

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>
УДК 615.072



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ

Р. А. Бубенчиков¹, Е. И. Саканян¹, Н. В. Зубкова¹, В. П. Добрынин¹, С. В. Горяинов²✉, Ф. Хажжар², Е. А. Платонов², Д. И. Писарев², Р. А. Абрамович²

¹ АО «НПО «Микроген», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский пер, д.10

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ Контактное лицо: Горяинов Сергей Владимирович. E-mail: goryainovs@list.ru

ORCID: Р. А. Бубенчиков – <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>; Е. И. Саканян – <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>; Н. В. Зубкова – <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>; В. П. Добрынин – <https://orcid.org/0000-0003-2487-8152>; С. В. Горяинов – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Ф. Хажжар – <https://orcid.org/0000-0001-8819-9349>; Е. А. Платонов – <https://orcid.org/0000-0002-6625-6653>; Д. И. Писарев – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Статья поступила: 23.08.2021

Статья принята в печать: 04.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. В последние десятилетия мировая фармакопейная практика уделяет особое внимание чистоте лекарственных средств. Определен перечень возможных примесей, присутствие которых в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах допустимо в установленных пределах, гарантирующих отсутствие токсического действия на организм человека при их приеме. Существуют примеси родственные, технологические и др. К числу технологических примесей относят, в том числе остаточные количества органических растворителей, используемых в технологии получения как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов. В рамках гармонизации требований национальной фармакопеи, фармакопеи ЕАЭС и ведущих зарубежных фармакопей в отечественную фармакопейную практику введен такой обязательный показатель качества, как содержание остаточных органических растворителей, в случае использования последних в технологическом процессе. В действующей ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» указаны общие принципы определения этого показателя качества и нормативные требования к содержанию этих растворителей в зависимости от класса токсичности. При производстве препаратов аллергенов в ряде случаев, в частности при работе с пыльцевыми аллергенами, в технологическом процессе используются органические растворители третьего класса токсичности: диэтиловый эфир и ацетон, предельное содержание которых составляет до 0,5 % (5000 ppm). При этом в производственном процессе препаратов аллергенов для обезжиривания и очистки могут использоваться как диэтиловый эфир или ацетон, так и оба растворителя одновременно, поэтому для их определения целесообразна разработка и использование унифицированной методики, ориентированной на применение при оценке качества конкретного лекарственного препарата аллергена.

Цель. Целью исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов.

Материалы и методы. Исследования проведены методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором с инжектированием исследуемых образцов с помощью автосэмплера на капиллярной кварцевой колонке Zebtron ZB-624 (G43, 6 % цианопропилфенил / 94 % диметилполисилоксан).

Результаты и обсуждение. Подобраны условия хроматографического разделения ацетона и диэтилового эфира на капиллярной кварцевой колонке. Определены параметры пригодности хроматографической системы. Проведена валидация разработанной методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность и прецизионность на уровне повторяемости и внутривлабораторной прецизионности. Определено содержание ацетона и диэтилового эфира в 26 препаратах аллергенов. Результаты количественного определения диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов, в технологическом процессе которых используются ООР, находятся в диапазоне 0,0053–0,0524 % для диэтилового эфира и 0,0029–0,0994 % для ацетона. Таким образом, содержание диэтилового эфира и ацетона во всех исследованных препаратах аллергенов было ниже установленной нормы (менее 0,5 %).

Заключение. Разработана аналитическая методика определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов с помощью метода ГЖХ, методика валидирована по характеристикам, отвечающим требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ препаратов аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание диэтилового эфира и ацетона составляет не более 0,5 %, что отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Следовательно, использование данной методики позволяет существенно повысить качество лекарственных препаратов аллергенов, в технологии получения которых используются органические растворители, так как контроль содержания их остаточных количеств гарантирует безопасность применения этих препаратов и их соответствие требованиям международных стандартов.

Ключевые слова: препараты аллергенов, остаточные органические растворители, газо-жидкостная хроматография, валидация

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

Вклад авторов. Р. А. Бубенчиков, Е. И. Саканян, Н. В. Зубкова, В. П. Добрынин, Ф. Хажжар, Е. А. Платонов., Д. И. Писарев – проведение эксперимента по разработке и валидации аналитической методики определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона. С. В. Горяинов – проведение валидационных испытаний, написание текста. Р. А. Абрамович – методология и дизайн исследования.

