

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В НОВОМ КАРДИОПРОТЕКТОРНОМ СОЕДИНЕНИИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

## Е.В. Компанцева

д. фарм.н., профессор, кафедра фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия)

## Д.Н. Луценко

аспирант, кафедра фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: lucenkodasha95@mail.ru

## М.В. Ларский

к. фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия)

**Актуальность.** Газовая хроматография – метод, позволяющий быстро и точно провести качественный и количественный анализ компонентов различных смесей, а также разделить их на составные части. Этот метод широко используется в различных отраслях промышленности, в том числе и фармацевтической.

**Цель исследования.** Разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей в субстанции биологически активного соединения (БАС) N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15) методом газовой хроматографии.

**Материал и методы.** Объект исследования – лабораторные образцы БАС VMA-13-15 (серия 2017, 2018 и 2019), а также стандартные образцы метанола (ГСО 8461-2003) и диэтилового эфира (ОСТ-84-2006-88) квалификации х.ч. Определение остаточных органических растворителей проводили методом газовой хроматографии на приборе «Кристалл-2000М».

**Результаты.** Разработана методика определения остаточных органических растворителей в субстанции БАС N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии. Методика валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

**Выводы.** Методика определения остаточных органических растворителей N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации.

**Ключевые слова:** БАС, газовая хроматография, валидация.

**Для цитирования:** Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Ларский М.В. Определение остаточных органических растворителей в новом кардиопротекторном соединении методом газовой хроматографии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(10):52–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-07>

Перспективным направлением в лечении ишемической болезни сердца является создание кардиопротекторных препаратов, повышающих устойчивость кардиомиоцитов к ишемии. С этой целью на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета было синтезировано биологически активное соединение (БАС), производное хиназолина N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) [1].

Изучение схемы синтеза исследуемого БАС показало использование при его получении и перекристаллизации таких органических растворителей, как метанол и диэтиловый эфир [2]. Не-

смотря на то, что БАС подвергается тщательной очистке, на конечной стадии в нем могут обнаруживаться минимальные количества указанных растворителей. Поэтому актуальной является разработка методики идентификации и количественного определения возможных примесей остаточных органических растворителей.

Согласно требованиям ОФС.1.1.0008.15, остаточные органические растворители распределены на три класса по предельно допустимому содержанию в лекарственных средствах и степени их возможного влияния на здоровье человека. Метанол относится ко второму классу токсичности с предельным содержанием 0,3%. Согласно фарма-

копейной статье, диэтиловый эфир относится к третьему классу токсичности, его содержание не должно превышать 0,5% [3].

Цель исследования – разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей в субстанции БАС N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Определение остаточных органических растворителей проводили методом газовой хроматографии на приборе «Кристалл-2000М» (зав. номер 6596), используя следующие условия хроматографирования: колонка насадочная – ZB-FFAP, 50 м × 0,32 мм × 0,5 нм; газ носитель – азот о.с.ч. 99,996%; скорость потока – 10 мин; объем вводимой пробы – 1 мкл; температура колонки – 160 °С; температура испарителя – 180 °С; температура детектора – 220 °С; давление газа – 65 кПа; длина колонки – 50 м; диаметр колонки – 0,32 мм.

Объектом исследования служили лабораторные образцы БАС VMA-13-15 (серия 2017, 2018, 2019), а также стандартные образцы (СО) метанола (ГСО 8461-2003) и диэтиловый эфир (ОСТ-84-2006-88) квалификации ч.д.а. Для взвешивания навесок для анализа использовали весы аналитические «ЛВ 210-А» (ООО «Сартогосм», Россия).

**Предлагаемая методика.** Субстанцию БАС в количестве 0,500 г (точная навеска) растворяли в мерной колбе вместимостью 10 мл в 5 мл воды

очищенной, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали. Свежеприготовленный раствор объемом 1 мкл вводили в хроматографическую колонку и проводили анализ в условиях, указанных выше.

