BG Pulse Journal USA
ISSN:1947-2536 http://www.bgpulseusa.com/index.php/bg

РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ В АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Оманов Д.Г[1]., Рахимов С.Б[2]., Сманова З.А[3]., Олимов Д.Ё[4]., Валиева Н.Г[5]., Ворисова Р.И[6], Жумаева Э.Ш[7].
[1,2,3,4]Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека, г.Ташкент
[5]Ташкентский Международный Университет Кимё
[6]Институт сухопутных войск университета Военной безопасности и обороны
[7]Навоийский государственный университет
Республика Узбекистан

Doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.22643209

Аннотация: В работе представлены результаты разработки единого аналитического метода количественного определения трех органических примесей – триэтиламина (ТЭА), N,N-диметиланилина (N,N-ДмА) и 2-этилгексановой кислоты (2-ЭГК) – в противобактериальных препаратах цефтриаксона и цефазолина с использованием газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД). В отличие от существующих нормативных методик, требующих применения трех различных хроматографических систем, предложенный метод позволяет проводить количественное определение всех трех примесей в одном хроматографическом цикле на капиллярной колонке сделанная из 94% диметилполисилоксана и 6% цианопропилфенила (SH-624). Разработанная методика характеризуется высокой эффективностью (число теоретических тарелок более 80000), хорошей симметричностью хроматографических пиков (фактор асимметрии не превышает 1,05 для каждого пика) и удовлетворительной разрешающей способностью. Предложенный подход существенно сокращает время анализа, снижает расход растворителей и ресурсов, а также минимизирует отрицательное влияние на хроматографические колонки, связанное с их частой заменой.

Ключевые слова: цефтриаксон, цефазолин, газовая хроматография, органические примеси, триэтиламин, N,N-диметиланилин, 2-этилгексановая кислота, ГХ-ПИД.

ВВЕДЕНИЕ

В современной фармацевтической практике контроль качества лекарственных средств приобретает все большее значение. Применение антибактериальных препаратов неуклонно возрастает практически во всех областях медицины, что обусловливает повышенные требования к их безопасности и эффективности[1-2]. Особое внимание уделяется содержанию органических примесей в субстанциях и готовых лекарственных формах, поскольку эти соединения могут оказывать токсическое действие и влиять на стабильность препаратов[3].

Согласно нормативным документам, органическими примесями, подлежащими контролю в препаратах цефтриаксона и цефазолина, являются триэтиламин (ТЭА), N,N-диметиланилин (N,N-ДмА) и 2-этилгексановая кислота (2-ЭГК) [4]. Триэтиламин широко используется в органическом синтезе в качестве основания и может присутствовать в лекарственных субстанциях в виде остаточного растворителя[5]. N,N-Диметиланилин

применяется в процессе очистки полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов и является потенциальным контаминантом. 2-Этилгексановая кислота может использоваться при синтезе некоторых антибиотиков и подлежит строгому контролю в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи[6].

В настоящее время количественное определение данных соединений в соответствии с нормативной документацией производится методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД) с использованием трех различных хроматографических систем[7]. Для определения ТЭА применяется колонка с 5% ПЭГ 1500 с 1% КОН на Хромасорбе W-AW, 0.7 М раствор NaOH был использован в качестве растворителя. Для N,N-ДмА – колонка с 10% OV-17 на хромосорбе N-AW-DMCS и 1 М раствор NaOH как растворитель, а так использовался внутренний стандарт Нафталин растворенный в Циклогексане. А для 2-ЭГК – капиллярная колонка с макроголом 20000 2-нитротерефталатом и 33% (об/об) раствор хлороводородной кислоты как растворитель. Несмотря на селективность данных методик, они требуют значительных временных и материальных затрат, а также постоянной замены колонок в термостате хроматографа, что негативно сказывается на их ресурсе и воспроизводимости анализа.

