

Н. Е. Кузьмина, С. В. Мусеев, В. И. Крылов,  
А. С. Дерябин, В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ “БУСЕРЕЛИНА АЦЕТАТ” МЕТОДОМ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051,  
Москва, Петровский бульвар д. 8, стр. 2

Оценена специфичность различных вариантов методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции “бусерелина ацетат” методом ЯМР спектроскопии путем сравнительного анализа спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  бусерелина ацетата и [5-*D*-тирозин]бусерелина ацетата в различных растворителях. Найдено, что максимальное различие в спектральных данных диастереомеров наблюдается при использовании дейтерированной воды в качестве растворителя. Показано влияние растворителя и внутримолекулярных невалентных взаимодействий на обменные прототропные превращения в L-гистидиновом фрагменте анализируемых олигомеров. От скорости прототропной таутомерии зависит ширина сигналов данной аминокислоты в спектрах  $^{13}\text{C}$ . Рекомендовано использовать в фармакопейном анализе вариант методики, основанный на  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии (растворитель —  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**Ключевые слова:** бусерелина ацетат; ЯМР спектроскопия; валидация аналитической методики; специфичность; прототропная таутомерия имидазолов.

Бусерелина ацетат (БА) является синтетическим аналогом естественного гонадотропин-рилизинг гормона. В медицине он используется при лечении онкологических заболеваний, бесплодия, эндометриоза и гиперпластических процессов эндометрия [1–3]. По своему строению бусерелина ацетат представляет собой нонапептид 5-оксо-*L*-пролил-*L*-гистидил-*L*-триптофил-*L*-серил-*L*-тирозил-*O*-*трет*-бутил-*D*-серил-*L*-лейцил-*L*-аргинил-*L*-пролил-*N*-этилаид ацетат). В соответствии с Европейской фармакопеей подлинность БА подтверждают методом ЯМР спектроскопии сравнением спектра испытуемого образца со спектром фармакопейного стандартного образца (ФСО), снятого в идентичных условиях [4]. Следует отметить, что в случае олигопептидов возможна альтернативная процедура, которая заключается в идентификации соединения напрямую, когда на основе данных 1D и 2D спектров ЯМР устанавливают аминокислотный состав и последовательность соединения аминокислот в олигопептидной цепи. Методика, основанная на самостоятельной структурной интерпретации спектральных данных, не требует использования ФСО, которые в настоящее время в нашей стране не производятся. Применение методик подобного типа в фармакопейном анализе соответствует целям импортозамещения.

Ранее нами были разработаны 4 варианта методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции БА методом ЯМР спектроскопии без использования ФСО с вариацией наблюдаемого ядра ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ) и растворителя ( $\text{D}_2\text{O}$  и  $\text{DMCO-d}_6$ ) [5]. Цель данного исследования — валидация разработанной методики и выбор наиболее селективного варианта, обеспечивающего максимальное разделение сигналов основ-

ного компонента и родственных примесей в субстанции БА.

### Экспериментальная часть

Валидацию методики проводили с использованием образца лекарственной субстанции БА (серия 02042017) и рабочего стандартного образца примеси D БА — [5-*D*-Тур]БА (серия 01042016) производства ЗАО “Ф-Синтез”, Россия. В 0,5 мл дейтерированного растворителя ( $\text{D}_2\text{O}$  или  $\text{DMCO-d}_6$ ) производства Cambridge Isotope Laboratories, Inc., растворяли 10 мг анализируемого образца (точная навеска не обязательна). В водный раствор прибавляли 10 мкл аналитического стандарта 1,4-диоксана производства Fluka для калибровки шкалы химических сдвигов ( $\delta$ ). Регистрацию спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H-}^1\text{H}$  gCOSY,  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  gHSQC,  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  gHMBC проводили на ЯМР спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) с 5 мм мультиядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой. Параметры эксперимента: температура — 25 °С, ширина спектра — 12 ( $^1\text{H}$ ) и 200 ( $^{13}\text{C}$ ) м.д., угол поворота намагниченности — 45°, время релаксации — 5 ( $^1\text{H}$ ) и 1 с ( $^{13}\text{C}$ ), количество накоплений сигнала свободной индукции — 4 ( $^1\text{H}$ ) и 2000 ( $^{13}\text{C}$ ), число точек аналого-цифрового преобразования — 64к, экспоненциальное умножение — 0,3 ( $^1\text{H}$ ) и 3,0 Гц ( $^{13}\text{C}$ ), автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы, калибровка шкалы  $\delta$  под  $\text{DMCO}$  ( $\delta = 2,50$  ( $^1\text{H}$ ) и 39,52 ( $^{13}\text{C}$ ) м.д.) и диоксан ( $\delta = 3,75$  ( $^1\text{H}$ ) и 67,19 ( $^{13}\text{C}$ ) м.д.) [6].

