

УДК 577.1.01

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЯ
«ОСТАТОЧНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ» В СУБСТАНЦИИ ГСБ-106**

**М.Е. Дуденкова, Л.Н. Грушевская, М.С. Сергеева, Л.М. Гаева,
Е.Д. Денисенко, С.В. Минаев, А.В. Тарасюк**

ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Разработана и валидирована методика идентификации и количественного определения остаточных органических растворителей в оригинальной субстанции, синтезированной в ФГБНУ «Национальный НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» – ГСБ-106, представляющей собой низкомолекулярный миметик на основе структуры четвертой петли BDNF. Использование метода газожидкостной хроматографии (ГЖХ) со статической паровфазной экстракцией и экспериментально подобранные условия хроматографирования позволили эффективно разделить хроматографические пики всех органических растворителей, используемых в процессе синтеза и очистки субстанции: метанола, пиридина, этанола и ледяной уксусной кислоты. Проведенная валидация методики доказала ее специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Ключевые слова: ГСБ-106, остаточные органические растворители, газожидкостная хроматография, паровфазная экстракция, валидация.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-46-50

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE TECHNIQUE DEFINITION
OF THE INDICATOR «RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS» IN SUBSTANCE GSB-106**

**M.E. Dudenkova, L.N. Grushevskaja, M.S. Sergeeva, L.M. Gaevaja,
E.D. Denisenko, S.V. Minaev, A.V. Tarasjuk**

FSBSI «National Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov»

The technique of identification and quantitative determination definition of residual organic solvents in the original substance synthesized in FSBSI «National Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov» on the basis of structure of the fourth loop of BDNF (GSB-106) is developed using method of gas-liquid chromatography (GLC) with static vapor-phase extraction. The developed conditions of analysis allowed to effectively divide chromatographic peaks of all organic solvents used in the course of synthesis and purification of substance at the last stages: methanol, pyridine, ethanol, acetic acid. The validation of the technique proved its specificity, linearity, correctness.

Key words: GSB-106, residual organic solvents, gas-liquid chromatography, vapor-phase extraction, validation.

Для внедрения субстанции в медицинскую практику в рамках доклинических испытаний необходимо доказательство ее чистоты. Одним из показателей контроля качества субстанции является содержание остаточных органических растворителей (ООР), которые могут влиять на фармакологическую активность лекарственного препарата. К ООР относят летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка и валидация методики определения содержания остаточных органических растворителей в субстанции ГСБ-106 методом газожидкостной хроматографии с учетом современных требований.

В ходе синтеза и выделения субстанции ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(N-

моносукцинил-L-серил-L-лизина) [4, 7] используют следующие растворители: метанол (второй класс токсичности, содержание не более 0,3 % / 3000 ppm), спирт этиловый (третий класс токсичности, содержание не более 0,5 % / 5000 ppm), пиридин (второй класс токсичности, содержание не более 0,02 % / 200 ppm).

Содержание в образце субстанции ледяной уксусной кислоты (ЛУК) должно быть обосновано производителем [5].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск и идентификация остаточных органических растворителей осуществлялись на газовом хроматографе Varian 450-GC с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером Varian PAL Autosampler.

Традиционным методом ввода пробы в газовой хроматографии является прямой ввод микрошприцем раствора в испаритель, но в данном исследовании этот способ имеет ряд недостатков. Большое количество воды может привести к разрушению (гидролизу) некоторых неподвижных жидких

фаз, содержащих полиэтиленгликоль [1]. Попадание в хроматографическую колонку нелетучего вещества субстанции может привести к блокированию активных центров неподвижных жидких фаз продуктами термического разложения.

Чтобы исключить перечисленные негативные факторы, для извлечения летучих остаточных растворителей был применен метод «анализа равновесного пара» (АРП), или «парофазный анализ» (ПФА), в зарубежной литературе получивший название Head-Space Analysis (HSA) [3]. Парофазный анализ в зависимости от условий применения различают на статический и динамический [2].

Нами был применен статический метод, заключающийся в термостатировании определенного количества раствора субстанции, содержащего остаточные летучие растворители в герметично закрытой вials. После установления фазового равновесия (20 мин), при котором часть летучего вещества переходила в газовую фазу, хроматографическим шприцом отбиралась часть газовой фазы и вводилась в испаритель хроматографа.

Валидация аналитической методики проводилась в соответствии с ГФ XIV и нормами руководства Международной конференции по гармонизации (ICH) Q2(R1) [6, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выбора оптимальных условий проведения анализа была изучена хроматографическая подвижность указанных выше растворителей, которые могут присутствовать в субстанции ГСБ-106. Выбор условий хроматографирования основывался на физико-химических свойствах анализируемых соединений.

