

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Институт химико-технологический
Кафедра аналитической химии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ ПЕРЕД ГЭК

Зав. кафедрой _____

_____ (подпись) _____ (Ф.И.О.)
« _____ » _____ 20 __ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЗ РЯДА АЗОЛОАЗИНОВ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пояснительная записка

04.04.01 93 2540 007 ПЗ

Научный руководитель: Ф.И.О. Шевырин В.А., к. х. н., ст. науч. сот-к _____ подпись
ученая степень, ученое звание (должность)

Нормоконтролер: Ф.И.О. Алямовская И. С. _____ подпись

Студент группы ХМ-280021 Ф.И.О. Климова Т. В. _____ подпись



Екатеринбург
2020

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Институт Химико-технологический
Кафедра Аналитической химии
Направление подготовки 04.04.01 – Химия
Образовательная программа 33.01 – Медицинская и фармацевтическая химия
Образовательная траектория Инструментальные методы исследования в фармацевтике

УТВЕРЖДАЮ

Зав. кафедрой _____
« ____ » _____ 201__ г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

студента Климовой Татьяны Васильевны группы ХМ-280021
(фамилия, имя, отчество)

1. Тема выпускной квалификационной работы Разработка методики определения остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях перспективных лекарственных средств из ряда азолоазинов методом газожидкостной хроматографии

Утверждена распоряжением по институту от « 25 » февраля 2020 г. № 33-09-05/30

2. Руководитель Шевырин В. А., кандидат химических наук
(Ф.И.О., должность, ученое звание, ученая степень)

3. Исходные данные к работе литературные данные и собственные исследования

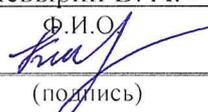
4. Перечень демонстрационных материалов презентация

5. Календарный план

№ п/п	Наименование этапов выполнения работы	Срок выполнения этапов работы	Отметка о выполнении
1.	<i>1 раздел (глава) Оформление ВКР</i>	до 06.06.2020 г.	выполнено
2.	<i>2 раздел (глава) Подготовка презентации</i>	до 12.06.2020 г.	выполнено
3.	<i>ВКР в целом</i>	до 18.06.2020 г.	выполнено

Руководитель _____
(подпись)

Задание принял к исполнению 01.06.2020
дата

Шевырин В. А.
Ф.И.О.

(подпись)

6. Выпускная квалификационная работа закончена «18» июня 2020 г., считая возможным допустить Климову Т. В. к защите выпускной квалификационной работы закончена в Государственной экзаменационной комиссии.

Руководитель _____
(подпись) Шевырин В. А.
Ф.И.О.

7. Допустить Климову Т.В. к защите магистерской диссертации в Государственной экзаменационной комиссии (протокол заседания кафедры № 4 от « 02 » июня 2020 г.).

Зав. кафедрой _____
(подпись)

Ф.И.О.

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа магистра: «Разработка методики определения остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях перспективных лекарственных средств из ряда азолазинов методом газожидкостной хроматографии»

Пояснительная записка 61 с, 21 рисунок, 15 таблиц, 41 библиографическое наименование, 3 приложения.

ОСТАТОЧНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ, КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ПАРОФАЗНЫЙ ВВОД, АЗОЛОАЗИНЫ.

Данная работа предполагает разработку методики анализа остаточных органических растворителей (ООР) в субстанциях натрия 3,8-диэтоксикарбонил-4-оксо-4*H*-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрата (АВ-19) и натрия 7-метилтио-4-оксо-3-циано-4*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида тригидрата (MNR-857).

Анализ литературных данных показал, что наиболее предпочтительным методом определения ООР является метод газожидкостной хроматографии с парофазным вводом пробы. Для определения целевых аналитов в исследуемых субстанциях рассмотрены схемы синтеза и строение соединений, и определено, что образцы могут содержать органические растворители II (гексан, пиридин, метанол) и III (этанол, этилацетат, 2-пропанол) классов опасности. Однако опытные данные показали наличие в образцах субстанций только этанола и пропан-2-ола. В связи с этим проводили количественное определение только указанных растворителей.

На основе литературных данных были определены исходные условия проведения хроматографического анализа. На практике исходная методика была скорректирована: изменение массы навески, разведения образца, времени выдерживания виалы, установление диапазона концентраций применения методики и метода количественного определения.

Разработанную методику анализа подвергали испытаниям на пригодность по таким показателям как специфичность, линейность, предел количественного определения, сходимость, промежуточная прецизионность и правильность. Согласно проведенным исследованиям была доказана достоверность и надежность получаемых с использованием данной методики результатов.

Количественное определение ООР с помощью разработанной методики в образцах субстанций АВ-19 (3 партии синтеза) и MNR-857 (5 партий синтеза) подтвердило их соответствие требованиям ОФС.1.1.0008.15 по показателю остаточные органические растворители (не более 0,5 % для растворителей III класса опасности).

ABSTRACT

Master's degree work: «Development of a method for assay of residual organic solvents in perspective pharmaceutical substances of the azoloazine family by gas-liquid chromatography»

Explanatory note 61 p., 21 fig., 15 tab., 41 bibliographic titles, 3 appendix.

RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS, ASSAY, GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY, HEADSPACE, AZOLAZINES, HETEROCYCLIC POLYNITROGEN COMPOUNDS.

This paper discusses the development of a method for assay of residual organic solvents in substances in substances such as sodium 3,8-diethoxycarbonyl-4-oxo-4*H*-pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazinide monohydrate (AB-19) and sodium 7-methylthio-4-oxo-3-cyano-4*H*-[1,2,4]triazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazinide trihydrate (MNR-857).

An analysis of the literature data showed that the most preferred method for determining residual organic solvents is headspace gas-liquid chromatography. To determine the target analytes in the studied substances, synthesis schemes and the structure of compounds are considered. Thanks to this, it was decided that the samples might contain organic solvents of hazard classes II and III. Class II includes hexane, pyridine, methanol, and class III includes ethanol, ethyl acetate, 2-propanol. However, experimental data showed the presence of only ethanol and propan-2-ol in the samples of substances. In this regard, an assay was carried out only for these two solvents.

Based on literature data, the initial conditions for the chromatographic analysis were determined. The original method was adjusted by changing the test portion of sample, diluting the samples, the holdup time of the vial, as well as by establishing ranges of concentrations and the method of quantitative measurement.

The developed analysis method was tested for suitability by such indicators as specificity, linearity, limit of quantification, repeatability, intermediate precision, and accuracy. According to the research, it was demonstrated that the analytical technique is acceptable for solving the task.

The residual organic solvents were quantified using the developed procedure for three batches of synthesis of substance AB-19 and for five batches of synthesis of substance MNR-857. The percentage of residual organic solvents in all samples was less than 0.5%. Thus, the results obtained satisfy the requirements of the article OFS.1.1.0008.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation in terms of residual organic solvents.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Методы анализа остаточных органических растворителей	8
1.2 Характеристика ГЖХ как метода анализа	9
1.2.1 Хроматографические параметры	14
1.2.2 Аппаратурное оформление ГЖХ.....	16
1.3 Объекты исследования	22
2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	25
2.1 Используемые реактивы, посуда и аппаратура	25
2.2 Разработка методики хроматографического анализа	25
2.2.1 Выбор методики анализа и начальных условий его проведения.....	26
2.2.2 Подбор концентрации растворов образцов	27
2.2.3 Подбор условий проведения анализа	28
2.2.4 Определение диапазона количественного определения.....	33
2.2.5 Установление матричного влияния на высвобождение ОР	34
2.2.6 Определение параметров хроматографического разделения.....	35
2.3 Методика определения ООР	37
2.3.1 Условия проведения анализа.....	37
2.3.2 Приготовление растворов.....	37
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	41
3.1 Градуировочная кривая	41
3.1.1 Результаты построения градуировочной кривой	41
3.1.2 Расчет параметров линейной зависимости	42
3.2 Определение показателей качества методики.....	45
3.2.1 Специфичность.....	45
3.2.2 Предел количественного определения.....	45
3.2.3 Линейность методики	48
3.2.4 Сходимость (повторяемость) методики	48
3.2.5 Воспроизводимость методики	49
3.2.6 Правильность методики.....	50
3.2.7 Критерии приемлемости полученных результатов.....	52
3.3 Количественное определение ООР в исследуемых субстанциях.....	53
3.3.1 Количественное определение ООР в субстанции MNR-857.....	54
3.3.2 Количественное определение ООР в субстанции АВ-19	55

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	58
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	62
ПРИЛОЖЕНИЕ А	62
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	64
ПРИЛОЖЕНИЕ В	66

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И СОКРАЩЕНИЙ

ГЖХ – газожидкостная хроматография;

ГФ – Государственная фармакопея Российской Федерации;

ЛС – лекарственное средство;

ООР – остаточные органические растворители;

ОР – органические растворители;

ПДК – предельная допустимая концентрация;

ПИД – пламенно-ионизационный детектор;

ПКО – предел количественного определения.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства (ЛС) в настоящее время являются частью жизни почти каждого человека. Востребованность данного типа товаров можно увидеть в объёмах коммерческого рынка ЛС в России, который лишь в марте 2020 года составил 127,3 млрд. рублей [1]. В то же время одной из важных задач фармации остается поиск и исследование соединений, проявляющих ту или иную активность.

Одним из активных направлений исследований является изучение соединений класса азолазинов. Их особенностью можно считать структурное сходство с биогенными пуринами, в результате чего отмечается широкий спектр биологической активности, в том числе противовирусные [2, 3], антидиабетические [4-7] свойства. Объектами исследования данной работы являются соединения натрия 3,8-диэтоксикарбонил-4-оксо-4Н-пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазинид моногидрат (АВ-19) и натрия 7-метилтио-4-оксо-3-циано-4Н-[1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинида тригидрат (MNR-857), которые проходят цикл доклинических исследований как средства для лечения диабета и его осложнений [7].

Процессы разработки новых препаратов включают множество этапов, в том числе установление показателей качества получаемого продукта. Качеством ЛС называют его соответствие установленным требованиям, которые указываются в фармакопейной статье или других нормативных документах [8]. В связи с токсичностью некоторых органических растворителей, которые образуются в процессе производства или используются при получении или очистке фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственных препаратов предусматривается их контроль на остаточные органические растворители [9].

Исходя из необходимости установления качества синтезируемых субстанций по данному показателю, целью работы является разработка методики количественного определения остаточных органических растворителей (ООР) в субстанциях биологически активных азолазинов, используя метод газожидкостной хроматографии с парофазным вводом образца.

Осуществление поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- Провести анализ литературных источников с целью получения информации о классах ОР, методах и условиях проведения количественного анализа ООР;
- Выбрать условия проведения количественного анализа;
- Определить показатели качества разработанной методики;
- Провести анализ субстанций АВ-19 и MNR-857 разных партий синтеза.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Методы анализа остаточных органических растворителей

Несмотря на всеобщее стремление к осуществлению на практике принципов зеленой химии, производство некоторых ЛС невозможно без использования тех или иных органических растворителей (ОР), представляющих риск для окружающей среды и здоровья живых организмов. В то же время фармацевтическая промышленность является одной из ведущих областей по потреблению данного рода реактивов [10].

К остаточным органическим растворителям относят летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса [11].

Ввиду отсутствия терапевтического действия, а также возможности нанесения вреда здоровью при употреблении ОР, необходимо их удаление из ЛС до установленного уровня. Нормы содержания того или иного растворителя устанавливаются исходя из степени его возможного риска для здоровья человека. Так, выделяют следующие классы органических растворителей [9-11]:

1 класс – высокотоксичные растворители (генотоксичные канцерогены), применяемые в фармацевтическом производстве в случаях, когда нельзя отказаться от их использования. К данному классу относят такие соединения как бензол, 1,1-дихлорэтен, 1,2-дихлорэтан.

2 класс – негенотоксичные канцерогены или возбудители необратимой токсичности, такой как нейротоксичность или тератогенность, например, ацетонитрил, гексан. Нормирование их в ЛС обусловлено максимально допустимым количеством, принимаемым в составе суточной дозы лекарственного средства.

3 класс – растворители низкой токсичности, суммарное содержание которых до 0,5 % не требует количественного определения. Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах составляет 50 мг/сут. К таким растворителям относят этанол, пропан-2-ол, ацетон, этилацетат и так далее.

4 класс – растворители, для которых не существует адекватных токсикологических данных. К таким растворителям относят метилтетрагидрофуран, 2,2-диметоксипропан, петролейный эфир, изооктан и другие.

Определение содержания остаточных органических растворителей может быть выполнено различными валидированными методиками [9]. Контроль можно осуществлять, используя термические методы анализа. Наиболее распространенными из них являются термогравиметрический и дифференциальный термический анализ, а также дифференциальная

сканирующая калориметрия [9].

Метод термогравиметрии заключается в определении зависимости изменения массы от температуры образца [12]. Дифференциальный термический анализ основан на измерении разности температур образца и эталона при нагревании или охлаждении, а дифференциальная сканирующая калориметрия – на измерении расхода теплового потока, требуемого для поддержания одинаковыми температур образца и эталона в данных условиях [13].

Рассматриваемые методы анализа относительно просты и не требуют больших материальных вложений. Однако относительно количественного анализа остаточных органических растворителей имеют ряд недостатков, таких как, отсутствие специфичности (определение только общего содержания ОР), влияние на результат связанной влаги.

Так же для определения ООР в некоторых случаях возможно использование методов инфракрасной спектроскопии, ЯМР и некоторых других, однако по пределам обнаружения и точности они уступают методу газовой хроматографии [14].

В настоящее время благодаря низким пределам обнаружения и специфичности, предпочтительным и наиболее распространённым методом определения остаточных органических растворителей является газожидкостная хроматография (ГЖХ) [10]. Еще одним важным ее преимуществом является возможность количественного анализа ОР в кристаллогидратах, в отличие, например, от термических методов анализа.

1.2 Характеристика ГЖХ как метода анализа

Хроматография является мощным и широко используемым аналитическим инструментом для проведения качественного и количественного анализа смесей веществ. Их разделение основывается на различии в скоростях перемещения соединений между двумя фазами, одна из которых является неподвижной, а другая движется в определенном направлении. В то же время хроматография как наука изучает межмолекулярные взаимодействия и перенос молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз [15].

Хроматография представляет собой совокупность методов анализа, отличающихся между собой по таким показателям, как агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз, механизм взаимодействия сорбат-сорбент, техника выполнения слоя сорбента и так далее [16]. Одним из основных критериев классификации видов хроматографии является агрегатное состояние подвижной фазы (рис.1.1). В этой роли могут выступать газы для газовой хроматографии, жидкости для жидкостной или сверхкритические жидкости для сверхкритической жидкостной хроматографии.

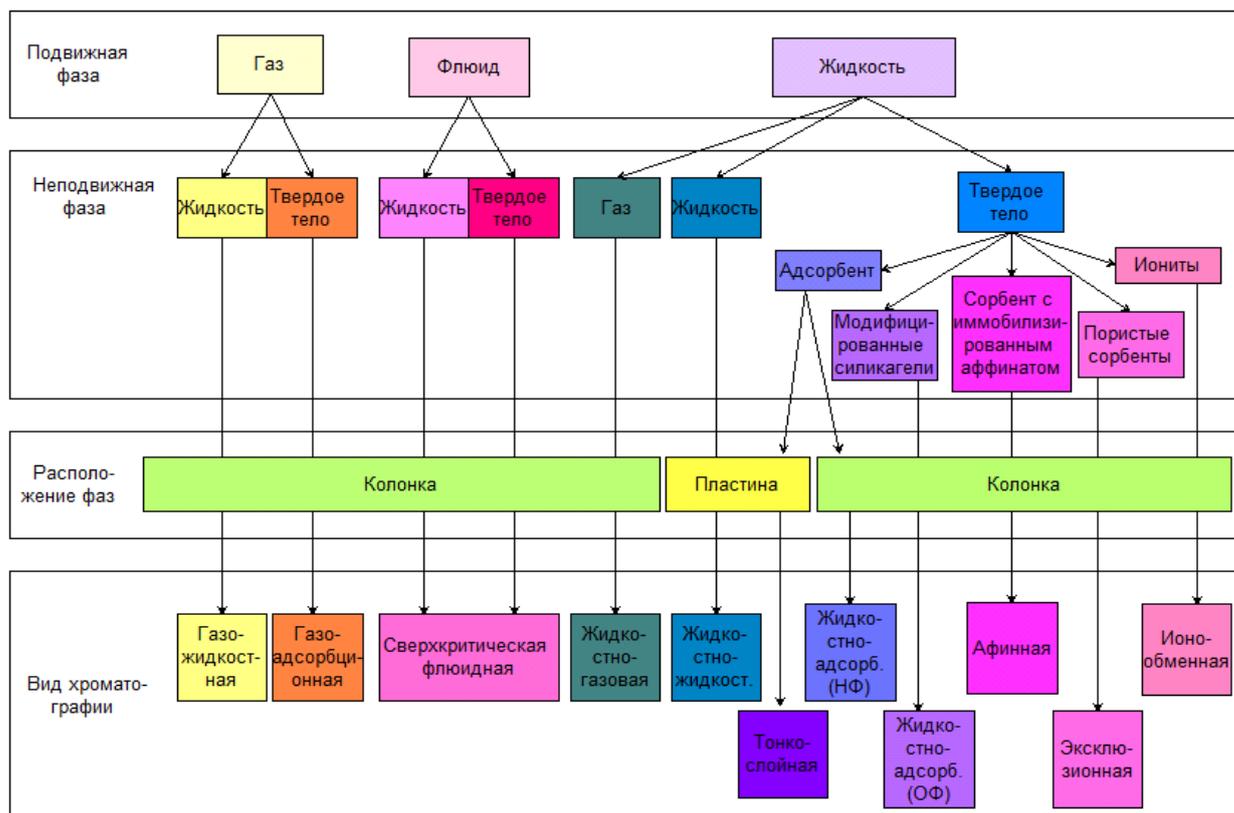


Рисунок 1.1 – Общая схема классификации видов хроматографии

ООР, рассматриваемые в данной работе, являются легколетучими соединениями, обладающими сравнительно низкими температурами кипения, с молекулярной массой менее 500 г/моль. Такие объекты анализа характерны для газовой хроматографии и в частности для ГЖХ, где в качестве неподвижной фазы используется жидкость. Процесс распределения аналита между неподвижной и подвижной фазами в этом случае в большей степени связывают с механизмом растворимости, хотя может происходить и абсорбция анализируемых соединений [15].

Для разделения определяемых соединений в ГЖХ используются хроматографические колонки. Различают насадочные, микронасадочные, капиллярные и поликапиллярные колонки [9]. Насадочные колонки имеют спиральную форму с диаметром сечения 2-4 мм и длиной 0,5-5 м и состоят обычно из нержавеющей стали, стекла или фторопласта. Скорость потока газа-носителя может устанавливаться в пределах от 10 до 60 мл/мин. Микронасадочные колонки отличаются от вышерассмотренных только размерами – диаметр 0,5-1,0 мм, длина 0,5-2 м. Капиллярные колонки, которые наиболее распространены в настоящее время, изготавливаются из плавленого кварца или металла. Их внутренний диаметр составляет 0,10-0,53 мм, а длина 5-200 м [9]. По способу нанесения неподвижной фазы капиллярные колонки делят на:

- С нанесением неподвижной жидкой фазы на внутреннюю поверхность колонки (WCOT-колонки);

- С нанесением слоя пористого сорбента на внутреннюю поверхность колонки (PLOT-колонки);
- С нанесением на внутреннюю поверхность колонки твердого носителя, пропитанного неподвижной жидкой фазой (SCOT-колонки);
- С химически привитой к внутренней поверхности капилляра неподвижной жидкой фазой.

Большой интерес представляют WCOT-колонки. Неподвижная фаза в виде тонкой пленки толщиной 0,1-5,0 мкм равномерно нанесена на внутренние стенки колонки, при этом поток газа движется в колонке с большой линейной скоростью, не встречая значительного сопротивления. Скорость газа-носителя может устанавливаться в пределах от 1 до 5 мл/мин.

Неподвижные фазы обычно подразделяют на полярные и неполярные. Наиболее распространенные неподвижные фазы представлены в табл.1.1 [17, 18].