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  БА и [5-*D*-Тур]БА в различных растворителях

№ атома	DMCO-d <sub>6</sub> , δ, м.д.		D <sub>2</sub> O, δ, м.д.	
	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА
<b>5-оксо-<i>L</i>-Pro</b>				
1	172,18	172,23	175,14	175,22
2	55,47	55,49	57,16	57,21
3	25,15	25,15	25,69	25,68
4	29,04	29,06	29,75	29,70
5	177,44	177,45	182,65	182,68
<b><i>L</i>-His</b>				
6	170,83	170,97	171,99	173,05
7	52,85	52,93	53,22	54,37
8	29,52	н/н	27,28	29,04
9	н/н	н/н	129,79	н/н
10	134,77	134,79	134,63	136,38
11	н/н	н/н	117,66	н/н
<b><i>L</i>-Trp</b>				
12	171,51	171,43	173,85	173,68
13	53,46	53,52	55,11	54,92
14	27,41	27,32	27,79	27,48
15	109,92	109,97	109,26	109,14
16	127,36	127,36	127,61	127,55
17	118,40	118,41	118,83	118,81
18	118,14	118,14	119,97	119,97
19	120,74	120,74	122,56	122,60
20	111,17	111,19	112,47	112,47
21	136,00	136,01	136,77	136,71
22	123,61	123,69	125,04	124,99
<b><i>L</i>-Ser</b>				
23	169,64	169,60	171,26	171,84
24	55,21	55,59	56,03	56,17
25	61,55	61,75	61,80	61,80
<b><i>L</i>-(<i>D</i>)-Tyr</b>				
26	170,83	169,87	173,36	173,11
27	54,16	54,37	56,45	55,47
28	36,93	36,46	36,73	36,70
29	127,41	127,61	128,17	128,48
30,34	130,18	130,20	131,19	131,23
31,33	114,78	114,82	116,12	116,03
32	155,82	155,76	155,31	155,15
<b><i>D</i>-Ser-<i>O</i>-tert-Bu</b>				
35	169,30	169,41	172,11	171,95
36	53,15	53,52	54,37	54,74
37	61,70	61,75	61,56	61,77
38	72,65	72,75	75,39	75,78
39 – 41	27,03	27,02	26,99	27,01
<b><i>L</i>-Leu</b>				
42	171,82	171,81	174,63	174,55
43	50,76	50,80	52,79	52,74
44	40,84	40,96	40,48	40,55
45	23,79	23,81	24,75	24,79
46	21,32	21,38	21,32	21,30
47	23,25	23,26	22,86	22,83
<b><i>L</i>-Arg</b>				
48	170,68	170,68	171,85	171,69
49	50,18	50,21	51,70	51,68
50	27,97	27,96	28,18	28,19
51	24,45	24,41	24,68	24,67
52	40,48	40,42	41,19	41,19
53	157,12	157,31	157,23	157,16
<b><i>L</i>-Pro-<i>N</i>-этилаид</b>				
54	171,18	171,19	174,15	174,18

№ атома	DMCO-d <sub>6</sub> , δ, м.д.		D <sub>2</sub> O, δ, м.д.	
	БА	[5-D-Тур]БА	БА	[5-D-Тур]БА
55	59,64	59,72	61,42	61,42
56	29,26	29,26	30,04	30,06
57	24,50	24,52	25,19	25,18
58	46,73	46,70	48,50	48,51
59	33,30	33,31	35,04	35,05
60	13,10	14,63	14,10	14,08
<b>Уксусная кислота</b>				
1a	22,40	24,67	23,38	23,87
2a	173,35	175,62	181,14	182,03

### Результаты и их обсуждение

Единственной валидационной характеристикой аналитических методик идентификации соединений

является специфичность — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут находиться в образце [7]. Специфичность аналитической методики