Целью данной работы является разработка единого аналитического метода количественного определения ТЭА, N,N-ДмА и 2-ЭГК в противобактериальных препаратах цефтриаксона и цефазолина, обеспечивающего селективность, эффективность и экспрессность анализа[8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали фармацевтические субстанции цефтриаксона и цефазолина. Вспомогательные вещества и растворители – дихлорметан (х.ч.) – квалификации «для хроматографии». Стандартные образцы триэтиламина, N,N-диметиланилина и 2-этилгексановой кислоты – с содержанием основного вещества не менее 99,0%.

Приготовление растворов

Испытуемый раствор. Около 1,0 г (точная навеска) испытуемого препарата растворяют в 10,0 мл дихлорметана, энергично встряхивают в течение 2 мин и обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Затем центрифугируют и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения. Готовят раствор, содержащий конечную концентрацию 0,02 мг/мл (20 ppm) триэтиламина, 0,02 мг/мл (20 ppm) N,N-диметиланилина и 0,2 мг/мл (200 ppm) 2-этилгексановой кислоты растворенные в дихлорметане.

Хроматографические условия

Анализ проводили на хроматографе Shimadzu GC-2030 с пламенно-ионизационным детектором. Использовали капиллярную кварцевую колонку длиной 30 м, внутренним диаметром 0,53 мм, покрытую слоем цианопропилфенил (6%) / диметилполисилоксана (94%) толщиной покрытия в 3,0 мкм (SH-624). Газ-носитель – азот для хроматографии, скорость потока 1,5 мл/мин. Деление потока 1:10. Температура инжектора 250°C, температура

детектора 250°C. Скорость потока азота 24 мл/мин, водорода 40 мл/мин, воздуха 400 мл/мин[9].

Температурный профиль колонки:

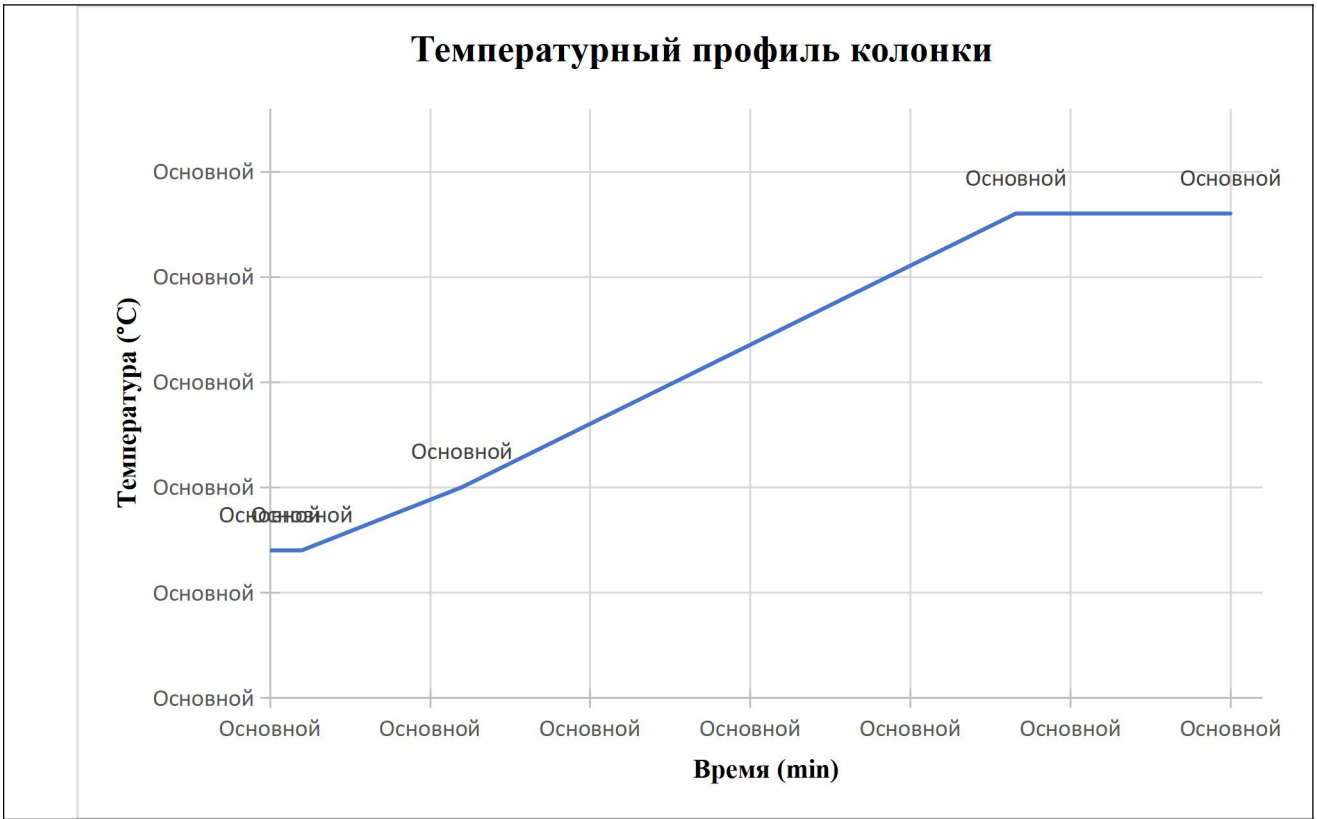


Рис.-1. Температурный профиль колонки

- 0–1,0 мин: 70°C (изотерма);
- 1,0–6,0 мин: 70→100°C (скорость подъема 6,0°C/мин);
- 6,0–23,3 мин: 100→230°C (скорость подъема 7,5°C/мин);
- 23,3–30,0 мин: 230°C (изотерма).

Хроматографировали попеременно по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения, получая не менее трех хроматограмм для каждого раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения работы проведен подбор хроматографических условий, обеспечивающих разделение и количественное определение трех целевых примесей в одном аналитическом цикле. Выбор колонки SH-624 (аналог DB-624) обусловлен ее универсальностью для анализа летучих органических соединений различной полярности. Данная неподвижная фаза на основе цианопропилфенил(6%)-диметилполисилоксана (94%) обеспечивает хорошее разделение как основных (ТЭА, N,N-ДмА), так и кислотных (2-ЭГК) соединений.

Разработанный температурный профиль позволяет достичь оптимального разделения всех трех примесей за 30 минут. При этом, в отличие от нормативных методик, требующих

проведения трех отдельных анализов на разных хроматографических системах, предлагаемый метод позволяет получить полную информацию о содержании всех контролируемых примесей в одном хроматографическом цикле.

Полученные хроматографические характеристики свидетельствуют о высокой эффективности разработанного метода (таблица). Число теоретических тарелок для всех трех определяемых соединений значительно превышает требования нормативной документации: для ТЭА – более 80 000 (при норме не менее 500), для N,N-ДмА – более 400 000 (при норме не менее 800), для 2-ЭГК – более 400 000 (при норме не менее 50 000). Столь высокие значения эффективности колонки достигаются за счет использования современной капиллярной колонки и оптимизированного температурного программирования.

Факторы асимметрии хроматографических пиков (tailing factor) не превышают 1,046 для всех определяемых соединений, что значительно ниже допустимых значений по нормативной документации (2,0 для ТЭА и N,N-ДмА, 2,5 для 2-ЭГК). Это свидетельствует об отсутствии значительной сорбции определяемых соединений на активных центрах колонки и инжектора. Особое значение это имеет для триэтиламина, который, как известно, склонен давать асимметричные пики вследствие взаимодействия с силанольными группами неподвижной фазы.

Разрешающая способность (resolution) между пиками N,N-диметиланилина и 2-этилгексановой кислоты составляет более 90,0 , между 2-ЭГК и ближайшим пиком более 2,0 что подтверждает полное разделение всех компонентов и селективность метода.