© Бубенчиков Р. А., Саканян Е. И., Зубкова Н. В., Добрынин В. П., Горяинов С. В., Хажжар Ф., Платонов Е. А., Писарев Д. И., Абрамович Р. А., 2022

© Bubenčikov R. A., Sakanyan E. I., Zubkova N. V., Dobrynin V. P., Goriainov S. V., Hajjar F., Platonov E. A., Pisarev D. I., Abramovich R. A., 2022

Благодарность. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Для цитирования: Бубенчиков Р. А., Саканян Е. И., Зубкова Н. В., Добрынин В. П., Горяинов С. В., Хажжар Ф., Платонов Е. А., Писарев Д. И., Абрамович Р. А. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(2):159–168. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

Development and Validation of a Procedure for the Quantitative Determination of Residual Organic Solvents in Allergen Preparations by GC

Roman A. Bubenchikov¹, Elena I. Sakanyan¹, Nataliya V. Zubkova¹, Valerii P. Dobrynin¹, Sergey V. Goriainov²✉, Fadi Hajjar², Evgeniy A. Platonov², Dmitry I. Pisarev², Rimma A. Abramovich²

¹ JSC "SIC "Microgen", 10, the 2nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia

² Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Sergey V. Goriainov. E-mail: goriainovs@list.ru

ORCID: Roman A. Bubenchikov – <https://orcid.org/0000-0003-0955-6892>; Elena I. Sakanyan – <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>;

Nataliya V. Zubkova – <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>; Valerii P. Dobrynin – <https://orcid.org/0000-0003-2487-8152>;

Sergey V. Goriainov – <https://orcid.org/0000-0002-7625-9110>; Fadi Hajjar – <https://orcid.org/0000-0001-8819-9349>; Evgeniy A. Platonov – <https://orcid.org/0000-0002-6625-6653>;

Dmitry I. Pisarev – <https://orcid.org/0000-0002-2996-7712>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Received: 23.08.2021

Revised: 04.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. One of the requirements for the quality of pharmaceuticals, including allergens, is the determination of residual organic solvents in them. In the production of allergen preparations, in a number of cases in the technological process, organic solvents of the third toxicity class are used, diethyl ether and acetone, which are solvents of low toxicity and their maximum content is allowed up to 0.5 % (5000 ppm). Since diethyl ether or acetone, and in some cases both solvents can be used simultaneously in the production process of allergen preparations for degreasing and cleaning, it is therefore advisable to develop and use a unified technique to determine them.

Aim. The aim of the study was to develop and validate a method for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations.

Materials and methods. The studies were carried out by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector with injection of the test samples using an autosampler on a Zebron ZB-624 capillary quartz column (G43, 6 % cyanopropylphenyl / 94 % dimethylpoly siloxane).

Results and discussion. The conditions for the chromatographic separation of acetone and diethyl ether on a capillary quartz column were selected. The parameters of the suitability of the chromatographic system have been determined. The developed method was validated according to the following characteristics: specificity, linearity, limit of quantitative determination, correctness and precision at the level of repeatability and intra-laboratory precision. The content of acetone and diethyl ether in 26 preparations of allergens was determined. The results of the quantitative determination of diethyl ether and acetone in allergen preparations, in the technological process of which OOP are used, are in the range of 0.0053–0.0524 % for diethyl ether and 0.0029–0.0994 % for acetone. Thus, the content of diethyl ether and acetone in all tested allergen preparations was below the established norm (less than 0.5 %).

Conclusion. An analytical method has been developed for determining the quantitative content of diethyl ether and acetone in allergen preparations using the GLC method; the method has been validated according to characteristics that meet the requirements of General Pharmacopoeia Monograph 1.1.0012.15 "Validation of analytical methods". The analysis of allergen preparations was carried out in accordance with the methodology. In all preparations, the content of diethyl ether and acetone was no more than 0.5 %.

Keywords: allergen preparations, residual organic solvents, gas chromatography, 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. Roman A. Bubenchikov, Elena I. Sakanyan, Nataliya V. Zubkova, Valerii P. Dobrynin, Fadi Hajjar, Evgeniy A. Platonov, Dmitry I. Pisarev – conducting an experiment to develop and validate an analytical method for determining the quantitative content of diethyl ether and acetone. Sergey V. Goriainov – conducting validation tests, writing text. Rimma A. Abramovich – research methodology and design.

Acknowledgment. This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

For citation: Bubenchikov R. A., Sakanyan E. I., Zubkova N. V., Dobrynin V. P., Goriainov S. V., Hajjar F., Platonov E. A., Pisarev D. I., Abramovich R. A. Development and validation of a procedure for the quantitative determination of residual organic solvents in allergen preparations by GC. *Drug development & registration.* 2022;11(2):159–168. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168>

ВВЕДЕНИЕ

Вопросам безопасности и эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов придается большее значение как в России, так и во всем мире. На сегодняшний день такие иммунобиологиче-

ские препараты, как аллергены, нашли широкое применение в клинической практике для диагностики и лечения аллергических заболеваний, вызванных иммунологическими реакциями повышенной чувствительности (IgE-зависимые) к аллергенам различной природы.

В последние десятилетия мировая фармакопейная практика уделяет особое внимание чистоте лекарственных средств. Определен перечень возможных примесей, присутствие которых в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах допустим в установленных пределах, гарантирующих отсутствие токсического действия на организм человека при их приеме. Существуют примеси родственные, технологические и др. К числу технологических примесей относят, в том числе остаточные количества органических растворителей, используемых в технологии получения как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов. В рамках гармонизации требований национальной фармакопеи, фармакопеи ЕАЭС и ведущих зарубежных фармакопей в отечественную фармакопейную практику введен такой обязательный показатель качества, как содержание остаточных органических растворителей, в случае использования последних в технологическом процессе [1–5]. В действующей ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» указаны общие принципы определения этого показателя качества и нормативные требования к содержанию этих растворителей в зависимости от класса токсичности.

