

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

БУШЕВСЬКИЙ Б., ЛЕБЕДИНЕЦЬ Л.

МОДИФІКАЦІЯ ПРОБОПІДГОТОВКИ В АНАЛІЗІ ЗАЛИШКОВИХ РОЗЧИННИКІВ У ЛІКАРСЬКИХ СУБСТАНЦІЯХ

Разработан метод определения остаточных количеств дихлорэтана в субстанциях лекарственных препаратов: нистатина и ницерголина путем концентрирования примесей из газовой фазы в каплю органического растворителя (SDE).

Представленный метод, по сравнению с традиционным методом парофазного анализа, обладает рядом преимуществ и является более экономичным.

The method of dichlorethane residual amounts determination in substances of medicinal preparations: nistatine and nicergoline, by single drop extraction (SDE), is developed.

This method, in comparison with the traditional method of head spase analysis has number of advantages and is more economic.

Розвиток аналітичних методів, використання сучасних приладів з чутливими і селективними детекторами не знімає проблеми підготовки проб. Незначна кількість речовин, що підлягають визначенню у багатокомпонентних пробах при аналізі об'єктів довкілля, харчових продуктів, фармацевтичних препаратів, вимагає ізолювання і попереднього концентрування цільових компонентів. Розв'язанню цих проблем сприяє застосування сучасних методів екстракції і концентрування.

При підготовці проб у хроматографічних дослідженнях широко використовують рідинно-рідинну екстракцію, яка є найдавнішим методом розділення сумішей [1]. Рідинно-рідинна екстракція може бути здійснена вручну струшуванням проби, що аналізується, з органічним розчинником у дільниці лійці або за допомогою екстрактора безперервної дії. В залежності від умов екстракції, екстракти містять малолеткі домішки середньої і низької полярності, кислоти або луги (екстракція при відповідних значеннях pH). Цей вид екстракції, маючи перевагу в простоті виконання, не позбавлений недоліків. Процедура екстракції забирає багато часу і вимагає використання великої кількості коштовних розчинників, що, як правило, є досить токсичними. Розділення у такий спосіб водної і органічної фаз часто супроводжується утворенням стійкої емульсії, особливо при ручній екстракції. Крім того, необхідні додаткові процедури випаровування екстрагенту з метою концентрування речовин, що аналізуються.

Крім рідинної екстракції, при підготовці проб для хроматографічного аналізу використовується твердофазова екстракція. Процедура твердофазової екстракції ґрунтуються на розділенні речовин у результаті сорбційних і іонообмінних процесів. Цей метод використовується для вилучення з водяних розчинів забруднювачів різної полярності. Для кожної конкретної задачі використовують сорбент з відповідними характеристиками. Перевагою цього методу екстракції є можливість обробляти великі за об'ємом проби невеликою кількістю твердої фази (сорбенту). Для десорбції достатньо малої кількості розчинника-десорбента, що дозволяє виключити з додаткові процедури випаровування. При малих кількостях розчинника-десорбента суттєво зменшується ризик забруднення проби. Десорбція може бути здійснена і в термічний спосіб. Екстракція, в залежності від об'єму проб води і характеру досліджуваних речовин, може проводитися у патроні, заповненому сорбентом [2–4] або на мембраних дисках [5, 6].

Останнім часом методи екстракції зазнали суттєвої модернізації. У техніці твердофазової екстракції Павлишин із співавторами [7] розробив і представив метод мікротвердофазової екстракції, який вже широко використовується в аналітичній практиці при аналізі слідових кількостей речовин в різноманітних пробах, оскільки є універсальним методом ізоляції і концентрування домішок з різних матриць. Суть методу полягає в мікроекстракції цільових компонентів рідкою фазою, що нанесена на кварцове волокно, вміщене у голку мікрошприца. При занурюванні голки такого шприца у розчин, що підлягає аналізуванню, цільові домішки концентруються на модифікованому волокні, після чого відібрана проба цим самим шприцом уводиться в інжектор хроматографа.