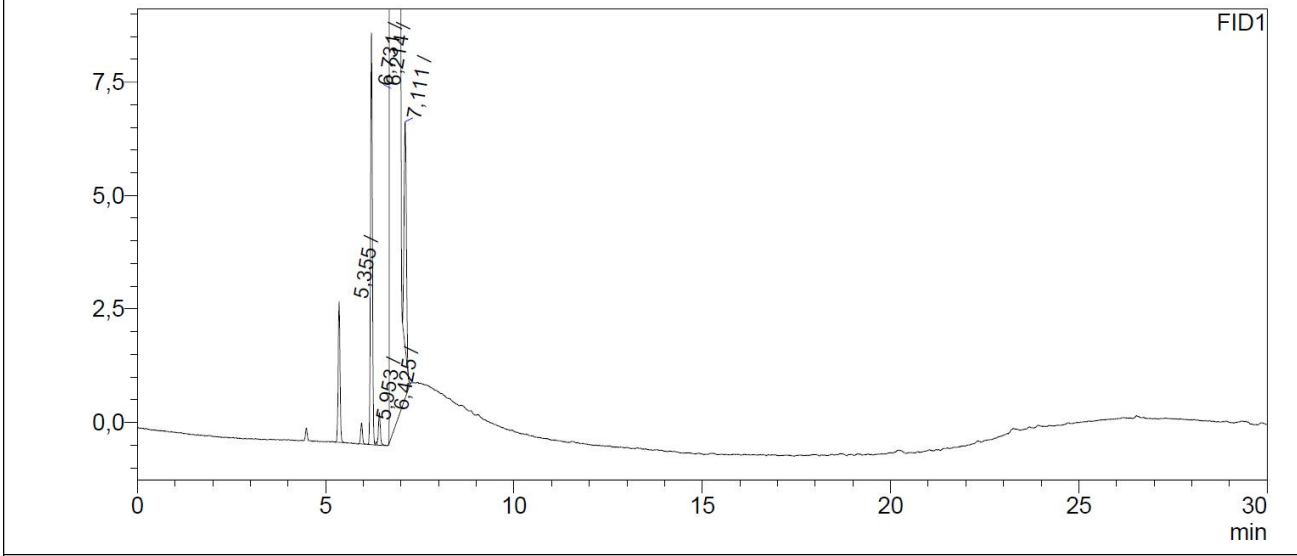


Рис.-2 Типичная хроматограмма растворитель (бланк Дихлорметан)