Содержание остаточных растворителей в БАС рассчитывали по формуле

$$C\% = \frac{S_x \cdot C_{ст} \cdot 100 \cdot 100}{S_{ст} \cdot a \cdot 1000},$$

где  $C_{ст}$  – количество СО в 1 мл стандартного раствора, мг;  $a$  – навеска БАС, г;  $S_x$  – площадь пика исследуемого вещества;  $S_{ст}$  – площадь пика стандартного образца.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественного определения остаточного содержания метанола и диэтилового эфира логично в качестве растворителя использовать воду очищенную, так как растворимость БАС в воде составляет 1:30 [4], диэтиловый эфир мало растворим в воде, а метанол смешивается с водой во всех соотношениях.

Для подтверждения *специфичности* методики определяли влияние растворителя на разделение пиков диэтилового эфира и метанола (рис. 1). С этой целью вводили в хроматографическую колонку пробы водного раствора модельной смеси, содержащий по 50 мг/мл стандартных образцов диэтилового эфира (ОСТ-84-2006-88) и метанола (ГСО 8461-2003).

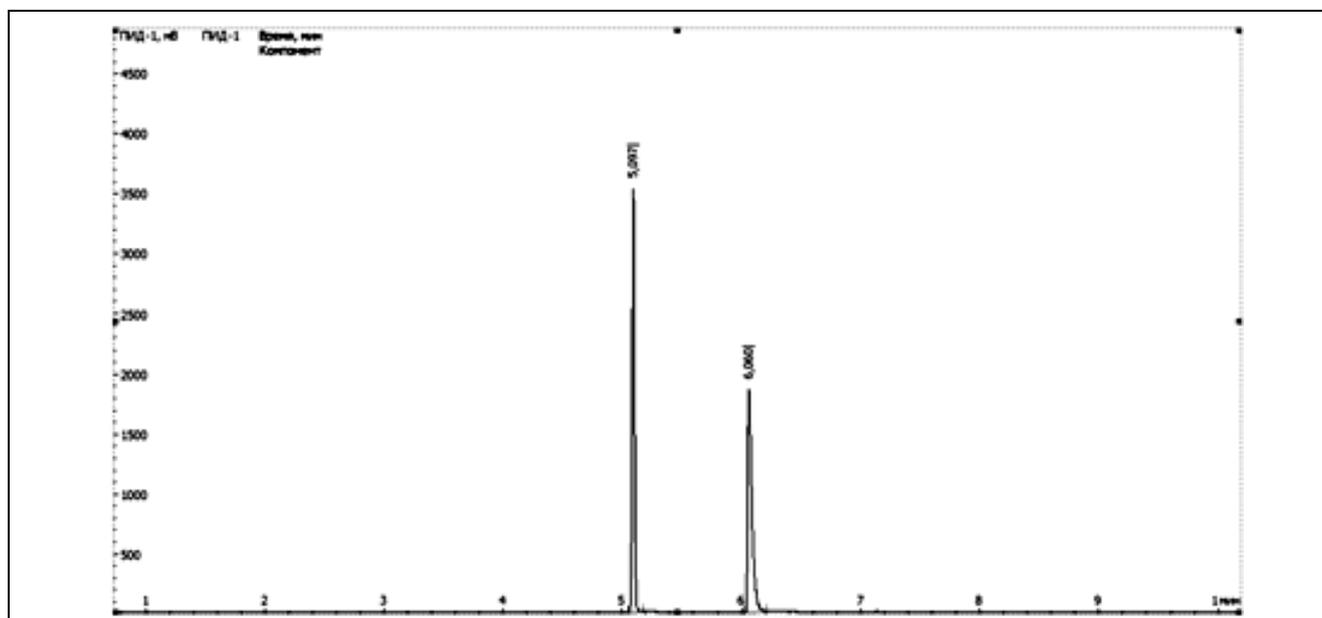


Рис 1. Хроматограмма модельной смеси диэтилового эфира и метанола в воде очищенной

На хроматограмме наблюдали полное разделение пиков метанола и диэтилового эфира (время выхода метанола – 6,060 мин, пика диэтилового эфира – 5,097 мин) (рис. 1), что является доказательством специфичности методики и подтверждает возможность определения указанных соединений при совместном присутствии в анализируемом образце.