Сьогодні мікromетоди набули широкого розповсюдження. В 1997 р. Jeannot і Cantwell [8] і незалежно від них He і Lee [9] запропонували простий метод мікроекстракції у краплю органічного розчинника, що висить на кінці голки мікро-шприца, зануреного у розчин з розчиненою у воді пробою. Видавлена крапля органічного розчинника абсорбує домішки, що знаходяться у водній фазі, тобто відбувається рідинно-рідинна мікроекстракція. В рідинно-рідинній екстракції розподіл між водяною і органічною фазами речовини, що аналізується (аналітом), характеризується коефіцієнтом розділення (K_d). Рівновага встановлюється швидше, якщо процес змішування проходить при енергійному струшуванні:

$$AH(aq) = AH(o), \quad (1)$$

де AH – аналіт; aq та o – водна та органічна фази, відповідно.

Співвідношення концентрації аналіту в обох фазах при встановленні рівноваги є постійною величиною:

$$K_d = [AH]_o / [AH]_{aq}. \quad (2)$$

При рідинній екстракції рівноважна концентрація аналіту в органічній фазі описується рівнянням:

$$Co.eq = K Caq.eq = \frac{K Caq.init}{1 + KV_o/V_{aq}}. \quad (3)$$

де K – коефіцієнт розділення, $Caq.init$ – початкова концентрація аналіту в водній фазі, $Caq.eq$ та $Co.eq$ – рівноважні концентрації в водній і органічній фазах, відповідно. K та $Caq.eq$ повинні бути достатньо великими, а фазове відношення помірно малим – для уникнення проблеми з визначенням. Крім того, застосовуючи цей метод у рутинному аналізі, можна обмежити час встановлення рівноваги. Тож, концентрація в органічній фазі може бути трохи менша ніж $Co.eq$. Jeannot і Canwell описали рідинну мікроекстракцію у краплю розчинника (Solvent micro extraction):

$$\frac{d Co}{dt} = Ai/V_o * bo (K Caq - Co), \quad (4)$$

де Co – концентрація аналіту в органічній фазі за час t , bo – масовий коефіцієнт перетворення відносно органічної фази, Ai – площа хроматографічного сигналу, Caq – концентрація аналіту в водній фазі за час t .

Тоді рівняння (4) може бути перетворене:

$$\frac{1}{bo} = \frac{1}{bo} + k \frac{1}{baq}, \quad (5)$$

де bo та baq – індивідуальні трансформовані масові коефіцієнти в обох фазах.

Для виконання аналізу за такою процедурою необхідно експериментальним шляхом визначити об'єм краплі, час встановлення рівноваги і час екстракції досліджуваних речовин у краплю розчинника. Цей спосіб підготовки проби був застосований при визначенні тригалометанів у природній воді [10]. Визначення проводилося із застосуванням двох способів пробопідготовки – шляхом мікротвердофазової екстракції (SPME) і шляхом мікроекстракції в краплю органічного розчинника (SDE).

Порівняння одержаних результатів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Порівняння результатів аналізу тригалометанів в природній воді із застосуванням різних способів пробопідготовки

Речовина	Межі калібрувальної кривої, mkg/L	SDE		SPME	
		r	RSD	r	RSD
CHCl ₃	1,9–26,2	0,982	4,4	0,992	3,4
CHBrCl ₂	2,1–12,0	0,979	5,1	0,996	2,8
CHBr ₂ Cl	1,6–0,8	0,989	3,1	0,994	2,8
CHBr ₃	0,5–9,2	0,997	2,5	0,996	2,1

Примітки: r – коефіцієнт регресії стандартної кривої, RSD – відносне стандартне відхилення (отримане з площ піків сигналів при $n = 10$), розраховане як (стандартне відхилення / значення) $\times 100\%$.

Газова екстракція як метод підготовки проб також зазнала істотної модифікації. Широко відомий метод парофазного аналізу (Head space), що застосовується для визначення летких домішок, при певних змінах стає більш чутливим і дозволяє визначати слідові кількості галоїдовмісних органічних домішок навіть при використанні полум'яно-іонізаційного детектора.

