

УДК 615.07:615.273.5

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ЕТАНОЛУ ТА 1,4-ДІОКСАНУ В СУКЦИФЕНАТІ ГАЗОХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ

С.І.Мерзлікін, О.А.Зінченко*, О.В.Суворов

Національний фармацевтичний університет,
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: toxchem@ukrfa.ua

* Державне підприємство “Державний науковий центр лікарських засобів”

Ключові слова: етанол; 1,4-діоксан; сукцифенат; газохроматографічний аналіз

Розроблена газохроматографічна методика визначення залишкових кількостей етанолу та 1,4-діоксану, що застосовуються як органічні розчинники у процесі синтезу і очистки сукцифенату. Запропоновані хроматографічні умови дозволяють визначити залишкові кількості етанолу в субстанції на рівні 0,1%, а 1,4-діоксану — 0,01%.

STANDARDIZATION OF THE RESIDUAL AMOUNTS OF ETHYL ALCOHOL AND 1,4-DIOXANE IN SUCCIPHENATE BY THE GAS CHROMATOGRAPHY METHOD

S.I.Merzlikin, A.A.Zinchenko, A.V.Suvorov

The gas chromatography method for determination of the residual amounts of ethyl alcohol and 1,4-dioxane used as organic solvents in the process of synthesis and purification of succiphenate has been developed. The chromatographic conditions proposed allow to determine the residual amounts of ethyl alcohol in the substance in the level of 0,1%, and 1,4-dioxane in the level of 0,01%.

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ОСТАТОЧНИХ КОЛИЧЕСТВ ЕТАНОЛА И 1,4-ДИОКСАНА В СУКЦИФЕНАТЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

С.И.Мерзликин, А.А.Зинченко, А.В.Суворов

Разработана газохроматографическая методика определения остаточных количеств этанола и 1,4-диоксана, используемых в качестве органических растворителей в процессе синтеза и очистки сукцифената. Предложенные хроматографические условия позволяют определить остаточные количества этанола в субстанции на уровне 0,1%, а 1,4-диоксана — 0,01%.

На сьогодні сучасна практична медицина відчуває гострий дефіцит фармакологічних засобів синтетичного походження, які впливають на згортаючу систему крові. Зокрема, такі препарати як епсилон амінокапронова кислота, транексамова кислота, амбен та дицинон [1-11] не в повній мірі задовольняють потреби фармацевтичного ринку у засобах резорбтивної дії з гарантією надійного ефекту, що застосовуються для зупинки капілярних кровотеч при хірургічних втручаннях, маткових кровотечах, виразковій хворобі, опіках тощо.

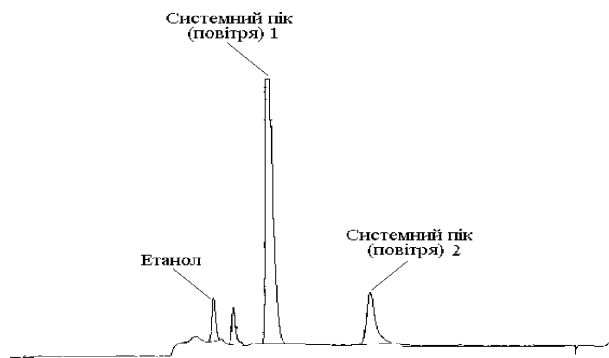
На кафедрі органічної хімії Національного фармацевтичного університету чл.-кор. НАН України, проф. В.П.Черних та проф. І.С.Гриценком [12, 13] синтезовано оригінальну субстанцію — натрієву сіль 4-ацетилсукцинанілової кислоти та розроблено на її основі фармакологічний препарат “Сукцифенат” — ліофілізований порошок по 0,1 г в ампулах по 5 мл, який виявляє гемостатичну та антифібринолітичну дію [14].

Для стандартизації залишкових кількостей етанолу та 1,4-діоксану, що застосовуються в процесі синтезу та очистки субстанції сукцифенату, згідно

з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ) [15] та Європейської фармакопеї [16] розроблено методику газохроматографічного аналізу вказаних розчинників. Регламентований [15] граничний вміст етанолу в субстанції та готових лікарських засобах становить 0,5%, а 1,4-діоксану — 0,038%.