Для определения *линейности* [5] методики, готовили в воде для жидкостной хроматографии растворы СО метанола и диэтилового эфира х.ч. с концентрацией каждого 10,0 мг/мл. Из полученных растворов методом разведения водой для жидкостной хроматографии готовили градуировочные растворы, разбавляя от 0,10 до 0,35 мг/мл соответствующего раствора водой для жидкостной хроматографии. При построении градуировочных графиков зависимости площади пика от концентрации стандартные растворы диэтилового эфира содержали от 0,2 до 1,2%, метанола – от 0,2 до 0,7%.

В хроматографическую колонку вводили по 1 мкл каждого раствора из приготовленной серии разведений. Раствор каждой градуировочной концентрации хроматографировали не менее трех раз. Рассчитывали средние значения площадей пиков и строили график зависимости аналитического сигнала площади пика от концентрации раствора.

Установлена линейная зависимость площади пика от концентраций метанола и диэтилового эфира (рис. 2; табл. 1 и 2).

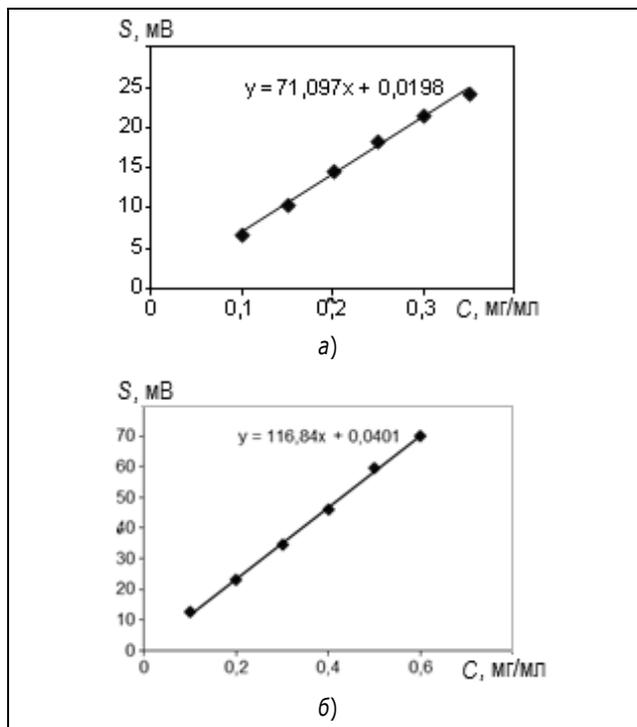


Рис 2. График зависимости площади пика от концентраций метанола (а) и диэтилового эфира (б)

Таблица 1. Результаты определения зависимости площади пиков от концентрации метанола

Концентрация метанола, мг/мл	Количество примеси, %	Площадь пика, мВ	Параметры линейной зависимости
0,10	0,2	6,838	$b = 71,097$ $S_b = 2,033$ $\Delta b = 5,646$ $a = 0,0198$ $S_a = 0,4314$ $\Delta a = 1,197$ $r = 0,9987$
0,15	0,3	10,408	
0,20	0,4	14,615	
0,25	0,5	18,421	
0,30	0,6	21,531	
0,35	0,7	24,287	

Таблица 2. Результаты определения зависимости площади пиков от концентрации диэтилового эфира

Концентрация диэтилового эфира, мг/мл	Количество примеси, %	Площадь пика, мВ	Параметры линейной зависимости
0,1	0,2	12,526	$b = 116,84$ $S_b = 3,147$ $\Delta b = 8,738$ $a = 0,040$ $S_a = 1,043$ $\Delta a = 2,898$ $r = 0,9997$
0,2	0,4	22,951	
0,3	0,6	34,484	
0,4	0,8	46,041	
0,5	1,0	58,566	
0,6	1,2	69,032	