В качестве растворителя был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), поскольку данный растворитель обладает высокой температурой кипения и крайне медленно испаряется при нормальном атмосферном давлении. Это делает его очень удобным растворителем для экстракции более летучих органических растворителей [8].

В качестве внутреннего стандарта был выбран бутанол-1, так как он схож по своему строению с другими определяемыми остаточными растворителями, присутствие которых наиболее вероятно в субстанции (метанол, этанол). На этапе разработки методики были исследованы модельные смеси органических растворителей и внутреннего стандарта (бутанол-1) с концентрациями, соответствующими нормам содержания ООР в субстанции [5].

Для извлечения анализируемых соединений из растворов 2 мл раствора модельной смеси помещали в хроматографическую вial объемом 15 мл и термостатировали. При выборе между различными режимами термостатирования образца было установлено, что необходимым условием достижения равновесного распределения анализируемых органических растворителей между жидкой и газовой фазами является выдерживание пробы при 80 °C в течение 20 минут.

Нами была проведена разработка условий хроматографирования, позволяющих эффективно разделить пики всех остаточных органических растворителей, присутствие которых возможно после завершающей стадии очистки субстанции ГСБ-106.

Наилучшего разделения всех веществ удалось добиться при использовании температурного градиента в следующих условиях: колонка капиллярная CP-WAX 52 CB, 50 м × 0,32 мм, 1,2 мкм (Agilent); скорость потока газа носителя (азота) 1,5 мл/мин; скорость потока водорода 30 мл/мин; скорость потока воздуха 300 мл/мин; температура инжектора 130 °C; температура детектора 190 °C; температура термостата в градиентном режиме (рис. 1); объем пробы 1000 мкл; внутренний стандарт бутанол-1; растворитель для проб ДМСО; время анализа 32 мин. Условия термостатирования пробы: температура 80 °C; время установления равновесия 20 мин.

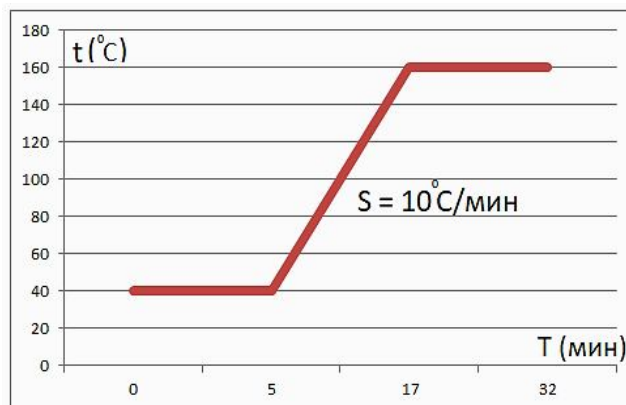


Рис. 1. Температурный градиент нагрева термостата

Разработанные условия обеспечивают четкое разделение хроматографических пиков всех анализируемых остаточных растворителей.

Времена удерживания анализируемых остаточных растворителей, параметры разделения, пределы обнаружения (ПО) и пределы количественного определения (ПКО) представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты оценки характеристик пиков определяемых ООР и их ПО и ПКО

Соединение	Метанол	Этанол	Бутанол-1	Пиридин	ЛУК
Время удерживания (RT), мин	9,80 ± 0,03	10,59 ± 0,04	14,64 ± 0,04	15,95 ± 0,04	20,23 ± 0,04
Относительное время удерживания (RTT)	0,670 ± 0,004	0,723 ± 0,006	1,0	1,089 ± 0,003	1,382 ± 0,005
Коэффициент асимметрии (As)	1,37 ± 0,01	1,31 ± 0,01	1,27 ± 0,01	2,35 ± 0,01	1,25 ± 0,01
Число теоретических тарелок (N)	123016 ± 345	162289 ± 237	925250 ± 547	492567,18 ± 326,00	655230 ± 231
Разрешение соседних пар (Rs)	-	2,05	23,24	16,94	46,17
ПО, мкг/мл *	0,914	0,668	0,738	0,664	10,18
ПКО, мкг/мл *	3,02	2,0	2,44	2,2	33,6

* Пределы обнаружения определены экспериментально по соотношению сигнал/шум (уровень шума ±30 мВ).

Типичная хроматограмма раствора модельной смеси органических растворителей представлена на рис. 2.