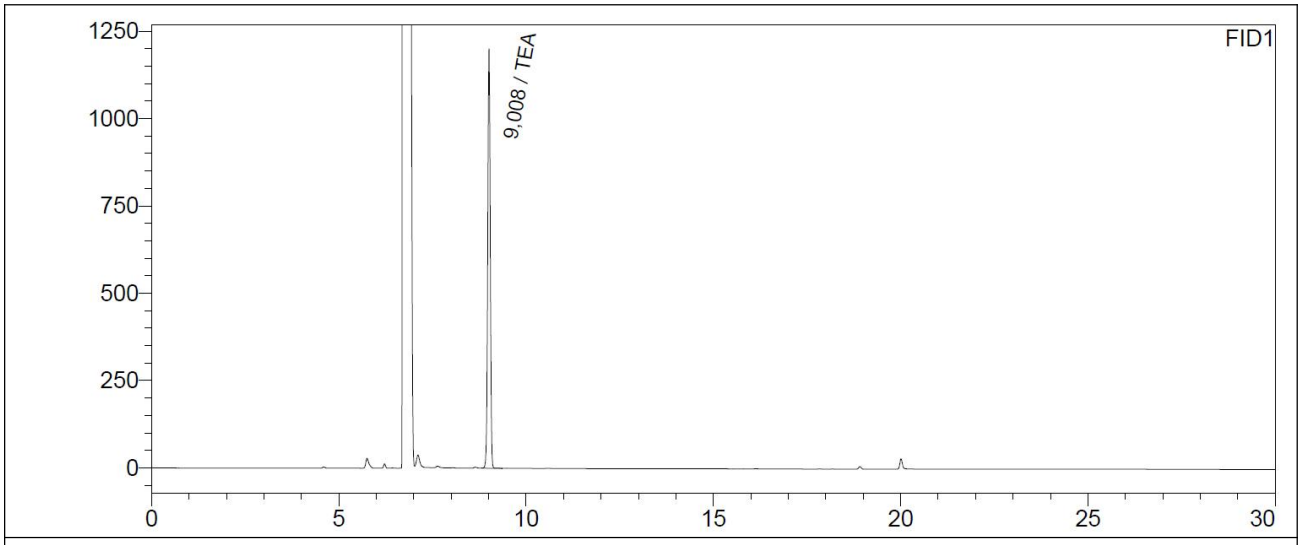


Рис.-3 Типичная хроматограмма стандартного образца ТЭА

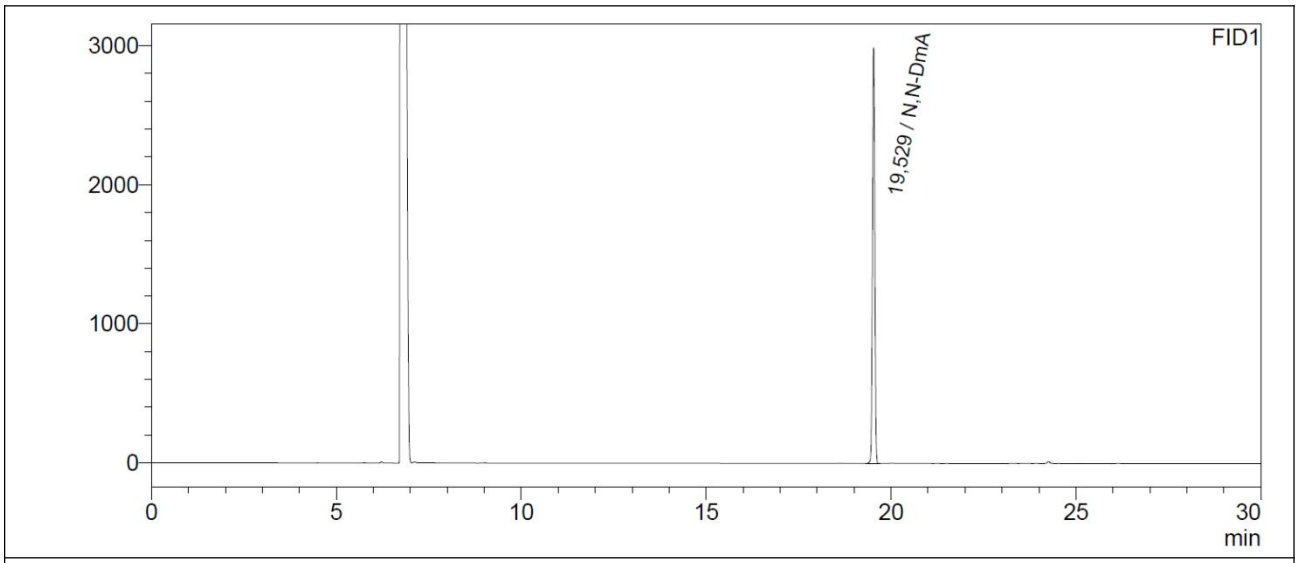