Согласно ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» остаточные органические растворители (ООР) – летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата полностью не удаляются после завершения технологического процесса¹.

При производстве препаратов аллергенов в ряде случаев, в частности при работе с пыльцевыми аллергенами, в технологическом процессе используются органические растворители третьего класса токсичности: диэтиловый эфир и ацетон, предельное содержание которых составляет до 0,5 % (5000 ppm).

Фармакопея Евразийского экономического союза предлагает проводить определение содержания остаточных органических растворителей любыми подходящими методиками, описанными в фармакопеях. Одним из современных методов идентификации и количественного определения ООР, согласно ведущим Фармакопеям, является газо-жидкостная хроматография с пламенно-ионизационным детектированием [6, 7]. Например, Фармакопея США в общей статье <467> дает рекомендации для разделения определяемых целевых компонентов использовать колонки с неподвижной фазой G43 и G16². Для решения поставленной задачи было принято решение

¹ ОФС.1.1.0008.15. «Остаточные органические растворители». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0008-15-ostatochnye-organicheskie-rastvoriteli/> Ссылка активна на 23.02.2022.

² The United States Pharmacopoeia, USP38/NF33. Residual Solvents <467>. The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville (MD). USA. 2012. Available at: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf. Accessed: 23.02.2022.

опробовать колонки с обеими неподвижными фазами (хроматографические колонки Zebron ZB-624 и ZB-WAX). При этом в производственном процессе препаратов аллергенов для обезжиривания и очистки могут использоваться как диэтиловый эфир или ацетон, так и оба растворителя одновременно, поэтому для их определения целесообразна разработка и использование унифицированной методики, ориентированной на применение при оценке качества конкретного лекарственного препарата аллергена [8–10].

Цель работы – разработка, апробация и валидация методики определения содержания ООР (диэтилового эфира, ацетона или их комбинаций) в препаратах аллергенов методом газо-жидкостной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на образцах препаратов бытовых, пищевых и эпидермальных аллергенов.

В качестве стандартных образцов диэтилового эфира и ацетона, а также растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) применялись реактивы с качеством для ГЖХ производства Merck KGaA, Германия (с чистотой не менее 99,9 %).

Разработка и валидация аналитической методики определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона проводилась на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Agilent 7890A (Agilent Technologies, США).

Для хроматографического анализа применялась капиллярная кварцевая колонка Zebron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593) и капиллярная кварцевая колонка Zebron ZB-WAX, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм (кат. № 1008621).

Валидацию аналитической методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На выбор условий хроматографического анализа ведущее влияние оказали физико-химические свойства диэтилового эфира и ацетона. Для выбора оптимальных условий анализа была изучена их хроматографическая подвижность.

Времена выхода диэтилового эфира и ацетона на колонке Zebron ZB-WAX (G16) 1,7 и 2,1 мин соответственно. Времена выхода диэтилового эфира и ацетона на хроматографической колонке Zebron ZB-624 (G43) составили 4,4 и 5,1 мин соответственно. Таким образом, для разработки методики была выбрана

³ ОФС.1.1.0012.15. «Валидация аналитических методик». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/> Ссылка активна на 23.02.2022.

хроматографическая колонка Zebtron ZB-624 (94 % полидиметилсилоксан / 6 % цианопропилфенил), т. к. она обеспечила лучшее разделение целевых компонентов. Наиболее часто применяемым методом измерения количественного содержания легколетучих компонентов на фоне матрикса неизвестного генезиса является использование варианта парофазного инжестирования проб, однако было принято решение остановиться на инжестировании исследуемых образцов с помощью автосэмплера, так как при использовании парофазного ввода проб было обнаружено образование артефактных соединений в системе. При проведении оптимизации условий хроматографического разделения диэтилового эфира и ацетона изучали влияние скорости газа-носителя, температурных режимов термостата и инжектора на их разделение. Подобрали градиент хроматографического разделения для оптимизации и ускорения процесса анализа единичного образца в сравнение с процедурой А статьи USP <467>.

Наилучшего разделения диэтилового эфира и ацетона удалось добиться при следующих условиях: газовый хроматограф Agilent 7890 с пламенно-ионизационным детектором; расход ПИД: воздуха 400 мл/мин, водорода 40 мл/мин; колонка: капиллярная кварцевая колонка Zebtron ZB-624, длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 1,8 мкм (кат. № 1023593).

Скорость подачи газа-носителя (гелий): 1,5 мл/мин; деление потока: 50:1; температура термостата колонки начальная 40 °С в течение 5 мин, подъем температуры до 240 °С со скоростью 25 °С/мин, затем выдержка в течение 1 мин; температура инжектора: 250 °С; температура детектора 260 °С; объем вводимого испытуемого раствора 1,0 мкл; время хроматографирования: 14 мин.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 1, А. Время выхода диэтилового эфира около 4,4 мин, ацетона около 5,1 мин. Также на хроматограмме помимо пиков ООР присутствуют сигналы, соответствующие фенолу (12,1 мин) и бензойной кислоте (13,2 мин), которые включаются в состав в качестве консервантов. Таким образом, для целей контроля ООР в препаратах аллергенов следует учитывать пики на хроматограммах с временами выхода до 7,0 мин.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Проверку пригодности проводят по следующим параметрам: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора, выраженная числом теоретических тарелок (NTP); фактор асимметрии пиков диэтилового эфира и ацетона (As); величина относительного стандартного отклонения (RSD); разрешение между пиками диэтилового эфира и ацетона (Rs) (таблица 1).