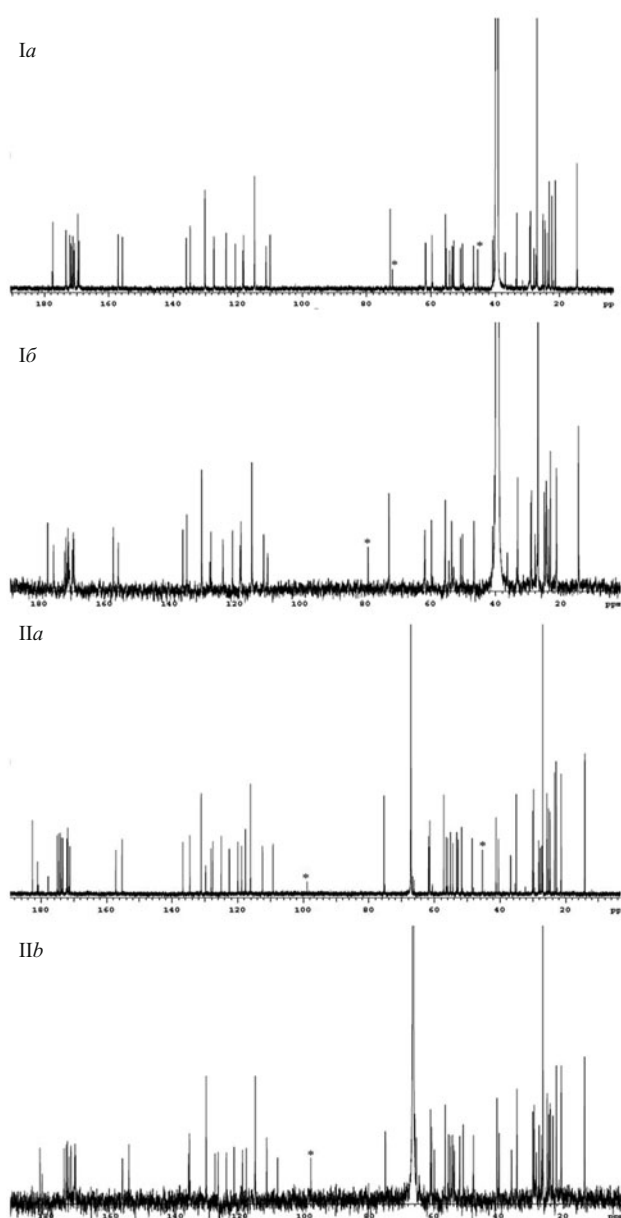


Рис. 1. Спектры <sup>13</sup>C БА (а) и [5-D-Тур]БА (б) в DMCO-d<sub>6</sub> (I) и D<sub>2</sub>O (II). \* Сигналы примеси.