Таблица 1.1 – Основные неподвижные фазы

Состав	Полярность	Определение вещества	Фазы	Диапазон температур, °С
Диметилполисилоксан 100 %	Неполярная	фенолы, углеводороды, амины, серосодержащие соединения, бензолы	HP-1 (OV-1, SE-30)	от – 60 до 325
Диметилполисилоксан (вязкая жидкость) 100 %		производные аминокислот, эфирные масла	OV-101, SP-2100	от 0 до 280
Дифенил 5 %, диметилполисилоксан 95 %		жирные кислоты, метиловые сложные эфиры, пестициды, гербициды	HP-5 (SE-52, OV-23, SE-54)	от – 60 до 325
Цианопропилфенил 6 %, метилполисилоксан 94 %	Средняя	пестициды	DB-1301	от – 20 до 280
Цианопропилфенил 14 %, метилполисилоксан 86 %		лекарственные средства, стероиды.	DB-1701 (OV-1701)	от – 20 до 280
Фенил 35 %, диметилполисилоксан 65 %		лекарственные средства, пестициды	DB-35	от 50 до 340
Фенил 50 %, метилполисилоксан 50 %		лекарственные средства, стероиды, пестициды	HP-50+ (DB-17, OV-17)	от 40 до 280

Продолжение таблицы 1.1

Состав	Полярность	Определение вещества	Фазы	Диапазон температур, °С
Цианопропилфенил 50 %, диметилполисилоксан 50 %	Полярная	жирные кислоты, метиловые сложные эфиры	OV-225	от 40 до 240
Трифторпропилдиметилполисилоксан 50 %		галогенсодержащие, ароматические соединения	DB-210 (OV-210)	от 45 до 240
Полиэтиленгликоль (ПЭГ)		кислоты, спирты, альдегиды, акрилаты, нитрилы	HP-INNOWax DB-Wax	от 40 до 260
ПЭГ, модифицированный		органические кислоты, спирты, кетоны	HP-FFAP	от 40 до 250

Выбор типа неподвижной фазы, толщины ее слоя, а также длины колонки осуществляется в зависимости от цели анализа и состава анализируемой пробы.

В качестве подвижной фазы в ГХ используются газы-носители, которые играют роль «переносчика» анализируемого образца и не должны взаимодействовать ни с пробой, ни с подвижной фазой. При этом разные газы способны оказывать влияние на ход анализа, например, изменять продолжительность анализа из-за различий в коэффициентах диффузии или ограничивать используемое давление из-за различий в вязкости [16].

Выбор газа-носителя ограничивается такими требованиями как [19]:

- обеспечение необходимых диффузных характеристик;
- соответствие требуемой чувствительности и принципу действия детектора;
- инертность к веществам, с которыми газ-носитель имеет соприкосновение;
- высокая доступность и малая цена;
- малая сорбируемость.

На рисунке 1.2 представлены данные, иллюстрирующие влияние вида газа-носителя на эффективность разделения. Минимальное значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) колонки, а, следовательно, наибольшая эффективность разделения достигается при использовании азота, однако наблюдается данный эффект в узком интервале малых линейных скоростей газа-носителя. Оптимальное разрешение при высоких скоростях газа-носителя можно достичь при использовании водорода – область минимума на кривой эффек-

тивности для данного газа существенно шире, причем максимум достигается при более высоких скоростях. Поэтому данный носитель наиболее предпочтителен для использования в ГХ, однако следует учитывать его взрывоопасность. Гелий занимает промежуточное положение между азотом и водородом, его использование ограничивается высокой стоимостью.

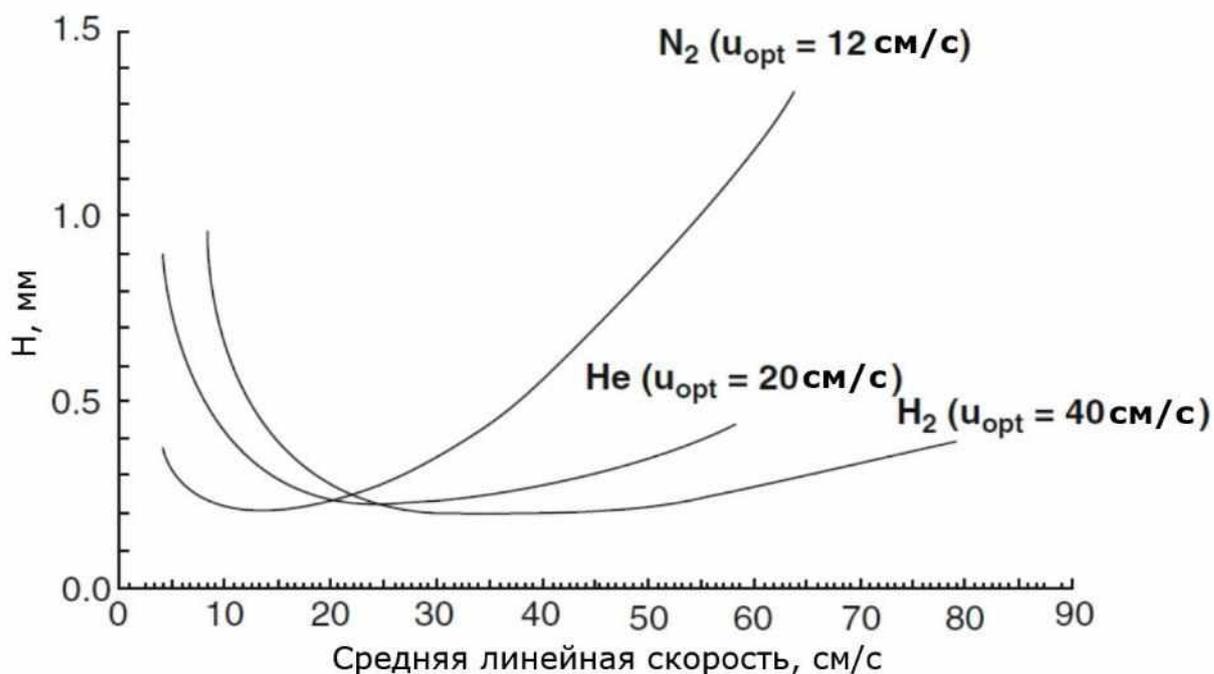


Рисунок 1.2 – Кривые зависимостей ВЭТТ от средних линейных скоростей для различных газов-носителей (Колонка – 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм; стационарная фаза – Rtx -1; температура колонки – 160 °С; тестовый раствор – C₁₇) [12]

Еще одним важным фактором в хроматографическом анализе является правильный выбор детектора. В основе детектирования лежит различие в физико-химических свойствах подвижной фазы и подвижной фазы с образцом. При этом детекторы могут быть селективными и неселективными, а также разлагать пробу или сохранять ее. Анализаторы для газовой хроматографии условно можно разделить на ионизационные и неионизационные. В качестве параметров для неионизационных детекторов используют показатели теплопроводности, плотности и др. К ионизационным анализаторам относят такие приборы, которые могут перевести пробу в ионизированное состояние каким-либо способом, например, ионизацией в водородном пламени, β-излучением, УФ-лучами и так далее. [19]. Вышеперечисленные факторы объясняют все многообразие возможных вариантов детекторов, предложенных для газовой хроматографии: пламенно-ионизационный детектор (ПИД), детектор по теплопроводности (катарометр), термоионный, электронно-захватный, масс-спектрометрический детекторы.

1.2.1 Хроматографические параметры

В процессе хроматографического опыта как результат получают хроматограмму, которая в общем случае представляет собой графическое или иное представление сигнала детектора, характеризующее количественную величину, используемую для измерения концентрации веществ в элюате, от времени или объема подвижной фазы [9]. Хроматограмма отображает пики, характеризующие выход вещества из колонки за определенный временной интервал, который зависит от таких факторов, как структура анализируемого вещества, состав элюентов, тип неподвижной фазы и так далее.

Рассмотрим основные параметры, используемые для описания хроматограмм [9, 14, 19]:

- Время удерживания несорбируемого компонента (t_0) характеризует время, которое несорбируемое вещество проходит от инжектора до детектора и определяется путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию (рис. 1.3).

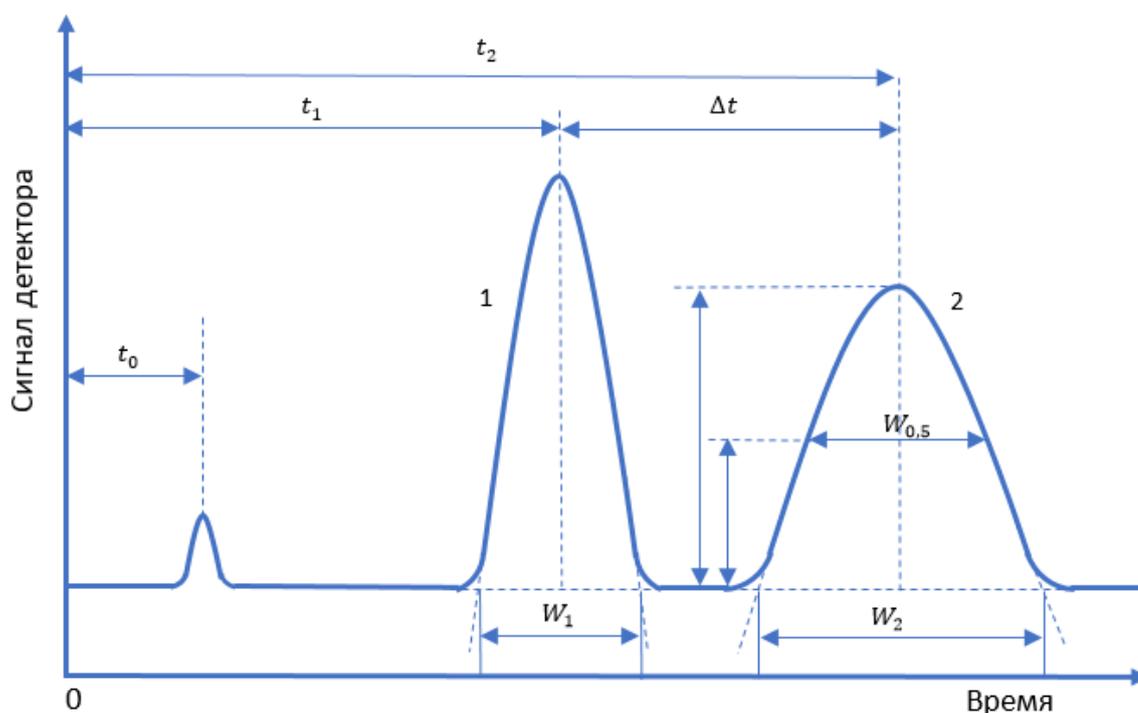


Рисунок 1.3 – Хроматограмма и основные хроматографические параметры: 1 и 2 – пики соединений 1 и 2; t_1 и t_2 – соответствующие времена удерживания; t_0 – время удерживания несорбирующегося вещества; W_1 и W_2 – ширина пиков у основания; $W_{0.5}$ – ширина пика на половине его высоты [12]

- Время удерживания (t_r) характеризует время, за которое компонент проходит всю систему от инжектора (момент ввода пробы принимается за $t = 0$) до детектора и определяется аналогичным путем.

- Исправленное время удерживания вещества (t'_r) характеризует время удерживания вещества за вычетом времени удерживания несорбируемого вещества. Может быть рассчитано по формуле:

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (1.1)$$

С целью возможности сопоставления получаемой информации обычно используют относительные параметры удерживания исследуемых соединений.

- Относительное время удерживания (r) характеризуют удерживание соединения i относительно какого-либо стандартного вещества (St):

$$r = \frac{t'_{r(i)}}{t'_{r(St)}} \quad (1.2)$$

В газовой хроматографии используются индексы удерживания с применением n -алканов (как наиболее изученных) в качестве веществ сравнения.

- Индекс удерживания при постоянной температуре колонки – индекс Ковача ($I_t^{H.\Phi.}$) характеризует удерживание вещества неподвижной фазой при установленной температуре относительно двух реперных n -алканов с числом атомов углерода z и $z+n$ ($n=1,2,3..$), рассчитывается следующим образом при условии $t'_{R(z)} \leq t'_{R(i)} \leq t'_{R(z+n)}$:

$$I_t^{H.\Phi.}(i) = 100 \cdot \left(z + n \cdot \frac{\lg t'_{r(i)} - \lg t'_{r(z)}}{\lg t'_{r(z+n)} - \lg t'_{r(z)}} \right), \quad (1.3)$$

где $t'_{r(i)}$ – исправленное время удерживания исследуемого соединения; $t'_{r(z+n)}, t'_{r(z)}$ – исправленные времена удерживания соответствующих реперных алканов.

Индекс удерживания для режима программирования температуры рассчитывается следующим образом при условии $T_{R(z)} \leq T_{R(i)} \leq T_{R(z+1)}$:

$$I^T = 100 \cdot \left(\frac{T_{r(i)} - T_{r(z)}}{T_{r(z+1)} - T_{r(z)}} + z \right), \quad (1.4)$$

где $T_{r(i)}, T_{r(z)}, T_{r(z+n)}$ – температуры удерживания исследуемого вещества и n -алканов с числом углеродных атомов z и $z + 1$ соответственно.

Так как значения температур удерживания прямо пропорциональны исправленным временам удерживания, определить которые можно с большей точностью при выполнении расчетов, часто используют значения времен удерживания (поправку на время удерживания несорбируемого компонента вводить не обязательно):

$$I^T = 100 \cdot \left(z + \frac{t_{r(i)}^T - t_{r(z)}^T}{t_{r(z+n)}^T - t_{r(z)}^T} \right) \quad (1.5)$$

- Ширина пика (W_x) измеряется на заданной высоте пика, например, ширина на половине высоты обозначается $W_{0,5}$ или W_{50} [9].

- Число эффективных теоретических тарелок (N) колонки является показателем эффективности разделения. Этот показатель можно рассчитывать следующим образом:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{0,5}}\right)^2, \quad (1.6)$$

где t_R – время удерживания, $W_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты, N – количество теоретических тарелок.

Исходя из формулы можно отметить, что чем меньше ширина пика, тем большее число составляет N , а значит и выше эффективность колонки.

- Фактор асимметрии (A_x) показывает, насколько форма пика отличается от нормального распределения. Нижний индекс x указывает, на какой высоте пика определяется асимметрия. Согласно ГФ XIV [9] высота, на которой определяют данный показатель, составляет 5 % высоты пика. Фактор асимметрии находят из выражения:

$$A_{0,05} = \frac{W_{0,05}}{2 \cdot f} \quad (1.7)$$

Критерием пригодности хроматографической системы для количественного определения является соблюдение для пика стандартного образца значения величины фактора асимметрии в пределах от 0,8 до 1,5 [9].

- Разрешение (R_s) – параметр, характеризующий расстояние между любыми двумя соседними пиками. Рассчитать данный параметр можно, исходя из значений ширины пика на нулевой линии (W), однако часто используют расчет данного параметра на 50 % высоты пика ($W_{0,5}$):

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{W^1 - W^2} = 1,18 \cdot \frac{t_2 - t_1}{W_{0,5}^1 + W_{0,5}^2} \quad (1.8)$$

Требованием ФС «Хроматография» [9] является условие, что значение R_s должно составлять более или равно 1,5. Однако в некоторых случаях, например, при несимметричности или значительно различной интенсивности пиков, выполнение данного соотношения не гарантирует полное разделение пиков. В этих случаях при оценке разделяющей способности применяют параметр «отношение максимум/минимум».

1.2.2 Аппаратурное оформление ГЖХ

Установка для ГЖХ представляет собой совокупность систем, обеспечивающих корректное проведение анализа. Основными узлами рассматриваемых приборов являются системы подачи газа носителя, ввода пробы, термостатирования колонки, детектирования, обработки данных, а также неотъемлемая составляющая – хроматографическая колонка [15]. Рассмотрим каждый узел хроматографической установки подробнее.

- Система подготовки газов

Действие данной системы направлено на решения ряда проблем, которые могут привести к некорректному проведению анализа. Одной из таких проблем является установка и стабилизация оптимального для данного анализа расхода газа-носителя, который влияет на показатели хроматографического разделения (время удерживания, ширина пиков), а также на чувствительность детекторов. Кроме того, недостаточная стабильность газовых потоков часто является причиной неустойчивой нулевой линии, что затрудняет количественную обработку хроматограмм [19].

Другой существенной проблемой, является обеспечение необходимого уровня чистоты используемых газов. Особую важность это имеет в случае использования высокочувствительных ионизационных детекторов, где примеси могут исказить нулевую линию. При использовании ПИД-детектора рекомендуется использовать газы с содержанием не менее 99,9995 % [20]. Кроме того, устанавливаются дополнительные фильтры. Пример системы очистки газов при использовании ПИД в хроматографах компании Agilent представлен на рис.1.4.



Рисунок 1.4 – Схема системы подготовки газов

- Система ввода пробы

Данная система отвечает за дозированный ввод пробы в парообразном состоянии в поток газа-носителя перед хроматографической колонкой. В этом случае должны применяться такие решения, чтобы исключить изменение состава пробы в процессе ввода, обеспечить воспроизводимость анализа, снизить эффект размывания пробы и др.

В связи с тем, что рассматриваемый этап проведения хроматографического анализа крайне важен и влияет на полученные результаты анализа, постоянно происходит совершенствование и поиск новых способов по осуществлению данного процесса. Первые конструк-

ции хроматографических систем предполагали ручной ввод образца, что вызывало большую вероятность внесения ошибки в ход опыта [19]. В последнее время наибольшее распространение получают автоматические системы дозирования, что позволяет существенно повысить точность и воспроизводимость анализа.

Для газообразных проб дозирование образца осуществляется при помощи шприца, дозирующего крана или с помощью парофазного отбора. Преимуществами первого дозирующего устройства является простота использования, в то время как применение крана приводит к большей воспроизводимости и большему удобству для осуществления промышленного использования. Оба метода в настоящее время пригодны для автоматического отбора проб, что снижает возможность возникновения погрешности результата вследствие субъективной человеческой ошибки.

Большое распространение в настоящее время получил способ дозирования пробы с помощью оборудования для статического или динамического парофазного анализа [9]. В большей степени популярность данного метода обусловлена возможностью сохранения чистоты оборудования при введении летучих аналитов в газовый хроматограф. Статический анализ заключается в отборе определенного объема газовой фазы после установления равновесия в хроматографической вiale. Динамический парофазный анализ отличается тем, что в течение определенного времени происходит продувание образца инертным газом и концентрирование летучих веществ в ловушке с последующим переносом в хроматографическую систему [9].

На рисунке 1.5 схематично представлен процесс установления равновесия между двумя фазами в хроматографической вiale при статическом анализе. Проба в жидком состоянии содержит матрицу и целевые компоненты. Для парофазного анализа аналиты должны переходить в газовую фазу, то есть быть летучими.

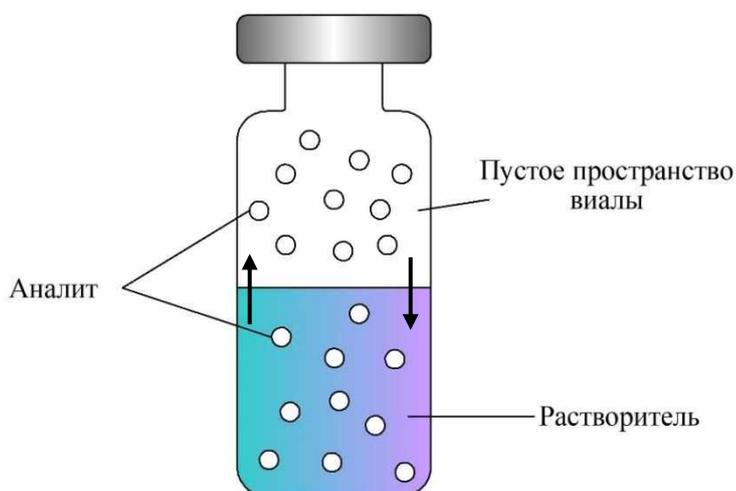
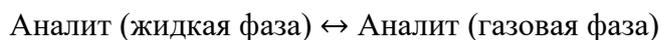


Рисунок 1.5 – Схема системы для статического извлечения аналита в свободное пространство вials

Воспроизводимость хроматографического анализа в этом случае основывается на установлении равновесия:



Константу равновесия выражают следующим образом:

$$K = \frac{[\text{Аналит (жидкая фаза)}]}{[\text{Аналит (газовая фаза)}]} = \frac{C_S}{C_G} \quad (1.9)$$

На процесс установления равновесия влияют такие факторы как температура и время выдерживания, природа анализируемого вещества, природа матрицы пробы. При этом площадь хроматографического пика (A), которая пропорциональна содержанию аналита в газовой фазе (C_G), связывают с начальной концентрацией аналита в жидкой пробе (C_0), коэффициентом распределения (K) и фазовым соотношением (β) следующим уравнением [23]:

$$A \propto C_G = \frac{C_0}{K + \beta}, \quad (1.10)$$

В процессе подбора условий проведения анализа стремятся к повышению содержания аналита в газовой фазе (C_G) с целью улучшения пределов его обнаружения. Для этой цели можно использовать различные решения, оказывающие влияние на параметры K или β уравнения 1.10. На коэффициент распределения K оказывают влияние изменение температуры анализируемого образца или изменение свойств его матрицы (высаливание) или свойств самого аналита (дериватизация), что связано с изменением давления паров аналита над жидкостью [23-25].