Таблица 1. Параметры пригодности хроматографической системы для диэтилового эфира и ацетона (n = 6)

Table 1. Parameters of suitability of the chromatographic system for diethyl ether and acetone (n = 6)

Органический растворитель Organic solvent	Время удерживания (RT), мин Retention time (RT), min	Площади пиков (S), mAu·s Peak areas (S), mAu·s	Фактор асимметрии пиков (As) Peak asymmetry factor (As)	Число теоретических тарелок (NTP) Theoretical plate number (NTP)
<i>Диэтиловый эфир</i> <i>Diethyl ether</i>				
	4,439	649	1,06	43685
	4,440	645	1,06	42547
	4,441	638	1,06	42896
	4,439	635	1,05	43245
	4,440	641	1,07	43587
	4,441	643	1,06	42987
RSD, %	0,02	0,8	–	–
<i>Ацетон</i> <i>Acetone</i>				
	5,123	750	1,07	51948
	5,124	776	1,07	51547
	5,122	771	1,08	51014
	5,125	760	1,07	52145
	5,122	759	1,08	52578
	5,124	772	1,08	52025
RSD, %	0,02	1,3	–	–

Хроматограмма стандартного раствора представлена на рисунке 1, Б. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам диэтилового эфира и ацетона на хроматограммах стандартного раствора, составляет не менее 42 547 и 51 014, что соответствует критериям приемлемости (не менее 10 000 теоретических тарелок).

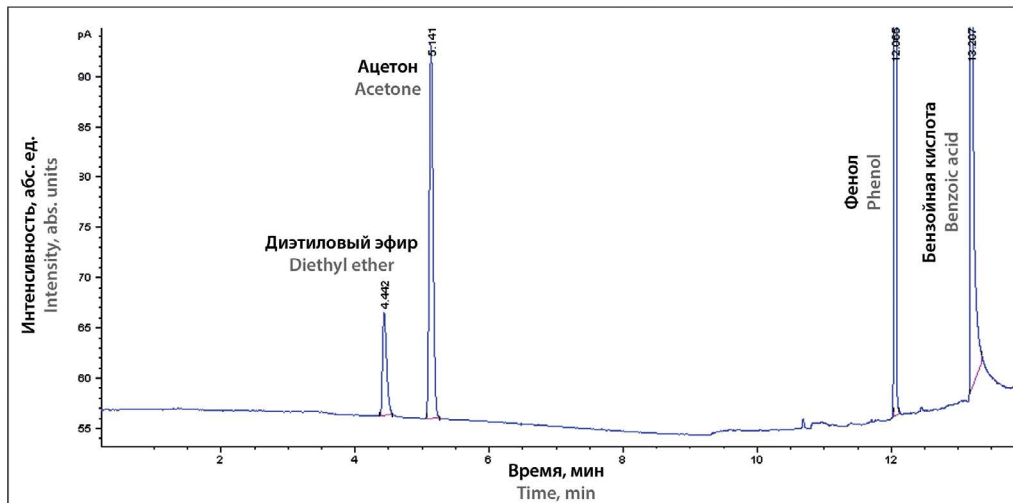
Фактор асимметрии пиков диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 1,06 и 1,07, что соответствует критериям приемлемости (не менее 0,8 и не более 1,6).

Относительное стандартное отклонение площадей пиков диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 0,8 и 1,3 %, что соответствует критериям приемлемости (не должно превышать 2,0 %).

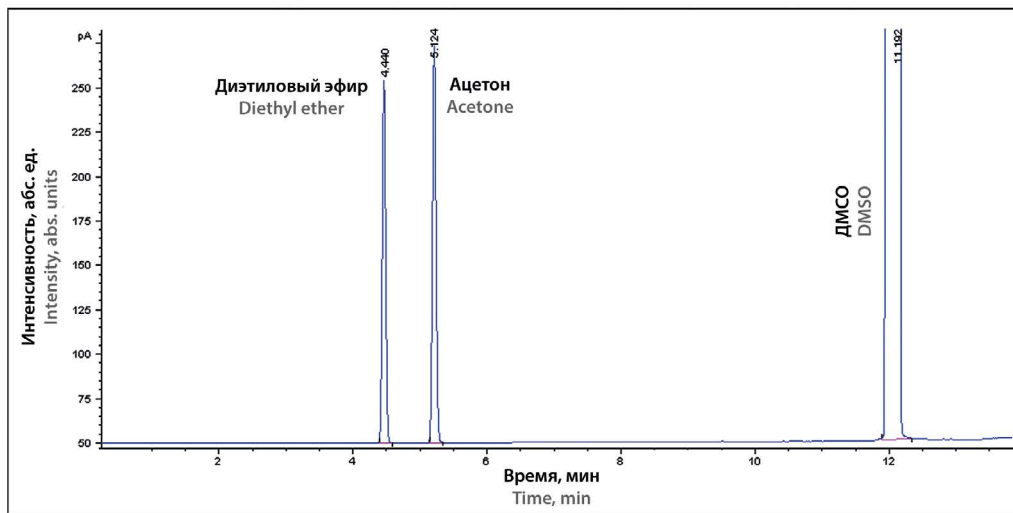
Разрешение между пиками диэтилового эфира и ацетона на хроматограмме стандартного раствора составляет 7,8, что соответствует критериям приемлемости (не менее 2,0).