У зв'язку з тим, що субстанція сукцифенату, окрім лікарських форм для зовнішнього та перорального застосування, запропонована також для створення ін'єкційних лікарських засобів для внутрішньом'язового та внутрішньовенного застосування, вміст залишкових кількостей спирту етилового в препараті рекомендовано обмежити до рівня 0,1%, як для інфузійних розчинів, а вміст залишкових кількостей 1,4-діоксану — до рівня 0,01%.

Залишкові кількості спирту етилового і 1,4-діоксану в сукцифенаті визначали методом газової хроматографії із застосуванням капілярної колонки з неполярною нерухою фазою — 5% фенілдиметилсилоксаном. Оскільки концентрація визначуваних компонентів відрізняється в 10 разів, для забезпечення придатних метрологічних характеристик методики застосовано два внутрішні



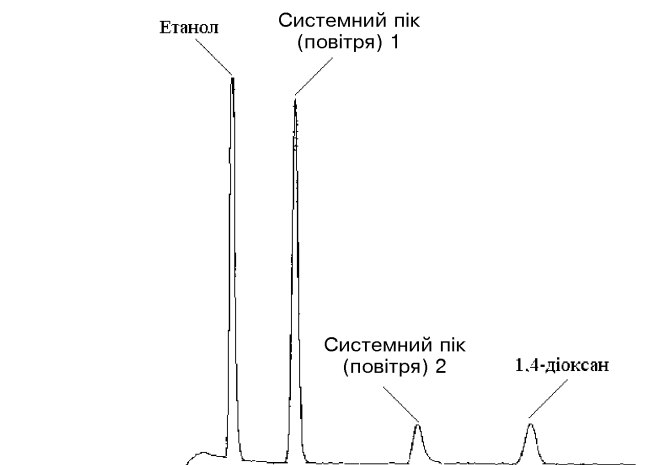
CALCULATION REPORT

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	1,423	1200	648		1	4.9138	Ethanol
	3	1,56	1144	557				
	5	1,81	19899	7452		2	81.4955	Inst1
	6	2,51	3318	762		3	13.5906	Inst2
TOTAL			25561	9419			100	

Рис. 1. Хроматограма випробуваного розчину сукцифенату.

стандарту. Концентрація першого внутрішнього стандарту (пропанолу-1) у випробуваному розчині і розчині порівняння вибрана близькою до гранично допустимої концентрації (ГДК) етанолу, а другого внутрішнього стандарту (бутанолу-1) — до ГДК 1,4-діоксану. Вибрані умови хроматографування забезпечують практично повне розділення піків етанолу і пропанолу-1, а також 1,4-діоксану і бутанолу-1.

Кількісне визначення залишкових кількостей спирту етилового в сукцифенаті проводили за показниками середніх значень відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1), обчислених з хроматограм випробуваного розчину та розчину порівняння відповідно. Кількісне визначення залишкових кількостей 1,4-діоксану проводили за показниками середніх значень відношення площ піків 1,4-діоксану



CALCULATION REPORT

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	1,426	9657	4602		1	39.9491	Ethanol
	2	1,828	10501	3806		2	43.4394	Inst1
	3	2,617	1852	409		3	7.6602	Inst2
	5	3,336	2164	424		4	8.9513	1,4-dioxan
TOTAL			24173	9241			100	

Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння етанолу та 1,4-діоксану.

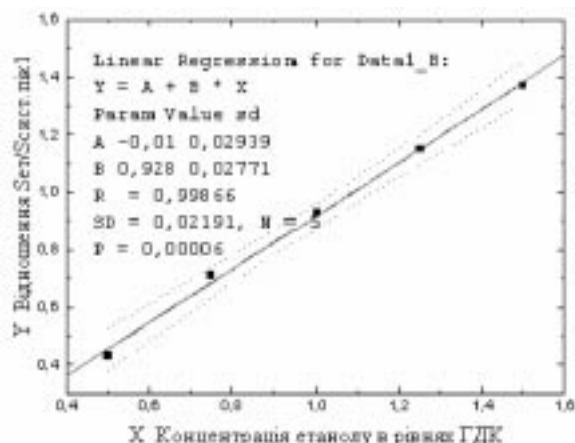


Рис. 3. Графік і параметри лінійної залежності відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1) від концентрації етанолу.