Принцип парофазного аналізу полягає у наступному. В спеціальний флакон місткістю V поміщають наважку досліджуваного розчину або твердого препарату об'ємом V_{np} . Об'єм газової фази $V_r = V - V_{np}$. Флакон герметично закривають і терmostатують до встановлення рівноваги між газовою фазою і пробою. Аліковтна частина газової фази вводиться в інжектор хроматографа і визначається абсолютно значення концентрації леткої речовини у газовій фазі Сг. Оскільки в процесі встановлення рівноваги кількість леткої речовини в пробі зменшилась на частину, що перейшла в газову фазу, початкова концентрація C_0 , pr зменшилася. Кількість речовини, що виділилася в газову фазу (Сг), залежить від коефіцієнту розділення $K = C_0, pr / C_g$ і співвідношення об'ємів фаз $r = V_r / V_{np}$. Без врахування зміни об'єму проби, приймаючи цю зміну відносно малою, концентрацію леткої речовини в пробі за її вмістом у рівноважній газовій фазі визначаємо за рівнянням:

$$C_0, np = C_g (K+r) . \quad (6)$$

Але при дослідженні слідових кількостей летких домішок в воді або у твердих пробах чутливості детектора не вистачає для надійного визначення статичної газової екстракції за наведеним методом. У таких випадках застосовують динамічну газову екстракцію, проведення якої вимагає додаткового обладнання і часу.

Натомість був запропонований [11] метод концентрування домішок із газової фази в краплю органічного розчинника (Single drop extraction – SDE), що висить на кінчику голки мікрошприца, який не занурений в розчин, а залишений у газовій фазі після встановлення рівноваги між газовою фазою і пробою – при експериментально визначеній температурі.

Мета цієї роботи полягає у дослідженні можливості застосування методу SDE при аналізі лікарських субстанцій на вміст залишкових органічних розчинників, зокрема – вміст дихлорметану в субстанціях ніцерголіну і ністатину. Леткі органічні розчинники використовуються (або утворюються) при виробництві лікарських субстанцій. Вони не мають терапевтичної дії, адекватної лікарському засобу, і повинні видалятися із субстанції. Їх вміст у препараті обумовлюється відповідними сертифікатами. Для контролю вмісту органічних залишкових розчинників застосовуються газохроматографічні методи, чутливість яких забезпечує надійність отримуваних результатів.

У схемі синтезу ніцерголіну і ністатину використовується дихлорметан – як розчинник для кристалізації. Присутність цього розчинника в кількості, що перевищує 0,05 % від маси субстанції, може викликати при вживанні

препарату небажані ускладнення (нейротоксикоз). Традиційно вміст дихлорметану визначається газохроматографічним методом. Наважка субстанції розчиняється у відповідному розчиннику, і при визначеннях хроматографічних умовах проводиться аналіз на вміст органічної домішки. Через низький допустимий вміст дихлорметану і відносно невелику чутливість до нього полум'яно-іонізаційного детектора наважка препарату досягає 1–2 г. При аналізі із застосуванням детектора електронного захвату виникають ускладнення через використання диметилформаміду – як розчинника наважки субстанції. Враховуючи високу вартість лікарських субстанцій, з метою зниження собівартості аналізу і відмови від розчинника для переведення наважки у розчин, ми провели дослідження можливості використання методу SDE для підготовки проби при аналізі залишкового розчинника в субстанціях ніцерголіну і ністатину.

Експериментальна частина

Матеріали і реактиви. Дихлорметан (Ч), MERK (Germany), гексан (Ч), Fluka (Buches, Switzerland), гелій і азот (99,999 %) фірми «Айсблік» (Одеса, Україна), деіонізована вода, одержана на приладі MILLIQ (Millipore El Paso TX, USA), шприц газохроматографічний Hamilton (Reno Nevada 720) для екстракції та інжекції, колонка кварцова капілярна RTx-5 (Restek Bellefonte, PA, USA): 30 м x 0,53 мм x 3 мкм, флакони скляні для парофазового аналізу (20 мл).

Прилади і обладнання. Хроматограф STAR 3400 фірми Varian (USA) з іонізаційно-полум'яним детектором. Терези аналітичні фірми Mettler-T (Germany). Сушильна шафа фірми Memmert UE-200 (Germany).