Зависимость коэффициента распределения от концентрации аналита и его свойств можно выразить следующей пропорцией:

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 \cdot \gamma_i}, \quad (1.11)$$

где p_i^0 – давление чистого растворителя, γ_i – коэффициент активности.

Коэффициент активности может изменяться вследствие варьирования ионной силы раствора или концентрации аналита. Однако наиболее простым методом изменения K является варьирование p_i^0 вследствие его зависимости от температуры, описываемой соотношением:

$$\log p_i^0 = -\frac{B}{T} + C, \quad (1.12)$$

где B и C – коэффициенты, зависящие от природы аналита; T – абсолютная температура, °K.

Исходя из уравнения 1.12, можно получить зависимость K от температуры:

$$\log K = \frac{B'}{T} - C' \quad (1.13)$$

Данное соотношение дает понять, что увеличение температуры приводит к увеличению коэффициента распределения. Однако такой эффект можно наблюдать не для всех соединений. В общем случае, чем лучше растворим аналит в данной матрице, тем сильнее коэффициент распределения будет зависеть от температуры выдерживания виалы. То есть изменение температуры существенно влияет на коэффициент распределения для полярных соединений в водных растворах, и имеет незначительное влияние в случае неполярных соединений [23]. Здесь стоит отметить, что для каждого аналита при определенных условиях характерен свой коэффициент распределения. Поэтому вещество, которое содержится в меньших количествах по сравнению с другими компонентами, может давать большие площади хроматографических пиков.

Учитывая зависимость 1.13, при подборе температуры проведения анализа также руководствуются принципом выбора наименьшего из ее возможных значений. Это обуславливается возможным термическим влиянием на пробу и протеканием побочных процессов, которые могут привести к ошибочным результатам. Кроме того, при увеличении температуры происходит увеличение давления, что при определенных условиях может привести к инструментальным проблемам.

Влияние на величину C_G также можно осуществлять благодаря изменению фазового соотношения путем варьирования объема жидкой фазы в виале. При этом часто используют диапазон значений от 20 до 80 % объема виалы [23]. Предел в 80 % является лимитирующим в связи с необходимостью сохранения достаточного пространства для проведения анализа, в то время как заполнение виалы менее, чем на 20 % возможно для проведения некоторых экспериментов. Подбор объема пробы проводят исходя из свойств соединения, учитывая, что увеличение количества образца (снижение фазового соотношения) приводит к увеличению C_G . Однако следует отметить, что значения K для разных соединений могут варьироваться в пределах четырех порядков, в то время как фазовое соотношение β обычно не изменяется так сильно. Поэтому, если K намного больше, чем β , то концентрация аналита в газовой фазе напрямую зависит от K . В этом случае фазовое соотношение (т.е. объем образца) мало или вообще не влияет на концентрацию в газовой фазе.

Таким образом, подбор условий установления парофазного равновесия является важным шагом к оптимальному проведению хроматографического анализа. При этом такие факторы, как температура флакона, выбор растворителя, объем пробы могут оказать сильное влияние на результаты анализов. Поэтому для обеспечения воспроизводимости количествен-

ного анализа пробы необходимо стремиться к соблюдению принятой для парофазного анализа методики.

Кроме различных систем дозирования существуют различные способы ввода образца в колонку [26]:

1. Ввод пробы с делителем потока (split);
2. Ввод пробы без делителя потока (splitless);
3. Ввод пробы в колонку (on-column injection);
4. Ввод пробы с программированием температуры испарителя.

Первый метод используют при большом содержании целевых соединений в пробе для сужения зоны пробы на входе в колонку. Однако при этом может происходить искажение пробы из-за разности в температурах испарения исследуемых соединений. В результате чего происходит неполный перевод пробы в газовую фазу и как следствие нелинейность деления потока.

Второй метод используют в случаях малого содержания целевых соединений в пробе. Размывание пробы в этом случае можно подавить, если использовать эффекты фокусирования: эффект растворителя или термическое фокусирование [19].

Метод ввода пробы с программированием температуры испарителя часто называют холодным вводом пробы. Данный метод заключается во введении образца в холодный испаритель, где происходит нагрев до испарения легкокипящего растворителя, затем производят резкое повышение температуры испарителя для испарения соединений с более высокой температурой кипения (аналиты). Такое решение позволяет уменьшить фракционирование пробы в игле шприца, а также провести концентрирование пробы.

- Хроматографическая колонка и термостат колонки

Колонка является одним из основных узлов хроматографической системы – в ней происходит разделение смесей соединений. Ее помещают внутрь термостата, основной задачей которого является обеспечение постоянного (изотермического) или определенного (запрограммированного) поддержания температуры колонки.

- Детектор

Детектор представляет собой устройство по обнаружению изменений, связанных с прохождением анализируемой пробы. Обычно он сопряжен с системой преобразования получаемого от детектора сигнала в приемлемый для интерпретации оператором.

Выбор детектора определяется основными характеристиками (чувствительность, предел детектирования, линейность, быстродействие и селективность), которые в наибольшей степени соответствуют цели анализа и условиям его проведения. В силу универсальности, превосходных характеристик и высоких эксплуатационных качеств, наибольшее распростра-

нение в анализе лекарственных средств получил пламенно-ионизационный детектор (ПИД) [9].

Схема ПИД представлена на рис.1.6. Принцип работы данного детектора основывается на возрастании ионного тока при попадании аналита в водородное пламя, в то время как возникновение ионного тока при прохождении газа-носителя обуславливается в большей степени наличием примесей в используемых газах [27]. Для работы ПИД необходимо использовать газы, способствующие горению пламени (водород и кислород/воздух). Кроме того, иногда применяют поддувочный газ для увеличения фокусирования пробы в пламени.

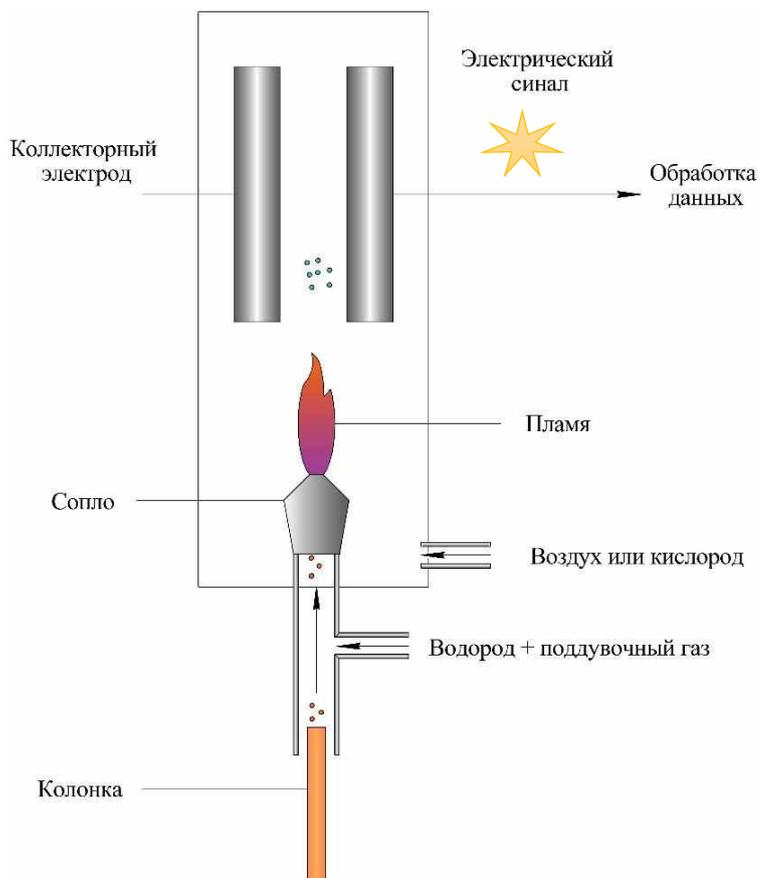


Рисунок 1.6 – Схема строения ПИД

1.3 Объекты исследования

Данная работа предполагает исследование, направленное на разработку методики анализа ООР в субстанциях натрия 7-метилтио-4-оксо-3-циано-4*H*-[1,2,4]триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинида тригидрата (рис. 1.7 а) и натрия 3,8-диэтоксикарбонил-4-оксо-4*H*-пиразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинид моногидрата (рис. 1.7 б). Для удобства обозначения каждое соединение имеет шифр – MNR-857 и АВ-19 соответственно. На рис.1.8 представлены этапы синтеза субстанции MNR-857. На схеме приведены названия органических растворителей,

которые используются на определенной стадии получения субстанции. Аналогично, схема синтеза субстанции АВ-19 представлена на рис.1.9.

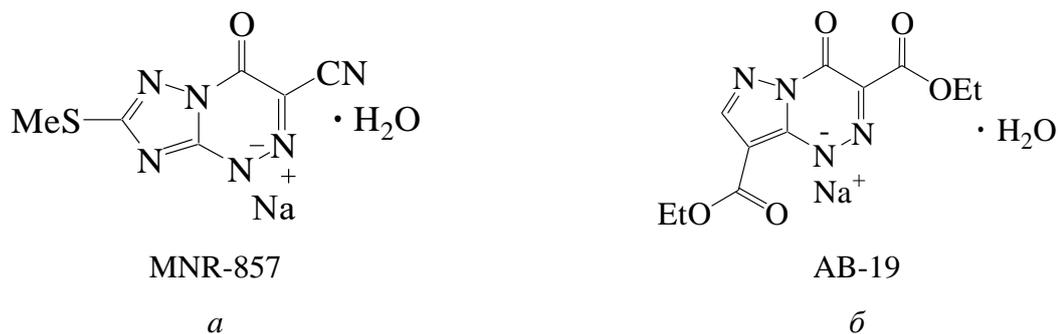


Рисунок 1.7 – Структурные формулы целевых субстанций

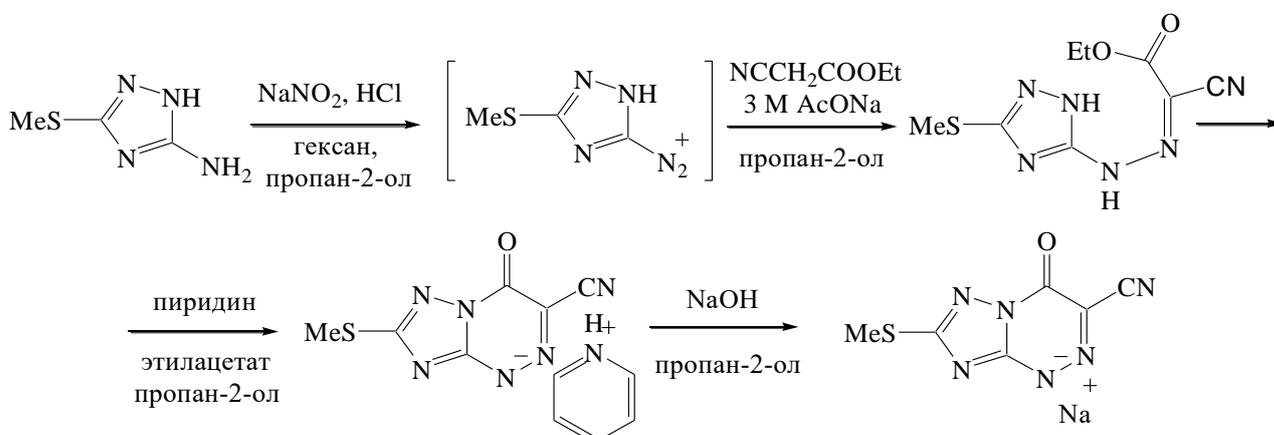


Рисунок 1.8 – Схема синтеза субстанции MNR-857

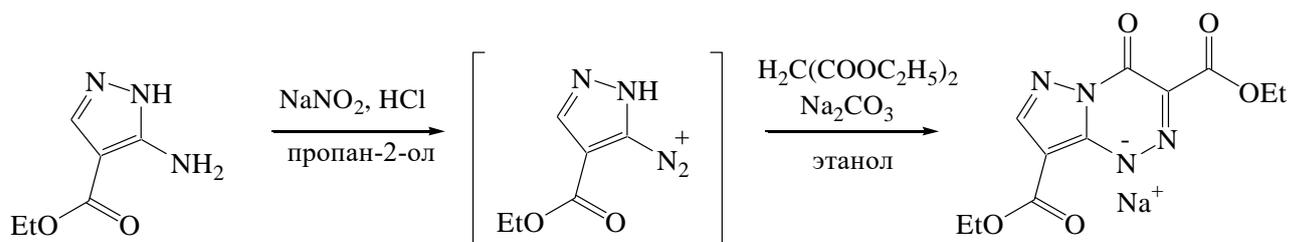


Рисунок 1.9 – Схема синтеза субстанции АВ-19

Исходя из схем, представленных на рис. 1.8 и 1.9 можем сделать вывод, что в целевых субстанциях могут находиться остаточные органические растворители, принадлежащие к II и III классам токсичности. В табл.1.2 представлены значения предельных допустимых концентраций для каждого из них согласно ГФ XIV [9].

Таблица 1.2 – ОР, участвующие в синтезе исследуемых соединений

ООР	Класс токсичности	ПДК мг/день	ПДК (мкг/г)
Пиридин	II	2,0	200
Гексан	II	2,9	290
Этилацетат	III	50,0	5000
Пропан-2-ол	III	50,0	5000
Этанол	III	50,0	5000

Для расчета предельной концентрации ОР II класса используют несколько методов [28]. В том случае, когда суточная доза препарата неизвестна, расчет ведут по формуле:

$$\text{Концентрация (ppm)} = \frac{1000 \cdot \text{ПДК}_д}{D}, \quad (1.14)$$

где ПДК_д – предельно допустимая дневная концентрация ОР, мг/день; D – дневная дозировка препарата, г/день.

В качестве суточной дозы препарата устанавливают значение 10 г. В результате такого решения, рассчитанные ПДК можно использовать в качестве граничных значений, для всех составляющих препарата (по массе не превышающих 10 г).

Для ОР третьего класса, которые являются малотоксичными соединениями, устанавливают общий предел употребления не более 50 мг в день или 0,5 % от массы исследуемого ЛС. При расчете по указанной выше формуле, данное значение составляет не более 5000 мкг/г [9].

2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Используемые реактивы, посуда и аппаратура

При проведении опытов были использованы следующие реактивы:

- вода, полученная с помощью системы очистки воды «Smart2Pure» фирмы «Thermo Scientific» (удельное сопротивление 18,2 МОм·см);
- этанол, медицинский концентрат для приготовления раствора для наружного применения, 95,2 % (ООО «РОСБИО», Россия);
- пропан-2-ол, «for HPLC» с содержанием не менее 99,8 % (VWR, США);
- гексан, х.ч., ТУ 2631-158-44493179-13 (Экос-1, Россия);
- этилацетат, х.ч., ГОСТ 22300-76 (Компонент-Реактив, Россия);
- пиридин, х.ч., ТУ 2631-159-44493179-13 (Экос-1, Россия).

А также использовалось следующее оборудование и лабораторная посуда:

- хроматографическая система «GC System 7890 В» (производство Agilent, США), с парофазным пробоотборником «Headspace Sampler 7697 А» (свидетельство об утверждении типа средств измерений US.C.31.001.A №53133, регистрационный номер 55612-13).
- аналитические весы «Shimadzu A UW 220», специального класса точности (ГОСТ 24104), диапазон взвешивания 0,01–220 г, дискретность 0,0001 г (свидетельство об утверждении типа средств измерений JP.C.28.004.A №56180, регистрационный номер 57927-14);
- колонка хроматографическая DB-624 UI (60 м × 0,32 мм × 1.8 мкм) с предельным диапазоном температур от -20 до 260 °С (Agilent, p/n 123-1364 UI);
- вials хроматографические вместимостью 20 мл с крышками и септой;
- колбы мерные стеклянные по ГОСТ 1770-74: исполнение 1, класс точности 2, вместимостью 25 и 100 см³;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29227-91: тип 1, исполнение 2, класс точности 2, вместимостью 0,5, 1, 5 см³;
- ультразвуковая ванна «Fisherbrand FB 11203» фирмы «Elma» (Германия);

2.2 Разработка методики хроматографического анализа

Разработка методики определения ООР в субстанциях АВ-19 и MNR-857 включает несколько стадий работы, например, выявление определяемых ООР, выбор метода анализа, подбор приемлемых условий проведения анализа.

2.2.1 Выбор методики анализа и начальных условий его проведения

Ранее мы отметили, что в процессе синтеза АВ-19 и MNR-857 участвуют растворители II и III классов опасности. В случае определения ОР II класса опасности важным требованием является селективность используемого метода. При анализе ООР III класса опасности допускается применение термических методов анализа, которые являются относительно простыми, однако неспецифичными. При этом в случае превышения содержания остаточных растворителей в субстанции установленного предела – 0,5 %, каждый ОР должен быть идентифицирован и определен количественно [9]. Поэтому, объектом нашего внимания стал метод ГЖХ, в связи с возможностью его применения для селективного количественного определения содержания ООР в исследуемых субстанциях. Кроме того, использование метода ГЖХ является предпочтительным для исследования кристаллогидратов, так как в этом случае количество высвобождаемой при нагревании воды не влияет на результат анализа.

В связи с тем, что ГФ XIV не предоставляет информации об условиях проведения хроматографического анализа ООР, в качестве отправной точки для выполнения экспериментов по разработке соответствующей методики мы использовали статью 467 Фармакопеи США [28] и основанные на ней методические указания для хроматографического анализа ООР с парофазным вводом образца, разработанные компанией Agilent [29-31]. Согласно этим документам определение ООР проходит в несколько этапов.

На первом этапе для растворителей I, II и III классов проводят процедуру сравнения площадей пиков хроматограмм исследуемых и стандартных растворов (с предельными концентрациями ОР). Если площадь какого-либо из пиков на хроматограмме испытуемого раствора превышает площадь соответствующего пика стандартного раствора, то проводят процедуру подтверждения, при этом повторяют анализ при использовании колонки с другой неподвижной фазой (G-16 вместо G-43). Данные фазы отличаются полярностью, что позволяет выявить возможное наложение пиков близких по времени удерживания соединений. Если результат превышения ПДК подтверждается, тогда проводят количественное определение соответствующего ОР с использованием колонки с фазой G-43.

Основываясь на полученной информации, было решено проводить опыты по разработке методики с использованием неподвижной фазы G-43 (соответствует колонкам Agilent DB-624), которая обладает средней полярностью и состоит на 6 % из цианопропилфенила, на 94 % из полидиметилсилоксана [17].

Кроме того, было решено принять для проведения анализа следующие параметры:

- температура испарителя – 140 °С, температура детектора – 250°С, деление потока – 1:5;

- термостатирование колонки при 40°C в течение 5 мин, затем повышение температуры со скоростью 16 °C/мин до 240°C, с выдержкой в течение 2-х мин;
- температура в парофазном термостате – 85 °C, температура петли инжектора – 85 °C, температура транспортной линии – 100 °C, время уравнивания виалы – 40 мин, время наполнения петли инжектора – 0,5 мин, период установления равновесия петли инжектора – 0,05 мин, давление во флаконе – 15 psi, скорость изменения давления в петле – 20 psi/min, уровень встряхивания виалы – 2.

Проводя первичные эксперименты по подбору условий методики, мы варьировали скорость газа-носителя для получения приемлемого разрешения пиков при возможно меньшем времени проведения анализа. Эксперименты проводили, основываясь на методических рекомендациях от компании Agilent [29-31] в области скоростей близких к 35 см/с (область оптимума на кривой рис.1.2). Наиболее приемлемым значением скорости газа-носителя в нашем случае оказалось значение – 2,5 мл/мин.

2.2.2 Подбор концентрации растворов образцов

Для адаптации существующей методики анализа ООР (представленной в статье 467 Фармакопеи США) мы внесли несколько поправок в порядок проведения экспериментов. Ввиду ограниченного объема образца для анализа мы подбирали массу навески и разведение образца таким образом, чтобы снизить расход субстанции, но в то же время не повлиять на возможность обнаружения ООР. Таким образом, было решено снизить массу навески образца до 0,1000 г (вместо 0,5 г) и разведение субстанций проводить в 5 см³ растворителя непосредственно в виале. В качестве растворителя использовали воду без добавления ДМСО ввиду того, что обе субстанции растворимы в воде (MNR-857 – растворима, АВ-19 – умеренно растворима). При подготовке проб субстанции АВ-19 для анализа добиться полного растворения навески удалось после дополнительной ультразвуковой обработки пробы в закрытой виале в течение 2-х минут при частоте 37 ГГц и температуре 60 °C.

Статья 467 предполагает использование специальных смесей ОР, из которых готовят образцы сравнения с установленными предельными концентрациями. В нашем случае мы использовали для сравнения модельные растворы, приготовленные из соответствующих чистых растворителей. Расчет необходимых концентраций ОР для приготовления растворов сравнения вели по формуле:

$$C_{\text{ср}} = \frac{\text{ПДК} \cdot m}{V}, \quad (2.1)$$

где ПДК_i – предельно допустимая концентрация растворителя [9], мкг/г; *m* – масса навески – 0,1 г; *V* – объем растворителя – 5,0 см³.