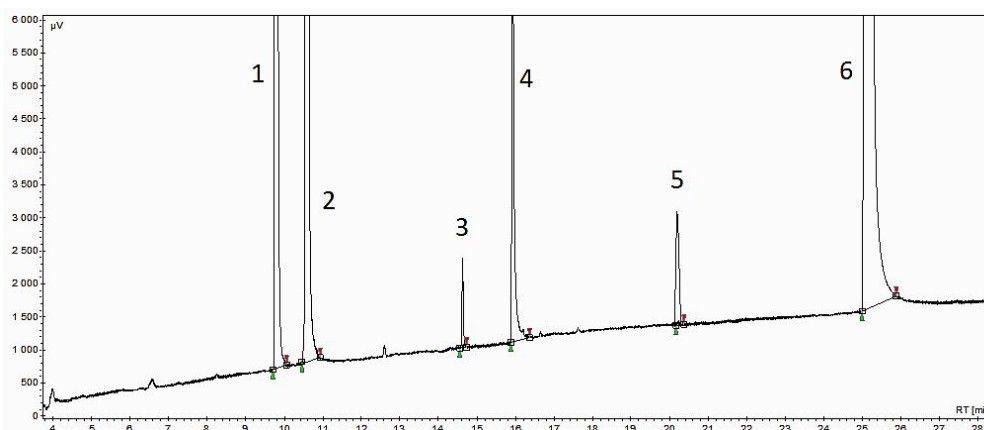


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси остаточных органических растворителей и внутреннего стандарта в предельно допустимых концентрациях: 1 – метанол, 0,3 мг/мл; 2 – этанол, 0,5 мг/мл; 3 – бутанол-1, 0,01 мг/мл; 4 – пиридин, 0,02 мг/мл; 5 – ЛУК, 5,0 мг/мл; 6 – ДМСО

Для установления линейности методики были приготовлены и проанализированы модельные смеси растворителей в диапазоне концентраций

от 0,0005 до 5,0 мг/мл. Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корреляции составил не менее 0,999 (рис. 3).

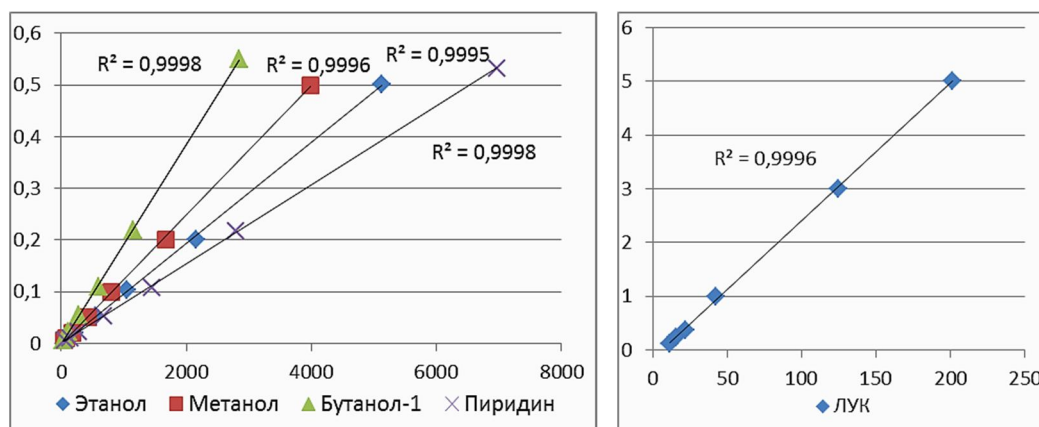


Рис. 3. Линейные регрессионные зависимости между концентрацией испытуемых соединений и площадью пика

Результаты оценки правильности и сходимости методики на модельных растворах остаточных растворителей представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты определения ООР в модельных растворах для оценки правильности и сходимости методики