**Правильность** [6] методики оценивали с помощью параметров линейной зависимости, в частности, по значению свободного члена уравнения. Приведенные результаты (табл. 1 и 2) показывают, что для метанола свободный член уравнения (а)  $0,0198 \pm 1,197$ , для диэтилового эфира –  $0,040 \pm 2,898$ . Так как свободный член уравнения (а) меньше его доверительного интервала ( $a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times S_a$ ), это свидетельствует об отсутствии систематической погрешности методики.

Линейную зависимость результатов ( $r \geq 0,99$ ) также подтверждают рассчитанные значения коэффициентов корреляции ( $r$ ) градуировочных графиков: для метанола –  $0,9987$ , для диэтилового эфира –  $0,9997$ . Таким образом, методика валидирована по показателям правильность и линейность.

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) рассчитывали, используя параметры линейной зависимости:  $ПО = 3,3S_a/b$  и  $ПКО = 10S_a/b$ . Для метанола полученные

данные составили  $ПО = 0,020$  мг/мл,  $ПКО = 0,060$  мг/мл и диэтилового эфира  $ПО = 0,029$  мг/мл,  $ПКО = 0,089$  мг/мл. Таким образом, при рабочей концентрации раствора VMA-13-15 5% возможно обнаружение примеси метанола в концентрации от  $0,060$  мг/мл и диэтилового эфира –  $0,089$  мг/мл.

Для определения **прецизионности** [7] методики использовали модельные смеси БАС с добавлением СО диэтилового эфира и метанола на трех уровнях по девяти точкам.

Как следует из данных табл. 3 и 4, методика валидна по параметру прецизионности, так как относительная погрешность (RSD) не превышает 3% при определении каждого из растворителей.

Разработанная методика обнаружения остаточных растворителей апробирована на VMA 13-15 (серия 2018). На хроматограммах анализируемых образцов (рис. 3 и 4) выявлены пики, соответствующие по времени удерживания пикам метанола и диэтилового эфира СО (рис. 1).

**Таблица 3. Результаты определения прецизионности (сходимости) методики определения метанола в модельных смесях**

Уровень	Взято метанола, мг/мл	Площадь пика, мВ	Найдено метанола, мг/мл	Найдено метанола, %	Метрологические характеристики
1	0,1000	6,851	0,0984	98,40	$x_{cp} = 101,84$ $S = 3,23$ $S_x = 1,07$ $\Delta x = 2,54$ $\varepsilon = 2,49\%$ $RSD = 1,05\%$
		6,799	0,0976	97,60	
		6,864	0,0986	98,60	
2	0,2000	14,362	0,2062	103,1	
		14,620	0,2099	104,95	
		14,592	0,2095	104,75	
3	0,3000	21,930	0,3149	104,96	
		21,880	0,3142	104,73	
		20,784	0,2985	99,50	
$S_{ct} = 13,925, C_{ct} = 0,2000$					

**Таблица 4. Результаты определения прецизионности (сходимости) методики определения диэтилового эфира (ДЭ) в модельных смесях**

Уровень	Взято ДЭ, мг/мл	Площадь пика, мВ	Найдено ДЭ, мг/мл	Найдено ДЭ, %	Метрологические характеристики
1	0,2000	22,922	0,1974	98,70	$x_{cp} = 99,37$ $S = 0,84$ $S_x = 0,279$ $\Delta x = 0,65$ $\varepsilon = 0,66\%$ $RSD = 0,27\%$
		22,978	0,1978	98,90	
		22,953	0,1976	98,80	
2	0,3000	34,583	0,2977	99,23	
		34,520	0,2972	99,06	
		34,349	0,2957	98,56	
3	0,4000	46,526	0,4006	100,15	
		46,402	0,3995	99,87	
		46,923	0,4040	101,10	
$S_{ct} = 34,840, C_{ct} = 0,3000$					