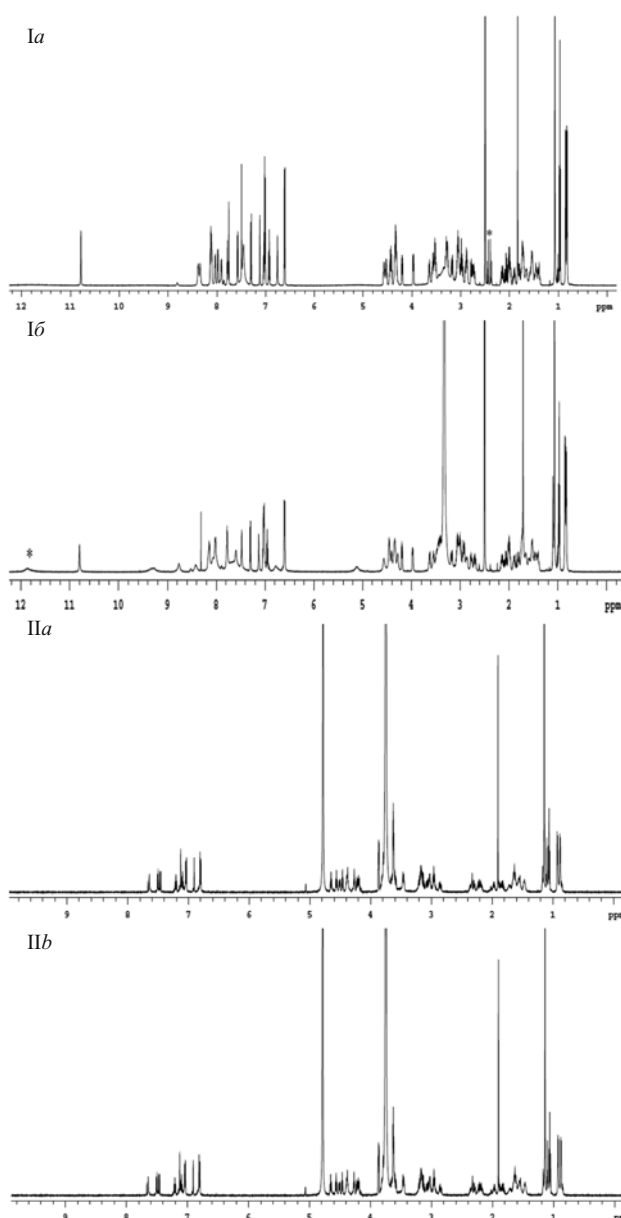


Рис. 2. Спектры <sup>1</sup>H БА (а) и [5-D-Тур]БА (б) в DMCO-d<sub>6</sub> (I) и D<sub>2</sub>O (II). \* Сигналы примеси.

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  БА и [5-*D*-Тур]БА в различных растворителях

№ атома	DMCO-d <sub>6</sub> , δ, м.д.		D <sub>2</sub> O, δ, м.д.	
	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА
<b>5-оксо-<i>L</i>-Pro</b>				
2	3,97 дд	3,98 дд	4,19 дд	4,19 м
3	1,75 м, 2,15 м	1,75 м, 2,15 м	1,66 м, 2,36 м	1,66 м, 2,35 м
4	2,17 м, 2,23 м	2,06 м, 2,01 м	2,27 м, 2,33 м	2,23 м, 2,30 м
2-NH	7,75 с	7,77 с		
<b><i>L</i>-His</b>				
7	4,43 м	4,41 м	4,64 дд	4,57
8	2,79 дд, 2,89 дд	2,77 дд, 2,87 уш. д	3,04 дд, 3,14 дд	2,96 м
10	7,49 с	7,49 с	8,37 с	7,64 уш.с.
11	6,76 с	6,78 уш.с.	7,13 с	6,91 с
7-NH	7,98 д	8,02 уш.с.		
9-NH	8,34 с	8,31 с		
<b><i>L</i>-Trp</b>				
13	4,57 м	4,57 м	4,69 дд	4,65 дд
14	2,97 м, 3,18 м	2,94 м, 3,18 м	3,19 м, 3,23 м	3,19 м
17	7,57 д	7,60 д	7,57 д	7,51 д
18	6,93 дд	6,95 дд	7,12 дд	7,10 дд
19	7,03 дд	7,03 м	7,23 дд	7,21 дд
20	7,30 д	7,30 д	7,48 д	7,46 д
22	7,12 с	7,12 с	7,18 с	7,12 с
13-NH	8,14 д	8,06 уш. с		
21-NH	10,79 с	10,80 с		
<b><i>L</i>-Ser</b>				
24	4,32 м	4,28 м	4,33 дд	4,27 дд
25	3,51 м, 3,57 м	3,41 м, 3,47 м	3,69 дд, 3,71 дд	3,63 м, 3,48 м
24-NH	8,39 д	8,42 уш. с		
25-OH	5,15 уш. с	5,15 уш. с.		
<b><i>L</i>-(<i>D</i>)-Tyr</b>				
27	4,53 м	4,46 м	4,37 м	4,51 дд
28	2,74 м, 2,87 м	2,70 м, 2,92 м	2,88 дд, 2,96 дд	3,07 дд, 2,86 дд
30,34	7,01 д	7,02 д	7,07 д	7,04 д
31,33	6,61 д	6,60 д	6,83 д	6,81 д
27-NH	7,91 д	8,02 уш. с		
32-OH	8,81 уш. с	8,81 уш. с		
<b><i>D</i>-Ser-<i>O</i>-tert-Bu</b>				
36	4,34 м	4,34 м	4,30 дд	4,46 дд
37	3,28 м	3,28 м	3,22 м, 3,50 м	3,63 м
39 – 41	1,07 с	1,07 с	1,10 с	1,14 с
36-NH	8,03 д (J = 7,6)	8,02 д (J = 7,6)		
<b><i>L</i>-Leu</b>				
43	4,33 м	4,35 м	4,38 м	4,39 м
44	1,40 м, 1,46 м	1,41 м, 1,46 м	1,56 м, 1,64 м	1,63 м, 1,55 м
45	1,66 м	1,66 м	1,55 м	1,62 м
46	0,82 д	0,83 д	0,85 д	0,88 д
47	0,85 д	0,85 д	0,90 д	0,92 д
43-NH	8,11 д	8,15 д		
<b><i>L</i>-Arg</b>				
49	4,45 м	4,45 м	4,46 дд	4,40 м
50	1,54 м, 1,72 м	1,59 м, 1,71 м	1,64 м, 1,77 м	1,72 м, 1,59 м
51	1,54 м	1,53 м	1,54 м	1,47 м
52	3,06 м	3,03 м	3,11 м	3,03 м
49-NH	8,13 д	8,14 м		
53-NH <sub>2</sub>	7,45 уш. с	7,65 уш. с		
<b><i>L</i>-Pro-<i>N</i>-этиламид</b>				
55	4,20 дд	4,19 дд	4,22 дд	4,22 дд
56	1,73 м, 2,00 м	1,72 м, 2,00 м	1,84 м, 2,18 м	2,18 м, 1,83 м
57	1,81 м, 1,90 м	1,81 м, 1,90 м	1,88 м, 1,98 м	1,97 м, 1,89 м
58	3,54 м, 3,65 м	3,55 м, 3,63 м	3,50 м, 3,65 м	3,62 м, 3,46 м
59	3,00 м, 3,07 м	3,00 м, 3,07 м	3,17 м	3,16 м

