мл	X , %	Метрологические характеристики
1	200,3	8,61	98,82	$X_{\text{ср}} = 98,88\%$ $S^2 = 0,02$ $S = 0,13$ $RSD = 0,13$ $\Delta_{\text{ср}} = 0,08$ $Pr = 1,32 \cdot 0,131 = 0,17$
2	200,8	8,65	99,03	
3	201,0	8,66	99,04	
4	198,3	8,52	98,77	
5	199,5	8,58	98,87	
6	202,1	8,68	98,73	
$X_{\text{ср}} = 98,81\%$; $S^2 = 0,02$; $S = 0,13$; $RSD = 0,13\%$ Коэффициент Пирсона 2,77 для двух групп измерений, $Pr = 2,77 \cdot 0,132 = 0,366$ $\Delta_{\text{ср}} = 0,098 < Pr = 0,366$ Критерий Стьюдента для двух групп измерений $t = 1,34 < t(0,95; 10) = 2,23$ (табл. данные) Критерий Фишера $F = S_{\text{max}}^2 / S_{\text{min}}^2 = 0,02 / 0,01 = 2,00 < F$ табл. данные (P, f_1, f_2) = 5,05, где $P = 0,95$; $f_1 = 5$; $f_2 = 5$				

С целью определения повторяемости методики рассчитывали предварительный норматив контроля повторяемости, исходя из того что повторяемость (сходимость) результатов параллельных определений признают удовлетворительной, в случае соответствия полученных значений неравенству:

$$|X_{\text{ср.1}} - X_{\text{ср.2}}| < 0,01 X_{\text{ср}} Pr_{\text{отн}}, \quad (7)$$

где $X_{\text{ср.1}}$ и $X_{\text{ср.2}}$ – значения результатов параллельных определений в условиях повторяемости; $X_{\text{ср}}$ – среднее значение результатов двух параллельных определений; $Pr_{\text{отн}}$ – норматив контроля повторяемости, %, вычисляемый по следующей формуле:

$$Pr_{\text{отн}} = \frac{Pr}{X_{\text{ср}}} 100 = \frac{2,77S}{X_{\text{ср}}} 100 \quad (8)$$

Согласно полученным данным (табл. 4), предельное значение критерия повторяемости $Pr_{\text{отн}}$ имеет величину: $Pr_{\text{отн}} = (0,366/98,81)100 = 0,370$. Таким образом, в ходе выполнения валидации методики предел повторяемости не превышает предельного значения и соответствует критериям приемлемости: $|98,74 - 98,88| < 0,01 \cdot 98,81 \cdot 0,370$, таким образом, получаем $0,14 < 0,366$, что соответствует критериям приемлемости (табл. 5).

Таблица 5. Результаты валидации (диапазон 80–120 %, $n = 6$)Table 5. Validation results (range 80–120%, $n = 6$)

Валидационный критерий	Полученное значение	Критическое значение
Специфичность	Методика специфична: растворитель (смесь уксусной и муравьиной кислот) не влияет на результат неводного потенциометрического титрования субстанции Thr-Thr	Компоненты системы не должны искажать результат
Линейность	Уравнение линейной зависимости титрования субстанции Thr-Thr описывается уравнением: $y = 0,044x + 0,014$ Коэффициент корреляции $r = 0,99998$	$r = \sqrt{R^2} = 1 > 0,98$
Правильность	Коэффициент Стьюдента, определяющий смещение результатов измерений в диапазоне 80, 100, 120 % соответственно равен 1,32; 0,31; 0,55; не превышает предельное значение $t(0,95; 5) = 2,28$. Средний коэффициент восстановления составил 100,07 %	Предельное значение коэффициента Стьюдента для серии измерений в исследуемом диапазоне концентраций должно быть выше определяемого смещения результатов. Коэффициент восстановления принадлежит диапазону 98–102 %

Валидационный критерий	Полученное значение	Критическое значение
Прецизионность	Повторяемость (сходимость результатов): $Pr = 0,20$; $\Delta_{cp} = 0,113$; выполняется неравенство $\Delta_{cp} < Pr$ Промежуточная прецизионность: для двух групп измерений $Pr = 0,366$, $\Delta_{cp} = 0,098 < Pr = 0,366$ Критерий Стьюдента для двух групп измерений $t = 1,34 < t(0,95; 10) = 2,23$ (табл. данные) Критерий Фишера для двух групп измерений $F = 2,00 < F$ табл. данные (0,95; 5; 5) = 5,05	Предел повторяемости для группы измерений $\Delta_{cp} < Pr$ Предел повторяемости для двух групп измерений $\Delta_{cp} < Pr$ Критерий Стьюдента для двух групп измерений $t < t(0,95; 10) = 2,23$ (табл. данные) Критерий Фишера для двух групп измерений $F < F$ табл. данные (0,95; 5; 5) = 5,05

В ходе проведенной валидации количественного определения основного вещества в субстанции треонилтреонина рассчитанные значения относительного стандартного отклонения (RSD) не превышали 1 %, что соответствует требованиям [18], предъявляемым к субстанциям и доказывает валидность методики.