Рис.-4 Типичная хроматограмма стандартного образца N,N-ДмА

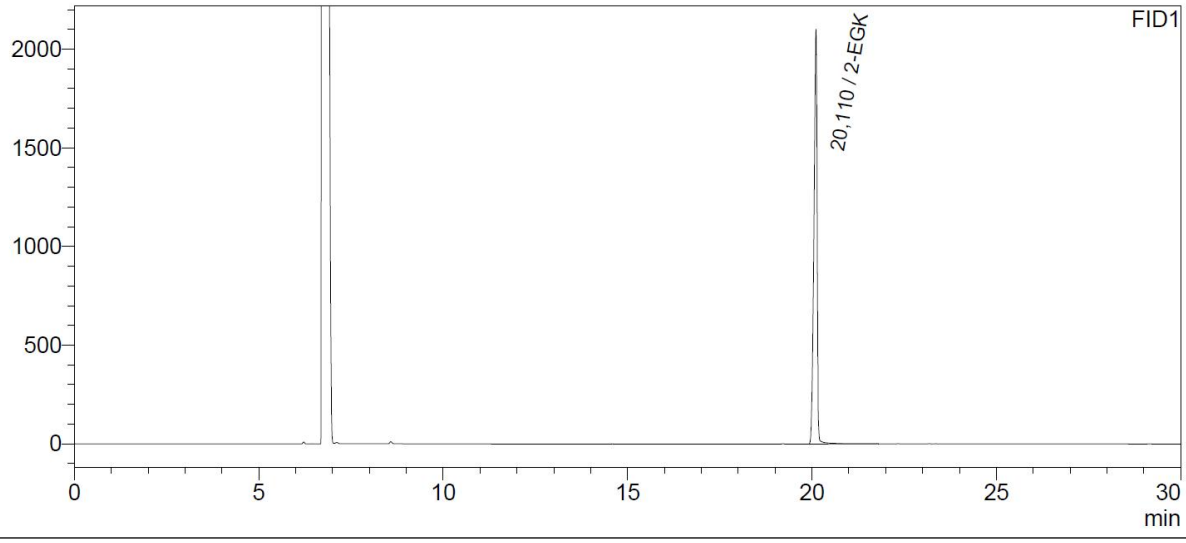
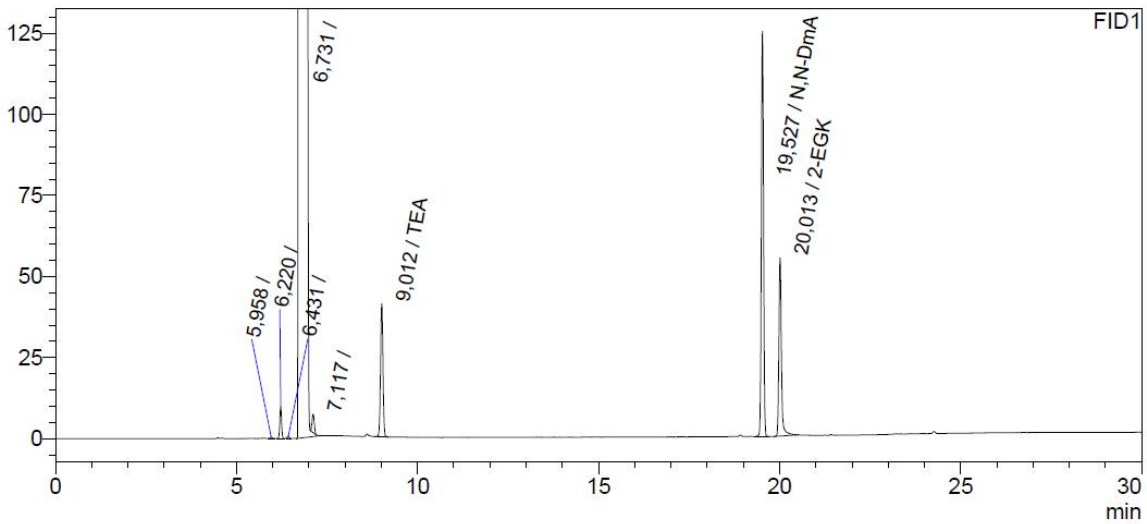