Хроматографічні умови. Температура детектора і інжектора 250 і 220 °C відповідно. Температура колонки програмувалася в режимі: початкова температура – 30 °C, підняття температури зі швидкістю від 5 до 70 °C протягом 1 хв і 3 хв та подальше підняття температури з тією ж швидкістю до 250 °C. Витримка – 3 хв. Умови аналізу відпрацьовувалися на стандартних розчинах дихлорметану, виготовлених на деіонізованій воді.

Підготовка проби. Наважку субстанції (ніцерголіну або ністатину) відбирали у спеціальний флакон місткістю 20 мл, герметично закривали пробкою з термостійкого матеріалу, закатували алюмінієвим ковпачком. Закритий флакон витримували у термостаті при оптимальній температурі протягом часу, необхідного для встановлення рівноваги між пробою і газовою фазою над нею. Процедуру екстракції проводили таким чином:

- органічний розчинник (гептан) набирали у мікрошприц об'ємом 2 мкл, голкою шприца проколювали прокладку у пробці флакону, занурюючи голку шприца у газову фазу;

- плунжером шприца видавлювали краплю розчинника об'ємом 2 мкл і витримували її на кінчику голки протягом часу, необхідного для екстракції дихлорметану в краплю розчинника (гептану);

- краплю втягували в середину шприца і шприц виймали з флакону;
- шприц уводили в інжектор хроматографа, виведеного на робочий режим.

Схему установки наведено на рисунку 1.

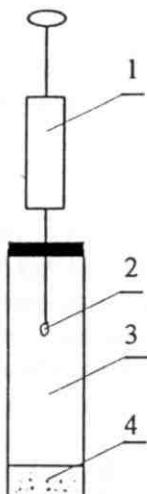


Рис. 1. Схема підготовки проби до газохроматографічного аналізу:

- 1 – мікрошприц;
- 2 – крапля розчинника;
- 3 – газова фаза;
- 4 – досліджувана проба.

Результати і обговорення

Об'єм краплі. На рисунку 2 наведено залежність величини хроматографічного сигналу від об'єму краплі розчинника (гептану), в яку здійснюється дифузія дихлометану з газової фази. При об'ємі краплі 4 мкл, температурі 40 °C і витримуванні краплі на кінчику голки протягом 40 с досягається найбільша величина сигналу. Але при такому об'ємі крапля не утримується на кінчику голки, і ризик її відриву збільшується. При введенні у хроматограф 4 мкл розчинника газохроматографічна колонка перевантажується. Тому за оптимальний об'єм краплі прийнято 2 мкл, що співпадає з попередніми дослідженнями [12].

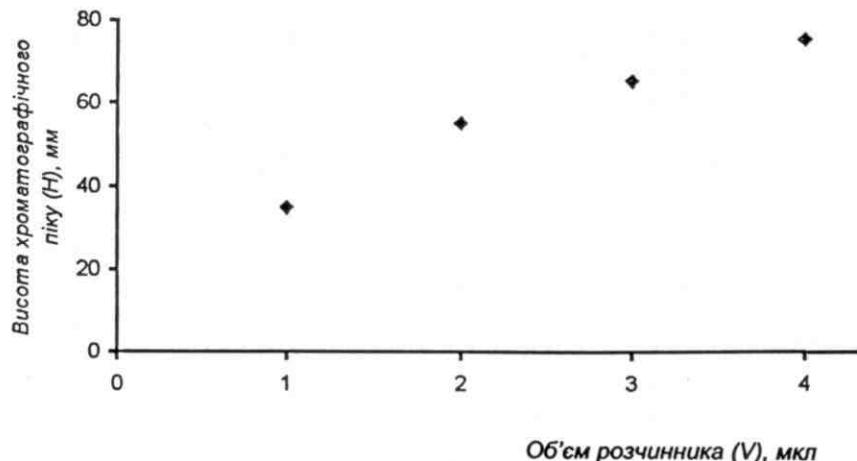


Рис. 2. Залежність величини хроматографічного сигналу (H) від об'єму краплі (V) розчинника (гептану).

Температура і час встановлення рівноваги. Для визначення оптимальних умов встановлення рівноваги між пробою субстанції і газовою фазою проби субстанції в герметично закритих фляконах витримували у термостаті при різних температурах, починаючи з 25 °C.

