

УДК 543.8

## БЫСТРЫЙ СКРИНИНГ ФАРМСУБСТАНЦИЙ НА F-, Cl-, Br- И S-СОДЕРЖАЩИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

М.Е. Чиварзин, И.А. Ревельский, А.В. Никошина, А.Н. Булдыжова,  
Д.А. Чепелянский, А.И. Ревельский

(кафедра аналитической химии; chivarzin@yandex.ru)

**Разработан быстрый прямой метод определения общего содержания F-, Cl-, Br- и S-органических соединений в фармацевтических субстанциях. Метод основан на прямой окислительной высокотемпературной конверсии и анализе всего абсорбата методом ионной хроматографии. Пределы обнаружения составили  $2 \times 10^{-6}$ – $4 \times 10^{-6}$  % в зависимости от элемента при пробе субстанции 1 мг.**

**Ключевые слова:** контроль качества фармацевтических субстанций, примеси, ионная хроматография.

В настоящее время контроль качества фармацевтической продукции (определение содержания основного вещества и небольшого числа примесей) проводится соответствующими ведомствами с использованием методов, описанных в соответствующих фармакопейных статьях. Наиболее часто используется метод ВЭЖХ, позволяющий определять небольшое число заданных или зарегистрированных примесей. Состав всех примесей в фармсубстанциях и фармпрепаратах на их основе, как правило, неизвестен, и все они не могут быть отделены от основного компонента (активного вещества) и разделены между собой, так как концентрация этого вещества на 2–6 порядков и более превышает концентрацию регистрируемых примесей. Кроме того, ряд неизвестных примесей может не элюироваться из колонки в условиях (колонка, элюент), выбранных для анализа.

Необходимо отметить, что для контроля качества каждого фармацевтического вещества необходимо использовать индивидуальные специфические условия хроматографического анализа, что требует больших затрат времени при контроле качества различных фармсубстанций и препаратов и исключает возможность осуществления быстрого скрининга проб фармсубстанций на содержание опасных веществ.

На основании сопоставления терапевтической активности оригинальных фармпрепаратов и дженериков известно, что ряд побочных эффектов вызван примесями, присутствующими в исследуемых образцах. Известно, что наиболее опасным является присутствие в воде F-, Cl-, Br- и S-органических веществ. Можно предположить, что присутствие этих соединений в лекарственных средствах также

опасно. Поскольку состав и число таких примесей неизвестны, для решения задачи наиболее перспективным является определение суммарного содержания F-, Cl-, Br- и S-органических примесей в фармсубстанциях (в пересчете на элемент).

Обзор литературы показал, что работы по определению суммарного содержания таких примесей в фармсубстанциях в литературе практически отсутствуют. Возможность определения таких соединений в чистых органических веществах была рассмотрена в работе [1]. Пределы обнаружения (в пересчете на элемент) составили  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  %. Определение проводили при сочетании высокотемпературной окислительной конверсии в потоке кислорода, поглощения продуктов конверсии и анализа абсорбата на анионы, соответствующие определяемым элементам ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$  и  $SO_4^{2-}$ ) методом ионной хроматографии. В качестве абсорбирующего раствора использовали элюент и анализировали 1/20 часть абсорбата. Проба составляла 1 мг.

Аналогичный подход используется для определения общего содержания рассматриваемых гетероэлементов в продуктах нефтепереработки [2]. Пределы обнаружения в пересчете на элемент составляют  $10^{-4}$ – $10^{-3}$  % при величине пробы, равной 100–200 мг и анализе 1/10–1/20 части объема абсорбата (деионизованная вода).

Настоящая работа посвящена созданию быстрого и высокочувствительного способа скрининга проб фармацевтических субстанций на общее содержание F-, Cl-, Br- и S-органических соединений на уровне следов. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

разработать условия селективного определения анионов  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $SO_4^{2-}$  в водных растворах и водных абсорбатах продуктов конверсии F-, Cl-, Br- и S-содержащих органических соединений, которым соответствуют эти анионы;

изучить условия, необходимые для минимизации пределов обнаружения F-, Cl-, Br- и S-содержащих примесей в фарм-субстанциях при анализе твердых матриц;

разработать способ определения общего содержания Hal- и S-органических соединений на уровне следов в фарм-субстанциях, основанный на сочетании высокотемпературной окислительной конверсии пробы, поглощении продуктов конверсии и анализе всего абсорбата (а не малой его части) методом ионной хроматографии;

определить общее содержание Hal- и S-органических соединений в образцах разных фарм-субстанций при использовании разработанного способа.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ионный хроматограф модели «881 Compact IC Pro» («Metrohm», Швейцария), включающий детектор по электропроводности модели «819 IC Detector» (объем ячейки 1,5 мкл) с двумя кольцевыми стальными электродами; насос высокого давления модели «818 IC Pump» (диапазон скоростей потока 0,2–2,5 мл/мин, максимальное давление 25 МПа); систему подавления «Metrohm Suppressor Module MSM», состоящую из трех переключаемых подавительных колонок, регенерируемых серной кислотой и промываемых деионизованной водой; систему дегазации элюента «CO<sub>2</sub>-Suppressor 853»; двухканальный перистальтический насос модели «833 IC Liquid Handling Unit» (диапазон скоростей потока 0,5–0,6 мл/мин).