Заключение. Проведена валидация количественного определения основного вещества в субстанции треонилтреонина методом неводного потенциометрического титрования. Полученные результаты свидетельствуют, что методика валидна и может быть рекомендована для подтверждения качества субстанции.

Список использованных источников

1. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design / A. C. Lee [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, no. 10. – P. E2383. <https://doi.org/10.3390/ijms20102383>
2. Хавинсон, В. Х. Лекарственные пептидные препараты: прошлое, настоящее, будущее / В. Х. Хавинсон // *Клиническая медицина.* – 2020. – Т. 98, № 3. – С. 165–177. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>
3. Khavinson, V. Kh. Morphofunctional Fundamentals for Peptide Regulation of Aging / V. Kh. Khavinson [et al.] // *Bio-logy Bulletin Reviews.* – 2011. – Vol. 1, N 4. – P. 389–393. <https://doi.org/10.1134/s2079086411040025>
4. Threonine metabolism in the intestine of mice: loss of mucin 2 induces the threonine catabolic pathway / M. Van der Sluis [et al.] // *J. Pediatric Gastroenterology Nutrition.* – 2009. – Vol. 49. – P. 99–107. <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e3181a23dbe>
5. Лекарственные средства на основе пептидов: применение, технологии получения [Электронный ресурс] / С. А. Бабина [и др.] // *Международ. студен. науч. вестник.* – 2019. – № 3. – Режим доступа: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19681>. – Дата доступа: 27.02.2021.
6. Фор, М. Аминокислоты для оптимального синтеза кишечного муцина (слизи) и защиты кишечника в здоровом и патологическом состояниях [Электронный ресурс] / М. Фор, Д. Брейе. – 2019. – Режим доступа: <https://www.proplan.ru/vet/zdorove/article/aminokisloty-dlya-optimalnogo-sinteza-kishechnogo-mucina-slizi-i-zaschity>. – Дата доступа: 27.02.2021.
7. Сорбция треонилтреонина и треонина ионообменными сорбентами / З. И. Куваева [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2016. – Т. 16, № 6. – С. 838–846.
8. Государственная фармакопея Республики Беларусь, ГФ РБ II; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. – Т. 1. – 1220 с.
9. Миронов, А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств / А. Н. Миронов. – М.: Гриф и К., 2013. – Т. II. – 280 с.
10. Алексеева, Г. М. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции / Г. М. Алексеева, В. Ф. Апраксин, Ю. Э. Генералова // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 66–71. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71>
11. Мархабуллина, Р. Ш. Валидация аналитической методики количественного определения субстанции 5,7-бис(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана методом потенциометрического титрования / Р. Ш. Мархабуллина, Л. М. Юсупова // *Эталон. Стандартные образцы.* – 2014. – № 4. – С. 30–35.
12. Разработка и валидация методики потенциометрического определения суммы дубильных веществ в траве зверобоя / А. И. Марахова [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* – 2014. – Т. 3, № 8. – С. 54–57.
13. Разработка и валидация методики потенциометрического определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» / Н. С. Скосырева [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* – 2016. – Т. 4, № 17. – С. 106–110.

14. Производство лекарственных средств: валидация методик испытаний: ТКП 432-2012 (02041). – Минск: Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 19 с.
15. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она методом потенциометрического титрования в неводной среде / Т. А. Гендугов [и др.] // Волгоград. науч.-мед. журн. – 2019. – № 4. – С. 39–42.
16. Исследование качества фармацевтических препаратов с использованием потенциометрического титратора / О. И. Юрченко [и др.] // Вісник Харків. нац. ун-ту. Серія: Хімія. – 2013. – № 1085, вип. 22. – С.231–239.
17. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола / П. В. Ткаченко [и др.] // Фармация Казахстана. – 2017. – № 8. – С. 13–16.
18. Фармакопея Евразийского экономического союза. – М.: Евразийская эконом. комиссия. – 2020. – Т. 1, ч. 1. – 584 с.