до площ піків внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1), також обчислених з хроматограм випробуваного розчину та розчину порівняння відповідно.

Хроматограми рівноважної газової фази над випробуваним розчином сукцифенату та розчином порівняння етанолу та 1,4-діоксану наведені на рис. 1 і 2 відповідно. Проводять не менше п'яти паралельних визначень.

Графіки та параметри лінійної залежності відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1) від концентрації етанолу та відношення площ піків 1,4-діоксану до площ піків внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1) від концентрації 1,4-діоксану наведені на рис. 3 і 4 відповідно.

Метрологічні характеристики методики та лінійність одержаних результатів від концентрації органічних розчинників перевіряли на модельних розчинах з концентрацією етанолу та 1,4-діоксану від 0,5 до 1,5 рівнів ГДК, наведених у табл. 1 і 2

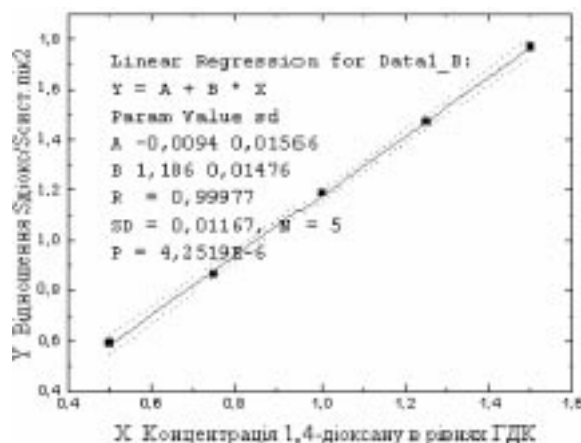


Рис. 4. Графік і параметри лінійної залежності відношення площ піків 1,4-діоксану до площ піків внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1) від концентрації 1,4-діоксану.

відповідно. Невизначеність методу при визначенні спирту етилового та діоксану становить 1,9% для кожного зазначеного розчинника.

Експериментальна частина

Приготування випробуваного розчину

Близько 100 мг (точна наважка) препарату поміщають у посуд місткістю 2 мл, додають 1,0 мл розчину внутрішніх стандартів і перемішують до повного розчинення препарату.

Приготування розчину порівняння

40 мл води Р поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають близько 50 мг (50 мкл) (точна наважка) 1,4-діоксану Р і близько 500 мг (630 мкл) (точна наважка) етанолу Р, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують.

1,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують.

Таблиця 1

Метрологічні характеристики методики при визначенні етанолу

μ(мг/г)	f	Xi	Xсер	Sx	S _x ⁻	P	t (P, f)	dX	ε%
		1,01							
		1,02							
1,0	4	1,02	1,006	0,015	0,067	95	2,776	0,019	1,9
		0,99							
		0,99							

Таблиця 2

Метрологічні характеристики методики при визначенні 1,4-діоксану

μ (мг/г)	f	Xi	Xсер	Sx	S _x ⁻	P	t (P, f)	dX	ε %
		10,22							
		10,01							
10,0	4	10,34	10,14	0,15	0,067	95	2,776	0,019	1,9
		9,98							
		10,16							

0,10 мл одержаного розчину поміщають у посуд місткістю 2 мл, додають 1,0 мл розчину внутрішніх стандартів і перемішують.

Приготування розчину пропанолу-1 і бутанолу-1 (внутрішнього стандарту)

95 мл води Р поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають мікрошприцем 12 мкл пропанолу-1 і 1,2 мкл бутанолу-1, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують.

По 1 мкл випробуваного розчину, розчину порівняння та розчину внутрішніх стандартів хроматографують на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором у таких умовах:

- колонка капілярна кварцова розміром 30 м x 0,53 мм з нерухомою фазою (5% фенілдиметилсилоксан), товщина шару 5,0 мкм;
- температура колонки — 100°C;
- температура блоку вводу — 160°C;
- температура детектора — 200°C;
- швидкість газу носія (гелій Р, водень Р, азот Р) — 8 мл/хв;
- коефіцієнт поділу потоку 1:7,5.