В таблице 2.1 указаны полученные по формуле 2.1 концентрации ОР для приготовления модельного раствора сравнения.

Таблица 2.1 – Концентрации ОР в модельном растворе

ООР	Класс токсичности	ПДК ОР в субстанции (мкг/г)	Концентрация ОР в растворе сравнения (мкг/см ³)
Пиридин	II	200	4
Гексан	II	290	5,8
Этилацетат	III	5000	100
Пропан-2-ол	III	5000	100
Этанол	III	5000	100

Для идентификации исследуемых растворителей проводили анализ модельной смеси. Полученные значения времен удерживания указаны в табл. 2.2.

Таблица 2.2 – Времена удерживания ОР

Растворитель	Время удерживания, мин
Этанол	6,59
Пропан-2-ол	7,48
Гексан	8,72
Этилацетат	9,67
Пиридин	12,51

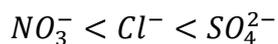
2.2.3 Подбор условий проведения анализа

При проведении предварительного качественного анализа образцов MNR-587 и АВ-19 на наличие в них ОР было обнаружено присутствие пропан-2-ола и этанола. В связи с этим, было принято решение проводить количественное определение именно для данных ОР.

Так как при изначально выбранных на основе литературных данных условиях анализа образец выдерживается при температуре 85 °С в течение 40 минут, нами было исследовано влияние данных условий на результат анализа и возможность варьирования данных параметров.

Изучение влияния температуры выдерживания вials на площадь соответствующих пиков растворителей проводили на стандартных растворах пропан-2-ола и этанола с концентрациями 10 мкг/см³ и 100 мкг/см³. При этом для увеличения отклика сигналов ООР при пониженных температурах было решено применить технологию высаливания.

В качестве высаливающих агентов могут использоваться неорганические соли – хлориды, сульфаты, нитраты и другие. Причем высаливающий эффект увеличивается в ряду:



На основе литературных данных [32, 33] для эксперимента было решено использовать хлориды натрия и аммония в концентрациях 1, 2 и 4 моль/л. На рисунках 2.1 и 2.2 представлены графики зависимости площади хроматографического пика этанола и пропан-2-ола соответственно от концентрации высаливающего агента. Эксперименты проводились для растворов с концентрациями исследуемых ОР 10 и 100 мкг/см³.

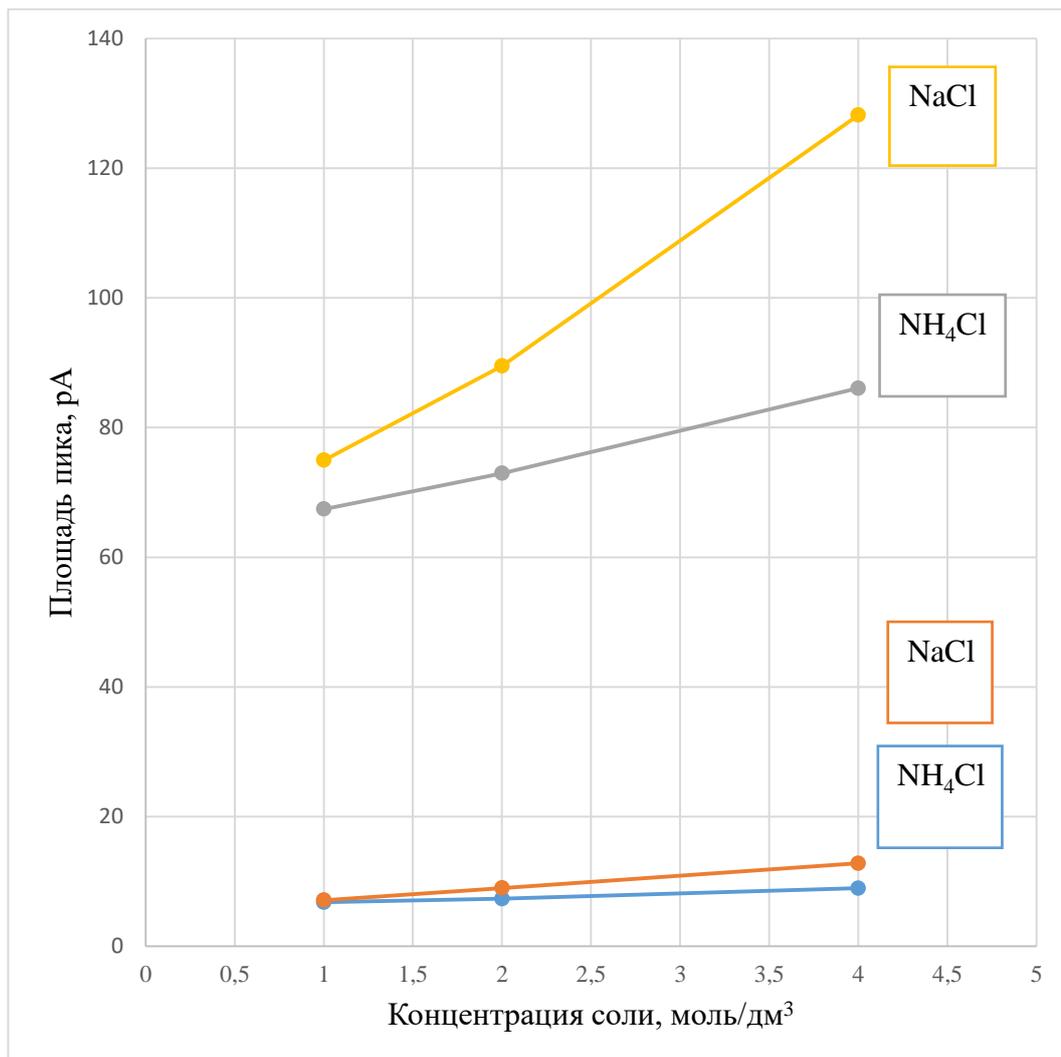


Рисунок 2.1 – Зависимость площади хроматографического пика этанола от концентрации высаливающего агента при выдерживании в течение 40 мин при температуре 40 °С для растворов с концентрациями 10 и 100 мкг/см³

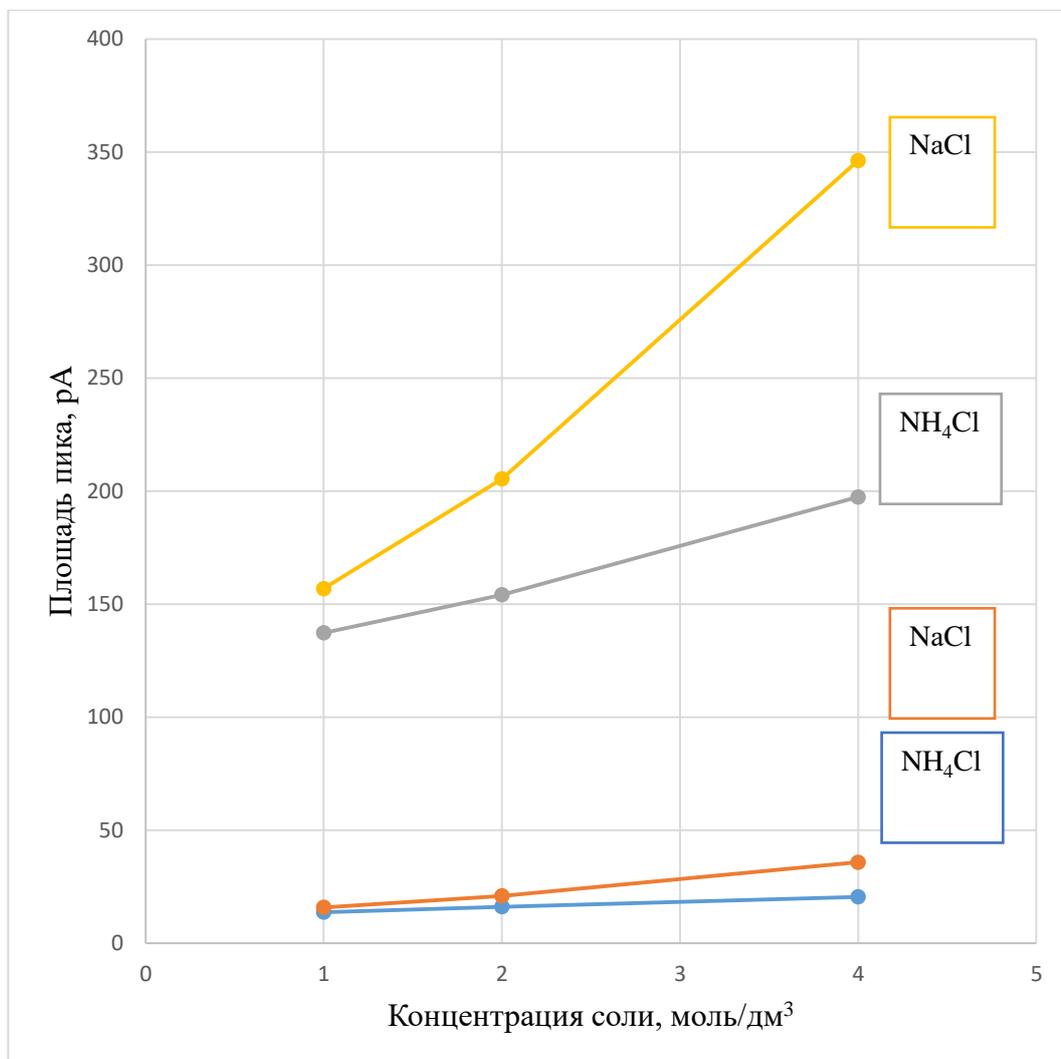


Рисунок 2.2 – Зависимость площади хроматографического пика пропан-2-ола от концентрации высаливающего агента при выдерживании в течение 40 мин при температуре 40°C для растворов с концентрациями 10 и 100 мкг/см³

По полученным зависимостям (рис.2.1 и 2.2) было определено, что большей высаливающей силой для определяемых растворителей обладает хлорид натрия по сравнению с хлоридом аммония. Кроме того, при увеличении концентрации соли в растворе наблюдалось увеличение площадей пиков растворителей. Для дальнейшего опыта по определению влияния температуры установления равновесия на площадь хроматографического пика в качестве высаливающего агента был выбран хлорид натрия в концентрации 4 моль/дм³.

Зависимость площади хроматографического пика от температуры установления равновесия изучали на стандартных растворах с концентрациями определяемых растворителей 10 и 100 мкг/см³ в 4 М растворе хлорида натрия в диапазоне температур от 40 до 60 °С. На рисунках 2.3 и 2.4 представлены результаты проведенных опытов для этанола и пропан-2-ола соответственно.

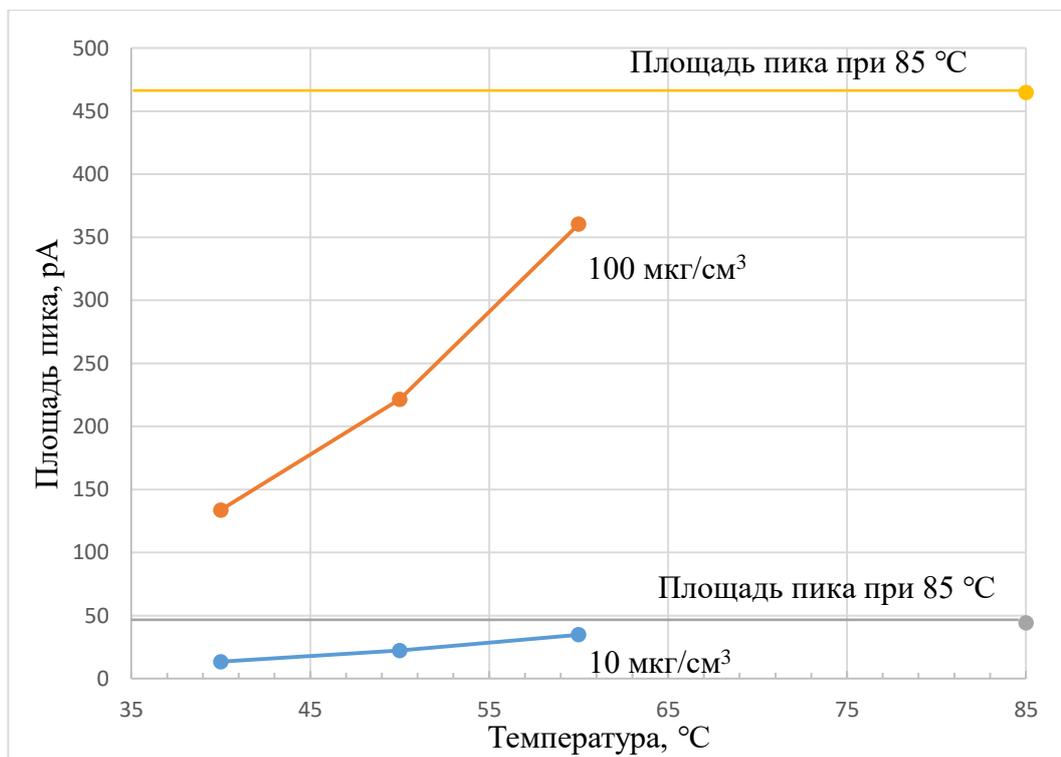


Рисунок 2.3 – Зависимость площади хроматографического пика этанола от температуры установления равновесия при выдерживании в течение 40 мин в растворе NaCl с концентрацией 4 моль/дм³

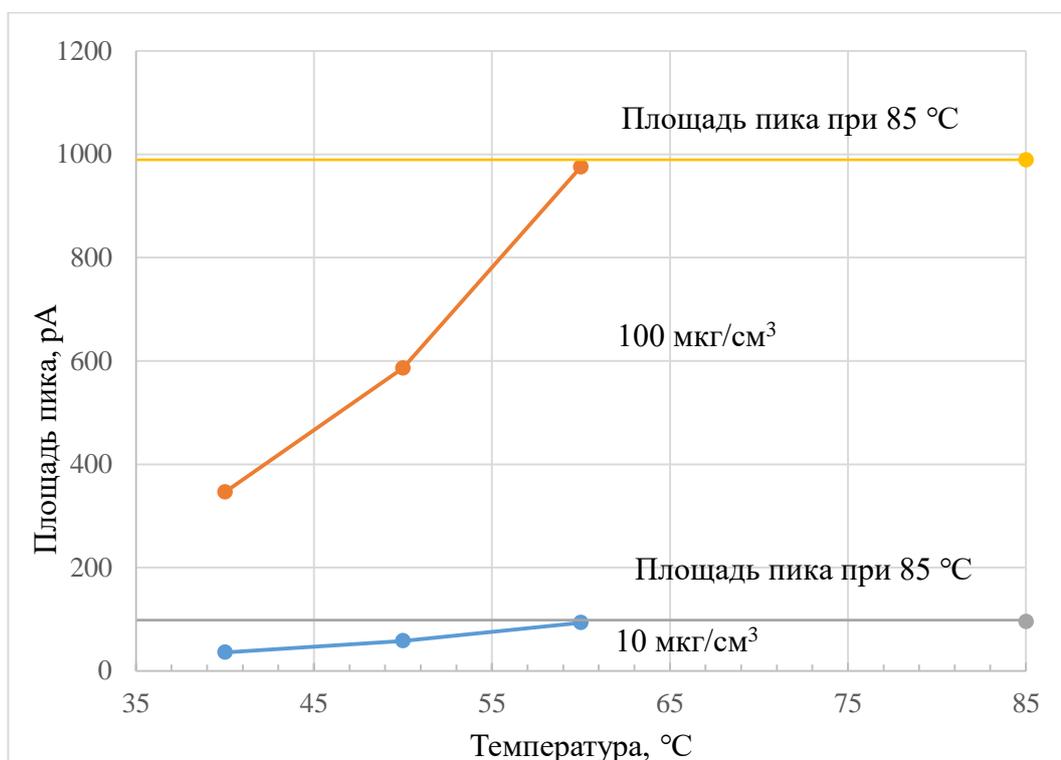


Рисунок 2.4 – Зависимость площади хроматографического пика пропан-2-ола от температуры установления равновесия при выдерживании в течение 40 мин в растворе NaCl с концентрацией 4 моль/дм³

Графики зависимостей (рис.2.3 и 2.4) показывают, что с увеличением температуры выдерживания виалы увеличивается площадь хроматографических пиков как этанола, так и 2-пропанола. При этом для более высоких концентраций ОР (100 мкг/см^3 по сравнению с 10 мкг/см^3) отмечается более крутой наклон кривой. Однако, полученные площади пиков исследуемых растворителей при температуре $60 \text{ }^\circ\text{C}$ в растворе хлорида натрия с концентрацией 4 моль/дм^3 оказались ниже, чем для растворов без высаливающего агента при температуре выдерживания виалы $85 \text{ }^\circ\text{C}$, что ухудшает пределы количественного определения.

Наряду с этим, при высаливании снижается растворимость субстанции, что ведет к меньшему высвобождению растворителя из матрицы. В связи с этим, было решено отказаться от использования хлорида натрия, а также оставить температуру выдерживания виалы равной $85 \text{ }^\circ\text{C}$.

Эксперимент по варьированию времени выдерживания виалы для установления равновесия между жидкой и газовой фазами проводили на стандартных растворах этанола (рис.2.5) и пропан-2-ола (рис.2.6) с концентрациями 10 мкг/см^3 и 100 мкг/см^3 при выдерживании виалы в течение 10, 20, 30 и 40 мин.

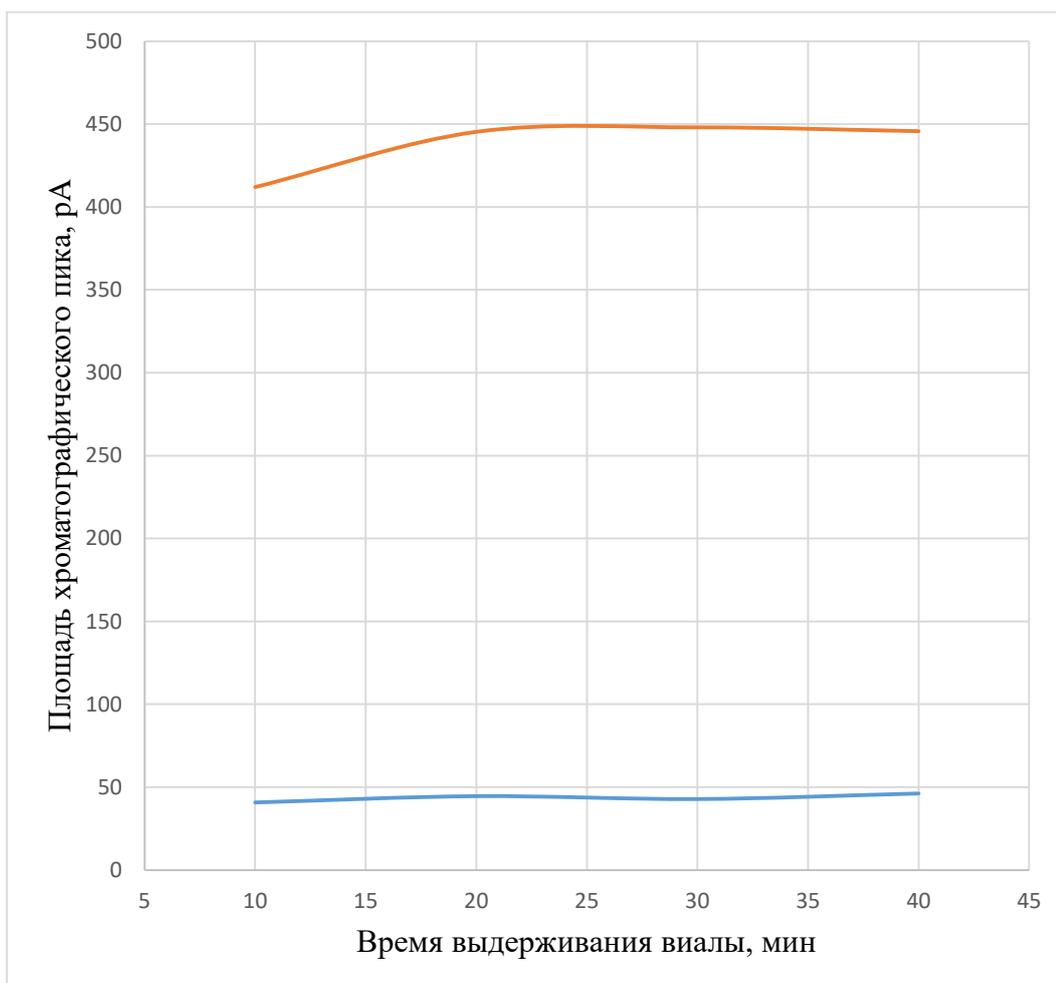


Рисунок 2.5 – Зависимость площади хроматографического пика этанола от времени установления равновесия при температуре $85 \text{ }^\circ\text{C}$