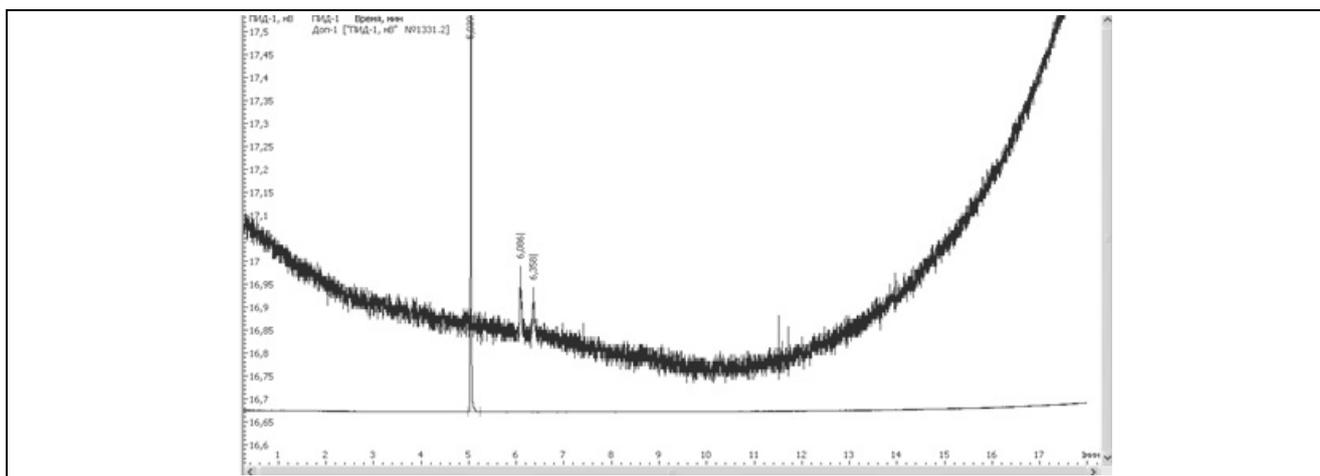


Рис 3. Хроматограммы раствора БАС и 0,1%-ного раствора диэтилового эфира

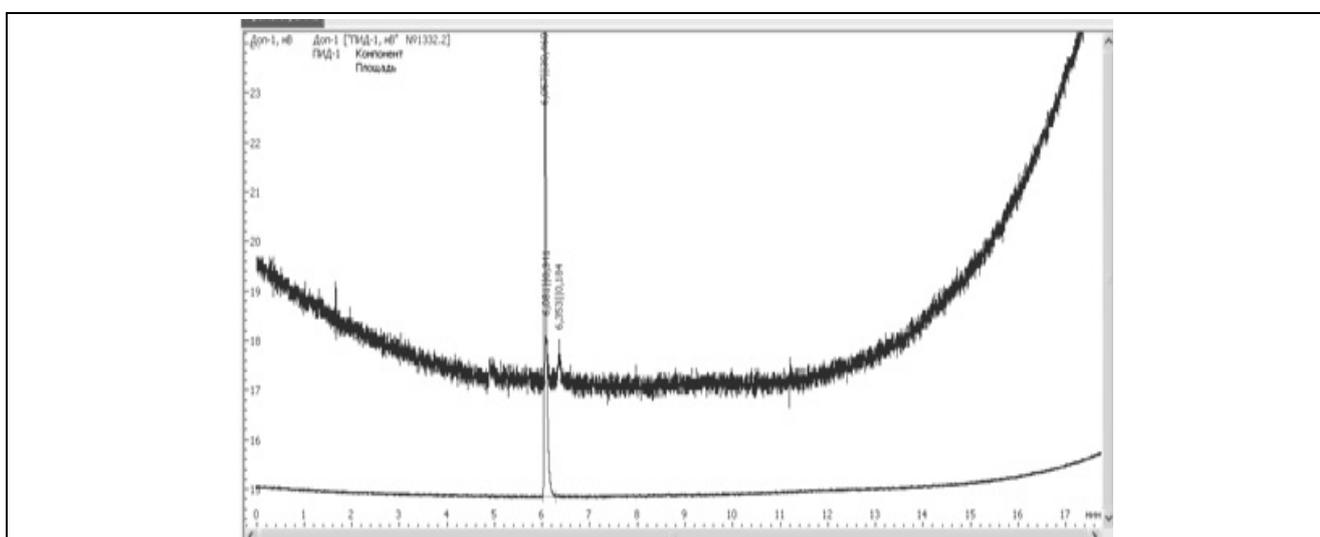


Рис. 4. Хроматограммы раствора БАС и 0,1%-ного раствора метанола

Таблица 5. Результаты статистической обработки времени удерживания метанола и диэтилового эфира при их определении в VMA 13-15

Метанол		Диэтиловый эфир	
$t_{уд.}$	Метрологические характеристики	$t_{уд.}$	Метрологические характеристики
6,057	$x_{ср} = 6,074$ $S = 0,015$ $S_x = 0,005$ $\Delta x = 0,012$ $\varepsilon = 0,20\%$	5,035	$x_{ср} = 5,061$ $S = 0,022$ $S_x = 0,007$ $\Delta x = 0,017$ $\varepsilon = 0,33\%$
6,100		5,039	
6,047		5,035	
6,079		5,093	
6,077		5,078	
6,086		5,087	

Наложение хроматограмм серийного образца БАС и модельных смесей искомых остаточных растворителей показало, что пики СО метанола и диэтилового эфира полностью совпадают по времени

удерживания с аналогичными пиками серийного образца БАС. В случае лабораторного образца БАС это подтверждает присутствие в нем метанола и диэтилового эфира в следовых количествах.

Полученные значения рассчитанных с помощью уравнений градуировочных графиков (см. рис. 2), количеств метанола (0,0041 мг/мл) и диэтилового эфира (0,0007 мг/мл) (см. рис. 3 и 4), оказались ниже рассчитанных результатов ПКО, что говорит о наличии лишь следовых количеств остаточных растворителей в БАС.

Результаты определения следовых количеств метанола и диэтилового эфира статистически обработаны по времени удерживания. Полученные данные представлены в табл. 5.