№ атома	DMCO-d <sub>6</sub> , δ, м.д.		D <sub>2</sub> O, δ, м.д.	
	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА	БА	[5- <i>D</i> -Тур]БА
60	0,97 τ	0,97 τ	1,06 τ	1,06 τ
59-NH	7,79 д	7,78 м		
<b>Уксусная кислота</b>				
1a	1,83 с	1,71 с	1,94 с	1,91 с

подтверждается доказательством того, что действующее вещество фармацевтической субстанции достоверно выявляется в присутствии примесей [8]. В случае методики, основанной на ЯМР спектроскопии, необходимо показать отсутствие полного перекрытия сигналов основного и примесного соединений в ЯМР-спектре. Самым сложным вариантом для разделения сигналов является смесь диастереомеров, поэтому выбор наиболее селективного варианта методики подтверждения подлинности БА проводили, сравнивая спектральные данные БА и [5-*D*-Тур]БА. Спектры <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H БА и его диастереомера в различных растворителях приведены на рис. 1, 2.

Видно, что спектры <sup>13</sup>C (практически не перекрывающиеся синглеты) характеризуются большей разрешенностью по сравнению со спектрами <sup>1</sup>H (частично или полностью перекрывающиеся мультиплеты алифатических структурных фрагментов олигопептидов), что делает их более пригодными для идентификации аминокислотного состава и аминокислотной последовательности в БА.

Структурная интерпретация спектральных данных, проведенная по описанному алгоритму [5], представлена в табл. 1 и 2, нумерация атомов соответствует рис. 3. Отклонения в положении сигналов диастереомеров считали значимыми, если разница в величинах δ превышала 0,1 м.д. для <sup>1</sup>H и 0,5 м.д. для <sup>13</sup>C [9].

Как видно из табл. 1 и рис. 1, в спектрах <sup>13</sup>C (DMCO-d<sub>6</sub>) БА и [5-*D*-Тур]БА максимальное расхождение в положении сигналов (Δδ = 2,27 м.д.) наблюдается для карбоксильной группы ацетат-аниона. Полученный результат подтверждает сделанный нами ранее вывод [5]: рекомендация Европейской фармакопеи [10] использовать в качестве эталона для калибровки шкалы δ ацетат-анион, присутствующий в образцах олигопептидов, не корректна. Сигналы аминокислот 2 диастереомеров практически совпадают, за исключением 5-Тур (Δδ амидной группы составляет 0,96 м.д.). При смене растворителя картина меняется кардинально. Во-первых, в спектрах <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) диастереомеров значимое расхождение в положении сигналов наблюдается не только для ацетат-аниона (Δδ = 0,89 м.д.) и 5-Тур (Δδ α-CH = 0,98 м.д.), но и для 4-*L*-Сер (Δδ амидной группы 0,98 м.д.) и 2-*L*-His (Δδ = 1,76 – 1,06 м.д.). Во-вторых, в спектре <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) [5-*D*-Тур]БА, в отличие от соответствующего спектра БА, отсутствуют сигналы углеродных ядер в позициях 4 и 5 имидазольного фрагмента 2-*L*-His. Ранее мы наблюдали такое явление исключительно в растворах ДМСО и объясняли его замедлением прототропной таутомерии в 4-замещенном имидazole вследствие невалентных взаимодействий с участием имидазольного протона и протоноакцепторного растворителя [5]. Факт, что для [5-*D*-Тур]БА замена ДМСО на воду не ведет к ускорению протонного обмена, позволяет предположить наличие внутримо-