Рис.-5 Типичная хроматограмма стандартного образца 2-ЭГК

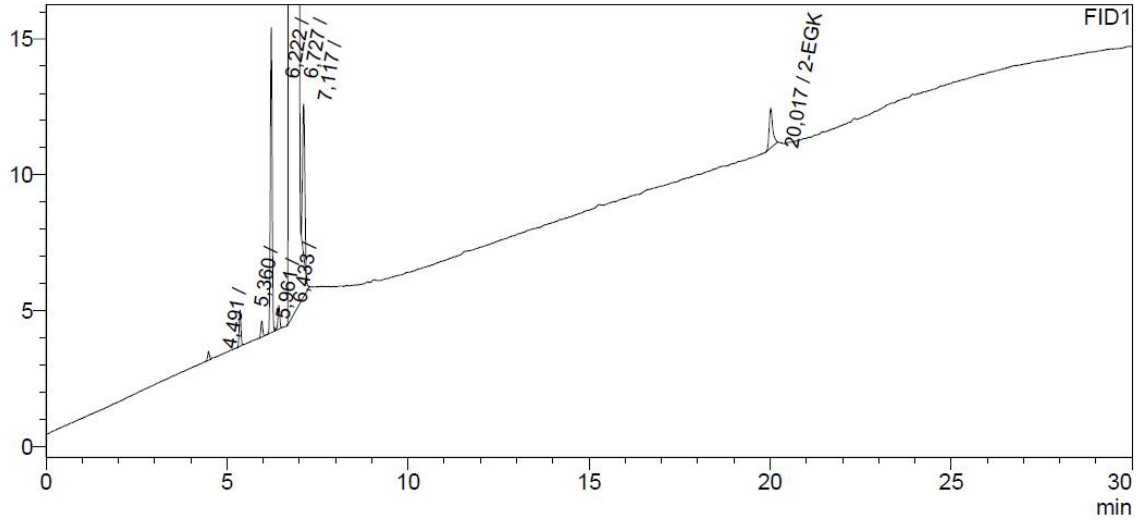


<Peak Table>

FID1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	NTP(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)
1		5,958	1722	496	68371	1,070	--
2		6,220	33445	9704	74104	1,029	2,868
3		6,431	2548	729	77197	--	2,290
4		6,731	142192210	17689348	12381	3,759	1,794
5		7,117	24291	5639	59572	1,047	2,152
6	TEA	9,012	182788	40844	86994	1,017	15,868
7	N,N-DmA	19,527	421009	124682	493973	1,017	90,124
8	2-EGK	20,013	86786	54890	455335	1,021	4,230
Total			142944799	17926332			

Рис.-6 Типичная хроматограмма стандартных образцов ТЭА, N,N-ДмА и 2-ЭГК



<Peak Table>

FID1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	NTP(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)
1		4,491	1180	327	38270	--	--
2		5,360	4413	1331	60167	1,042	9,689
3		5,961	2042	581	66143	1,013	6,681
4		6,222	38894	11192	73265	1,025	2,825
5		6,433	3024	860	80696	--	2,311
6		6,727	151537351	18420022	11913	3,831	1,744
7		7,117	24250	5566	58046	1,044	2,141
8	2-EGK	20,017	9827	1457	240012	1,398	91,616
Total			151620981	18441336			

Рис.-7 Типичная хроматограмма испытуемого образца

Разработанный метод имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с существующими нормативными методиками. Во-первых, использование единой хроматографической системы исключает необходимость постоянной замены колонок, что продлевает срок их службы и улучшает воспроизводимость результатов. Во-вторых, сокращение общего времени анализа (30 минут против суммарного времени трех отдельных определений) повышает производительность лабораторных исследований. В-третьих, унификация подходов к пробоподготовке и использованию растворителей снижает расход реактивов и образование отходов, что соответствует принципам «зеленой» аналитической химии.

Следует отметить, что выбор дихлорметана в качестве растворителя для испытуемого раствора обусловлен его способностью эффективно экстрагировать все три определяемые примеси из субстанции антибиотика, а также совместимостью с выбранной хроматографической системой. Применение ультразвуковой бани на стадии пробоподготовки обеспечивает более полное извлечение примесей из матрицы препарата.

Таблица.1

Сравнительная характеристика хроматографических параметров

Показатель	Требования НД	Полученные значения
Число теоретических тарелок		
ТЭА	Не менее 500	Более 80 000
N,N-ДмА	Не менее 800	Более 400 000
2-ЭГК	Не менее 50 000	Более 400 000
Фактор асимметрии		
ТЭА	Не более 2,0	1,017
N,N-ДмА	Не более 2,0	1,017
2-ЭГК	Не более 2,5	1,021
Разрешающая способность		
N,N-ДмА / 2-ЭГК	–	Более 90,0
2-ЭГК / предыдущий пик	–	Более 2.0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан аналитический метод количественного определения триэтиламина, N,N-диметиланилина и 2-этилгексановой кислоты в препаратах цефтриаксона и цефазолина с использованием газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. В отличие от существующих нормативных методик, требующих применения трех различных хроматографических систем, предложенный метод позволяет проводить количественное определение всех трех примесей в одном хроматографическом цикле на капиллярной колонке SH-624.

Разработанная методика характеризуется высокой эффективностью (число теоретических тарелок более 80000 для всех определяемых соединений), хорошей симметричностью хроматографических пиков (фактор асимметрии не превышает 1,05) и удовлетворительной разрешающей способностью. Полученные хроматографические параметры значительно превосходят требования нормативной документации.

Предложенный подход существенно сокращает время анализа, снижает расход растворителей и ресурсов, а также минимизирует отрицательное влияние на хроматографические колонки, связанное с их частой заменой. Разработанный метод может

быть рекомендован для внедрения в практику контроля качества противобактериальных препаратов цефтриаксона и цефазолина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Djozan D, Jouyban A, Norouzi J. Ultrasonic assisted SPME coupled with GC and GC-MS using pencil lead as a fiber for monitoring the organic volatile impurities of ceftazidime. J Chromatogr Sci. 2008 Sep; 46(8):680-5. doi: 10.1093/chromsci/46.8.680. PMID: 18796222.
2. Margosis M. GLC determination of N,N-dimethylaniline in penicillins. J Pharm Sci. 1977 Nov;66(11):1634-6. doi: 10.1002/jps.2600661136. PMID: 915748.
3. V. B. de Camargo and C. V. Garcia, “Analytical Method by Headspace-Gas Chromatography for Determination of Six Residual Solvents in Losartan Potassium Raw Material.” Journal of Separation Science 48, no. 11 (2025): e70319. https://doi.org/10.1002/jssc.70319
4. Общий технический регламент Республики Узбекистан № 365 «О безопасности лекарственных средств», Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан, 2016 г.
5. Moore W.M., Edwards R.J., Bavda L.T. An Improved Capillary Gas Chromatography Method for Triethylamine. Application to Sarafloxacin Hydrochloride and GnRH Residual Solvents Testing // Analytical Letters. – 1999. – Vol. 32, No. 13. – P. 2603–2612. – DOI: 10.1080/00032719908542991.
6. British Pharmacopoeia. – Vol. V. – Appendix VIII O. 2-Ethylhexanoic Acid (Ph. Eur. method 2.4.28). – London: The Stationery Office, 2012.
7. European Pharmacopoeia. – 10th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2019.
8. Tankiewicz M., Namieśnik J., Sawicki W. Analytical procedures for quality control of pharmaceuticals in terms of residual solvents content: Challenges and recent developments // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – Vol. 80. – P. 328–343.
9. Оманов Д.Г., Рахимов С.Б., Сманова З.А., Турабов Н., Мадатов У.А. Dori vositalarida trietilamin (TEA), N,N-dimetilanilin (N,N-DMA) va 2-etilgeksan kislotasini (2-EGK) gaz xromatografiyasi usuli yordamida bir vaqtning o‘zida aniqlash usuli. Патент на полезную модель, № FAP 3084