Таким образом, выбранные хроматографические условия обеспечивают удовлетворительное разделение диэтилового эфира и ацетона.

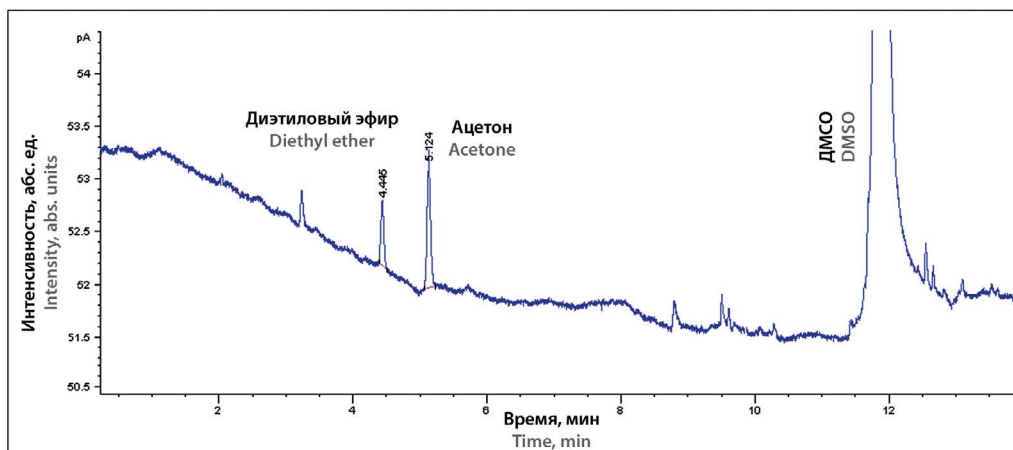
Валидацию разработанной методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, предел количественного определения (ПКО), правильность, прецизионность.



А
А



Б
Б



В
С

Рисунок 1. Типичные хроматограммы испытуемого раствора (А), стандартного раствора (Б), раствора с концентрацией диэтилового эфира и ацетона на уровне ПКО (В)

Figure 1. Typical chromatograms of test solution (A), standard solution (B), solution with the concentration of diethyl ether and acetone at the LOQ level (C)

Специфичность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона подтверждена набором хроматограмм раствора «бланк» (растворителя), раствора плацебо, стандартного раствора и испытуемого раствора. Времена удерживания диэтилового эфира и ацетона на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Времена удерживания диэтилового эфира и ацетона стандартного и испытуемого растворов

Table 2. Retention times of diethyl ether and acetone of the standard and test solutions

Время удерживания, мин (RT) Retention time (RT), min	Соединение Compound	Число теоретических тарелок (NTP) Theoretical plate number (NTP)	Разрешение (R) Resolution (R)	Асимметрия (As) Asymmetry (As)
<i>Стандартный раствор</i> Standard solution				
4,440	Диэтиловый эфир Diethyl ether	43685	-	1,05
5,124	Ацетон Acetone	51948	7,80	1,07
<i>Испытуемый раствор</i> Sample solution				
4,442	Диэтиловый эфир Diethyl ether	26214	-	1,53
5,141	Ацетон Acetone	38539	6,52	1,25

В результате установлена специфичность методики для определения ацетона и диэтилового эфира и исключена возможность присутствия пиков, которые могут мешать определению растворителей.

Для проверки линейности были приготовлены и проанализированы серия растворов стандартных образцов диэтилового эфира и ацетона. Линейная за-

висимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне от 10 до 150 % от нормируемого содержания. Значения коэффициентов корреляции для линейной зависимости составляют более 0,995, что подтверждает линейность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона (рисунок 2).

Пределы количественного определения (ПКО) нормируемых ООР находили экспериментально путем приготовления серии разведений стандартного раствора. Для раствора, содержащего диэтиловый эфир и ацетон на уровне предела количественного определения, соотношение сигнал/шум должно быть не менее 10:1 (рисунок 1, В).

Значения ПКО для диэтилового эфира и ацетона от нормируемого содержания составили 0,0025 мг/мл. Данные значения находятся ниже диапазона применения методики количественного определения, что соответствует критериям приемлемости методики.

Правильность методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона доказывали методом добавок, для этого готовили модельные смеси путем прибавления диэтилового эфира и ацетона к раствору плацебо до концентрации ПКО, 100 и 150 % от номинальной (9 измерений, 3 концентрации внутри определяемого диапазона). Рассчитывали открываемость (отношение найденного содержания к введенному, выраженное в процентах) (таблица 3).

