

УДК 543.544

С. М. БРИЛЛИАНТЕ, Р. Л. ФИРОР, Ф. Л. ВИЛЛЕ,
И. Л. ЧАНГ, Д. ДЮБАЛД

ПАРОФАЗНЫЙ ГАЗО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ СОГЛАСНО ФАРМАКОПЕЕ США.

*ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОБОРУДОВАНИЯ HP
ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ*

Публикация (23) 5963-7109E

ПАРОФАЗНЫЙ АНАЛИЗ

Установлена высокая степень точности результатов и линейности отклика детектора, полученных при определении летучих органических примесей в фармацевтических препаратах с помощью парофазного пробоотборника HP 7694 HS, колонки HP INNOWax и газового хроматографа HP 6890. Определение примесей в субмикrogramмовых количествах и ниже легко достичь при выполнении условий, перечисленных в табл. 1.

Поскольку HP 7694 HS позволяет *одновременно встряхивать и нагревать до шести образцов* с программированием времени нагрева при постоянной температуре, с заранее установленным временем ввода пробы, образцы можно анализировать каждые 10 мин, что существенно повышает общую производительность анализа.

HP 7694 HS позволяет загружать до 44-х образцов с их последующим анализом в автоматическом режиме. Технический уход за испарителем сведен к минимуму, т. к. благодаря HS-вводу в ГХ-систему и капиллярную колонку попадают только летучие вещества.

These data show the high levels of precision and linearity that can be obtained for the determination of OVIs in bulk pharmaceutical substances using the HP 7694 headspace sampler, the HP-INNOWax column, and the HP 6890 Series GC. Detection in the sub-ppm to low-ppm levels are easily achievable using the optimum conditions listed in table 1. Because the HP 7694 allows up to six samples to be heated and shaken concurrently using a preprogrammed constant heating time (CHT) along with preset sample injection intervals, samples can be continuously analyzed every 10 minutes. Up to 44 samples at a time can be loaded into the HP 7694 for continuous sampling. Inlet maintenance is minimized as is capillary column maintenance because headspace injection ~~only~~ introduces volatiles into the GC system.

Введение

Методика 467 Фармакопеи США со времени ее внедрения в 1990 г. подвергалась различным изменениям [1]. В настоящее время определены 5 регламентируемых растворителей и порог их обнаружения [2–4]. Ниже представлены результаты и условия анализа этих летучих органических примесей в фармацевтических препаратах с применением Head Space (HS) (статического парофазного пробоотборника) – описанного в методике 467 Фармакопеи США. Здесь приведены экспериментальные условия применения пробоотборника HP 7694 (HS) с газовым хроматографом HP 6890 (ГХ), с вводом пробы в режиме деления потока, капиллярной колонкой HP INNOWax и пламенно-ионизационным детектором (ДИП). Для построения калибровочной кривой использовали образцы, содержащие предельно допустимые уровни концентраций этих растворителей в воде. В диапазоне концентраций (ниже предельно допустимых) были достигнуты высокая точность результатов и линейность отклика детектора.

Методика 467 Фармакопеи США включает пять отдельных методик для анализа летучих органических примесей в фармацевтических препаратах [5]. Эти методики предполагают три способа ввода исследуемых образцов в хроматограф:

- прямое введение пробы в инжектор – в режиме без деления потока: метод I и V;
- динамический парофазный метод (Purge & Trap): метод II и III;
- статический HS-метод IV [6].

Гьюдет и Сиверт [7], сравнивая результаты, полученные при введении пробы методами I и V, с данными HS-методики, пришли к выводу, что HS-методика предпочтительней и значительно чувствительней при определении хлороформа. Деннис с сотрудниками [8] указывают, что метод HS может применяться для исследования около 60 % фармацевтических препаратов. Обе группы отметили одно большое преимущество метода HS: в ГХ систему вводятся только летучие компоненты и, вследствие этого, инжектор, детекторы и колонка не загрязняются, что позволяет весьма существенно продлить непрерывную работу

газохроматографической системы без необходимости ее обслуживания (чистки или замены). Уилей и др.[9] показали преимущество использования новой модели парофазного пробоотборника HP 7694, по сравнению с ее предшественником HP 19395A, при оценке качества фармацевтических препаратов.

Чанг и др.[10] нашли оптимальное время наступления равновесия между жидкой и газовой фазами, а также температуру термостатирования для пяти летучих органических примесей при использовании парофазного пробоотборника HP 7694 с газовым хроматографом HP 5890 (серии II) и капиллярной колонки HP INNOWax. Настоящая работа выполнена на новом газовом хроматографе HP 6890, информация об условиях эксперимента содержится в ссылках [9, 10].

Ниже приведен перечень органических растворителей и их максимально допустимые концентрации в фармацевтических препаратах:

Бензол	—	100 ppm
Трихлорэтилен	—	100 ppm
Хлороформ	—	50 ppm
1,4-Диоксан	—	100 ppm

Примечание.