Содержание в % от концентрации исп. раствора	Взято, г (m_1)	Найдено, г (m_2)	Абсолютная ошибка, А ($m_2 - m_1$)	Отн. ошибка $A \times 100/m_1$	Найдено, %	Метрологические характеристики
Метанол						
0,005	0,0065	0,0063	0,0002	3,08	96,92	$X_{ср} = 99,47$ $S = 1,43$ $RSD = 1,44 \%$ $\Delta X = 1,33$ $\varepsilon = 1,33 \%$ $t_{выч} = 1,12$ $t_{табл.} = 2,45$
0,01	0,0132	0,0134	-0,0002	1,52	101,52	
0,02	0,0269	0,0265	0,0004	1,49	98,51	
0,05	0,0657	0,0655	0,0002	0,31	99,70	
0,1	0,1013	0,1009	0,0004	0,39	99,61	
0,15	0,1507	0,151	-0,0003	0,21	100,20	
0,2	0,2013	0,2009	0,0004	0,21	99,80	
Этанол						
0,01	0,0103	0,0104	-0,0001	0,97	100,97	$X_{ср} = 99,76$ $S = 1,06$ $RSD = 1,06 \%$ $\Delta X = 0,92$ $\varepsilon = 0,92 \%$ $t_{выч} = 1,53$ $t_{табл.} = 2,45$
0,02	0,0206	0,0201	0,0005	2,43	97,57	
0,05	0,0525	0,0522	0,0003	0,57	99,43	
0,1	0,1032	0,1028	0,0004	0,39	99,61	
0,15	0,1514	0,1517	-0,0003	0,20	100,20	
0,2	0,2021	0,2019	0,0002	0,10	99,90	
0,5	0,5012	0,5018	-0,0006	0,10	100,1	
Пиридин						
0,005	0,0053	0,0054	-0,0001	1,89	101,89	$X_{ср} = 99,76$ $S = 1,42$ $RSD = 1,42 \%$ $\Delta X = 1,32$ $\varepsilon = 1,32 \%$ $t_{выч} = 1,13$ $t_{табл.} = 2,45$
0,01	0,0107	0,0104	0,0003	2,80	97,20	
0,02	0,0217	0,0215	0,0002	0,92	99,08	
0,05	0,0535	0,0537	-0,0002	0,37	100,37	
0,1	0,1071	0,1068	0,0003	0,28	99,72	
0,15	0,1526	0,1525	0,0001	0,07	99,93	
0,2	0,2003	0,2005	-0,0002	0,10	100,10	
Ледяная уксусная кислота						
0,1	0,1153	0,1147	0,0006	0,520382	99,45	$X_{ср} = 99,95$ $S = 0,27$ $RSD = 0,27 \%$ $\Delta X = 0,25$ $\varepsilon = 0,25 \%$ $t_{выч} = 2,21$ $t_{табл.} = 2,45$
0,2	0,2304	0,2313	-0,0009	-0,39063	100,39	
0,37	0,3711	0,3709	0,0002	0,053894	99,95	
0,5	0,5008	0,5004	0,0004	0,079872	99,92	
1,0	1,0002	0,9993	0,0009	0,089982	99,91	
2,0	2,0341	2,0338	0,0003	0,014749	99,99	
3,0	3,0012	3,0017	-0,0005	-0,01666	100,02	

Критерием приемлемости при определении правильности методики определения остаточных органических растворителей являются величина относительной ошибки среднего результата и отсутствие значимой систематической ошибки.

Численные значения коэффициента нормированных отклонений t (коэффициент Стьюдента), рассчитанные по результатам анализа, составили не более 2,2. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95%-й доверительной вероятности и степени свободы $f = 6$ равно 2,45, то есть соблюдается неравенство $t_{выч} < t_{табл.}$ (95 %, 6).

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, относительная ошибка среднего результата для всех примесей не превышает 5,0 %, что приемлемо.

Эти данные позволяют считать, что результаты, полученные с помощью разработанной методики определения остаточных органических растворителей в субстанции ГСБ-106 методом ГЖХ, являются правильными и неотягощены систематической ошибкой.

Нами была оценена прецизионность (сходимость) методики. Сходимость оценивали при выполнении анализа в одной лаборатории одним аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня.

Относительные стандартные отклонения (RSD) для всех обнаруженных ООР не превышали 2,0 %, что свидетельствует об удовлетворительной прецизионности методики [6].

Для проверки пригодности хроматографической системы было предложено готовить раствор всех определяемых ООР в предельно допустимых концентрациях. Проверка пригодности проводится по следующим параметрам: эффективность хроматографической колонки, выраженная числом теоретических тарелок (N), фактор асимметрии пика бутанола (As), величина относительного стандартного отклонения площади пика (RSD), а также по разрешению (Rs) между соседними парами пиков.

На основании полученных результатов были установлены следующие критерии приемлемости:

числом теоретических тарелок (N) для пика бутанола не менее 900000; фактор асимметрии пика бутанола (A_s) не более 1,5; величина относительного стандартного отклонения площади пика бутанола (RSD) не более 2,0 %; разрешение пиков метанола и этанола $2,0 \pm 0,05$.

С помощью разработанной методики был проведен анализ образца субстанции ГСБ-106. Для приготовления испытуемого раствора 0,2 г субстанции ГСБ-106 (точная навеска) помещали в хроматографическую вials объемом 15 мл, добавляли 2 мл раствора В (внутреннего стандарта – раствора бутанола-1 с концентрацией 0,01 мг/мл).