Разделение анионов проводили с помощью разделительных колонок модели Star Ion A300 (100×4,6 мм) фирмы «Phenomenex» и модели Metrosep A Supp 4 фирмы «Methrom» (250×4,0 мм), элюент – NaHCO<sub>3</sub>:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,6:3,75 мМ). Кроме того, для разделения применяли вышеприведенные колонки и колонки Metrosep A Supp 5 фирмы «Methrom» (50×4,0 мм), элюент – водный раствор NaHCO<sub>3</sub> (10 мМ). В работе использовали концентрирующую колонку фирмы «Metrohm» модели Metrosep APC 1 HC (12,5×4,0 мм), а также весы «MX5» фирмы «Mettler Toledo» (Швейцария); систему для получения деионизованной воды «Водолей М» («Химэлектроника», Россия)

(сопротивление получаемой воды 18,2 МОм); высокотемпературную трубчатую печь; кварцевый реактор (19×750 мм).

Для приготовления элюента использовали Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> («ч.д.а.», Россия) и NaHCO<sub>3</sub> («х.ч.», Россия); для приготовления регенерирующего раствора применяли H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> («ос.ч.», Россия). В работе использовали стандартную смесь анионов: NaF («ч.д.а.», Россия), NaCl («ч.д.а.», Россия), KBr («ч.д.а.», Россия), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> («ч.д.а.», Россия), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> («ч.д.а.», Россия), а также деионизованную воду.

Стандартные растворы готовили весовым методом. Раствор неорганических анионов в воде получали растворением соответствующих солей. В мерную колбу вместимостью 50,0 мл вносили взвешенное количество соли в диапазоне (13,910–21,480) ± 0,005 мг. Содержимое колбы перемешивали и доводили до метки деионизованной водой. Растворы с меньшей концентрацией готовили последовательным разбавлением данного раствора деионизованной водой. Содержание анионов в растворах составляло от  $n \cdot 10^{-9}$  до  $n \cdot 10^{-7}$  г/мл. При проведении высокотемпературной окислительной конверсии использовали кислород (медицинский, баллон), степень чистоты которого составляла 99,999%. Пробу фарм-субстанции вводили в кварцевый реактор в непрерывном потоке кислорода с помощью лодочки (температура печи 950°C, масса вводимой пробы около 1 мг, скорость потока кислорода 20–80 мл/мин). Продукты конверсии поглощали в абсорбере, заполненном деионизованной водой. Объем воды в абсорбере 1–4 мл. Общее время окислительной конверсии, сбора в абсорбер полученных продуктов и слудки CO<sub>2</sub> не превышало 5 мин.

### Обсуждение результатов

Для обеспечения минимальных пределов обнаружения примесей Hal- и S-органических соединений в фарм-субстанциях необходимо было минимизировать прежде всего пределы детектирования анионов в водных растворах, обеспечить их селективность определения и возможность анализа больших объемов водных растворов анионов. Это было необходимо для обеспечения возможности снижения пределов обнаружения анионов по концентрации за счет анализа всего объема водного абсорбата (а не его малой части).

Анализ больших проб водных растворов с концентрирующей колонкой и разделительными колонками Star A Ion 300 (100×4,60 мм) фирмы «Phenomenex», Metrosep A Supp 4

(250×4,0 мм) и Metrosep A Supp 5 (50×4,0 мм) фирмы «Methrom» с использованием стандартного элюента  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3,6:3,75 мМ) показал, что на хроматограмме регистрировался отрицательный пик, мешавший определению пика  $\text{Cl}^-$ . Для его минимизации в работе [3] проводили вытеснение из концентрирующей колонки остатков воды элюентом до перевода концентрата аналитов в разделительную колонку тем же элюентом. Проведенные нами эксперименты подтвердили такую возможность, однако показали, что воспроизводимость подобного ввода пробы невысока.

В связи с этим мы исследовали другой подход к решению данной проблемы. Он основан на за-

мене стандартного элюента водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (10 мМ). Эксперименты показали, что при использовании изученных колонок и этого элюента наблюдается исчезновение отрицательного пика, однако резко возрастает время удерживания аналитов и общее время анализа. Решение задачи было достигнуто при использовании разделительной колонки Metrosep A Supp 5 (50×4,0 мм) и 10 мМ водного раствора  $\text{NaHCO}_3$  в качестве элюента.