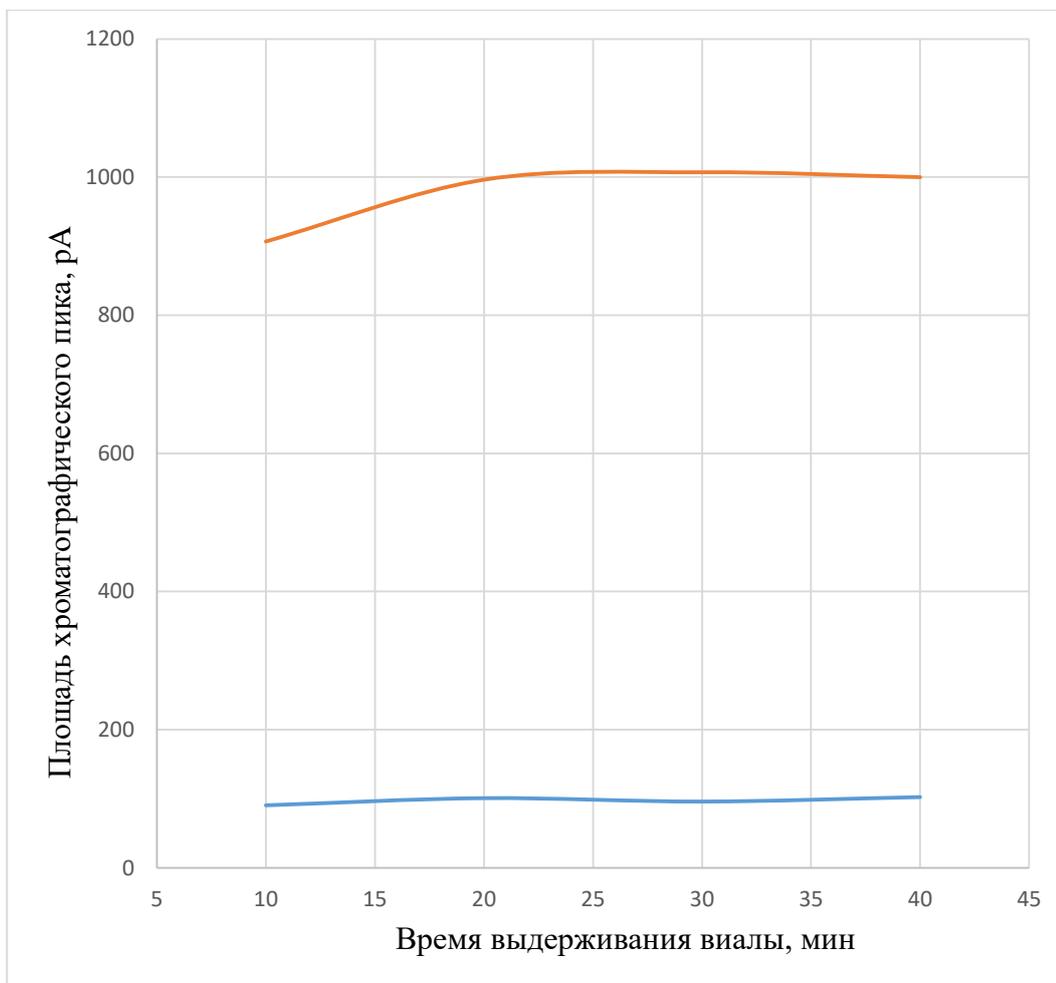


Рисунок 2.6 – Зависимость площади хроматографического пика 2-пропанола от времени установления равновесия при температуре 85 °C

Графики зависимостей (рис.2.5 и 2.6) показывают, что при заданных условиях равновесие между газовой и жидкой фазами в хроматографической виале для этанола и пропан-2-ола достигается за 20 мин.

Снижение времени установления равновесия позволяет снизить время анализа на 20 мин, а также термическое влияние на пробу, в связи с этим было решено принять данное усовершенствование методики для количественного анализа этанола и пропан-2-ола в субстанциях АВ-19 и MNR-857.

2.2.4 Определение диапазона количественного определения

Для количественного определения был выбран метод внешнего стандарта, который заключается в определении концентрации путем сравнения площадей пиков определяемых компонентов на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца. Частным случаем данного метода является метод градуировочной кривой, в ходе которого определяют взаимосвязь между измеренным сигналом (y) и количеством определяемого ве-

щества (x) и рассчитывают уравнение градуировочной функции. Согласно ГФ XIV [9] при проведении анализа лекарственных форм для построения кривой по стандартному образцу производят его разведение, которое подбирается таким образом, чтобы концентрация основного соединения в растворе стандартного образца была в диапазоне от 80 до 120 % от ожидаемой концентрации в пробе.

В нашем случае для расширения области определения в соответствии с возможными содержаниями определяемых компонентов был взят диапазон от 10 до 200 % от предельного содержания ОР (100 мкг/мл). При этом строился график по 10 точкам.

2.2.5 Установление матричного влияния на высвобождение ОР

Эффект влияния матрицы может оказать негативное действие на результат количественного анализа. В связи с этим стремятся к его нивелированию. Для этого прибегают к разным способам, например, устанавливают коэффициент пересчета, прибегают к дополнительной пробоподготовке, используют метод стандартных добавок [34, 35].

Для исключения возможной ошибки при проведении анализа мы сравнили результаты экспериментов с использованием метода стандартных добавок с полученными по градуировочной кривой для образца субстанции АВ-19.

Метод стандартных добавок заключается во введении в пробу известного количества определяемого вещества и сравнения сигналов, которые были получены для испытуемого раствора со стандартной добавкой и для испытуемого раствора определяемого вещества без добавки [9, 34, 35]. Содержание аналита в исследуемом образце рассчитывают следующим образом:

$$C_x = C_{\text{std}} \cdot \frac{S_x}{S_{\text{std}+x} - S_x}, \quad (2.2)$$

где C_{std} – концентрация стандартной добавки; S_x – интенсивность сигнала определяемого вещества (площадь или высота пика) для испытуемого раствора без стандартной добавки; $S_{\text{std}+x}$ – интенсивность сигнала определяемого вещества (площадь или высота пика) для испытуемого раствора со стандартной добавкой.

Влияние матрицы определяли для образца субстанции АВ-19 одной партии синтеза. Пробы с добавками и без добавки подвергали анализу 3 раза. В таблицах 2.3 и 2.4 представлены средние значения концентраций этанола и пропан-2-ола соответственно, которые были определены методами добавок ($\overline{C_x^{\text{доб}}}$) и градуировочной кривой ($\overline{C_x^{\text{град}}}$). Для полученных результатов были рассчитаны значения критериев Фишера ($f_{\text{расч}}$) и Стьюдента ($t_{\text{расч}}$) и сравнены с табличными значениями ($f_{\text{табл}}$ и $t_{\text{табл}}$).

Таблица 2.3 – Результаты количественного определения этанола в субстанции АВ-19

Номер опыта	C_{std} , мкг/см ³	\bar{S}_x , pA	$\overline{C}_x^{\text{доб}}$, мкг/см ³	$\overline{C}_x^{\text{град}}$, мкг/см ³	Сравнение результатов
1	–	142,9278		32,29	$S_1^2 = 0,194, S_2^2 = 0,190$
2	50,2	368,9119	31,75		$f_{\text{табл}}(5\%; 2; 5) = 5,79 > f_{\text{расч}} = 1,02$
3	100,4	588,6102	32,20		$t_{\text{табл}}(5\%; 7) = 2,36 > t_{\text{расч}} = 2,30$

Таблица 2.4 – Результаты количественного определения пропан-2-ола в субстанции АВ-19

Номер опыта	$\overline{C}_{\text{std}}$, мкг/см ³	\bar{S}_x , pA	$\overline{C}_x^{\text{доб}}$, мкг/см ³	$\overline{C}_x^{\text{град}}$, мкг/см ³	Сравнение результатов
1	–	87,1953		8,88	$S_1^2 = 0,032, S_2^2 = 0,026$
2	47,87	570,5786	8,64		$f_{\text{табл}}(5\%; 5; 2) = 19,33 > f_{\text{расч}} = 1,26$
3	95,73	1057,806	8,60		$t_{\text{табл}}(5\%; 7) = 2,36 > t_{\text{расч}} = 2,07$

Таким образом, исходя из расчетов f и t критериев, различия средних результатов, полученных методом градуировочного графика и методом добавок не значимы. Принимая во внимание, что в получаемых методом добавок результатах анализа скомпенсирован матричный эффект, можно сделать вывод о незначимости данного влияния и на результаты, полученные по градуировочному графику.

2.2.6 Определение параметров хроматографического разделения

Перед экспериментами по количественному определению ООР в исследуемой субстанции проводили анализ растворов с предельными концентрациями соответствующих ООР. Целью данных опытов являлось определение хроматографических параметров разделения исследуемых соединений, с помощью которых можно проверить надлежащее функционирование используемой системы, а также идентифицировать то или иное соединение (по времени удерживания).

Масса навески этанола составила 1,0017 г, а масса навески 2-пропанола – 0,9971 г. Исходя из данных паспортов к используемым реактивам, определяли массовую концентрацию ООР в применяемом для анализа растворе – 95,36 мкг/см³ этанола и 99,71 мкг/см³ пропан-2-ола.

Для проведения анализа в 3 стеклянных флакона (виалы) вместимостью 20,0 см³ отбирали по 5,0 см³ модельной смеси. Пропан-2-ол и этанол идентифицировали по абсолютному времени удерживания – 7,48 и 6,59 мин соответственно. Результат представлен на рис. 2.7. По хроматограмме модельного раствора были определены параметры, указанные в табл.2.5.

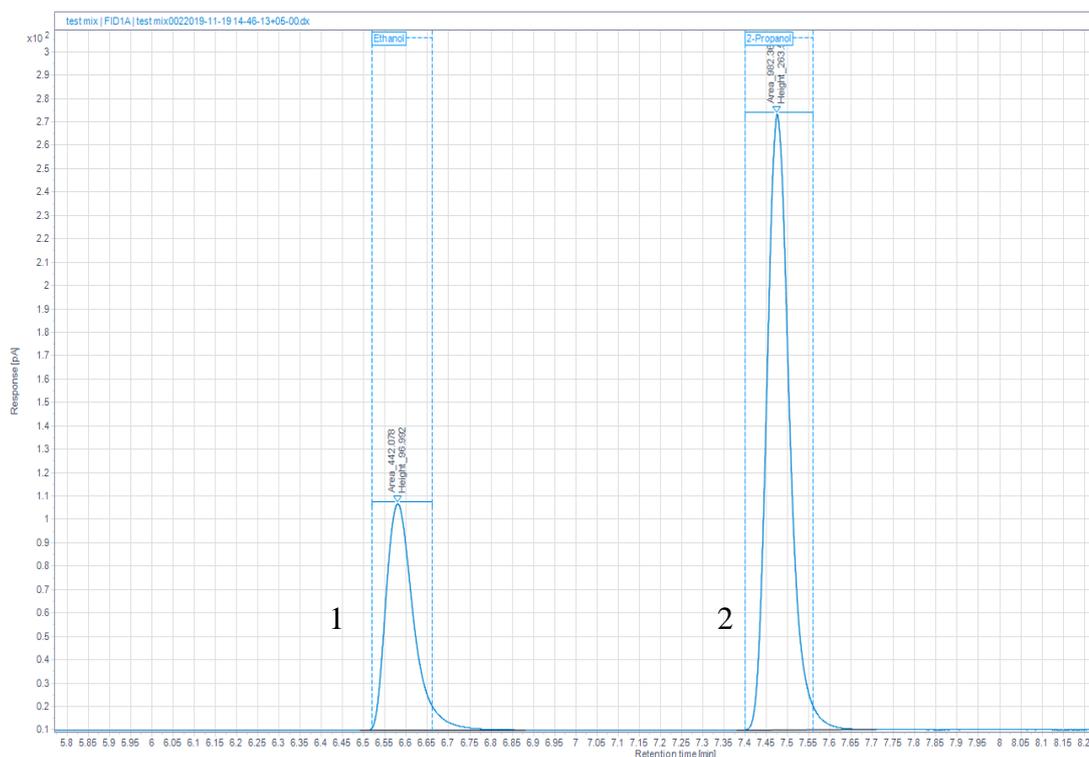


Рисунок 2.7 – Фрагмент хроматограммы модельного раствора (1 – этанол; 2 – 2-пропанол)

Таблица 2.5 – Хроматографические параметры пиков модельной смеси

Показатели	Этанол	2-Пропанол
Эффективность колонки и форма пика		
N	55500±10000	97000±3000
A _s	1,46±0,02	1,27±0,04
Разделительная способность		
R _s	8,64±0,36	
Воспроизводимость		
RSD t _R , %	0,009	0,013
RSD S, %	0,28	0,21

Согласно указанным в ГФ XIV требованиям [9], значения асимметрии пика не должны превышать 1,5, а значения разрешения должны быть более 1,5. Исходя из представленных в табл.2.5 данных, можно сделать вывод, что предъявленные к рассматриваемым показателям требования выполнены.

2.3 Методика определения ООР

2.3.1 Условия проведения анализа

Анализ на наличие и количественное содержание ООР в субстанции проводили на кварцевой капиллярной колонке «DB-624 UI» длиной 60 м с диаметром 0,32 мм и толщиной нанесенной неподвижной фазы 1,8 мкм, состоящей на 6% из цианопропилфенила и на 94% из полидиметилсилоксана. При этом устанавливали следующие параметры проведения анализа: температура испарителя – 140 °С, температура детектора – 250 °С, скорость газоносителя (гелий) – 2,5 мл/мин, деление потока – 1:5.

Для термостата колонки был выбран следующий режим: выдерживание при 40°С в течение 5 мин, затем повышение температуры со скоростью 16 °С/мин до 240°С, с выдержкой в течение 2-х мин.

Параметры парофазного ввода были представлены следующими значениями: температура в парофазном термостате – 85 °С, температура петли инжектора – 85 °С, температура транспортной линии – 100 °С, время уравнивания виалы – 20 мин, время наполнения петли инжектора – 0,5 мин, период установления равновесия петли инжектора – 0,05 мин, давление во флаконе – 15 psi, скорость изменения давления в петле – 20 psi/мин, уровень встряхивания виалы – 2.

Перед проведением измерений хроматографическую систему выдерживали в течение 2-х часов в заданном режиме (см. выше). После уравнивания системы проводили определение ООР.

Соблюдались следующие условия работы:

- температура окружающего воздуха 22 ± 3 °С;
- атмосферное давление 97 ± 10 кПа;
- относительная влажность от 40 до 90%;
- напряжение в питающей сети 220 ± 20 В;
- частота тока в питающей сети 50 ± 1 Гц.

2.3.2 Приготовление растворов

- Образцы исследования. Испытуемый раствор готовили в хроматографической виале вместимостью 20 см³ путем взятия навески около 0,1000 г (точная навеска) исследуемой субстанции и ее растворения в 5,0 см³ дистиллированной воды. Для субстанции АВ-19 проводили дополнительную обработку ультразвуком при температуре 60 °С в течение 2-х минут при 37 ГГц. Виалу закрывали винтовой крышкой с септой из политетрафторэтилена.

Для каждого образца субстанций проводили не менее 3-х испытаний. Растворы использовались после приготовления и не подлежали хранению.

- Модельная смесь. В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносили небольшое количество дистиллированной воды ($\sim 20 \text{ см}^3$), затем брали навески массами $0,0400 \text{ г}$ пиридина, $0,0580 \text{ г}$ гексана, и по $1,0000 \text{ г}$ этилацетата, пропан-2-ола и этанола (точные навески), доводили раствор до метки дистиллированной водой, а затем тщательно перемешивали (Раствор А1). Далее отбирали пипеткой вместимостью 1 см^3 , соответствующий объем раствора А1, вносили в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводили до метки дистиллированной водой (Раствор Б1). После тщательного перемешивания в хроматографическую виалу вместимостью 20 см^3 с помощью градуированной пипетки вместимостью 5 см^3 вносили соответствующий объем раствора Б1. Виалу закрывали винтовой крышкой с септой из политетрафторэтилена. Растворы анализировались после приготовления и не подлежали хранению.

- Градуировочные растворы. Готовили путем разбавления основного раствора и использовали в этот же день.

Основной раствор А2 готовили в мерной колбе вместимостью 100 см^3 , в которую вносили небольшое количество дистиллированной воды ($\sim 20 \text{ см}^3$), а затем с помощью лабораторных весов добавляли по 1 г пропан-2-ола и этанола (точные навески). Полученную смесь доводили дистиллированной водой до метки и перемешивали. Масса навески пропан-2-ола составила $1,0028 \text{ г}$, а этанола – $1,0040 \text{ г}$. Концентрации растворов определяли согласно массовым долям этанола и пропан-2-ола, указанным в паспортах: этанол – $95,2 \%$, пропан-2-ол – $100,0 \%$.

Градуировочный раствор 1 готовили путем внесения в мерную колбу объемом $100,0 \text{ см}^3$ с помощью градуированной пипетки ($0,1 \text{ см}^3$) $0,1 \text{ см}^3$ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 1 составила $10,028 \text{ мкг/см}^3$. Концентрация этанола в градуировочном растворе 1 составила $9,581 \text{ мкг/см}^3$.

Градуировочный раствор 2 готовили путем внесения в мерную колбу $100,00 \text{ см}^3$ с помощью градуированной пипетки ($0,5 \text{ см}^3$) $0,3 \text{ см}^3$ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 2 составила $30,084 \text{ мкг/см}^3$. Концентрация этанола в градуировочном растворе 2 составила $28,674 \text{ мкг/см}^3$.

Градуировочный раствор 3 готовили путем внесения в мерную колбу $100,00 \text{ см}^3$ с помощью градуированной пипетки ($0,5 \text{ см}^3$) $0,5 \text{ см}^3$ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуи-

ровочном растворе 3 составила 50,140 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 3 составила 47,790 мкг/см³.

Градуировочный раствор 4 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (1,0 см³) 0,8 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 4 составила 80,224 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 4 составила 76,465 мкг/см³.

Градуировочный раствор 5 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (1,0 см³) 0,9 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 5 составила 90,252 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 5 составила 86,023 мкг/см³.

Градуировочный раствор 6 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (1,0 см³) 1,0 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 6 составила 100,280 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 6 составила 95,808 мкг/см³.

Градуировочный раствор 7 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (2,0 см³) 1,1 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 7 составила 110,308 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 7 составила 105,139 мкг/см³.

Градуировочный раствор 8 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (2,0 см³) 1,2 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 8 составила 120,336 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 8 составила 114,697 мкг/см³.

Градуировочный раствор 9 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (2,0 см³) 1,5 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуировочном растворе 9 составила 150,420 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 9 составила 143,371 мкг/см³.

Градуировочный раствор 10 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (2,0 см³) 2,0 см³ основного раствора А2. Дистиллированной водой доводили объем до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в градуи-

ровочном растворе 10 составила 200,560 мкг/см³. Концентрация этанола в градуировочном растворе 10 составила 191,162 мкг/см³.

Каждый из приготовленных градуировочных растворов 1–10 отбирали по 5,0 см³ в 3 виалы, вместимостью 20,0 см³. Флаконы герметично закрывали крышкой с септой. В хроматографическую систему вводили по 1 см³ газовой фазы раствора. Этанол и пропан-2-ол идентифицировали по абсолютному значению времени удерживания – 6,59 и 7,48 мин соответственно.

- Растворы для расчета предела количественного определения. Готовили путем разбавления градуировочных растворов 1 и 6 и использовали в этот же день.

Раствор для расчета предела количественного определения – П1 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (1,0 см³) 1,0 см³ градуировочного раствора 6. Дистиллированной водой доводили объем колбы до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в растворе П1 составила 1,003 мкг/см³. Концентрация этанола в растворе П1 составила 0,958 мкг/см³.