Для приготовления раствора внутреннего стандарта около 0,01 г бутанола-1 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, содержащую заранее отмеренные 5 мл ДМСО. Доводили объем раствора ДМСО до метки (Раствор А).

Затем 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора ДМСО до метки и тщательно перемешивали. Концентрация 0,01 мг/мл (Раствор В).

Для приготовления стандартного раствора около 0,03 г метанола, 0,05 г этанола, 0,002 г пиридина, 5,0 г ледяной уксусной кислоты (точные навески) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую заранее отмеренные 50 мл ДМСО, далее добавляют 1 мл раствора А. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Тщательно перемешивают.

В экспериментальном образце субстанции ГСБ-106 нами были обнаружены и количественно определены такие остаточные органические растворители, как: метанол – не более 0,11 %, этиловый спирт – не более 10,1 %, пиридин – не более 0,01 % и ледяная уксусная кислота – не более 3,2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения ООР в субстанции ГСБ-106 с помощью метода ГЖХ с применением парофазного анализа. Разработанная методика позволяет обнаружить все органические растворители, используемые в ходе синтеза и очистки субстанции: метанол, этанол, пиридин и ЛУК при их совместном присутствии.

Доказана линейность зависимости площадей пиков всех изученных растворителей от их концентрации в пробе в диапазоне применения методики, определены их пределы обнаружения и количественного определения. Показано отсутствие систематической ошибки методики на модельных смесях.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о специфичности, линейности,

правильности и прецизионности (сходимости) разработанной методики, что позволяет рекомендовать ее для включения в проект НД на субстанцию ГСБ-106.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вигдергауз М.С. Расчеты в газовой хроматографии. – М.: Химия, 1978. – С. 246.
2. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Введение в газовую хроматографию. – М.: Химия, 1990. – С. 344.
3. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Курс газовой хроматографии. – М.: Химия, 1974. – С. 376.
4. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // *Биоорг. химия*. – 2012. – Т. 38, № 3. – С. 280–290.
5. ОФС 1.1.0008.15 Остаточные органические растворители // *ГФ XIV*. – Т. 1. – С. 203.
6. ОФС 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // *ГФ XIV*. – Т. 1. – С. 276.
7. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106 // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5, № 4 (19). – С. 116–120.
8. Bordwell F.G., Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution // *Acc. Chem. Res.* – 1988. – P. 21.
9. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) // ICH Harmonized Tripartite Guideline. – 2005.

REFERENCES

1. Vigdergauz M.S. Raschety v gazovoj hromatografii [Calculations in gas chromatography]. Moscow: Himija, 1978. P. 246.
2. Gol'bert K.A., Vigdergauz M.S. Vvedenie v gazovuyu hromatografiju [Introduction to gas chromatography]. Moscow: Himija, 1990. P. 344.
3. Gol'bert K.A., Vigdergauz M.C. Kurs gazovoj hromatografii [Gas chromatography course]. Moscow: Himija, 1974. P. 376.
4. Gudasheva T.A., Tarasjuk A.V., Pomogajbo S.V. i dr. Dizajn i sintez dipeptidnyh mimetikov mozgovogo nejrotroficheskogo faktora [Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain neurotrophic factor]. *Bioorgan. himija* [Bioorgan. chemistry], 2012, Vol. 38, no. 3, pp. 280–290. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. OFS 1.1.0008.15 Ostatochnye organicheskie rastvoriteli [Residual organic solvents]. *GF XIV*, Vol. 1, p. 203.
6. OFS 1.1.0012.15. Validacija analiticheskikh metodik [Validation of analytical methods]. *GF XIV*, Vol. 1, p. 276.
7. Seredenin S.B., Voronina T.A., Gudasheva T.A. i dr. Antidepressivnyj jeffekt original'nogo nizkomolekuljarnogo mimetika BDNF, dimernogo dipeptida GSB-106 [Antidepressant effect of the original low molecular weight BDNF mimetic, GSB-106 dimeric dipeptide]. *Acta Naturae*, 2013, Vol. 5, no. 4 (19), pp. 116–120.
8. Bordwell F.G., Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Acc. Chem. Res.*, 1988, p. 21.
9. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005.

Контактная информация

Дуденкова Мария Евгеньевна – к. ф. н., старший научный сотрудник опытно-технологического отдела ФГБНУ «Национальный НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», e-mail: otopharm@mail.ru