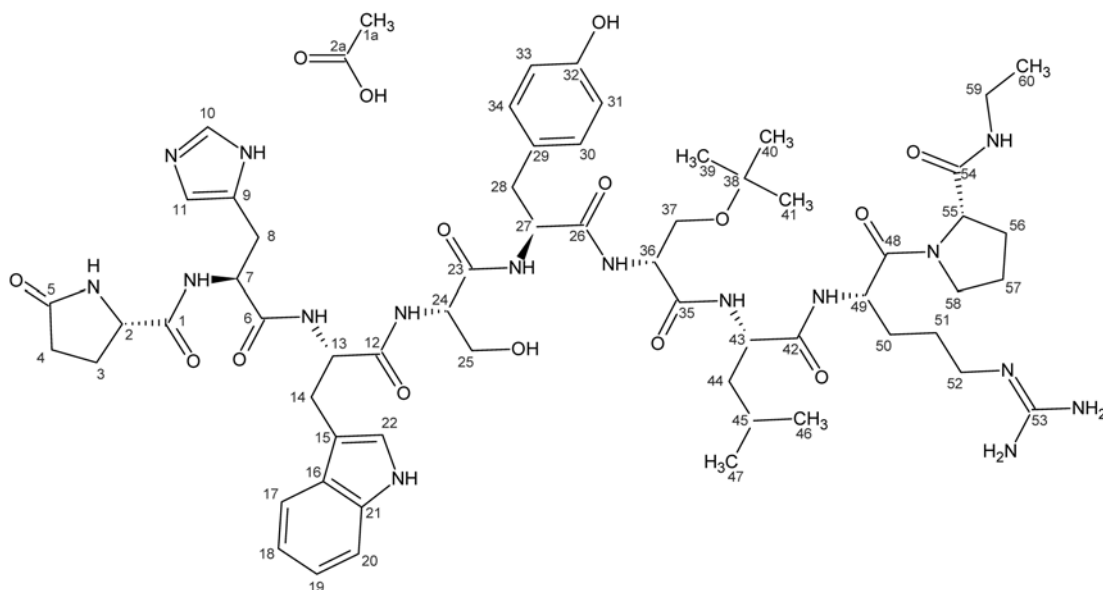


Рис. 3. Нумерация структурных фрагментов в молекуле БА.

лекулярного взаимодействия с участием 4-замещенного имидазола, которое и замедляет скорость прототропной таутомерии. По-видимому, изменение пространственной ориентации 5-Туг вызывает перестройку системы невалентных взаимодействий в олигопептиде, в результате которой происходит усиление неэквивалентности электронного окружения углеродных ядер в позициях 4 и 5 имидазольного цикла и, как следствие, уширение соответствующих сигналов до критического соотношения S/N (их видимое отсутствие). Доказательством различной вовлеченности 2-*L*-His в систему внутримолекулярных невалентных взаимодействий в водных растворах БА и [5-*D*-Туг]БА является существенное различие в величинах  $\delta$  его сигналов в диастереомерах. В ДМСО этого не наблюдается. Можно предположить, что перестройка системы внутримолекулярных невалентных взаимодействий затрагивает и амидную группу 4-*L*-Ser, что вызывает сдвиг ее сигнала в слабую область поля.

Аналогично спектрам  $^{13}\text{C}$ , в спектрах  $^1\text{H}$ , снятых в ДМСО- $d_6$ , наблюдается существенное различие в положении сигналов ацетат-аниона ( $\Delta\delta = 0,12$  м.д.) и 5-Туг ( $\Delta\delta = 0,14 - 0,11$  м.д.). Характерной особенностью протонных спектров в ДМСО- $d_6$  является зависимость сигналов аминных и гидроксильных протонов от pH анализируемого образца. Так, присутствующая в образце [5-*D*-Туг]БА уксусная кислота (допускается НД) влияет на форму и положение сигналов ОН-групп в 5-*D*-Туг и 4-*L*-Ser,  $\text{NH}_2$ -группы в 8-*L*-Arg. Несовпадение сигналов спектров из-за допускаемых НД различий в pH образцов, а не из-за различий в их строении, является препятствием для использования данного варианта методики подтверждения подлинности БА в фармакопейном анализе.