В 1991 г. Фармакопея США (USP – NF [3]) отменила анализ следов этиленоксида. Также было предложено поднять допустимый уровень содержания метилхлорида с 100 ppm до 500 ppm [11]. В 1993 г. настоятельно рекомендовалось включить в список USP ацетонитрил (50 ppm), 1,2-дихлорэтан (100 ppm) и пиридин (100 ppm). (Анализировать эти три вещества предложено Комиссией европейской фармакопеи и Японской фармацевтической ассоциацией).

Экспериментальная часть

Для приготовления концентрированного раствора, содержащего все пять растворителей, в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 90 мл метанола, затем прибавляли по 1,0 г метилхлорида, трихлорэтилена, бензола, 1,4-диоксана, и 0,5 г хлороформа. Раствор доводили метанолом до уровня 100 мл. Основной раствор хранился охлажденным, а рабочие стандартные растворы готовили ежедневно. Для того, чтобы получить раствор, содержащий 2 мг/мл метилхлорида, трихлорэтилена, диоксана, а также 1 мг/мл хлороформа, из основного раствора (после того, как раствор достигал комнатной температуры), отбирали 20 мл этого раствора и прибавляли к 100 мл воды, не содержащей органических примесей. Эти концентрации соответствуют уровням, которые были бы получены при растворении 100 мг лекарственного средства (содержащего максимально допустимые концентрации каждого растворителя) в 5 мл воды. Был приготовлен ряд рабочих стандартных растворов, чтобы можно было оценить линейность показаний детектора и пределы обнаруже-

ния каждого растворителя. Для этого в мерную колбу, содержащую 100 мл воды (без органических примесей), прибавляли 2 – 20 мкл основного раствора. Для проведения ГХ анализа аликвоты стандартных водных растворов объемом 5 мл помещали в сосуды вместимостью 20 мл, содержащие (1,0±0,1) г безводного сульфата натрия. Сосуды быстро закрывали тефлоновыми прокладками, которые герметично зажимались на горловине сосуда крышками из тонкого алюминия. Содержимое сосуда аккуратно перемешивали до возможно полного растворения сульфата натрия. Для анализа были выбраны три фармацевтические субстанции: хлорид натрия, аспирин и аскорбиновая кислота.

В табл. 1–3 представлены типы и характеристики используемого оборудования и приборов, параметры и условия анализа, выполняемого по методике 467 Фармакопеи США.

Таблица 1. Оборудование и условия анализа, используемые при выполнении метода 467 Фармакопеи США

Наименование оборудования	Типы и характеристики приборов
1	2
Газовый хроматограф	HP 6890 (с полным электронным управлением потоками газов ЭУПГ)
Испаритель	С делением/без деления потока
Колонка	HP INNOWax, 30 м x 0,53 мм x 1,0 мкм (HP 19095N-123)
Детектор	Пламенно-ионизационный (ДИП)
Ввод образца	HP 7694 парофазный пробоотборник, все поверхности на пути пробы к испарителю покрыты инертным материалом Silcosteel™
Сочленение HS с ГХ	HS – линия подачи газовой пробы вводится в хроматограф на расстоянии 40 мм от прокладки инжектора
Вспомогательный модуль ЭУПГ	Используется для достижения избыточного давления
Обработка данных	Автоматическая

Таблица 2. Параметры парофазного пробоотборника HP 7694 HS

Режимы работы	Значения показателей
Температура термостата, °C	80
Температура HS-линии, °C	110

1	2
Температура петли, °C	90
Время достижения равновесия, мин	40
Режим встряхивания	Интенсивный
Размер петли, мл	1,0
Время наполнения петли, с	0,15
Время ввода пробы, мин	0,30
Давление в сосуде с пробой, Па (от HP6890)	10,0
Время приложения избыточного давления в сосуде с пробой, мин	0,1

Таблица 3. Параметры ГХ анализа на приборе HP 6890

Режимы работы	Значения показателей
1	2
Газ-носитель	Гелий
Температура испарителя, °C	250
Давление в испарителе, Па	5,0
Скорость потока газа-носителя, мл/мин	6,89
Линейная скорость потока газа-носителя через колонку, см/с	48 (постоянная скорость потока)
Деление потока (при вводе пробы)	1:10
Температура детектора, °C	300
Скорость потока водорода, мл/мин	40,0
Скорость потока воздуха, мл/мин	450,0
Скорость потока вспомогательного газа, мл/мин	30,0
Температурная программа:	
– изотермический режим в течение 3,5 мин, °C	50
– программирование температуры со скоростью 10 °C/мин, °C, не более	60
– изотермический режим, °C	60
– программирование температуры со скоростью 40 °C/мин, °C, не более	190
– изотермический режим в течение 1 мин, °C	190

Примечание. Все вещества выходят из колонки за время до 5 мин.
Дополнительное время давалось для того, чтобы из ГХ системы гарантированно вышли другие неизвестные вещества (из образцов).

Обсуждение результатов

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма пяти летучих веществ, полученная при исследовании рабочего стандартного раствора согласно методике 467 Фармакопеи США, метод IV (см. табл. 1.) Концентрация хлороформа составляла 1 мг/мл, для всех остальных растворителей – 2 мг/мл. Эти величины составляли предельно допустимые концентрации (ПДК) для каждого соединения. Даже без применения специальных приемов (проведения работы при пониженных температурах термостата), все пять растворителей хорошо разделялись и имели четко выраженную форму пика. Все пять исследованных веществ выходили в пределах до 5 мин.

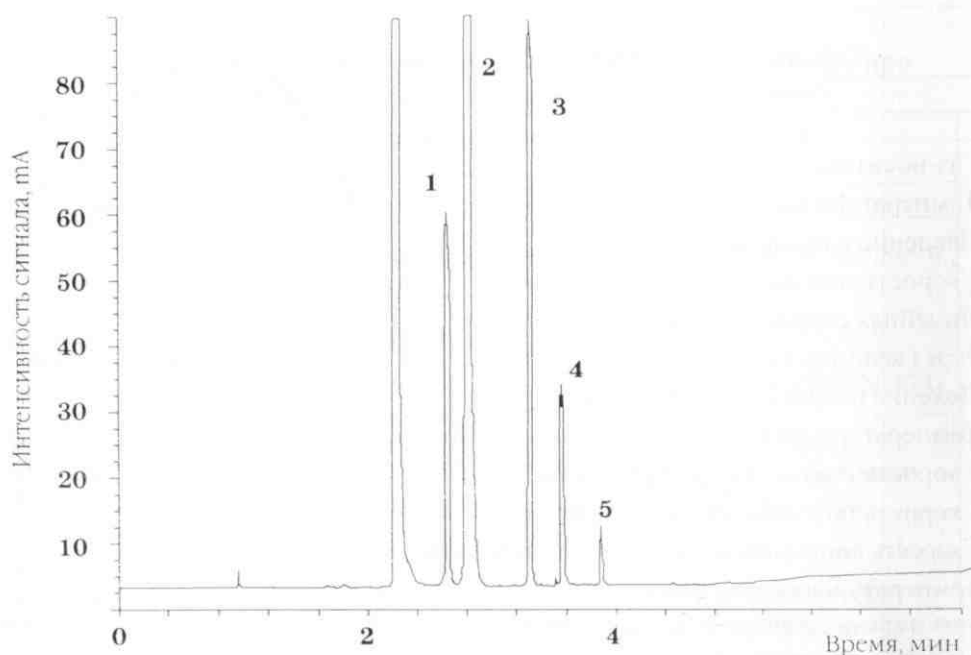


Рис. 1. Хроматограмма калибровочной смеси остаточных растворителей в фармацевтических препаратах, полученная при введении пробы из газовой фазы с помощью пробоотборника HS:

1 – метиленхлорид, 2 – бензол, 3 – ТХЭ, 4 – хлороформ, 5 – 1,4-диоксан.

Одной из целей данной работы было продемонстрировать точность методики 467 при анализе органических растворителей на уровне предельно допустимых концентраций (ПДК). Сосуды с анализируемыми пробами нагревали в течение 40 мин при 80 °С и интенсивном встряхивании и анализировались пятикратно.

Результаты изучения точности анализа приведены в табл. 4, где представлены площади пиков для каждой пробы. Для каждого растворителя показаны пло-

щадя пиков, стандартное отклонение и относительное среднеквадратичное отклонение (ОСКО, %). ОСКО оказалось низким для растворителей, включая 1,4-диоксан, для которого оно было значительно ниже предела -15 %, установленного Фармакопеей США.

Примечание. Парофазный пробоотборник HP 7694 HS позволяет встряхивать термостатируемые образцы с высокой и низкой интенсивностью.

Таблица 2. Сходимости площадей пиков органических примесей, содержащихся в воде в концентрациях на уровне ПДК (по данным ГХ/HS -анализа)

Ввод	Метилен-хлорид	Бензол	ТХЭ	Хлороформ	Диоксан
1	139,3	698,4	138,5	36,8	11,4
2	139,9	709,9	140,7	37,5	12,4
3	140,9	713,9	141,5	37,6	12,7
4	139,4	703,5	139,1	37,3	13,0
5	140,8	710,3	140,2	37,6	13,2
Среднее значение	139,3	707,2	140,0	37,4	12,6
Ст. отклонение	1,549	6,197	1,230	0,337	0,722
ОСКО, %	1,1	0,8	0,8	0,9	5,7

Другой целью этой работы являлась проверка линейности полученных значений площадей пиков всех пяти соединений при любых концентрациях их в растворе для тех же условий эксперимента. Стандарты были приготовлены в диапазоне концентраций от 2 до 200 % от величины ПДК каждого растворителя. Результаты были выражены калибровочной кривой по шести точкам, каждая из которых представляет собой среднее значение из пяти параллельных определений. Были получены значения линейности отклика детектора в заданном диапазоне для всех растворителей значительно ниже 15 %, требуемых Фармакопеей США. Как и предполагалось, наиболее низкий отклик детектора был для 1,4-диоксана. Это, вероятно, было связано с его высокой растворимостью в воде. Тем не менее, он легко определялся как качественно, так и количественно, предел обнаружения его лежал существенно ниже 100 ppm, требуемого Фармакопеей США для фармацевтических препаратов. В табл. 5 приведены данные по линейности и воспроизводимости результатов. Три фармацевтические субстанции (хлорид натрия, аспирин, аскорбиновая кислота) были приготовлены тем же способом, что и стандарты. В результате исследования и соблюдения условий, описанных выше, летучие органические примеси не были обнаружены.

Табл. 5. Линейность отклика детектора и воспроизводимость

Состав	Амплитуда концентраций, ppm	ОСКО, %	Коэффициент корреляции
Метиленхлорид	2 – 200	1,8	0,9962
Хлороформ	1 – 100	1,9	0,9899
Бензол	2 – 200	1,0	0,9867
Трихлорэтилен	2 – 200	1,7	0,9921
1,4-Диоксан	2 – 200	1,5	0,9995

Примечания.

1. ОСКО составлен (в среднем) по диапазонам концентраций, приведенным в колонке № 2.
2. Коэффициент корреляции определен из линейной зависимости по шести точкам.

1. *Organic Volatile Impurities*. The United States Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, Third Supplement // The United States Pharmacopeial Convention. – Rockville, MD, 1990. – P. 2395–2397.
2. *Organic Volatile Impurities*. The United States Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, Fourth Supplement // The United States Pharmacopeial Convention. – Rockville, MD, 1991. – P. 2508–2510.
3. *Organic Volatile Impurities*. The United States Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, Fifth Supplement // The United States Pharmacopeial Convention. – Rockville, MD, 1992. P. 2706–2708.
4. *Organic Volatile Impurities*. The United States Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, Sixth Supplement // The United States Pharmacopeial Convention. – Rockville, MD, 1993, pp. 2927–2929.
5. *V. A. Gray*. Organic Volatile Impurities Testing Initiative, An Update // *Pharmacopeial Forum* 18:3205, 1992.
6. *Organic Volatile Impurities Chemical Tests*. The United States Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII, Seventh Supplement // The United States Pharmacopeial Convention. Rockville. – 1992. – P. 3120.
7. *A. E. Gudat and H.-J. P. Sievert*. Analysis of Volatile Compounds in Excipient Materials / Hewlett-Packard Company Application Note 228–208, Publication No. (43) 5091-5610E, October 1992
8. *K. J. Dennis, P. A. Josephs, and J. Dokladalova*. Proposed Automated Headspace Method for Organic Volatile Impurities <467> and Other Solvents / *Pharmacopeial Forum*. 18:2962, 1992.
9. *Performing USP 467 Using the HP 7694 Headspace Sampler* / P. L. Wylie, R. L. Firor, L. Cobelli, and M. Bergna // Hewlett-Packard Company. Application Note 228–237, Publication No. (43) 5091–7757E, 1993.
10. *I. L. Chang, D. DiUbaldo, and W. J. Sanders*. Headspace Analysis of Organic Volatile Impurities in Bulk Pharmaceutical Chemicals // Hewlett-Packard Company. Application Note 228–255, Publication No. (43) 5091–9661E, 1994.
11. *Pharmacopeial Forum*, 19, Number 3, May–June 1993, Organic Volatile Impurities <467>. – P. 5335–5337.

Перевод настоящей публикации осуществлен на русский язык в 2000 году специалистами фирмы «АЛСИ». Мы с благодарностью примем пожелания и критические замечания наших читателей.

Фирма «АЛСИ» – официальный дистрибьютор Аджилент Текнолоджис (до 01. 11. 1999 г. – аналитическое отделение Хьюлетт-Паккард) по аналитическому оборудованию в Украине.

Фирма «АЛСИ» осуществляет:

- Поставки, установку, обучение, гарантийное и пост-гарантийное обслуживание аналитического оборудования.
- Поставки лабораторного оборудования и химических реактивов.

03049, Украина, г. Киев, ул. Шовкуненко, 8/20, кв. 51.

Тел/факс: (044) 246 1040, 417 4997, 245 3224, 276 7505, 276 2120.