Раствор для расчета предела количественного определения – П2 готовили путем внесения в мерную колбу 100,00 см³ с помощью градуированной пипетки (1,0 см³) 1,0 см³ градуировочного раствора 1. Дистиллированной водой доводили объем колбы до метки и перемешивали. Концентрация пропан-2-ола в растворе П2 составила 0,100 мкг/см³. Концентрация этанола в растворе П2 составила 0,096 мкг/см³.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Градуировочная кривая

3.1.1 Результаты построения градуировочной кривой

Построение градуировочной кривой основывалось на результатах анализа градуировочных растворов 1-10, методика приготовления которых указана в разделе 2.3.2. В результате проведенных опытов были получены значения площадей пиков этанола и пропан-2-ола, приведенные в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Площади пиков ОР градуировочных растворов 1-10

№ раствора	Введено, мкг/см ³	Площади пиков		
		1 измерение	2 измерение	3 измерение
Этанол				
1	9,581	42,611	42,164	43,175
2	28,674	131,244	130,423	129,974
3	47,79	213,342	214,483	212,519
4	76,465	346,107	347,081	349,37
5	86,023	393,477	398,25	400,011
6	95,808	444,102	445,111	444,39
7	105,139	473,59	487,02	479,731
8	114,697	517,454	513,35	510,201
9	143,371	679,014	659,844	648,500
10	191,162	867,784	861,12	865,158
Пропан-2-ол				
1	10,028	95,517	95,562	96,226
2	30,084	295,633	292,767	290,693
3	50,140	477,777	479,565	475,67
4	80,224	764,738	776,863	781,653
5	90,252	876,99	892,027	895,114
6	100,280	992,063	997,27	994,992
7	110,308	1046,075	1064,075	1057,32
8	120,336	1153,236	1139,993	1136,004
9	150,420	1476,981	1477,511	1443,345
10	200,560	1939,894	1919,64	1933,356

Обработка полученных данных с помощью программного обеспечения привела к построению градуировочных кривых этанола и пропан-2-ола в координатах: массовая концентрация ОР в мкг/см³ – площадь хроматографического пика. Градуировочные кривые для этанола и пропан-2-ола приведены в Приложении А на рисунках А.1 и А.2 соответственно.

3.1.2 Расчет параметров линейной зависимости

Линейная зависимость выражается уравнением:

$$y = bx + a, \quad (3.1)$$

где y – измеряемая величина; x – концентрация (количество) определяемого вещества или элемента; b – угловой коэффициент линейной зависимости; a – свободный член линейной зависимости.

С целью подтверждения достоверности линейной связи между x и y проводят корреляционный анализ полученных данных, а затем рассчитывают значения констант a и b и их доверительные интервалы.

Первым этапом подтверждения линейности является расчет коэффициента корреляции:

$$r = \frac{m \cdot \sum_1^m x_i \cdot y_i - \sum_1^m x_i \cdot \sum_1^m y_i}{\sqrt{[m \cdot \sum_1^m x_i^2 - (\sum_1^m x_i)^2] \cdot [m \cdot \sum_1^m y_i^2 - (\sum_1^m y_i)^2]}} \quad (3.2)$$

В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $\geq r 0,98$ [9].

Коэффициенты a и b зависимости рассчитывают с использованием метода наименьших квадратов по полученным значениям переменной y (площади пиков ОР градуировочных растворов) и заданным значениям x (концентрация ОР в градуировочных растворах):

$$b = \frac{m \cdot \sum_1^m x_i \cdot y_i - \sum_1^m x_i \cdot \sum_1^m y_i}{m \cdot \sum_1^m x_i^2 - (\sum_1^m x_i)^2} \quad (3.3)$$

$$a = \frac{\sum_1^m y_i - b \cdot \sum_1^m x_i}{m}, \quad (3.4)$$

где m – объем выборки.

При использовании коэффициентов a и b для расчета значений y при известных значениях x , согласно зависимости (3.1), полученные значения y обозначают через $Y_1, Y_2, \dots, Y_i, \dots, Y_n$. Разброс значений Y_i относительно значений y_i характеризуется величиной дисперсии, которую вычисляют по уравнению:

$$s_0^2 = \frac{\sum_1^m (y_i - Y_i)^2}{f} = \frac{\sum_1^m y_i^2 - a \cdot \sum_1^m y_i - b \cdot \sum_1^m x_i \cdot y_i}{f}, \quad (3.5)$$

где f – число степеней свободы ($f = m - 2$).

В свою очередь, дисперсии констант b и a (s_b^2 и s_a^2) находят по уравнениям:

$$s_b^2 = \frac{m \cdot s_0^2}{m \cdot \sum_1^m x_i^2 - (\sum_1^m x_i)^2} \quad (3.6)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m} \cdot \sum_1^m x_i^2 \quad (3.7)$$

Стандартные отклонения s_b и s_a и величины Δb и Δa , необходимые для оценки доверительных интервалов констант уравнения 3.1, рассчитывают по формулам:

$$s_b = \sqrt{s_b^2} \quad (3.8)$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} \quad (3.9)$$

$$\Delta b = t(P, f) \cdot s_b \quad (3.10)$$

$$\Delta a = t(P, f) \cdot s_a \quad (3.11)$$

Исходя из уравнения 3.1 с известными константами a и b можно найти точку графика с координатами x и y , называемая центром калибровочного графика:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^m x_i}{m} \quad (3.12)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_1^m y_i}{m} \quad (3.13)$$

В данной точке и ее окрестностях отмечаются наименьшие отклонения значений y_i от значений Y_i . Стандартные отклонения s_y и s_x величин Y и X относительно центра графика можно определить по следующим уравнениям:

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}} \quad (3.14)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2} \cdot \left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} \right]} \quad (3.15)$$

где n_j – количество вариант y , по которым вычислено искомое значение X ($n_j = 1$, так как расчет стандартных отклонений ведем для центра калибровочного графика).

С учетом значений s_y и s_x могут быть найдены значения величин ΔY и ΔX :

$$\Delta Y = t(P, f) \cdot s_y \quad (3.16)$$

$$\Delta X = t(P, f) \cdot s_x \quad (3.17)$$

Значения s_x и ΔX , которые были найдены при $n_j = 1$ характеризуют воспроизводимость метода [9].

Проведем статистический анализ результатов, полученных для градуировочных растворов 1-10 (табл.3.1). Значения рассчитанных статистических показателей для полученных кривых этанола и пропан-2-ола представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.2 – Статистическая обработка полученных данных

Показатель	Значения	
	Этанол	Пропан-2-ол
m	10	
$f(m-2)$	8	
\bar{x}	89,87	94,26
\bar{y}	409,69	911,95
b	4,55	9,65
a	0,36	2,32
$t(0,95,8)$	2,31	
Δb	0,09	0,20
Δa	9,30	21,21
s_0^2	317,31	1650,62
r	0,9997	0,9997
s_x	0,93	1,00
ΔX при $n_{j=1}$	2,14	2,30
$\frac{\Delta X \cdot 100}{\bar{x}}, \%$	2,38	2,45

Таким образом, обе градуировочные кривые (рис.А.1 и А.2 в приложении А) имеют коэффициенты корреляции 0,9997. Данные значения удовлетворяют условию $\geq r 0,98$, что свидетельствует о приемлемости применения полученных графиков для количественного определения этанола и пропан-2-ола в субстанциях MNR-857 и АВ-19. Кроме того, были рассчитаны коэффициенты a и b для каждой зависимости и получены следующие уравнения:

$$\text{Этанол} \quad y = 4,55x + 0,36,$$

$$\text{Пропан-2-ол} \quad y = 9,65x + 2,32.$$

Так как центральная точка графика и ее окрестности имеют наименьшее отклонение полученных значений от найденных (по зависимости 3.1), были рассчитаны показатели воспроизводимости метода – s_x и ΔX . Для этанола: $s_x = 0,93$, $\Delta X = 2,14$ мкг/см³. Для пропан-2-ола: $s_x = 1,00$, $\Delta X = 2,45$ мкг/см³.

3.2 Определение показателей качества методики

При разработке той или иной методики анализа лекарственных средств (особенно методики количественного определения) часто требуется подтверждение ее пригодности для решения поставленной задачи – ее валидация.

При валидации проводится оценка аналитической методики по таким показателям как: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, промежуточная прецизионность, устойчивость [9, 36-41].

3.2.1 Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов.

Для валидируемой методики количественного определения и испытаний на примеси должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов, подвижной фазы, растворителя не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Специфичность может доказываться на основе данных, полученных при анализе модельных смесей известного состава или результатах анализов реальных объектов, выполненных параллельно, с другой методикой, специфичность которой доказана [9, 37].

В нашем случае специфичность методики определялась путем анализа модельной смеси исследуемых ОР (рисунок 2.7). Для каждого растворителя было определено время удерживания пика (табл.2.2) и некоторые другие хроматографические параметры (табл.2.5). Полученные пики не перекрывались и имели приемлемые значения фактора асимметрии (диапазон значений 0,8-1,5) и разрешения (более или равно 1,5). Искажающее влияние матрицы на результат анализа было исключено исходя из приведенных в разделе 2.2.5 опытов. Кроме того, на хроматограммах чистого растворителя (воды) отсутствовали пики в областях времен удерживания исследуемых ОР.

3.2.2 Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) – это наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть определено с использованием разработанной методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью [36-39].

Для инструментальных методов анализа возможно использование нескольких методик оценки ПКО – по отношению сигнал/шум и по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту градуировочного графика, построенного в области предела количественного определения [36-39].

В случае использования соотношения сигнал/шум значение ПКО соответствует концентрации, при которой отношение сигнала к уровню шума 10:1. Расчет ведут по формуле:

$$\text{ПКО} = \frac{10 \cdot h}{H} C_{min}, \quad (3.18)$$

где H – высота пика, соответствующего рассматриваемому веществу на хроматограмме указанного стандартного раствора, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии; h – размах фонового шума; C_{min} – концентрация раствора, используемого для определения ПКО.

Измерение размаха фонового шума проводится в интервале времен удерживания, продолжительность которого не менее 5-кратного значения ширины пика на его полувысоте, расположенном по возможности равномерно по обе стороны от места обнаружения пика [9].

В данных целях мы исследовали растворы с концентрациями ОР 0,1 и 1,0 мкг/см³, значения которых находятся вблизи ПКО, и приготовленных согласно пункта 2.3.2. Конечные концентрации этанола в приготовленных растворах П1 и П2 составили 0,096 и 0,958 мкг/см³, а пропан-2-ола – 0,100 и 1,003 мкг/см³.

Хроматограммы раствора с концентрацией этанола 0,096 мкг/см³ и пропан-2-ола 0,100 мкг/см³ представлены на рис.3.1 и рис.3.2 соответственно.

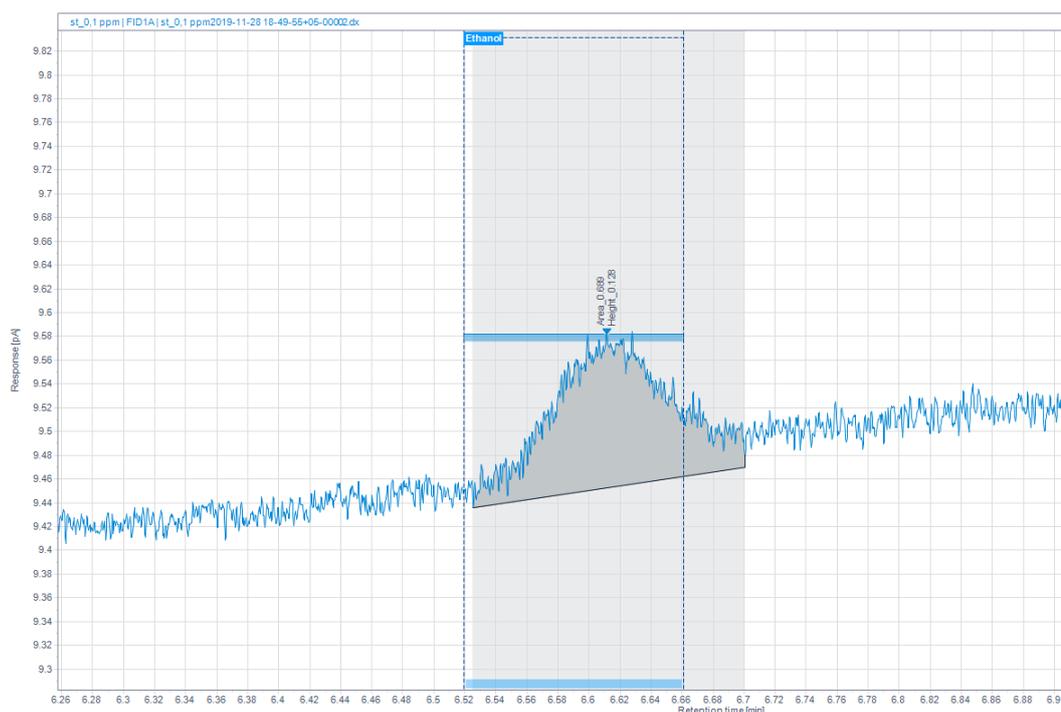


Рисунок 3.1 – Хроматограмма раствора с концентрацией этанола 0,096 мкг/см³

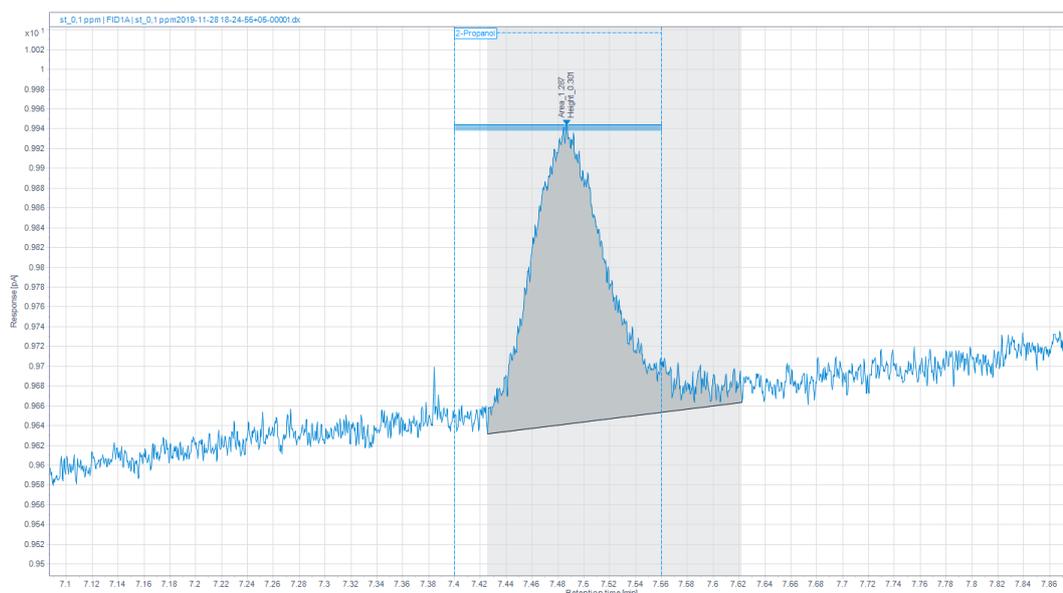


Рисунок 3.2 – Хроматограмма раствора с концентрацией пропан-2-ола 0,100 мг/см³

По данным рисунка 3.1 определили соотношение сигнал/шум для раствора этанола, которое составило 5,12:1, что свидетельствует о невыполнении установленного требования по соотношению S/N.

По данным рисунка 3.2 определили, что соотношение S/N для раствора пропан-2-ола составило 15:1. Выполнив пересчет по формуле 3.18, получили расчетное предельное значение концентрации пропан-2-ола для количественного определения, которое составило 0,067 мг/см³.

Для определения ПКО этанола проводили дополнительное испытание при концентрации 0,958 мг/см³. Результат опыта представлен на рисунке 3.3.

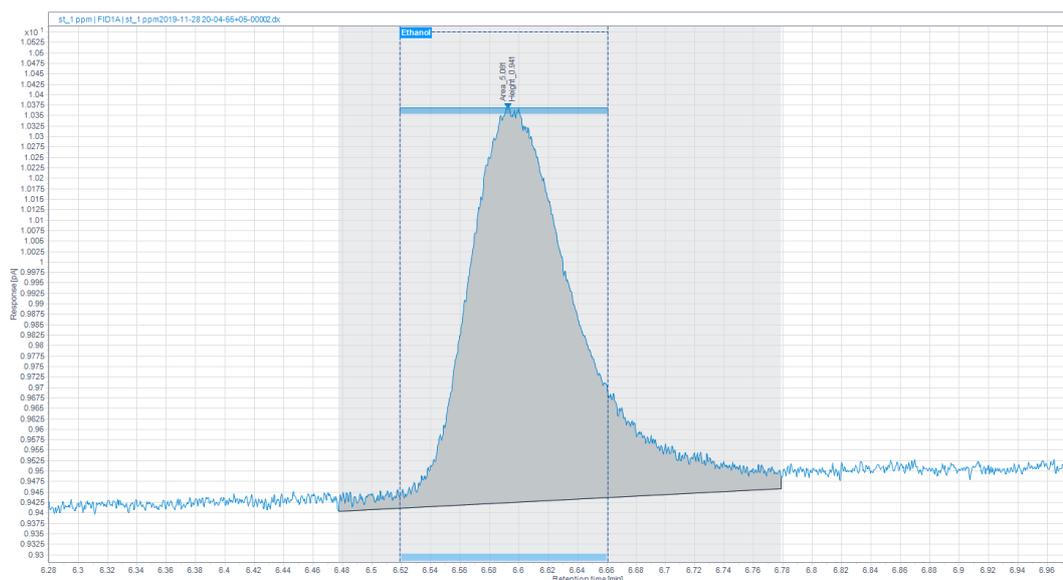


Рисунок 3.3 – Хроматограмма раствора с концентрацией этанола 0,956 мг/см³

По данным рисунка 3.3 определили соотношение S/N , которое в данном случае составило 34,2:1. Выполнив пересчет по уравнению 3.18 получили расчетное предельное значение концентрации этанола для количественного определения, которое составило $0,280 \text{ мкг/см}^3$.

Таким образом, для определения ПКО исследуемых ОР при использовании разработанной методики были проанализированы данные хроматограмм растворов этанола с концентрациями $0,096$ и $0,956 \text{ мкг/см}^3$ (рис.3.1 и 3.3 соответственно) и пропан-2-ола с концентрацией $0,100 \text{ мкг/см}^3$ (рис.3.2). Пределы количественного определения этанола и пропан-2-ола составили $0,280 \text{ мкг/см}^3$ и $0,067 \text{ мкг/см}^3$ соответственно.

3.2.3 Линейность методики

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. При подтверждении линейности аналитической методики проводят измерения аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества.

Линейность предложенной методики как для этанола, так и для пропан-2-ола была доказана путем построения градуировочных графиков соответствующих растворителей в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкг/см^3 по 10 точкам. Статистический обсчет данных прямых (Таблица 3.2) показал, что оба построенных графика в указанном диапазоне значений обладают линейностью.

3.2.4 Сходимость (повторяемость) методики

Сходимость – это способность получать сравнимые результаты при применении определенной методики в идентичных условиях (один лаборант, день, оборудование и др.). Сходимость также определяют по результатам 9-ти измерений на отрезке или всем диапазоне использования методики или же по результатам 6 измерений отдельно приготовленных проб при выбранной концентрации остаточного растворителя [37].

Определение сходимости проводили исходя из результатов анализа 6 образцов с концентрациями этанола и пропан-2-ола в области предельного содержания (100 мкг/см^3). Полученные значения концентрации пересчитали на массы навесок этанола ($m=1,0090 \text{ г}$) и пропан-2-ола ($1,0034 \text{ г}$). Результаты определения сходимости значений этанола и пропан-2-ола при использовании разработанной методики количественного анализа остаточных органических растворителей представлены в таблице 3.3 и таблице 3.4 соответственно.

Таблица 3.3 – Определение сходимости результатов анализа этанола

№	Концентрация, мкг/см ³	Метрологические характеристики
1	97,071	Число определений $n = 6$; Число степеней свободы $f = n - 1 = 5$; Среднее значение $\bar{X} = 96,824 \%$; Дисперсия $S^2 = 0,193$; Среднее квадратичное отклонение $S = 0,440 \%$; Коэффициент Стьюдента $t(95 \%, 5) = 2,57$; Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{x},\%} = 0,200 \%$; Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 0,203 \%$; Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 0,209 \%$.
2	96,604	
3	96,620	
4	96,232	
5	96,918	
6	97,499	

Таблица 3.4 – Определение сходимости результатов анализа пропан-2-ола

№	Концентрация, мкг/см ³	Метрологические характеристики
1	102,922	Число определений $n = 6$; Число степеней свободы $f = n - 1 = 5$; Среднее значение $\bar{X} = 102,337 \%$; Дисперсия $S^2 = 0,214$; Среднее квадратичное отклонение $S = 0,463 \%$; Коэффициент Стьюдента $t(95 \%, 5) = 2,57$; Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{x},\%} = 0,209 \%$; Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 0,225 \%$; Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 0,219 \%$.
2	102,564	
3	102,33	
4	102,071	
5	101,588	
6	102,548	

Статистический обсчет полученных данных показал возможность получать сравнимые результаты при применении разработанной методики в идентичных условиях.

3.2.5 Воспроизводимость методики

Воспроизводимостью (прецизионностью) называют способность получать сравнимые результаты при применении данной методики в разных условиях (разные сотрудники, дни, оборудование и др.). Различают промежуточную (внутрилабораторную) и межлабораторную прецизионность. На начальном этапе разработки методики проводят внутрилабораторные испытания. Если же методику анализа планируют включить в проект общей фармакопейной статьи, фармакопейной статьи или в нормативную документацию на фармакопейные стандартные образцы, тогда определяют межлабораторную прецизионность [9].