Открываемость диэтилового эфира и ацетона принадлежит интервалу 98–102 %. Коэффициент вариации открываемости диэтилового эфира и ацетона не превышает 2,0 % ($n = 9$), как и требуется по критериям приемлемости.

Прецизионность разработанной методики устанавливали в виде повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Для определения повторяемости определяли содержание диэтилового эфира и ацетона в препарате аллергена в шести проворно-стях в течении одного рабочего дня (таблица 4).

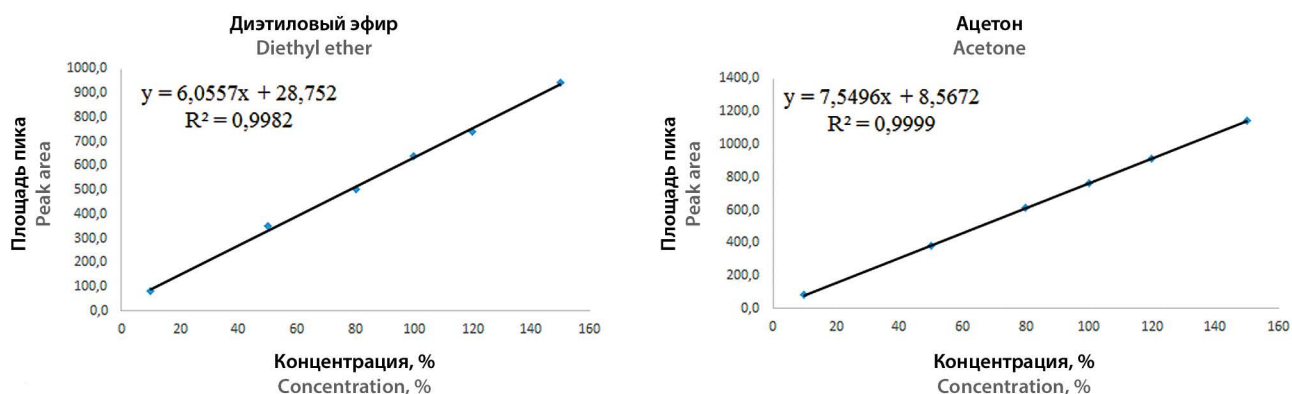


Рисунок 2. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации диэтилового эфира и ацетона (% от нормируемого содержания)

Figure 2. Linear dependence of the analytical signal on the concentration of diethyl ether and acetone (% of the limit content)

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики определения диэтилового эфира и ацетона

Table 3. Results of assessing the correctness of the method for determining diethyl ether and acetone

Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	
	Диэтиловый эфир Diethyl ether	Ацетон Acetone
Наименьшее значение, X, % Minimal value, X, %	98,4	98,7
Наибольшее значение, X, % Maximum value, X, %	101,9	101,8
Среднее значение, X _{ср.} , % Average value, X _{av.} , %	100,6	100,7
Дисперсия, S ² Variance, S ²	1,36	1,10
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S	1,17	1,05
Стандартное отклонение среднего результата, S _о Standard error, S _о	0,39	0,35
Коэффициент вариации, S _{вр.} , % Coefficient of variation, S _{vr.} , %	1,16	1,04
Доверительный интервал (P = 0,95), % Confidence interval (P = 0,95), %	0,9 (от 99,7 до 101,5) 0,9 (from 99,7 to 101,5)	0,8 (от 99,9 до 101,5) 0,8 (from 99,9 to 101,5)

Полученные значения коэффициента вариации результатов количественного определения диэтилового эфира и ацетона не превышают 2,0 %, что и требуется по критериям приемлемости.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности исследования проводили в течение двух рабочих дней с использованием свежеприготовленных растворов. Рассчитывали содержание диэтилового эфира и ацетона, среднее значение, стандартное отклонение, стандартное отклонение среднего результата, коэффициент вариации по результатам количественного определения диэтилового эфира и ацетона в испытуемых образцах (n = 6) (таблица 5).

Значения коэффициента вариации результатов количественного определения диэтилового эфира и ацетона не превышает 2,0 %, что отвечает критериям приемлемости.

Различия между дисперсиями средних результатов двух выборок статистически незначимы. При сравнении результатов, полученных в разные дни, различия в воспроизводимостях отсутствуют, т. е. случайные погрешности одного порядка.

Проведенные исследования по установлению валидационных показателей характеризуют разработанную методику как специфичную, точную и достоверную для определения ООР в производстве препаратов аллергенов.

Разработанная методика количественного определения ООР была использована для анализа в препаратах аллергенов.

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 50,0 мл помещали около 250,0 мг (точная навеска) диэтилового эфира и около 250,0 мг (точная навеска) ацетона, доводили объем раствора ДМСО до метки и перемешивали (концентрация диэтилового эфира и ацетона около 5,0 мг/мл).

Испытуемый раствор готовили следующим образом: около 1,0 мл испытуемого образца помещали в стеклянную хроматографическую виалу для проведения анализа и взвешивали.