Вміст етанолу або 1,4-діоксану в препараті (X), %, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V_i * m_{oi} * 1,1 * 1 * 0,1 * 100}{V_{oi} * m * 50 * 10 * 1,1} = \frac{V_i * m_{oi}}{V_{oi} * m * 50}$$

де: V_i — середнє значення відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1) або середнє значення відношення

площ піків 1,4-діоксану до площ піків внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1), обчислене з хроматограм випробуваного розчину;

V_{oi} — середнє значення відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1) або середнє значення відношення площ піків 1,4-діоксану до площ піків внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1), обчислене з хроматограм розчину порівняння;

m_{oi} — маса наважки етанолу або 1,4-діоксану, мг;

m — маса наважки препарату, мг.

Вміст C_2H_6O (етанолу) в препараті має бути не більше 0,1%.

Вміст $C_4H_8O_2$ (1,4-діоксану) в препараті має бути не більше 0,01%.

Результати вважаються вірогідними, якщо виконуються вимоги тесту “Перевірка придатності хроматографічної системи”.

Висновки

1. Розроблено методику газохроматографічного визначення залишкових кількостей етанолу та 1,4-діоксану, що застосовуються в процесі синтезу та очистки субстанції оригінального гемостатичного фармакологічного засобу “Сукцифенат”.

2. Вибрані хроматографічні умови дозволяють визначити вміст етанолу в сукцифенаті на рівні 0,1%, а 1,4-діоксану — 0,01%. Невизначеність методу при визначенні спирту етилового та 1,4-діоксану становить 1,9% для кожного зазначеного розчинника.

Література

1. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / Merck Dekker*. — New York, Toronto, Tokio, 2002. — 3032 p.
2. Singh I., Laungani G.B. // *J. Urol.* — 1992. — Vol. 40. — P. 227.
3. Tagariello A. // *Haemophilia*. — 2002. — Vol. 6. — P. 581-583.
4. Schulman S. // *Blood Coag. Fibrin*. — 1998. — Suppl. 9. — P. 97-111.
5. Бертрам Г. Катцунг. *Базисная и клиническая фармакология: в 2-х т. Т. 2. / Пер. с англ. — М. — С.Пб.: Бином — Невский Диалект, 1998. — 670 с.*
6. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: в 2-х т. Т. 1. — Изд. 13-е, новое. — Х.: Торсинг, 1998. — 560 с.*
7. Макаров В.А. // *Гематол. и трансфузиол.* — 1993. — Т. 38, №6. — С. 36-40.
8. Макаров В.А. // *Гематол. и трансфузиол.* — 1992. — Т. 37, №1. — С. 34-36.
9. Вартамян Р.С. *Синтез основных лекарственных средств*. — М.: Мед. информ. агентство, 2004. — 845 с.
10. Kostova I.N., Manolov I.J., Dantchev N.T. // *Фармація (България)*. — 1997. — Т. 44, №3-4. — С. 6-8.
11. Суховий М.В., Вознюк В.П., Томілін В.В. // *Укр. журн. гематол. та трансфузиол.* — 2002. — Т. 2, №3. — С. 57-59.
12. Гриценко И.С. *Синтез, превращения и биологическая активность производных гидразидов арилсульфокислот: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. — Х., 1992. — 60 с.*
13. Черних В.П., Коваленко С.Н., Журавель Н.А. // *ЖОФХ*. — 2003. — Т. 1, №1-2. — С. 6-12.
14. Черних В.П., Березнякова А.І., Бризицька О.А. // *Клінічна фармація*. — 2000. — Т. 4, №1. — С. 64-67.
15. *Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”*. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с. — Доп. 1. — 2004. — 520 с.
16. *Identification and control of residual solvents // European Pharmacopoeia*. — 5th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2004. — P. 113-118.

Надійшла до редакції 06.03.2006 р.

Примітки: Перевірка придатності хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- коефіцієнт розділення піків етанолу і внутрішнього стандарту 1 (пропанолу-1), обчислений з хроматограм розчину порівняння, має бути не менше 2,0 (ДФУ вид.1, 2.2.28);
- відносне стандартне відхилення відношення площ піків етанолу до площ піків внутрішнього стандарту 1, розраховане з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше 2%;
- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком внутрішнього стандарту 2 (бутанолу-1) на хроматограмах розчину порівняння, має бути не менше 5000 теоретичних тарілок (ДФУ вид.1, 2.2.28).