Из табл. 5 следует, что относительная погрешность определения времени удерживания пиков находится в пределах 0,2% для метанола и 0,33% – для диэтилового эфира. Эти значения подтверждают возможность обнаруживать наличие следовых количеств обоих искомым остаточных растворителей с достаточной точностью и могут служить критерием для подтверждения чистоты БАС.

## ВЫВОДЫ

Разработана методика определения остаточных органических растворителей в биологически активном соединении N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии. Методика валидна по показателям: специ-

фичность, линейность, правильность и прецизионность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Патент № 2622638 (РФ). Производные хиназолин-4(3H)-она, обладающие нейро- и кардиопротекторной активностью / В.И. Петров, И.Н. Тюренков, А.А. Озеров, М.С. Новиков и др. 2016129010 заявл., 14.07.2016; опубл. 19.06.17. Бюл. № 17.
2. Глухова Е.Г. Синтез и фармакологические свойства новых карбонильных производных хиназолин-4(3H)-она: Автореф. дисс. ... канд. фарм. наук: 14.04.12. Волгоград: Волг. мед. университет. 2016; 120 с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XIV. М.: МЗ РФ, 2018. Т. 1. [Электронный ресурс].
4. Луценко Д.Н., Компанцева Е.В. Изучение физико-химических свойств субстанции нового биологически активного соединения хиназолин-4(3H)-она. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сб. науч. трудов. 2018; 24–27.
5. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XIII. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/felm>.
6. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994; 268 с.
7. Daksh S., et al. Validation of analytical methods – Strategies & Singficance. Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci. April-May 2015; 4(3): 489–1497.

Поступила после доработки 28 июля 2021 г.