Сравнительный анализ спектров  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) БА и [5-*D*-Туг]БА выявил значительное расхождение в величинах  $\delta$  в 2-*L*-His ( $\Delta\delta = 0,73 - 0,22$  м.д.), 4-*L*-Ser ( $\Delta\delta = 0,21$  м.д.), 5-Туг ( $\Delta\delta = 0,14 - 0,11$  м.д.), 6-*O*-tBu-*D*-Ser ( $\Delta\delta = 0,16$  м.д.). Этот факт подтверждает сделанное на основе  $^{13}\text{C}$  спектральных данных предположение о перестройке системы внутримолекулярных

невалентных взаимодействий в олигопептиде при изменении пространственной ориентации 5-Туг с *L* на *D*.

Таким образом, валидирована методика подтверждения подлинности БА методом ЯМР спектроскопии. Использование  $\text{D}_2\text{O}$  в качестве растворителя обеспечивает ее большую селективность по сравнению с ДМСО- $d_6$  на обоих ядрах ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ). Выбор ядра  $^{13}\text{C}$  дает возможность получить более разрешенный спектр с практически не перекрывающимися сигналами структурных фрагментов аминокислот олигопептида. Поэтому в фармакопейном анализе целесообразнее использовать вариант методики  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. I. Mezo, S. Lovac, I. Palyi, et al., *J. Med. Chem.*, **40**(21), 3353 – 3358 (1997).
2. Л. Х. Хасханова, М. И. Пиддубный, И. М. Ордянец и др., *Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология*, № 1, 225 – 227 (2002).
3. Е. Ю. Сафронова, А. А. Крашенинников, С. А. Сергиенко и др., *Исслед. и практика в медицине*, **4**(2), 23 – 28 (2017).
4. Monograph 01 / 2017:1077 *Buserelin*, in: *European Pharmacopoeia*, 9th ed., Vol. 1, European Department for the Quality of Medicines & Health Care, Strasbourg (2016), pp. 1887 – 1889.
5. Н. Е. Кузьмина, С. В. Моисеев, В. И. Крылов и др., *Антибиот. и химиотер.*, **62**(7 – 8), 40 – 46 (2017).
6. Н. Е. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **62**(21), 7512 – 7515 (1997).
7. Н. В. Юргель (ред.), *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации)*, Спорт и культура-2000, Москва (2007).
8. В. В. Береговых (ред.), *Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, Литерра, Москва (2008).
9. ОФС. 1.2.1.1.0007.15, *Спектроскопия ядерного магнитного резонанса*, в: ГФ РФ, XIII изд., т. 1, Изд-во Министерства здравоохранения РФ, Москва (2015), сс. 396 – 407.
10. General monograph 2.2.64, *Peptide identification by nuclear magnetic resonance*, in: *European Pharmacopoeia*, 9th ed., Vol. 1, European Department for the Quality of Medicines & Health Care, Strasbourg (2016), p. 112.

Поступила 16.01.18

## VALIDATION OF THE METHOD FOR AUTHENTICITY CONFIRMATION OF BUSERELIN ACETATE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE BY NMR SPECTROSCOPY

N. E. Kuz'mina, S. V. Moiseev, V. I. Krylov, A. S. Deryabin, V. A. Yashkir, and V. A. Merkulov

Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 127051 Moscow, Russia

The specificity of different variants of the method of authenticity confirmation of buserelin acetate pharmaceutical substance by NMR spectroscopy was estimated by comparing  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of buserelin acetate and [5-*D*-tyrosine]buserelin acetate in various solvents. It was found that the maximum difference in the spectral characteristics of diastereomers is observed when deuterated water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) is used as solvent. It is established that the choice of solvent and the intramolecular non-valent interactions influence the exchange prototropic transformations in L-histidine fragments of the analyzed oligomers. The rate of prototropic tautomerism determines the signal width of this amino acid in  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. It is recommended to use the variant based on  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy with  $\text{D}_2\text{O}$  solvent in pharmacopoeal analysis.

**Keywords:** buserelin acetate; NMR spectroscopy; validation of analytical method; specificity; prototropic tautomerism of imidazoles.