Промежуточную воспроизводимость мы определяли в условиях двух рабочих дней. При этом использовали данные по определению сходимости и данные, полученные аналогичным способом в другой день. Полученные значения концентрации пересчитали на массы навесок этанола ($m=1,0017$ г) и пропан-2-ола ($m=1,0045$). Результаты представлены в табл.3.5. Для полученных результатов были проведены расчеты критериев Фишера ($f_{расч}$) и Стьюдента ($t_{расч}$) и сравнены с табличными значениями ($f_{табл}$ и $t_{табл}$).

Таблица 3.5 – Определение промежуточной прецизионности результатов анализа ОР

№ пробы	Этанол, мкг/см ³		Пропан-2-ол, мкг/см ³	
	День 1	День 2	День 1	День 2
1	97,071	96,677	102,922	101,689
2	96,604	96,327	102,564	101,547
3	96,620	95,364	102,33	100,197
4	96,232	96,989	102,071	102,365
5	96,918	96,046	101,588	101,136
6	97,499	95,300	102,548	100,553
\bar{X}	96,824	96,117	102,337	101,248
S	0,440	0,687	0,463	0,791
$S_{\bar{X},\%}$	0,200	0,491	0,209	0,619
$\Delta\bar{X}$	0,203	0,495	0,225	0,657
$f_{табл} (5\%; 5; 5) = 5,05$	$f_{расч} = 2,44$		$f_{расч} = 2,92$	
$t_{табл} (5\%; 10) = 2,228$	$t_{расч} = 1,939$		$t_{расч} = 2,157$	

Исходя из полученных расчетных значений f и t критериев (табл.3.5), делаем вывод, о незначимости различий средних результатов выборок, полученных в разные дни как для этанола, так и для пропан-2-ола.

3.2.6 Правильность методики

Правильность методики – это отклонение получаемого при использовании данной методики среднего результата определений от значения, принимаемого за истинное. Чтобы определить данный показатель, используют данные анализов не менее 9 проб на отрезке или всем диапазоне применения методики или не менее 6 отдельно приготовленных проб при выбранной концентрации ОР.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

- а) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или мо-

дельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

б) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

в) рассмотрение линейности: если свободный член уравнения статистически достоверно не отличается от нуля, то это приводит к свободе от систематической ошибки [9, 38].

Определение правильности методики проводили, используя первый подход, по результатам анализа трех растворов с содержанием этанола и пропан-2-ола в диапазоне концентраций 10, 100, 150 % от предельного содержания органического растворителя. Каждый раствор подвергали анализу по три раза. Результаты представлены в табл. 3.6. и табл. 3.7.

Таблица 3.6 – Определение правильности результатов анализа этанола

Введено, мкг/см ³	Найдено мкг/см ³	Найдено, %	Метрологические характеристики
9,507	9,52	100,14	Число определений $n = 9$;
	9,33	98,18	Число степеней свободы $f = n - 1 = 8$;
	9,22	97,02	Среднее значение $\bar{X} = 98,99 \%$;
95,07	93,91	98,78	Дисперсия $S^2 = 2,20$;
	93,99	98,87	Среднее квадратичное отклонение $S = 1,48 \%$;
	93,99	98,87	Коэффициент Стьюдента $t(95 \%, 8) = 2,31$;
142,60	141,49	99,22	Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{X},\%} = 1,50 \%$;
	141,95	99,54	Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 1,14 \%$;
	143,12	100,36	Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 1,15 \%$.

Таблица 3.7 – Определение правильности результатов анализа пропан-2-ола

Введено, мкг/см ³	Найдено мкг/см ³	Найдено, %	Метрологические характеристики
10,015	9,92	99,02	Число определений $n = 9$;
	9,80	97,84	Число степеней свободы $f = n - 1 = 8$;
	9,72	97,03	Среднее значение $\bar{X} = 99,09 \%$;
100,150	99,24	99,09	Дисперсия $S^2 = 2,10$;
	99,57	99,42	Среднее квадратичное отклонение $S = 1,45 \%$
	99,53	99,38	Коэффициент Стьюдента $t(95 \%, 8) = 2,31$;
150,225	149,22	99,33	Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{X},\%} = 1,46 \%$;
	150,09	99,91	Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 1,12\%$;
	151,39	100,77	Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 1,13 \%$.

Критерии приемлемости полученных результатов рассмотрены в пункте 3.2.7.

3.2.7 Критерии приемлемости полученных результатов

Для определения пригодности используемой аналитической методики устанавливают выполнение определенных требований, которые зависят от объекта испытаний и типа методики [39]. Для каждого отдельного случая устанавливаются собственные пределы, удовлетворяя которым, методика является приемлемой для проведения анализа. В нашем случае для оценки рассчитанных показателей качества мы опирались на ориентировочные значения показателей качества методики количественного определения ООР методом газожидкостной хроматографии [37]. В таблице 3.8 представлена сравнительная характеристика полученных результатов с соответствующими требованиями.

Таблица 3.8 – Критерии приемлемости параметров валидации

Показатели качества	Критерий приемлемости	Этанол	Пропан-2-ол
Специфичность	Отсутствие сигналов в области анализируемого пика;	+	+
	Отсутствие матричного влияния на результат определения;	+	+
	Степень разделения пиков анализируемых соединений от соседних $\geq 1,5$	+(8,64)	+(8,64)
Линейность	Коэффициент корреляции $\geq 0,99$	+(0,9997)	+(0,9997)
Сходимость	Серия 1: коэффициент вариации $\leq 4,0$ %	+(0,20 %)	+(0,21 %)
	Серия 2: коэффициент вариации $\leq 4,0$ %	+(0,49 %)	+(0,62 %)
Промежуточная прецизионность	Выполнение: <i>f</i> и <i>t</i> -тестов	+ / +	+ / +
	Коэффициент вариации $\leq 4,0$ %	+(1,14 %)	+(1,46 %)
Правильность	Отклик среднее значение от 95 до 105 %	+(98,99 \pm 1,14)	+(99,09 \pm 1,12)

Таким образом, нами были определены такие показатели, как специфичность, линейность, предел количественного определения, сходимость, промежуточная прецизионность и правильность методики количественного определения этанола и пропан-2-ола. При этом полученные значения данных показателей соответствовали принятым критериям (табл.3.8). В

связи с этим можно утверждать, что разработанный метод количественного определения ООР позволяет получить достоверные и надежные результаты.

3.3 Количественное определение ООР в исследуемых субстанциях

Образцы исследуемых субстанций готовили согласно указанной в пункте 2.3.2 методике. Процентное содержание ОР во взятых навесках субстанций рассчитывали по формуле:

$$w_i = \frac{X_i \cdot 5}{m_i} \cdot 100 \%, \quad (3.19)$$

где X_i – найденное по градуировочной зависимости значение массовой концентрации ОР в испытуемом растворе (мкг/см³); m – масса навески, г; 5 – объем испытуемого раствора, см³.

Полученные для каждого образца результаты (x_i) подвергали статистической обработке. Для этого вычисляли среднее арифметическое (\bar{x}) всех значений по уравнению:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}, \quad (3.20)$$

где n – объем выборки.

Далее определяли разброс x_i относительно среднего \bar{x} в результате нахождения стандартного отклонения s (оценка случайной погрешности) по уравнению:

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_1^n d^2}{f}}, \quad (3.21)$$

где s^2 – дисперсия; d – отклонение значения x_i относительно среднего \bar{x} ($d_i = x_i - \bar{x}$); f – число степеней свободы ($f = n - 1$).

Стандартное отклонение среднего результата рассчитывали по уравнению:

$$S_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3.22)$$

Кроме того, определяли относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации), который рассчитывали по формуле:

$$S_{\bar{x},\%} = \frac{S_{\bar{x}} \cdot 100\%}{\bar{x}} \quad (3.23)$$

Значение $\Delta\bar{x}$, которое характеризует степень неопределенности истинного значения определяемой величины определяли по следующему уравнению:

$$(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}) = \bar{x} \pm \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}}, \quad (3.24)$$

где $t(P, f)$ – табличное значение критерия Стьюдента.

Значения $\Delta\bar{x}$ использовали для вычислений относительных погрешностей среднего результата ($\bar{\epsilon}$), выражая эти величины в %:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (3.25)$$

3.3.1 Количественное определение ООР в субстанции MNR-857

Для анализа было взято по 3 навески образцов субстанции MNR-857 пяти разных партий синтеза. Массы навесок представлены в таблице Б.1 приложения Б. В результате проведения измерений было обнаружено, что из представленных в табл. 1.2 растворителей, которые могли оказаться в пробе, все образцы субстанции MNR-857 содержат только пропан-2-ол. По полученным площадям пиков данного растворителя с помощью градуировочной зависимости (приложение А) были найдены значения массовых концентраций пропан-2-ола в испытуемых растворах.

В ходе анализа были получены хроматограммы (рис В.1 в приложении В) по которым определены значения содержания пропан-2-ола в исследуемых образцах (табл. Б.1 приложения Б). Результаты статистической обработки полученных данных представлены в таблице Б.2 приложения Б. Для наглядности на диаграмме рисунка 3.4 изображено соответствие результатов установленному требованию по содержанию ООР.



Рисунок 3.4 – Процентное содержание пропан-2-ола в образцах субстанции MNR-857

В соответствие с требованиями ОФС.1.1.0008.15 ГФ XIV для растворителей III класса опасности их содержание не должно превышать 0,5 %. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о соответствии исследованных образцов субстанции MNR-857 требованиям ОФС.1.1.0008.15 по показателю остаточные органические растворители.

3.3.2 Количественное определение ООР в субстанции АВ-19

Аналізу подвергали по 3 навески образцов субстанции АВ-19 трех разных партий синтеза. Массы навесок представлены в таблице Б.3 приложения Б. В результате проведения измерений было обнаружено, что в представленных образцах субстанции АВ-19 были найдены остаточные органические растворители этанол и пропан-2-ол. По полученным площадям пиков данного растворителя с помощью градуировочных зависимостей (приложение А) были найдены значения массовых концентраций этанола и пропан-2-ола в испытуемых растворах.

По результатам анализа были определены значения содержания ООР в исследуемых образцах (табл. Б.3 приложения Б). Результаты статистической обработки полученных данных представлены в таблице Б.4 приложения Б. Пример типичной хроматограммы образца субстанции АВ-19 представлен на рис.В.2 приложения В. Для наглядности на диаграмме рисунка 3.5 изображено соответствие результатов установленному требованию по содержанию ООР.

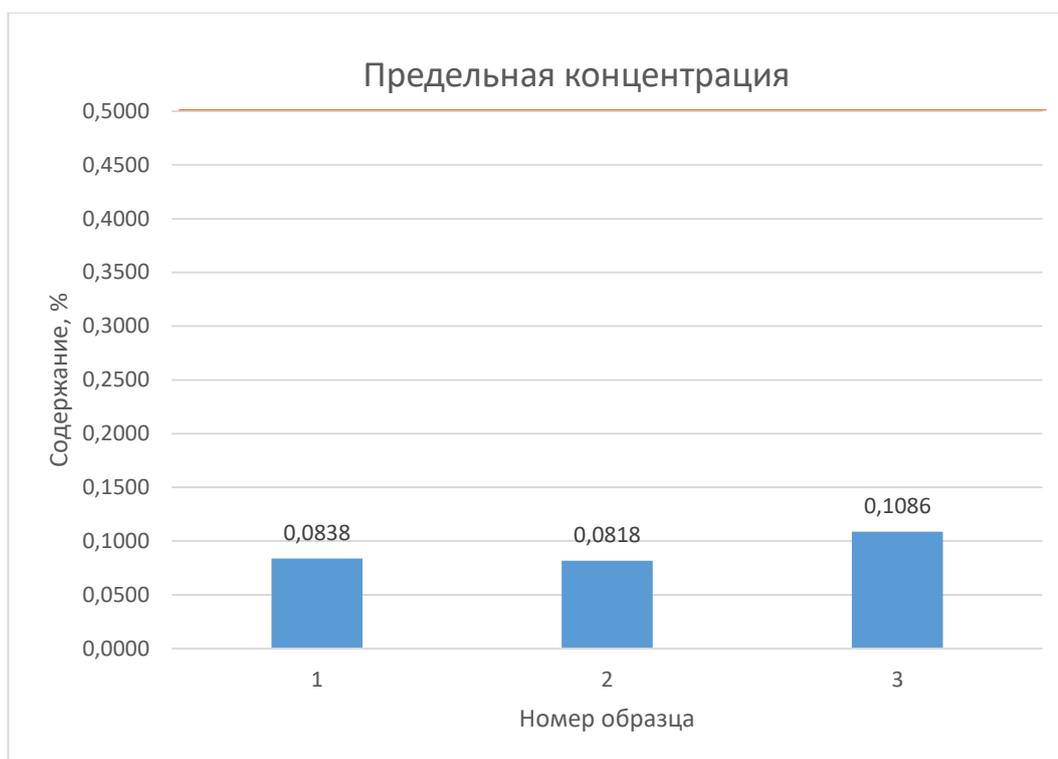


Рисунок 3.5 – Процентное содержание ООР в образцах субстанции АВ-19

В результате исследования было обнаружено, что образцы 1-2 субстанции АВ-19 содержат остаточный растворитель – этанол. Образец 3 содержал и этанол и пропан-2-ол. Полученные суммарные (для образца 3) значения содержания ООР в субстанции не превышают предельно допустимое содержание ООР III класса опасности (рис.3.7). Таким образом, все

анализируемые образцы субстанции АВ-19 соответствуют требованиям ОФС.1.1.0008.15 по показателю остаточные органические растворители.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы был составлен аналитический обзор литературы, рассматривающий газожидкостную хроматографию с парофазным вводом как метод количественного анализа остаточных органических растворителей. На основе полученной информации были определены начальные условия проведения хроматографического анализа. На практике предложенная методика была скорректирована путем подбора приемлемой скорости потока газа-носителя, изменения массы навески (0,1 г), степени разведения образца (растворение в виале в 5 см³ воды), времени выдерживания виалы при температуре 85 °С (20 мин). Также было подтверждено отсутствие матричного влияния на результат анализа.

Для возможности дальнейшего применения разработанной методики были проведены испытания на ее пригодность по таким показателям как специфичность, линейность, предел количественного определения, сходимость, промежуточная прецизионность и правильность. Полученные результаты удовлетворяли принятым критериям (табл.3.8). В результате чего, было подтверждено получение достоверных и надежных результатов при использовании разработанной методики количественного определения этанола и пропан-2-ола.

Используя разработанную методику количественного определения этанола и пропан-2-ола, были проведены испытания образцов исследуемых субстанций разных партий синтеза. Количественное определение проводилось по градуировочным кривым этанола и пропан-2-ола.

Результаты исследований 5 образцов субстанции MNR-857 показали наличие лишь пропан-2-ола, количественное содержание которого во всех образцах удовлетворяло установленным требованиям (не более 0,5 %).

В результате испытания образцов субстанции АВ-19 из трех партий синтеза было обнаружено, что образцы 1 и 2 содержат остаточный растворитель – этанол. Образец 3 содержал как этанол, так и пропан-2-ол. Полученные суммарные (для образца 3) значения содержания ООР также удовлетворяли установленным требованиям.

Таким образом, было выявлено соответствие всех исследуемых образцов субстанций MNR-857 и АВ-19 требованиям ОФС.1.1.0008.15 по показателю остаточные органические растворители.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фармацевтический рынок в марте 2020 г.: ёмкость увеличилась на 26,2 % .– URL <https://www.dsm.ru/news/1124/> (дата обращения: 28.04.2020);
2. Новый противовирусный препарат Триазавирин. Результаты II фазы клинического исследования / О. И. Киселев [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – С. 9-12;
3. Противовирусный препарат триазавирин®: от скрининга до клинической апробации / Э. Г. Деева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 144-153;
4. Активность новых соединений на основе азолазина на моделях оценки антигликирующего действия и ингибирования ДПП-4 / Е.В. Соколова [и др.] // Вестник. – 2019. – Т. 69, № 1. – С. 79-82;
5. Biologically active azolo-1,2,4-triazines and azolopyrimidines / V. L. Rusinov [и др.] // Russian Chemical Bulletin. – 2018. – Т. 67, № 4. – С. 573–599;
6. 6-Nitroazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-ones as Antidiabetic Agents / A.A. Spasov [и др.] // Archiv der Pharmazie. Chem Life Sci – 2017. – 350 – e1700226;
7. Меченные стабильными изотопами азолазины. Синтез обогащенного изотопами ^{13}C и ^{15}N производного пиразоло[5,1-с][1,2,4]триазины – потенциального антидиабетического агента / Т. С. Шестакова [и др.] // Химия гетероциклических соединений – 2019. – Т. 55, № 9. – С. 856–860;
8. Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ (последняя редакция). – UPL: <http://www.consultant.ru> (Дата обращения: 11.10.2019);
9. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. – UPL: <http://resource.rucml.ru> (Дата обращения: 11.10.2019);
10. Grodowska, K. Organic solvents in the pharmaceutical industry / K. Grodowska, A. Parczewski // Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. – 2010. – № 1. – С. 3-12;
11. ICH harmonized guideline Q3C (R6). Impurities: guideline for residual solvents. ICH; 2019. – UPL:http://database.ich.org/sites/default/files/Q3C6_Guideline_2019_0410.pdf (Дата обращения: 13.10.2019);
12. Корзанов, В. С. Термогравиметрия: учебное пособие для студентов III курса химического факультета / В. С. Корзанов, М. Г. Котомцева, Р. И. Юнусов. – Пермь : Изд-во Перм. ун-та, 2007. – 71 с.;
13. Термический анализ. Ч. 2: Методы термического анализа / В. И. Ивлев [и др.]. – Саранск: изд-во Мордов. ун-та, 2017. – 44 с.;

14. Grodowska K. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. – 2010. – № 1. – С. 13-26;
15. *Practical Gas Chromatography. A Comprehensive Reference* / К. Dettmer-Wilde [и др.]. : ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. – 902 с.;
16. Аналитическая хроматография / К. И. Сакодынский [и др.]. – Москва: Химия, 1993. – 464 с.;
17. Соответствие капиллярных ГХ колонок разных производителей по фазам. – URL:http://www.uralekopribor.ru/stati/gazovyye_hromatografyi/sootvetstvie_kapillyarnyih_kolono_k_ot_raznyih_proizvoditeley (Дата обращения: 13.10.2019);
18. Капиллярные колонки Zebron производства Phenomenex (США). – URL:http://www.portlab.ru/sites/default/files/zebron_sposoby_resheniya_osnovnyh_problem_voznikayushchih_v_processe_raboty_na_gh.pdf (Дата обращения: 13.10.2019);
19. Практическая газовая и жидкостная хроматография: учебное пособие / Б. В. Столяров [и др.]. – СПб : Изд-во С.-Петербург. университета, 2002. – 616 с.
20. Agilent ГХ, ГХ/МС и ALS Руководство по подготовке рабочего места. – URL:<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3430-98038.pdf> (дата обращения: 10.02.2020);
21. Wang, Y. Recent Advances in Headspace Gas Chromatography. / Y. Wang, J. McCaffrey, D. L. Norwood // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2008. – № 31.– С. 1823–1851;
22. Poole, C. *Gas Chromatography* / C. Poole, L. S. Ettre. – Elsevier, 2012. – 688 с.;
23. Kolb B. *Static headspace-gas chromatography* / B. Kolb, L. S. Ettre. – New York: John Wiley and Sons, 2006. – 376 с.;
24. Snow, N.H. Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography. / N.H. Snow, G.P. Bullock, D. L. Norwood // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Т. 1217, № 16. – С. 2726–2735.
25. Rodinkov, O. V Static Headspace Analysis and Its Current Status. / O. V Rodinkov, A. S. Bugaichenko, L. N. Moskvina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2020. – Т. 75, № 1. – С. 1 - 17;
26. Bailey, R. Injectors for capillary gas chromatography and their application to environmental analysis. / R. Bailey // *Journal of Environmental Monitoring*. – 2005. – Т. 7, № 11. – С. 1054-1058;
27. Holm, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. / T. Holm // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – № 842. – С. 221-227;

28. The United States Pharmacopeia. 37th revision. National formular 32th edition USP 37 – NF 32; ed. 32th. – 2014;
29. Анализ остаточных растворителей с использованием парофазного пробоотборника Agilent 7697A и газового хроматографа Agilent 7890B. – URL: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-1834RU.pdf> (дата обращения: 07.11.2019);
30. Analysis of USP <467> Residual Solvents with Improved Repeatability Using the Agilent 7697A Headspace Sampler. – URL: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-7625EN.pdf> (дата обращения: 07.11.2019);
31. Optimizing Vial Pressurization Parameters for the Analysis of USP <467> Residual Solvents Using the 7697A Headspace Sampler. – URL: http://www.ingenieria-analitica.com/product/optimizing_vial_pressurization_parameters_for_the_analysis_of_residual_solvents_using_the_7697a_headspace_sampler.pdf (дата обращения: 07.11.2019);
32. Measuring and Modeling the Salting-out Effect in Ammonium Sulfate Solutions. / C. Wang [и др.] // *Environmental Science and Technology*. – 2014. – Т. 48, № 22. – С. 1-20;
33. Banat F. A. Experimental Study of the Salt Effect in Vapor/Liquid Equilibria Using Headspace Gas Chromatography / F. A. Banat, F. A. Abu Al-Rub, J. Simandl // *Chemical Engineering & Technology*. – 1999. – Т. 22, № 9. – С. 761-765;
34. Жебентяев, А. И. Аналитическая химия. Химические методы анализа. / А. И. Жебентяев, А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – М. : Инфра-М, 2014. – 542 с.;
35. Васильев, В. П. Аналитическая химия. Часть 2. Физико-химические методы анализа. / В. П. Васильев. – М. : Дрофа, 2016. – 384 с.
36. Эрмер, Й. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. / Й. Эрмер, Х. Джон, МакБ. Миллер. – М. : Группа компаний ВИАЛЕК, 2013. – 512 с.
37. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. Береговых В. В. М.: Литтерра, – 2008. – 132 с.;
38. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М.: Издательство «Спорт и Культура – 2000». – 2007. – 192 с.;
39. Гризодуб, А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Харьков : Государственное предприятие "Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств", 2016. – 396 с.;
40. Бутина, Е. В. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в инновационной активной фармацевтической суб-

станции методом ГЖХ ПИД / Е. В. Бутина, С. А. Зайцев, А. В. Басевич // Аналитические методики и методы контроля. – 2016. – . – Т. 17, № 4. – С. 124-128;

41. Мархабуллина, Р. Ш. Валидация аналитической методики определения остаточных органических растворителей для стандартизации субстанции 5,7-бис-(метанитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана / Р. Ш. Мархабуллина, Л. М. Юсупова // Разработка и производство стандартных образцов. – 2014. – № 1. – С. 55-61;

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

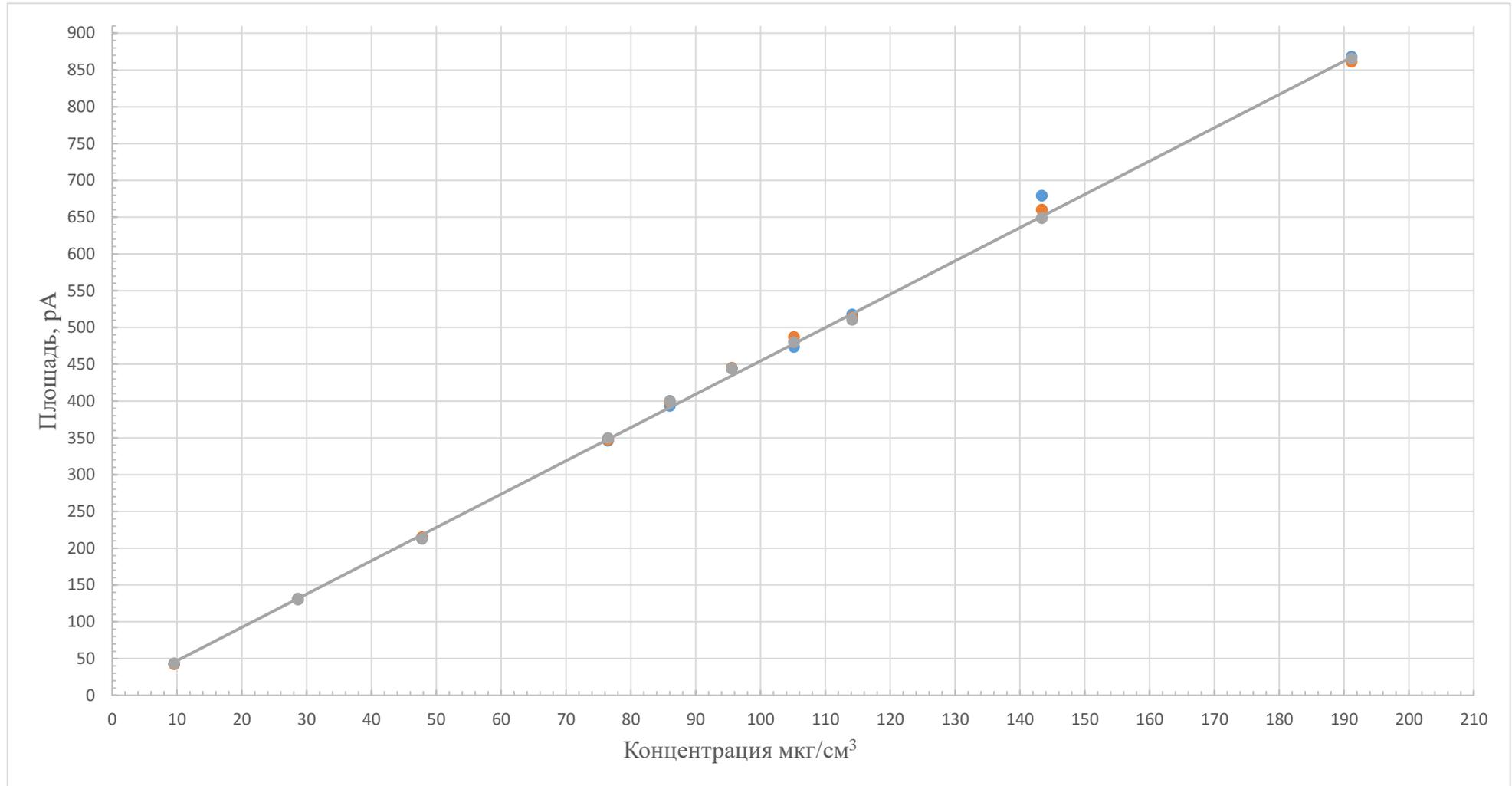


Рисунок А.1– Градуировочная кривая этанола в диапазоне концентрации 10-200 мкг/см³

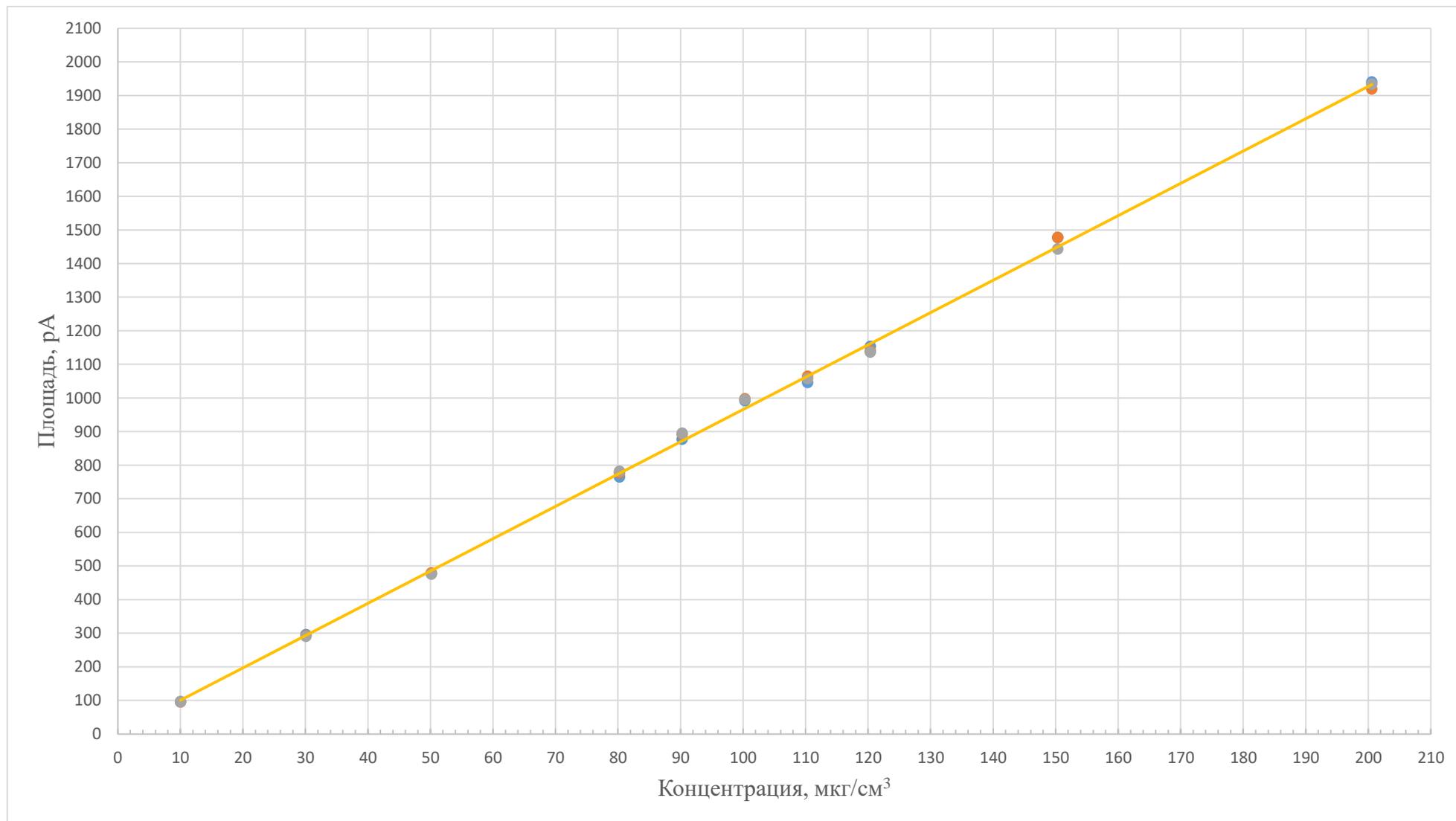


Рисунок А.2– Градуировочная кривая пропан-2-ола в диапазоне концентрация 10-200 мкг/см³

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Содержание пропан-2-ола в образцах субстанции MNR-857

Номер образца	1 параллельное измерение			2 параллельное измерение			3 параллельное измерение		
	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %
1	0,1010	0,336	0,0017	0,1016	0,341	0,0017	0,1011	0,332	0,0016
2	0,1002	0,423	0,0021	0,0997	0,408	0,0020	0,1016	0,429	0,0021
3	0,1004	0,216	0,0011	0,1002	0,228	0,0011	0,1004	0,223	0,0011
4	0,1004	0,348	0,0017	0,0999	0,333	0,0017	0,1000	0,342	0,0017
5	0,1007	0,197	0,0010	0,0997	0,193	0,0010	0,1008	0,202	0,0010

Таблица Б.2 – Статистическая обработка результатов анализа субстанции MNR-857

Номер образца	Объем выборки	Число степеней свободы	Среднее арифметическое, %	Дисперсия	Стандартное отклонение	Доверительный интервал ($t_{0,95,2}$), %	Относительная погрешность, %
1	3	2	0,0017	$3,31 \cdot 10^{-10}$	$1,82 \cdot 10^{-5}$	$4,52 \cdot 10^{-5}$	2,72
2			0,0021	$1,40 \cdot 10^{-9}$	$3,74 \cdot 10^{-5}$	$9,30 \cdot 10^{-5}$	4,45
3			0,0011	$9,67 \cdot 10^{-10}$	$3,11 \cdot 10^{-5}$	$7,72 \cdot 10^{-5}$	6,97
4			0,0017	$1,14 \cdot 10^{-9}$	$3,37 \cdot 10^{-5}$	$8,38 \cdot 10^{-5}$	4,92
5			0,0010	$3,06 \cdot 10^{-10}$	$1,75 \cdot 10^{-5}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$	4,42

Таблица Б.3 – Содержание этанола и пропан-2-ола в образцах субстанции АВ-19

Номер образца	1 параллельное измерение			2 параллельное измерение			3 параллельное измерение		
	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %	Масса навески, г	Концентрация, мкг/мл	Содержание, %
Этанол									
1	0,1011	16,837	0,0833	0,0998	16,67	0,0835	0,1004	17,012	0,0847
2	0,1001	16,682	0,0833	0,1008	16,71	0,0829	0,0996	15,768	0,0792
3	0,0990	7,078	0,0357	0,0992	7,541	0,0380	0,1007	7,600	0,0377
Пропан-2-ол									
3	0,0990	14,059	0,0710	0,0992	14,156	0,0714	0,1007	14,5	0,0720

Таблица Б.4 – Статистическая обработка результатов анализа субстанции АВ-19

Номер образца	Объем выборки	Число степеней свободы	Среднее арифметическое, %	Дисперсия	Стандартное отклонение	Доверительный интервал ($t_{0,95,2}$), %	Относительная погрешность, %
Этанол							
1	3	2	0,0838	$6,03 \cdot 10^{-7}$	$7,77 \cdot 10^{-4}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$	2,30
2			0,0818	$5,24 \cdot 10^{-6}$	$2,29 \cdot 10^{-3}$	$5,69 \cdot 10^{-3}$	6,96
3			0,0372	$1,52 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	8,25
Пропан-2-ол							
3	3	2	0,0720	$2,53 \cdot 10^{-7}$	$5,03 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$	1,75

ПРИЛОЖЕНИЕ В

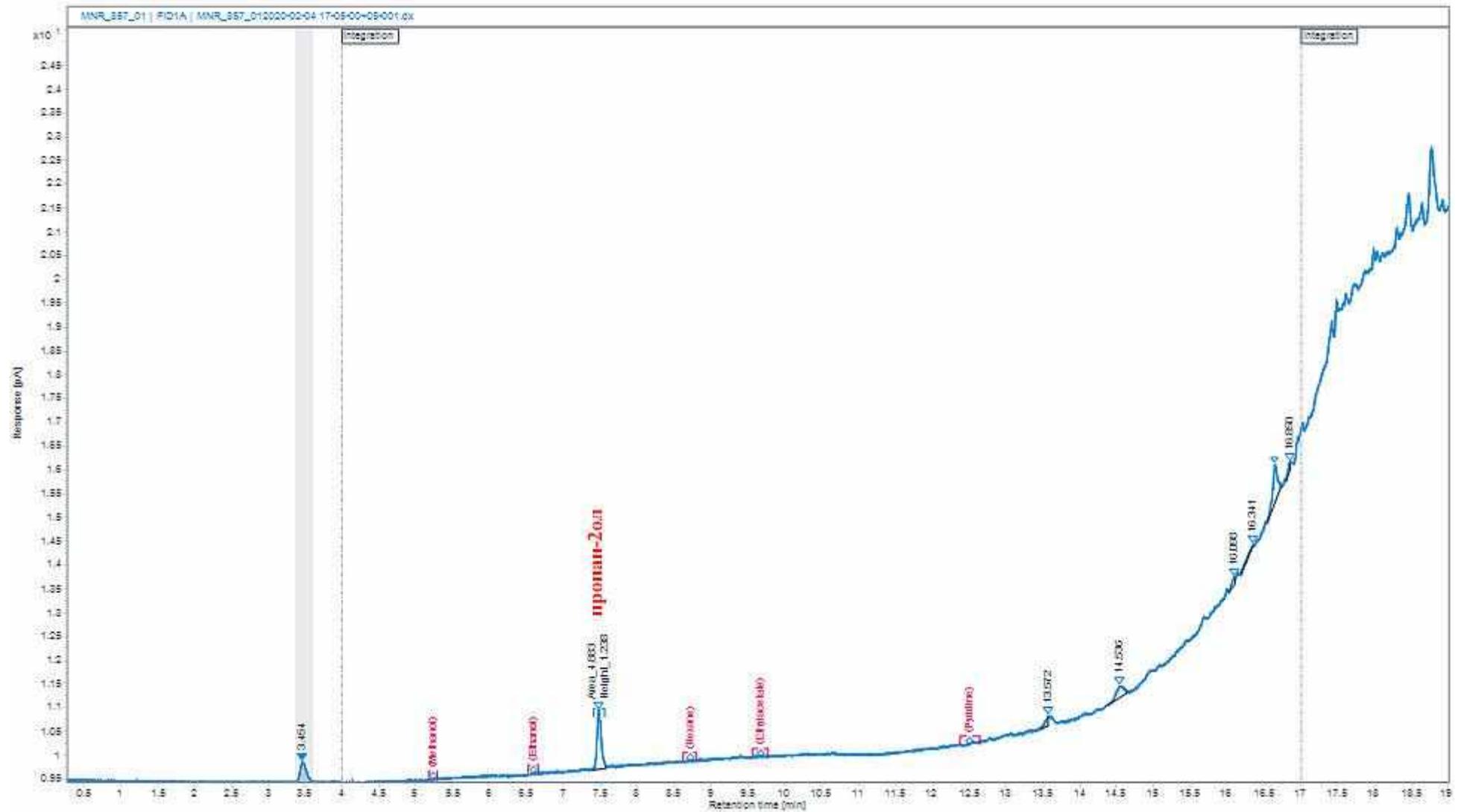


Рисунок В.1– Типичная хроматограмма образца субстанции MNR-857

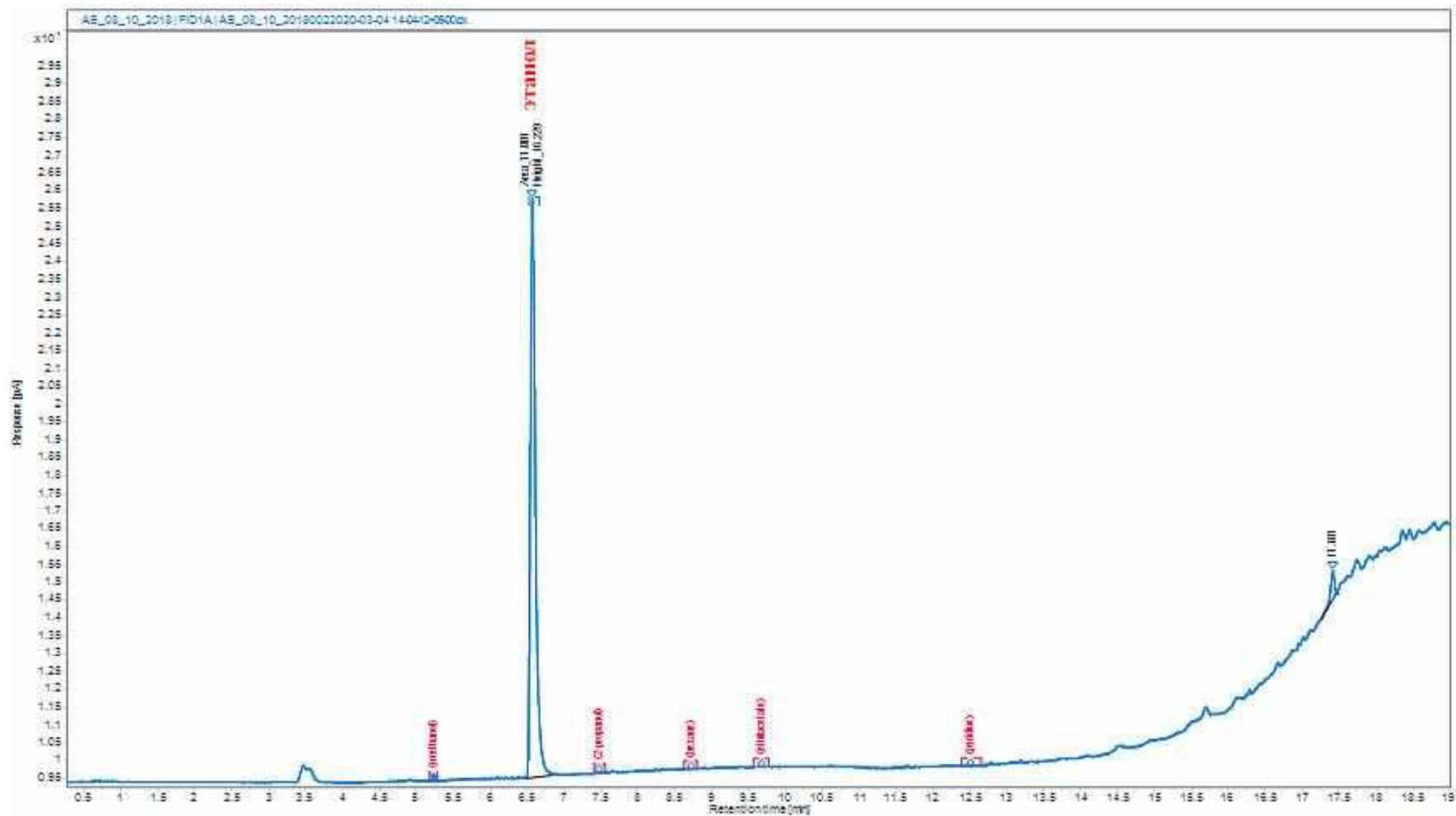


Рисунок В.2– Типичная хроматограмма образца субстанции АВ-19