Содержание диэтилового эфира и ацетона рассчитывали по методу внешнего стандарта [14]. Содержание диэтилового эфира и ацетона (X, %) в препаратах аллергенов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 50},$$

где S – площадь пика диэтилового эфира или ацетона на хроматограммах испытуемого раствора; S₀ – средняя площадь пика диэтилового эфира или ацетона на хроматограммах стандартного раствора; a₀ – навеска диэтилового эфира или ацетона, взятая для приготовления стандартного раствора, мг; a – навеска испытуемого образца, мг; P – чистота диэтилового эфира или ацетона, %.

Результаты количественного определения диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов, в технологическом процессе которых используются ООР, находятся в диапазоне 0,0053–0,0524 % для диэтилового эфира и 0,0029–0,0994 % для ацетона. Таким образом, содержание диэтилового эфира и ацетона во всех исследованных препаратах аллергенов было ниже установленной нормы (менее 0,5 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана аналитическая методика определения количественного содержания диэтилового эфира и ацетона в препаратах аллергенов с помощью метода ГЖХ, методика валидирована по характеристикам, отвечающим требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

Проведенный в соответствии с разработанной методикой анализ препаратов аллергенов свидетельствует о том, что во всех препаратах содержание диэтилового эфира и ацетона составляет не более 0,5 %, что отвечает требованиям ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители».

Следовательно, использование данной методики позволяет существенно повысить качество лекарственных препаратов аллергенов, в технологии получения которых используются органические растворители, так как контроль содержания их остаточных количеств гарантирует безопасность применения этих препаратов и их соответствие требованиям международных стандартов.

Таблица 4. Оценка повторяемости методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона ($n = 6$)

Table 4. Evaluation of the repeatability of the method for the quantitative determination of diethyl ether and acetone ($n = 6$)

Диэтиловый эфир ($a_0 = 253,0$ мг; $S_0 = 647,2$) Diethyl ether ($a_0 = 253,0$ mg; $S_0 = 647,2$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	44,1	43,9	44,1	44,03	999,6	0,0344
	43,8	44,2	43,9	43,97	999,3	0,0343
	44,1	44,2	44,1	44,13	999,8	0,0344
	43,2	43,1	43,2	43,17	999,8	0,0337
	43,3	43,4	43,7	43,47	999,5	0,0339
	42,9	43,2	43,5	43,20	998,9	0,0337
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0341
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						1,13279E-07
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,000336
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000137
Коэффициент вариации, $S_{\text{вр}}$, % Coefficient of variation, $S_{\text{вр}}$, %						0,987
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0337–0,0344
Ацетон ($a_0 = 253,8$ мг; $S_0 = 770,0$) Acetone ($a_0 = 253,8$ mg; $S_0 = 770,0$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	146,5	146,8	146,7	146,67	999,6	0,0965
	145,9	146,0	146,1	146,05	999,3	0,0962
	151,1	151,4	151,2	151,23	999,8	0,0995
	151,6	151,7	151,6	151,63	999,8	0,0998
	145,8	145,9	146,0	145,90	999,5	0,0960
	145,2	145,1	145,1	145,13	998,9	0,0956
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0973
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						3,49767E-06
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,001870
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000763
Коэффициент вариации, $S_{\text{вр}}$, % Coefficient of variation, $S_{\text{вр}}$, %						1,923
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0953–0,0992

На основании изложенного можно рекомендовать включить показатель качества и разработанную методику определения количественного содержания ООР в проект НД на препараты аллергенов.

ЛИТЕРАТУРА

- Олефир Ю. В., Саканян Е. И., Шишова Л. И., Сенченко С. П. Фармакопейные требования к качеству лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)11:48–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54.
- Таубэ А. А., Гилек М. Т., Саканян Е. И. Методические подходы к повышению качества лекарственного растительного сырья морфологической группы «пыльца». *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;(55)12:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-56-60.
- Невская Л. В., Лавренчик Е. И., Жданова М. Ю., Фадейкина О. В., Капитанова В. К. Международный опыт стандартизации препаратов аллергенов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):222–229.
- Олефир Ю. В., Саканян Е. И., Шемерянкина Т. Б., Сенченко С. П., Зайцев С. А., Бармин А. В. Стандартизация фармацевтических субстанций по разделу «чистота». *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)8:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-8-56-60.

Таблица 5. Оценка внутривлабораторной прецизионности методики количественного определения диэтилового эфира и ацетона

Table 5. Evaluation of the in-laboratory precision of the method for the quantitative determination of diethyl ether and acetone

Диэтиловый эфир ($a_0 = 252,6$ мг; $S_0 = 640,2$) Diethyl ether ($a_0 = 252,6$ mg; $S_0 = 640,2$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	44,2	44,1	44,1	44,13	999,6	0,0348
	43,4	43,8	43,6	43,60	999,4	0,0344
	44,1	44,2	44,1	44,13	999,7	0,0348
	44,5	44,4	44,4	44,43	1000,2	0,0350
	43,1	43,4	43,2	43,23	999,5	0,0341
	43,5	43,8	43,0	43,43	999,5	0,0342
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0345
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						1,33E-07
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,000364
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000149
Коэффициент вариации, $S_{\text{вр}}$, % Coefficient of variation, $S_{\text{вр}}$, %						1,054
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0341–0,0349
Ацетон ($a_0 = 251,8$ мг; $S_0 = 760,6$) Acetone ($a_0 = 251,8$ mg; $S_0 = 760,6$)	S_1	S_2	S_3	$S_{\text{ср.}}$ $S_{\text{ав.}}$	a , мг a , mg	X , %
	146,5	146,8	146,7	146,67	999,6	0,0970
	145,9	145,2	145,6	145,57	999,4	0,0962
	151,1	150,8	151,2	151,03	999,7	0,0998
	151,6	151,7	151,6	151,63	1000,2	0,1002
	147,2	146,9	147,0	147,03	999,5	0,0972
	146,8	146,5	146,4	146,57	999,5	0,0969
Среднее значение (X), % Average value (X), %						0,0979
Дисперсия, S^2 Variance, S^2						2,81E-06
Стандартное отклонение, S Standard deviation, S						0,001675
Стандартное отклонение среднего результата, S_0 Standard error, S_0						0,000684
Коэффициент вариации, $S_{\text{вр}}$, % Coefficient of variation, $S_{\text{вр}}$, %						1,711
Доверительный интервал ($P = 0,95$), % Confidence interval ($P = 0,95$), %						0,0961–0,0996

- Терёшкина О. И., Гуськова Т. А., Раменская Г. В., Самылина И. А. Фармакопейные подходы к нормированию остаточных органических растворителей в лекарственных средствах. *Фармация*. 2017;(66)1:9–13.
- Дуденкова М. Е., Грушевская Л. Н., Сергеева М. С. Разработка и валидация методики идентификации и количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;(54)2:49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-49-53.
- Петухов А. Е., Петрыкина Е. А., Терёшкина О. И., Раменская Г. В., Антипова О. М., Турашев А. Д., Завьялова Е. Г., Головин А. В., Павлова Г. В., Копылов А. М. Стандартизация субстанции тромбаптаниба по показателю «остаточные органические растворители». *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;(52)4:53–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-53-58.
- Ластовка А. В., Яковлева Е. Ю., Коллегов В. Ф., Фадеева В. П., Салахутдинов Н. Ф. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии в субстанции (2r,4r,4ar,7r,8ar)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-

- 2h-хромен-4-ол, обладающей анальгетической активностью. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2018;84(9):13–20.
9. 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.
 10. Бутина Е. В., Зайцев С. А., Басевич А. В. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в инновационной активной фармацевтической субстанции методом ГЖХ ПИД. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(4):124–128.
 11. Гольберт К. А., Вигдергауз М. С. Введение в газовую хроматографию. М.: Химия; 1990. 344 с.

REFERENCES

1. Olefir Yu. V., Sakanyan E. I., Shishova L. I., Senchenko S. P. Pharmacopoeial requirements to the quality of medicinal products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)11:48–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54. (In Russ.)
2. Taube A. A., Gilyok M. T., Sakanyan E. I. Methodological approaches to improving the quality of raw medicinal plant materials of the pollen morphology group. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;(55)12:56–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-56-60. (In Russ.)
3. Nevskaya L. V., Lavrenchik E. I., Zhdanova M. Yu., Fadeykina O. V., Kapitanova V. K. International practice of allergen products standardization. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2017;17(4):222–229. (In Russ.)
4. Olefir Y. V., Sakanyan E. I., Shemeryankina T. B., Senchenko S. P., Zaitsev S. A., Barmin A. V. Standardization of drug substances according to the purity section. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)8:56–60. (In Russ.)
5. Teryoshkina O. I., Guskova T. A., Ramenskaya G. V., Samylina I. A. Pharmacopoeial approaches to rationing residual organic solvents in medicines. *Pharmacy*. 2017;(66)1:9–13. (In Russ.)
6. Dudenkova M. E., Grushevskaya L. N., Sergeeva M. S. Development and validation of methods for identification and quantitative determination of residual organic solvents in the substance of the dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;(54)2:49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-2-49-53. (In Russ.)
7. Petukhov A. E., Petrykina E. A., Tereshkina O. I., Ramenskaya G. V., Antipova O. M., Turashev A. D., Zav'yalova E. G., Golovin A. V., Pavlova G. V., Kopylov A. M. Standardization of thrombaptanib drug substance for residual organic solvents. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;(52)4:53–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-53-58. (In Russ.)
8. Lastovka A. V., Yakovleva E. Yu., Kollegov V. F., Fadeeva V. P., Salakhutdinov N. F. Chromatographic determination of residual organic solvents in (2r,4r,4ar,7r,8ar)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2h-chromen-4-ol which exhibits high analgesic activity. *Zavodskaya Laboratoriya. Diagnostika Materialov*. 2018;84(9):13–20. (In Russ.)
9. 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. (In Russ.)
10. Butina E. V., Zaitsev S. A., Basevich A. V. Development and validation of method of quantitative determination of residual organic solvents in innovative active pharmaceutical ingredient with GC-FID. *Drug development & registration*. 2016;(4):124–128. (In Russ.)
11. Holbert K. A., Wigdergauz M. S. Introduction to Gas Chromatography. Moscow: Khimiya; 1990; 344 p. (In Russ.)