References

1. Lee A. C., Harris J. L., Khanna K. K., Hong J. H. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 10, pp. E2383. <https://doi.org/10.3390/ijms20102383>
2. Khavinson V. K. Peptide medicines: past, present, future. *Clinical Medicine (Russian Journal)*, 2020, vol. 98, no. 3, pp. 165–177 (in Russian). <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-3-165-177>
3. Khavinson V. Kh., Linkova N. S., Trofimov A. V., Polyakova V. O., Sevostyanova N. N., Kvetnoy I. M. Morphofunctional Fundamentals for Peptide Regulation of Aging. *Biology Bulletin Reviews*, 2011, vol. 1, no. 4, pp. 389–393. <https://doi.org/10.1134/s2079086411040025>
4. Van der Sluis M., Schaart M. W., de Koning B. A., Schierbeek H., Velcich A., Renes I. B., van Goudoever J. B. Threonine metabolism in the intestine of mice: loss of mucin 2 induces the threonine catabolic pathway. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 2009, vol. 49, pp. 99–107. <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e3181a23dbe>
5. Babina S. A., Zheltysheva A. Yu., Shuklin G. O., Shuklina A. A., Yaparov A. E. Medicines based on peptides: application, production technologies. *Mezhdunarodnyi studencheskii nauchnyi vestnik = European Student Scientific Journal*, 2019, no. 3. Available at: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19681> (accessed 27 February 2021) (in Russian).
6. Faure M., Breuillé D. *Amino acids for optimal synthesis of intestinal mucin (mucus) and intestinal protection in healthy and pathological conditions*. 2019. Available at: <https://www.proplan.ru/vet/zdorove/article/aminokisloty-dlya-optimalnogo-sinteza-kishechnogo-mucina-slizi-i-zaschity> (in Russian).
7. Kuvaeva Z. I., Karankevich E. G., Rudakovskaya E. B., Bulyga D. M. Sorption of threonylthreonine and threonine by ion exchange sorbents. *Zh. Sorbionnye i hromatograficheskie processy = Sorption and chromatography processes*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 838–846 (in Russian).
8. Sheryakova A. A. (ed.). *State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, SP RB II. Vol. 1*. Molodechno, Pobeda Publ., 2012. 1220 p. (in Russian).
9. Mironov A. N. *Guidelines for the examination of medicines. Vol. 2*. Moscow, Grif i K. Publ., 2013. 280 p. (in Russian).
10. Alekseeva G. M., Apraksin V. F., Generalova Yu. E. Exploring of acid-basic properties, development and validation of the method of quantitative determination of original pharmaceutical substance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 66–71 (in Russian). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-1-66-71>
11. Markhabullina R. Sh., Yusupova L. M. Validation of the analytical procedure of quantitative determination of 5,7-bis (meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan by potentiometric titration. *Etalony. Standartnye obraztsy = Measurement Standards. Reference Materials*, 2014, no. 4, pp. 30–35 (in Russian).
12. Marakhova A. I., Stanishevsky Ya. M., Potapov V. I., Sorokina A. A. Development and validation of a method for potentiometric determination of tannins in the herb of St. John's wort. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*, 2014, vol. 3, no. 8, pp. 54–57 (in Russian).
13. Skosyeva N. S., Malakhova N. A., Saraeva S. Yu., Melnikova O. A., Petrov A. Yu. *Development and validation of method for potentiometric determination of silver in pharmaceutical substance "Argamid"*. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*, 2016, no. 4, pp. 106–110 (in Russian).
14. ТКП-432-2012-02041 Technical Code of Common Practice. *Production of Medicines: Validation of Test Methods*. Minsk, Department of the pharmaceutical industry of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, 2012. 19 p. (in Russian).
15. Gendugov T. A., Glushko A. A., Ozerov A. A., Shcherbakova L. I. Development and validation of method of quantitative determination of substance 3-[2-oxo-2-(4-phenyl-1-piperazinyl)ethyl] quinazoline-4 (3H) -one by method of potentiometric titration in a non-aqueous medium. *Volgogradskii nauchno medicinskii zhurnal = Volgograd Journal of Medical Research*, 2019, no. 4, pp. 39–42 (in Russian).
16. Yurchenko O. I., Khasanova M. A., Dobriyan M. A., Chernozhuk T. V. Study of the quality of pharmaceuticals using a potentiometric titrator. *Visnik Kharkivskogonatsional'nogo universiteta. Seriya: Khimiya = Kharkov University Bulletin. Chemical Series*, 2013, no. 1085, iss. 22, pp. 231–239 (in Russian).
17. Tkachenko P. V., Kolesnik S. V., Zhuravel I. A., Zavada O. A., Derbisbekova U. B. *Development and validation of the method of quantitative determination of the substance of 4-(4-chlorophenyl) sulfo-3-ethylthio-5-aminopyrazole. Farmatsiya Kazakhstana [Pharmacy of Kazakhstan]*, 2017, no. 8, pp. 13–16 (in Russian).
18. *Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Vol. 1, part 1*. Moscow, Eurasian Economic Commission, 2020. 584 p. (in Russian).

Информация об авторах

Водопьянова Людмила Александровна – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Куваева Зоя Ивановна – д-р хим. наук, профессор, зав. отделом лекарственных веществ. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lie@ifoch.bas-net.by

Каранкевич Елена Григорьевна – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь); E-mail: extract@ifoch.bas-net.by

Корзюк Екатерина Борисовна – мл. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Liudmila A. Vodopyanova – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Zoya I. Kuvaeva – D. Sc. (Chemistry), Professor. Head of the Department. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lie@ifoch.bas-net.by

Elena G. Karankevich – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: extract@ifoch.bas-net.by

Ekaterina B. Korzyuk – Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).