## DETERMINATION OF RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS IN A NEW CARDIOPROTECTIVE COMPOUND BY GAS CHROMATOGRAPHY

© Authors, 2021

### E.V. Kompantseva

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)

### D.N. Lutsenko

Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)

E-mail: [lucenkodasha95@mail.ru](mailto:lucenkodasha95@mail.ru)

### M.V. Larsky

Ph.D.(Pharm.), Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Pyatigorsk, Russia)

**Relevance.** Gas chromatography – a method that allows you to quickly and accurately conduct a qualitative and quantitative analysis of the components of various mixtures, as well as divide them into their component parts – is widely used in various industries, including pharmaceutical.

**The purpose** of this study was to develop and validate a method for determining residual organic solvents in the substance of the biologically active compound (BAS) N-[2-[4-oxo-3(4h)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine (VMA-13-15) by gas chromatography.

**Material and methods.** The objects of the study were laboratory samples of BAS VMA-13-15 (series 2017, 2018 and 2019), as well as CO methanol (GSO 8461-2003) and diethyl ether (OST-84-2006-88) qualifications of the hc.

**Results.** A method for the determination of residual organic solvents in the BAS substance N-[2-[4-oxo-3(4h)-quinazoliny]propionyl]-guanidine by gas chromatography has been developed. The method was validated according to the following indicators: specificity, linearity, correctness and precision.

**Conclusions.** The method for determining the residual organic solvents of N-[2-[4-oxo-3(4h)-quinazoline]propionyl]-guanidine can be recommended for inclusion in the draft regulatory documentation.

**Key words:** BAS, gas chromatography, validation.

**For citation:** Kompantseva E.V., Lutsenko D.N., Larsky M.V. Determination of residual organic solvents in a new cardioprotective compound by gas chromatography. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(10):52–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-07>

## REFERENCES

1. Patent № 2622638 (RF). Proizvodnye hinazolin-4(3n)-ona, obladajushhie nejro- i kardioprotektojnogo aktivno-st'ju / V.I. Petrov, I.N. Tjurenkov, A.A. Ozerov, M.S. Novikov i dr. 2016129010 zajavl., 14.07.2016; opubl. 19.06.17. Bjul. № 17.
2. Gluhova E.G. Sintez i farmakologicheskie svojstva novyh karbonil'nyh proizvodnyh hinazolin-4(3N)-ona: Avtoref. diss. ... kand. farm. nauk: 14.04.12. Volgograd: Volg. med. universitet. 2016; 120 s.
3. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XIV. M.: MZ RF, 2018. T. 1. [Jelektronnyj resurs].
4. Lucenko D.N., Kompanceva E.V. Izuchenie fiziko-himi-cheskih svojstv substancij novogo biologicheski aktivnogo soedinenija hinazolin-4(3N)-ona. Razrabotka, is-sledovanie i marketing novoj farmaceuticheskoj pro-dukcii. Sb. nauch. trudov. 2018; 24-27.
5. Obshhaja farmakopejnaja stat'ja 1.1.0012.15. Validacija analiticheskikh metodik. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. VIII. T. I. M.; 2015. Avaitab-lefrom: <http://femb.ru/felm>.
6. Derffel' K. Statistika v analiticheskoj himii. M.: Mir, 1994; 268 s.
7. Daksh S., et al. Validation of analytical methods - Strategies & Singificance. Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci. April-May 2015; 4(3): 489-1497.



## Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

**Алпизарин** (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh).

По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

**Аммифурин** (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

**Анмарин** (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифунгальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

**Гипорамин** (таблетки, мазь, суппозитории, лиофилизат), рег. №№ 98/305/1; 98/305/10; 98/305/12 – противовирусное средство, получаемое из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.)

**Глицирам** (таблетки, гранулы), рег. №№ 76/252/7; 70/730/48; 88/542/3 – оказывает противовоспалительное стимулирующее действие на кору надпочечников, умеренно отхаркивающее средство, получаемое из корней и корневищ солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru