

ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОССИПОЛА В СУБСТАНЦИИ «КАГОЦЕЛ»

И.В. Киселева¹, Б.А. Рудой^{1*}, доктор биологических наук профессор,
А.В. Пирогов², доктор химических наук, профессор, **Н.Г. Толмачева²**

¹ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»;

Российская Федерация, 125252, Москва, ул. авиаконструктора Микояна, д. 12

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет;

Российская Федерация, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Введение. В процессе синтеза противовирусного препарата «Кагоцел®» используются молекулы госсипола – природного полифенола, содержащегося в хлопчатнике. При превышении дозы госсипол может проявлять токсичные свойства. Каждая серия производимой субстанции обязательно контролируется по содержанию свободного госсипола в конечном препарате.

Цель работы. Проведение валидационных исследований разработанной ВЭЖХ-методики определения примесей свободного госсипола для внедрения в систему контроля качества при производстве фармацевтической субстанции «Кагоцел».

Материал и методы. Объект исследования – фармацевтическая субстанция «Кагоцел». Примеси госсипола определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием.

Результаты. В соответствии с современными фармакопейными требованиями валидирована высокочувствительная и специфичная ВЭЖХ-методика определения свободного госсипола в субстанции «Кагоцел». Значения всех валидационных характеристик соответствуют установленным критериям приемлемости.

Заключение. Методика позволяет надежно детектировать примеси свободного госсипола в субстанции «Кагоцел» с высокой достоверностью и правильностью при их содержании свыше $1,56 \cdot 10^{-5}$ мг/мл.

Ключевые слова: госсипол, кагоцел, ВЭЖХ, валидация.

*E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru

ВВЕДЕНИЕ

Действующим веществом противовирусного препарата «Кагоцел®» является уникальное соединение, полученное методом химического синтеза, в результате которого к полимерным молекулам окисленной перйодатным методом карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) ковалентно присоединены молекулы госсипола [1]. Госсипол — природный полифенол, содержащийся в хлопчатнике и защищающий растение от различных неблагоприятных факторов. В ходе многочисленных зарубежных исследований доказано, что госсипол оказывает выраженное фармакологическое действие, проявляя противовирусную, противоопухолевую, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность [2]. Ранее на основе госсипола были созданы различные лекарственные формы, которые использовались в медицинской практике [3]. Однако его применение в качестве лекарства ограничено в связи с малой терапевтической широтой по величинам используемых доз, особенно при системном введении [4,5].

Как показали проведенные за рубежом исследования, в результате молекулярных сшивок с различными соединениями или полимерными носителями

госсипол утрачивает свои токсические свойства [6, 7]. Технология получения субстанции «Кагоцел» включает химический синтез, при котором применяли именно такой прием. За счет использования избытка окисленной карбоксиметилцеллюлозы и многократных стадий очистки продукта обеспечивается максимально полное удаление примесей свободного госсипола в конечном продукте. Каждая серия производимой субстанции обязательно контролируется по этому показателю. Для этой цели до настоящего времени используют спектрофотометрический метод контроля, утвержденный нормативным документом на фармацевтическую субстанцию «Кагоцел». Его считают универсальным, экспрессным и экономичным. С учетом высокого значения коэффициентов молярной экстинкции госсипола, чувствительность фотометрического метода достаточна для обеспечения надежного контроля примесей остаточного госсипола в субстанции на абсолютно безопасном уровне.

Однако фотометрические методы, широко используемые в системе контроля качества лекарств, помимо указанных достоинств, имеют такие недостатки, как малая разрешающая способность, зависимость от условий детектирования, более высокая подверженность мешающему действию примесей. Поэтому современные фармакопеи, в том числе и

Государственная фармакопея РФ (ГФ РФ), опираясь на общемировую практику рекомендуют вводить в систему контроля качества лекарственных средств наиболее специфичные и чувствительные методы, прежде всего – высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

В связи с этим ГФ РФ XIII издания содержит требование обязательного использования стандартов примесей для идентификации и контроля количественного содержания токсичных примесей к фармацевтическим ингредиентам.

Применительно к госсиполу эффективные и чувствительные хроматографические методы были ранее разработаны в разных вариантах исполнения [8–10]. Кроме научных исследований, они используются также в системе контроля пищевых продуктов на содержание примесей госсипола [12, 13]. Очищенный госсипол, необходимый для разработки таких методик, доступен, его предлагают производители химических реактивов.

Цель работы. Проведение валидационных исследований разработанной ранее ВЭЖХ-методики определения примесей свободного госсипола для внедрения в систему контроля качества при производстве фармацевтической субстанции «Кагоцел».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ВЭЖХ-анализ выполняли на жидкостном хроматографе Agilent 1260, оборудованном четырехкомпонентным градиентным насосом со встроенным дегазатором, автоматическим устройством для ввода пробы, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей. Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent Open LAB Chromatography Data System (CDS) Chem. Station Edition.

Для приготовления раствора сравнения использовали стандартный образец (СО) госсипола производства компании «Dr. Ehrenstorfer» с содержанием основного вещества 91,0%. Для приготовления подвижной фазы применяли ацетонитрил HPLC grad «Biosolv», фосфорную кислоту «Sigma-Aldrich», калия фосфат однозамещенный «Sigma-Aldrich», воду Milli-Q. Все растворы перед введением в хроматограф были профильтрованы через мембранный фильтр PTFE «Supelco» с размером пор 0,45 мкм.

Методика приготовления испытуемого раствора: около 500 мг субстанции «Кагоцел» (точная навеска) помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл из темного стекла, прибавляют 10 мл ацетонитрила, 0,2 мл ледяной уксусной кислоты, закрывают колбу пробкой и перемешивают в течение 15 мин на магнитной мешалке. Из полученной суспензии извлекают перемешивающий элемент, промывают его 3 мл ацетонитрила, добавляют смывы в колбу с суспензией. Количественно переносят

содержимое конической колбы в мерную колбу вместимостью 25 мл из темного стекла. Доводят объем раствора до метки ацетонитрилом и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр PTFE (политетрафторэтилен) с размером пор 0,45 мкм. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Получение раствора сравнения: около 10 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) госсипола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл из темного стекла, прибавляют 10 мл ацетонитрила, тщательно перемешивают до полного растворения. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор А). 2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор Б). 1,0 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор С – около 0,001 мг/мл). Раствор С фильтруют через мембранный фильтр PTFE с размером пор 0,45 мкм. Раствор стабилен в течение 21 ч при хранении в защищенном от света месте.

Процесс разделения проводили на хроматографической колонке Zorbax Eclipse Plus C18 250×4,6 мм, заполненной октадецилсилильным эндкепированным силикагелем для хроматографии (C18) с размером частиц 5 мкм. Хроматографическая колонка снабжена защитной предколонкой 12,5×4,6 мм с тем же сорбентом. В качестве подвижной фазы использовался буферный раствор 30 мМ калия фосфата однозамещенного рН 2,5 и ацетонитрил в соотношении 2:8. Колонку поддерживали при постоянных температуре 40°C и скорости потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Объем пробы – 10 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 235 нм.

При выполнении валидации методики количественного определения госсипола в субстанции «Кагоцел» были получены и обработаны результаты по следующим параметрам: специфичность, предел количественного определения, линейность и диапазон, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость), стабильность растворов, робастность. Оценку параметров линейности количественного определения и установления предела количественного определения (ПКО) осуществляли с использованием растворов стандарта госсипола.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель подтверждения специфичности методики – определение способности метода ВЭЖХ измерять точно и селективно содержание госсипола в субстанции «Кагоцел» в присутствии системных пиков и посторонних примесей, а также компонентов, которые могут образовываться (привноситься) в процессе пробоподготовки образцов. Специфичность опре-

деляли, анализируя хроматограммы подвижной фазы (бланков) и растворителя (рис. 1), а также растворов госсипола в исходном состоянии (рис. 2) и после воздействия на его раствор стресс-факторов: кислой (ледяная уксусная кислота, 30 мин) и щелочной (0,01М раствор NaOH, 30 мин) среды, термического воздействия (нагревание при 45°C в течение 15 мин, окисление 0,1% раствором пероксида водорода). На всех хроматограммах, кроме образца, подвергнутого кислотному воздействию, пик госсипола отсутствовал из-за его полной деградации. Поэтому в дальней-

ших испытаниях оценку избирательности разделения пика госсипола с пиками примесей проводили по раствору субстанции, обработанному кислотой. На хроматограмме образца (смеси стандарта госсипола с субстанцией, после воздействия кислоты) разрешение пика госсипола с пиком ближайшей примеси составило 5,6, что обеспечивало высокую надежность и специфичность обнаружения госсипола в смеси с веществом субстанции «Кагоцел» (рис. 3). При этом была подтверждена гомогенность пика госсипола (коэффициент подобия 999,8).

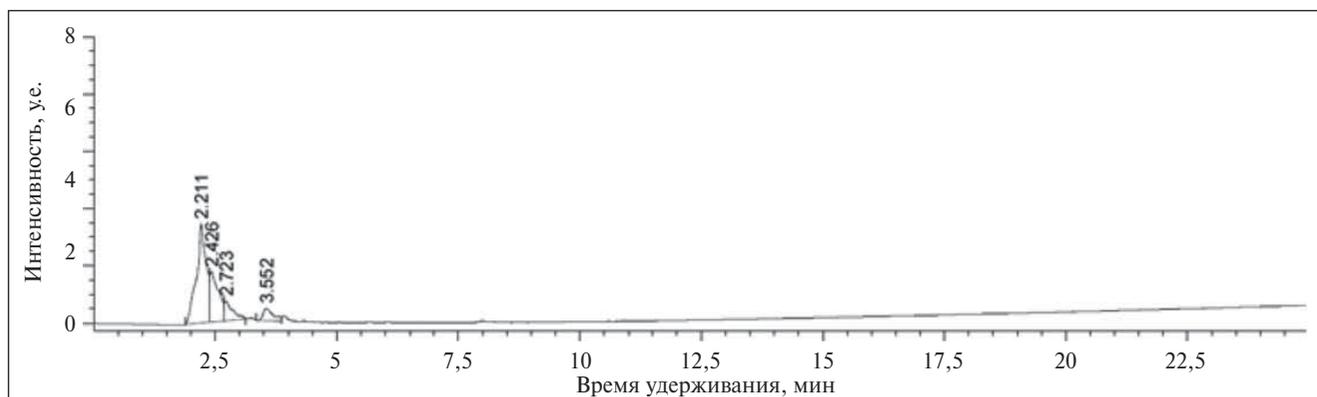


Рис. 1. Хроматограмма подвижной фазы (бланк)

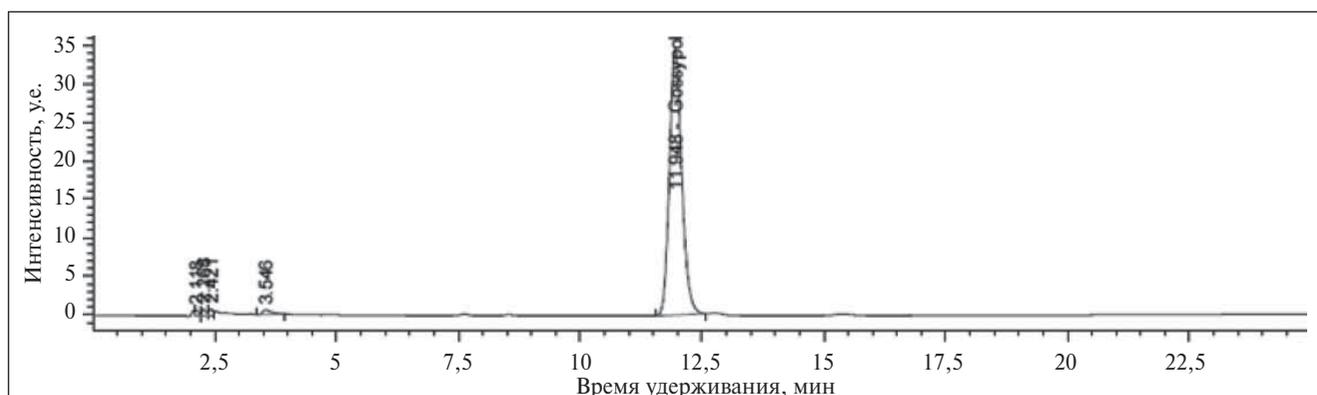


Рис. 2. Хроматограмма раствора сравнения (стандартный образец госсипола)

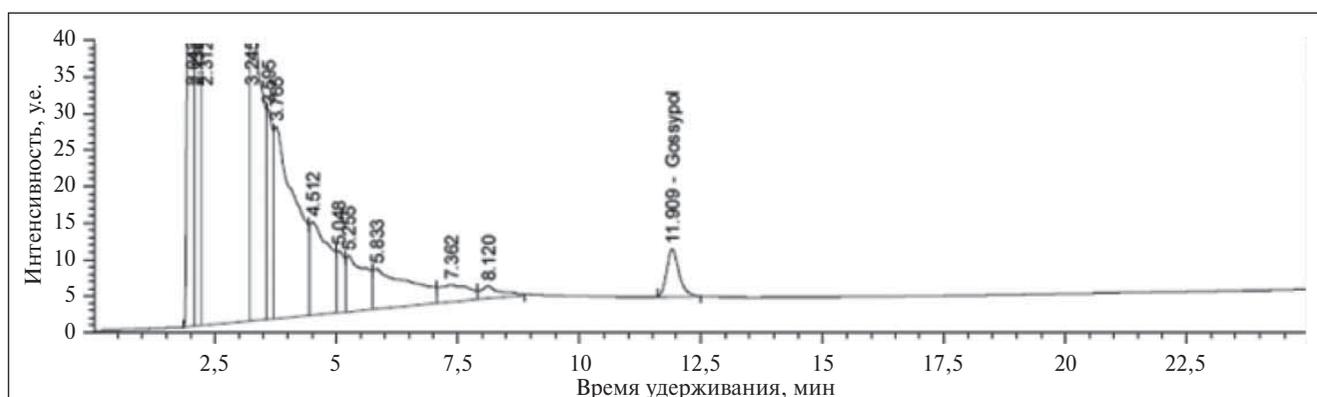


Рис. 3. Хроматограмма смеси госсипола с субстанцией после кислотного гидролиза

При выборе условий проведения испытаний по показателям линейности и правильности максимально допустимую величину содержания примесей свободного госсипола в субстанции определяли с учетом требований ГФ РФ XIII издания к фармацевтическим субстанциям и имеющихся данных литературы о безопасных уровнях содержания госсипола в продуктах, используемых человеком. Согласно данным научной и медицинской литературы, предельно допустимое содержание примесей свободного госсипола в пищевых продуктах составляет 0,45–0,6 мг на 1 г продукта [2, 14, 15]. Европейская ассоциация по безопасности пищевых продуктов (EFSA) на основании анализа результатов доклинических и клинических исследований установила, что безопасные для состояния здоровья человека дозы госсипола находятся на уровне ниже 0,1 мг на 1 кг массы тела, т.е. менее 5–7 мг в сутки для взрослого человека [16].

Кроме того, согласно требованиям фармакопей ведущих стран мира и требованиям ГФ РФ XIII изд. (ОФС 1.1.0006.15), определен особый порядок контроля в фармацевтических субстанциях токсичных примесей. Установлен так называемый квалификационный порог допустимого содержания примесей в фармацевтических субстанциях – 0,15% от массы субстанции или 1 мг на человека в сутки при приеме лекарственного препарата (в зависимости от того, что больше). При превышении этого порога должна проверяться токсикологическая безопасность примеси. Квалификационный порог значительно ниже, жестче, чем установленный нормами пищевой безопасности уровень поступления госсипола в организм. Эти данные и рекомендованная инструкцией по применению таблеток «Кагоцел®» максимальная суточная доза в пересчете на субстанцию (72 мг) показывают, что установленный фармакопеей квалификационный порог содержания примесей (1 мг в сутки) обеспечивается, если установить предел содержания этой примеси в субстанции на уровне ниже $1/72 = 0,013$ или 1,3% от массы субстанции. Сопоставление этой цифры со значением безопасной дозы поступления госси-

пола в организм человека и с величиной допустимого содержания каждой единичной примеси в субстанции (согласно ГФ РФ XIII, так называемый контролируемый предел составляет 0,05%) свидетельствует, что соблюдение даже установленного контролируемого предела (который более чем в 20 раз превышает расчетную безопасную дозу) заведомо обеспечит безопасность применения препарата. Поэтому именно эта величина была исходно выбрана в качестве ориентира при установлении верхнего предела определения показателей линейности и правильности разрабатываемой методики.

Однако проведенные с использованием разработанного метода дальнейшие исследования большого количества архивных образцов производственных серий субстанции «Кагоцел» показали, что порог в 0,05% для целей валидации слишком высокий, поскольку обнаруживаемое в этих образцах количество свободного госсипола меньше этого показателя на 1–2 порядка. Поэтому с учетом имеющихся данных литературы о высокой чувствительности методик ВЭЖХ для госсипола, подтвердившихся в ходе наших экспериментов по отработке методики с использованием СО госсипола, для проведения валидационных испытаний в качестве верхнего предела содержания госсипола в субстанции была взята величина, составляющая 1/10 от установленного фармакопеей контролируемого порога, т.е. 0,005% от массы активного вещества.

В соответствии с правилами валидации хроматографического метода предел количественного определения (ПКО) рассчитывали с использованием растворов СО госсипола (рис. 4). Определяли минимальную концентрацию госсипола, для которой величина отношения сигнал:шум составляет не менее 10. Результаты приведены в табл. 1.

Таким образом, значение ПКО госсипола составило $1,56 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. Относительное стандартное отклонение высоты пика госсипола, рассчитанное по 6 последовательным хроматограммам раствора с содержанием госсипола, равным ПКО (см. рис. 4), составляет 3,5%.

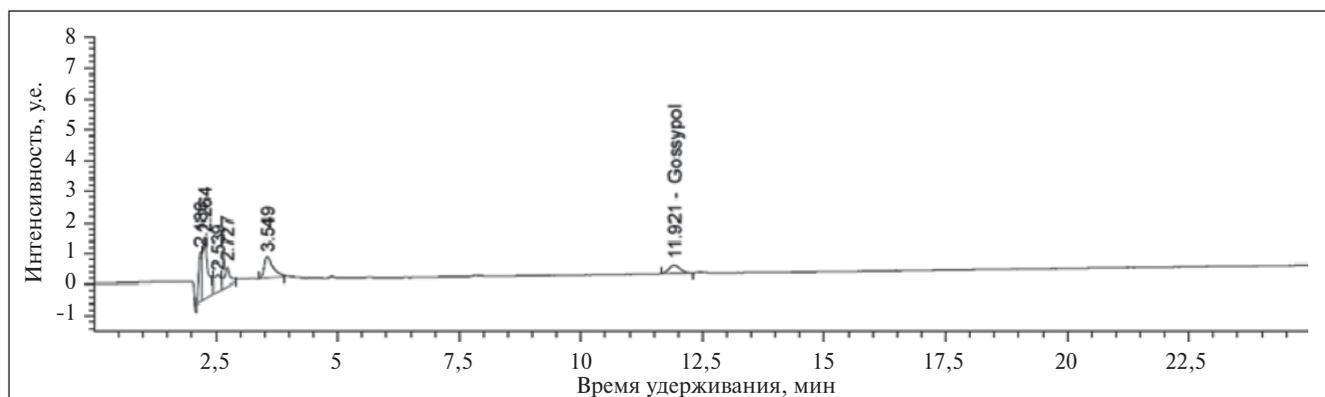


Рис. 4. Хроматограмма раствора госсипола в концентрации, соответствующей пределу количественного определения

Линейность определяли путем регистрации площади пика для серии из 10 растворов СО с содержа-

нием госсипола в диапазоне концентраций от установленного ПКО до 0,002 мг/мл (150 % от выбранного верхнего допустимого предела содержания примеси в субстанции). Методом наименьших квадратов рассчитывали уравнение линейной регрессии зависимости площади пика от концентрации госсипола (мг/мл) и метрологические параметры уравнения линейной регрессии (рис. 5). Установлено, что между величиной площади пика и концентрацией госсипола существует линейная зависимость на всем диапазоне концентраций госсипола. Результаты, полученные в ходе исследования линейности, соответствуют установленным критериям приемлемости.

При последующих валидационных испытаниях определяли свободный госсипол в модельных смесях, добавляя заданные количества раствора СО госсипола к испытываемому раствору субстанции.

Правильность методики устанавливали методом добавок на испытываемых модельных растворах субстанции «Кагоцел» с добавлением к ним известных концентраций СО госсипола. При этом использовали модельные смеси с концентрациями специфической примеси на уровне ПКО, а также равные 100 и 150% от установленного верхнего значения предельного содержания госсипола в субстанции «Кагоцел» (0,005%), что соответствовало 0,00005 • ПКО, а именно 0,00500% и 0,00750% от рабочей концентрации субстанции «Кагоцел» в испытываемых растворах (табл. 2). Согласно результатам исследования, полученная открываемость находится в пределах установленной для валидационных испытаний нормы. Доверительный интервал включает 100% значение, что исключает наличие систематической погрешности. Следовательно, данная методика обладает достаточной правильностью для достижения удовлетворительных результатов в количественном определении госсипола в субстанции «Кагоцел».

Прецизионность методики оценивали, определяя сходимость результатов путем повторения анализа на 6 пробах одним химиком в один день на

Таблица 1

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОССИПОЛА

№	Концентрация госсипола, мг/мл	Сигнал	Соотношение сигнал:шум
1	$4,44 \cdot 10^{-6}$	-(*)	-(*)
2	$8,89 \cdot 10^{-6}$	-(*)	-(*)
3	$1,56 \cdot 10^{-5}$	0,2805	14
4	$2,22 \cdot 10^{-5}$	0,4644	24
5	$2,89 \cdot 10^{-5}$	0,7393	38
6	$3,56 \cdot 10^{-5}$	0,8231	42

Примечание: Звездочка – величина сигнала не превышала уровень шума.

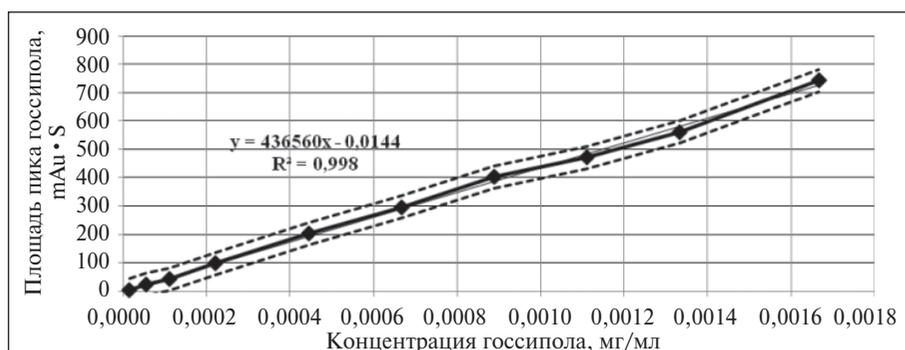


Рис. 5. График зависимости площади пика от концентрации госсипола

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ГОССИПОЛА В РАСТВОРАХ СУБСТАНЦИИ

№	Содержание госсипола, % от установленного предельного содержания	Значение площади пика, мАл · s	Общее найденное количество госсипола, %	Количество добавленного госсипола, %	Найденное количество госсипола за вычетом исходного, %	Открываемость, %
1	1,5 (соотв. ПКО)	226,7	0,0025	0,0001	0,0001	100,0
		226,0	0,0025		0,0001	100,0
		229,4	0,0025		0,0001	100,0
2	100	683,5	0,0075	0,0052	0,0051	98,1
		713,7	0,0078		0,0054	103,8
		690,4	0,0076		0,0052	100,0
3	150	958,4	0,0105	0,0078	0,0081	103,8
		954,6	0,0105		0,0081	103,8
		966,6	0,0106		0,0082	105,1
Среднее значение						101,6
Стандартное отклонение						2,5
Относительное стандартное отклонение, %						2,4
Доверительный интервал среднего значения (p=95%)						99,7–103,5

одном оборудовании, а также определяя внутрилабораторную прецизионность (табл. 3) при анализе в одной лаборатории одной и той же пробы с полным повторением процедуры приготовления пробы и выполнения измерений другим химиком. Сходимость оценивали путем расчета относительного стандартного отклонения (RSD), полученного по 6 последовательным определениям, выполненным одним химиком в один день. Оценку внутрилабораторной прецизионности при установленном доверительном интервале определяли по 2 критериям: F-критерию Фишера и t-критерию Стьюдента. Выяснили, что методика обладает хорошей сходимостью (RSD менее 10%) и внутрилабораторной прецизионностью в результате выполнения всех критериев приемлемости.

В ходе исследования робастности методики было установлено, что варьирование параметров хроматографирования [рН 2,45–2,50, состав подвижной фазы (% ацетонитрила $\pm 2\%$), температура колонки $\pm 5^\circ\text{C}$, скорость подвижной фазы $\pm 0,2$ мл/мин] не оказывает значительного влияния на количество найденного госсипола в субстанции «Кагоцел». Относительное стандартное отклонение не превышает 20,0%. Методика неробастна к изменению рН выше 2,5 (при приготовлении подвижной фазы рН=2,55 наблюдалось выпадение кристаллов соли). Результат количественного определения госсипола в субстанции «Кагоцел»

не зависит от изменения времени экстракции в пределах 15 ± 5 мин.

Разработанная методика была успешно апробирована в системе контроля качества при производстве фармацевтической субстанции «Кагоцел» и использована для ретроспективного анализа хранящихся архивных образцов ранее произведенных серий субстанции (2013–2015 гг. выпуска). В ходе проведенного анализа 150 образцов (серий) субстанции установлено, что обнаруживаемое количество свободного госсипола варьировало в пределах от 0,0002 до 0,0030%, т.е. на уровне, в 20–100 меньше установленного ГФ РФ XIII и контролируемого порога содержания примесей в фармацевтических субстанциях (0,05%). Такое низкое содержание обнаруживаемых минимальных примесей госсипола (что соответствует количеству госсипола в максимальной суточной дозе препарата от 0,0001 до 0,002 мг) обеспечивает гарантированную безопасность препарата «Кагоцел®» в соответствии с инструкцией по медицинскому применению лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с современными фармакопейными требованиями проведены валидационные исследования разработанной высокочувствительной и специфичной ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел». Значения всех валидационных характеристик соответствуют установленным критериям приемлемости.

Показано, что методика позволяет надежно детектировать примеси свободного госсипола в субстанции «Кагоцел» с высокой достоверностью и правильностью при их содержании свыше $1,56 \cdot 10^{-5}$ мг/мл. Указанная чувствительность методики соответствует данным зарубежных публикаций по ВЭЖХ-анализу содержания госсипола [8–10, 12]. Весь госсипол, вносимый извне в субстанцию, надежно и правильно выявляется в этом комплексе, что свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции свободных молекул госсипола на полимерной матрице субстанции.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Сайиткулов А.М. Индукторы интерферона растительного происхождения: автореф. дис. докт. биол. наук. М., 1995. (Sajitkulov A.M. Interferon inducers of plant origin: author. dis. doctor. Biol. Sciences. Moscow, 1995 (in Russian)).
2. Wang X., Howell C.P., Chen F., Yin J., Jiang Y. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2009; 58: 215–63.
3. Лавренова Г.В., Лавренев В.К. Энциклопедия лекарственных растений. Том 2. Донецк: Донеччина, 1997. (Lavrenova G.V., Lavrenov V.K. Encyclopedia of medicinal plants. Tom 2. Doneck: Donechchina, 1997 (in Russian)).
4. Eagle E.; Bialek H.F.; Davies D.L., Bremer J.W. Biological vs. chemical evaluation of toxicity and protein quality of cottonseed meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1956; 33: 15–20.
5. Lordelo M.M., Davis A.J. Calhoun M.C., Dowd M. K., Dale N.M. Relative toxicity of gossypol enantiomers in broilers. *Poult. Sci.*, 2005; 84: 1376–82.
6. Auelbekov S.A., Mirzaabdullaev A.B., Aslanova D.K.. Synthesis and antiviral activity of gossypol derivatives. *Pharm Chem J.*, 1985; 19 (7): 479–81.

Таблица 3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСИ ГОССИПОЛА В СУБСТАНЦИИ «КАГОЦЕЛ»

№	Найденное количество госсипола, %	
	химик 1	химик 2
1	0,0027	0,0026
2	0,0027	0,0026
3	0,0027	0,0025
4	0,0028	0,0026
5	0,0025	0,0027
6	0,0022	0,0022
n	6	6
Среднее	0,0026	0,0025
Стандартное отклонение	0,0002	0,0002
Относительное стандартное отклонение, %	8,1	7,1
Расчетный критерий Фишера	1,4	
Табличный критерий Фишера F (p=95%, 5, 5)	5,05	
Расчетный критерий Стьюдента $t_{\text{расч.}}$	0,63	
Табличный критерий Стьюдента $t_{\text{табл.}}$ (p=95%, 10)	2,23	

7. Тилжабаев К.З., Камаев Ф.Г., Выпова Н.А. Синтез, структура и «острая» токсичность несимметричных альдегидных производных госсипола. Биорг. химия, 2010; 36 (3): 423–8. (Tiljabaev K.Z., Kamaev F.G., Vypova N.L. Synthesis, structure and «acute» toxicity of the asymmetric aldehyde derivatives of gossypol. Bioorg. himija, 2010; 36 (3): 423–8 (in Russian)).

8. Wang M.-Z. Analysis of gossypol by high performance liquid chromatography. J. Ethnopharmacology, 1987; 20 (1): 1–11.

9. Yingran C., Hong Z., Zeng Y. An optimized gossypol high-performance liquid chromatography assay and application in evaluation of different gland genotypes of cotton. J. Biosci., 2004; 29 (1): 101–5.

10. Chandrashekar R., Karunakar R. K., Jyothi C. P., Lakshmi B. N. Gossypol Analysis in Bt and Non-Bt Cotton Seed Extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). International Journal of Herbal Medicine, 2013; 1 (2): 53–8.

11. Sprogøe K., Stärk ., Ziegler H.L. Combining HPLS-PDA-MS-SPE-NMR with circular dichroism for complete natural product characterization in crude extracts: levorotatory gossypol in *Thespesia danis*. J. Nat. Prod., 2008; 71: 516–9.

12. Hron R.J., Kuk M.S., Abraham G. Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography. J. Am. Oil Chem. Soc., 1990; 67 (3): 182–7.

13. Hron R.J., Kim H.L., Calhoun M.C., Fisher G.S. Determination of (+)-, (-)-, and total gossypol in cottonseed by high-performance liquid chromatography. Am. Oil Chem. Soc., 1999; 76 (11): 1351–5.

14. Food and Drug Administration. Food and drug administration department of health and services. Code of Federal Regulations, 2016; 1 (21).

15. Preparation of edible cotton seed protein concentrates. Guideline for edible cottonseed protein flours and related products. WHP guideline. PAG Guidelines № 4. Food and Nutrition Bulletin, 1980; 2 (3): 60.

16. Scientific opinion. Gossypol as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal, 2008; 908: 1–55.

Поступила 9 августа 2016 г.

VALIDATION OF HPLC PROCEDURE FOR DETERMINATION OF GOSSYPOL IN THE SUBSTANCE KAGOCEL

I.V. Kiseleva¹; Professor B.A. Rudoy¹, PhD; Professor A.V. Pirogov², PhD; N.G. Tolmacheva²

¹ООО «NIARMEDIK PLYUS»; 12, Aircraft Designer Mikoyan St., Moscow 125252, Russian Federation

²Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; 1, Leninsky Gory, Build. 3, GSP-1, Moscow 119991, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. The molecules of gossypol, a natural polyphenolic compound present in the cotton plant, are used to synthesize the antiviral drug Kagocel®. The higher dose of gossypol may exhibit toxic properties. Each batch of the produced substance must be necessarily checked for free gossypol content in the final product.

Objective: To conduct validation studies of the developed HPLC procedure for determining the impurities of free gossypol, which should be included in a quality control system when manufacturing the pharmaceutical substance Kagocel.

Material and methods. The pharmaceutical substance Kagocel was an investigation subject. Gossypol impurities were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometric detection.

Results. The highly sensitive and specific HPLC procedure for determining free gossypol in the substance Kagocel was validated in accordance with the current pharmacopoeial requirements. All validation parameters meet the acceptance criteria.

Conclusion. The procedure can reliably detect, with a high degree of accuracy, free gossypol impurities being more than $1.56 \cdot 10^{-5}$ mg/ml in the substance Kagocel.

Key words: gossypol, Kagocel, high performance liquid chromatography, validation.