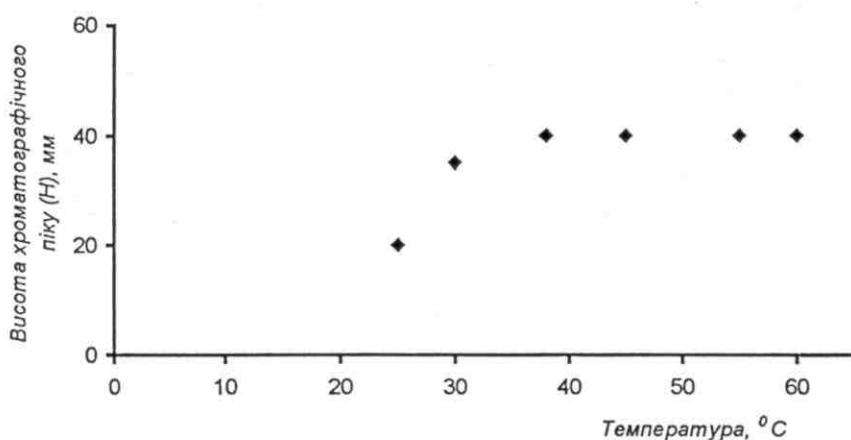


Рис. 3. Залежність величини хроматографічного сигналу (H) від температури термостатування проби.

Як видно з рисунку 3, рівновага встановлюється при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Оптимальний час встановлення рівноваги при температурі $40\text{ }^{\circ}\text{C} - 40$ хв (таблиця 2).

Таблиця 2. Залежність величини хроматографічного сигналу (H , мм) від часу встановлення рівноваги між газовою фазою і пробою (t , хв)

Показник	Значення показників					
	41	53	64	73	73	74
Сигнал (H , мм)						
Час встановлення рівноваги (t , хв)	5	10	20	40	50	60

Залежність величини хроматографічного сигналу від часу утримання краплі. Залежність хроматографічного сигналу від часу дифузії дихлорметану в краплю на кінчику голки наведено на рисунку 4 (при температурі терmostатування вихідної проби $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і витримуванні проби в терmostаті протягом 40 хв). При витримуванні протягом 40 хв флакону із субстанцією, що містить 50 мкл введеного дихлорметану, найбільший сигнал реєструється при часі дифузії (витримуванні краплі на кінчику голки) протягом 75 с. Але висота сигналу, що досягається при витримуванні протягом 30 с, є достатньою для визначення дихлорметану в пробі. При цьому зменшується ризик відриву краплі дихлорметану з кінчика голки.

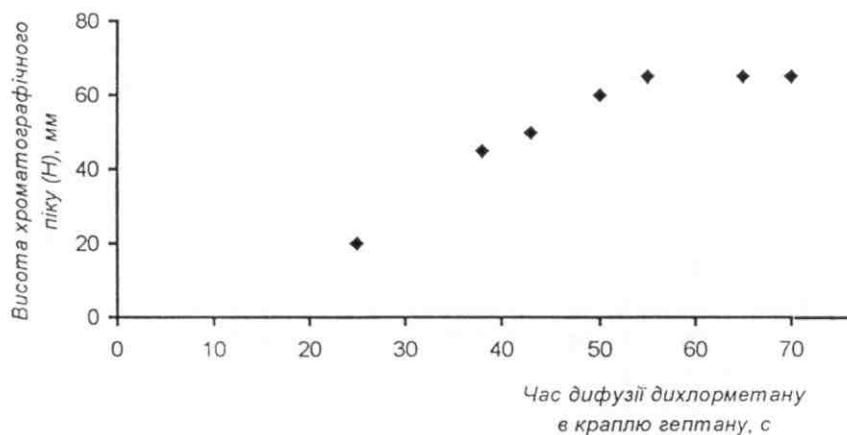


Рис. 4. Залежність величини хроматографічного сигналу від часу дифузії дихлорметану в краплю гептану.

На підставі отриманих даних розроблено методику вилучення дихлорметану із субстанції ніцерголіну і ністатину.

Вилучення дихлорметану із субстанції ніцерголіну і ністатину. Наважку субстанції (блізько 0,1 г) зважують у фляконі для екстракції, герметично закривають пробкою і витримують в термостаті при 40 °C протягом 40 хв. За вищезгаданою схемою (рисунок 1) відбирається і вводиться в інжектор хроматографа 2 мкл гептану з абсорбованим у ньому дихлорметаном. Визначення виконується з двома паралельними пробами. Хроматографічний сигнал порівнюється із сигналами проб стандартів субстанцій, в які вводилися відповідні кількості дихлорметану.

Отримані результати порівнювалися з даними аналізу традиційним методом.

Традиційний метод визначення. Наважку препарату зважують у мірній колбі місцістю 10 мл, дадуть 1 мл розчину внутрішнього стандарту (спирт бутиловий-2) та 3 мл диметилформаміду до повного розчинення і ним же доводять до мітки. Після перемішування розчину вводять в інжектор хроматографа почергово по 1 мкл розчину препарату і розчину стандарту (дихлорметану) для кількісного визначення вмісту дихлорметану в препараті.

Результати визначення вмісту дихлорметану в субстанції традиційним методом і методом із застосуванням техніки SDE при підготовці проби наведено у таблиці 3.

Таблиця 3. Порівняння результатів аналізу дихлорметану в субстанції, одержаних традиційним методом і з використанням мікроекстракції домішок краплею розчинника (SDE)

Наважка субстанції, г	Вміст дихлорметану, %	Наважка субстанції, г	Вміст дихлорметану, %
0,0995	0,0099	1,0245	0,0096
0,1062	0,0106	1,1004	0,0109
0,0934	0,0098	0,9986	0,0110
0,1007	0,0108	1,0345	0,0101
0,0996	0,0102	0,9872	0,0098

Застосування методу SDE при підготовці проби дозволяє суттєво зменшити наважку, скоротити час виконання аналізу і зменшити кількість використаних розчинників.

Список літератури

1. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. – М. Мир. – 1977. – 345 с.
2. Vasylechko V. O., Lebedynets L. O., Gryshchouk G. V., Kuzma Yu. B., Vasylechko L. O. and Bernatska T. M. Adsorption of Copper on Transcarpathian Mordenite // Adsorption Science & Technology. 1996. – P. 267–277 .

3. *Vasylechko V. O., Lebedynets L. O., Gryhchouk G. V., Leboda R., Scubiszewska-Zeba J.* Badania nad pszydatnoscia Zakarpatskiego klinoptijoity do adsorpcji chloroformu z rostvorow wodnych. // Ochrona Srodowiska, 1998, № 12. – S. 70.
4. *Vasylechko V. O., Lebedynets L. O., Greshchouk D. V., Leboda R. and Scubiszewska-Zeba J.* Investigations of Usefulnus of Transcarpathian Zeoliys in Trase Analysis of Waters Aplication of Mordenite for Preconcentration of Trase Amount of Copper and Cadmium. // Chtm. Anal. (Warshawa), 1999, V. 44 – P.1013.
5. *Buszewski B., Cendrowska I., Gadzala-Kopciuch R., Jezierska M., Ligor M., Ligor T.* Związki organiczne w srodowisku i metody ich oznaczania.. Biblioteka Monitoringu Srodowiska. – Warszawa. – 1997.
6. *Buszewska T., Siepak J., Buszewski B.*, GIT Spezial., 1998, № 4/2. – C. 65.
7. *Pawlishyn J.* Solid Phase Microextraction – Theory and Practice. Wiley & Sons, Inc.. USA. – New York . – 1997.
8. *Jeannot M. A. and Cantwell F. F.* Anal Chem., 1997, № 69. – S. 223.
9. *He Y. & Lee H. K.* Anal. Chem., 1997, 69. – S. 235.
10. *Buszewski B. & Ligor T.* LC GC Europe, 2002, № 15 (2). – S. 92 .
11. *Buszewski B. & Ligor T.* Water, Air & Soil Pollution, 2001, № 29. – S. 55.
12. *Ligor T. & Buszewski B.* Chromatographia, 2000, № 52. – S. 279.

Nicolas Copernicus University, TORUN, Poland
Університет ім. М. Коперника,
м. Торунь, Польща

Отримано
08.01.2003

AT "Галичфарм"
м. Львів, Україна