Хроматограммы, полученные при анализе 1 мл деионизованной воды и раствора в ней анионов  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , приведены на рис. 1, 2 соответственно. Концентрация анионов составляла  $n \cdot 10^{-9} - n \cdot 10^{-8}$  г/мл. Как видно из рис. 1, хромато-

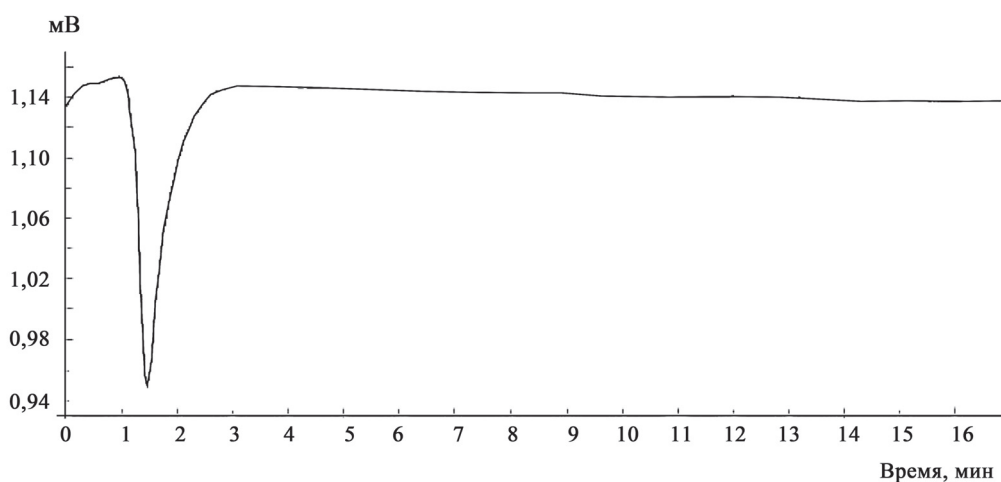


Рис. 1. Хроматограмма, полученная при вводе 1 мл деионизованной воды в хроматограф (разделительная колонка Metrosep A Supp 5, элюент – 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ )

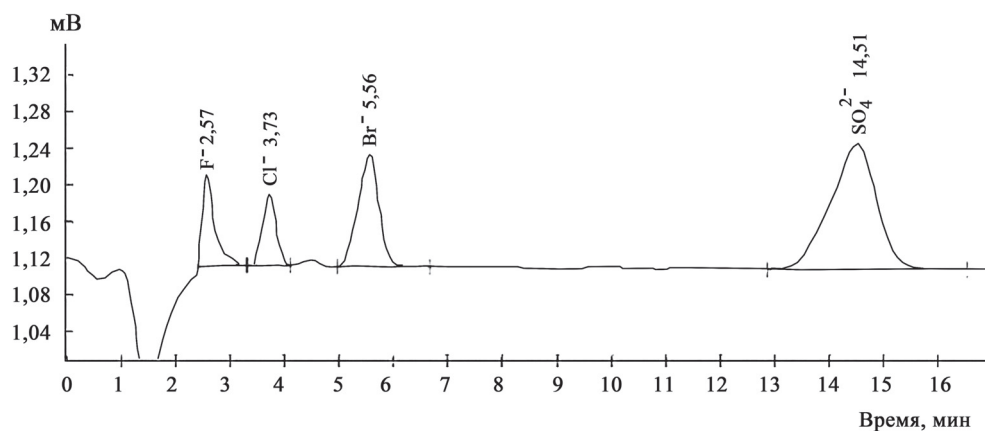


Рис. 2. Хроматограмма, полученная при вводе 1 мл раствора анионов  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  в хроматограф (разделительная колонка Metrosep A Supp 5, элюент – 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ )

грамма свободна от отрицательных пиков, т.е. обеспечиваются условия, необходимые для селективной регистрации определяемых анионов. На рис. 2 приведена хроматограмма, полученная в результате анализа раствора анионов, проведенного в тех же условиях, что и анализ деионизованной воды (рис. 1).

Перед нами стояла также проблема снижения фона деионизованной воды, которая использовалась в качестве поглощающего раствора продуктов конверсии. Исследование показало, что минимальный фон обеспечивался в тех случаях, когда контейнеры деионизованной воды большого объема были изготовлены из кварца, а не из полимера, как общепринято.

Решение этой задачи позволило использовать деионизованную воду для абсорбции продуктов конверсии и анализировать весь объем абсорбата, а не малую его часть, а следовательно, снизить пределы обнаружения. Оптимальный объем абсорбата, как показало исследование, составил 1 мл, скорость кислорода – 20 мл/мин. Были построены соответствующие градуировочные графики.

Расчитанные для выбранных условий анализа пределы детектирования (в пересчете на элемент, отношение сигнал:шум 3:1) составили, г:  $1,5 \times 10^{-11}$ ,  $1,8 \times 10^{-11}$ ,  $5,4 \times 10^{-11}$  и  $4,5 \times 10^{-11}$  для F, Cl, Br и S соответственно.

Проведенные исследования позволили приступить к изучению возможности определения общего содержания галоген- и серосодержащих органических соединений в разных образцах фарм-субстанций. При прямом определении масса анализируемой пробы фарм-субстанции, подаваемой в реактор с помощью лодочки, составила 1 мг.

Мы изучили возможность определения суммарного содержания F-, Cl-, Br- и S-органических соединений в фарм-субстанциях, содержащих в молекуле активного вещества азот. Показано, что при окислительной конверсии таких соединений

на хроматограмме регистрируется пик нитрита, который может мешать определению хлора (пик хлора может перекрываться с пиком нитрита). В случае такого вещества, как кофеин (N = 29%), наблюдалось полное перекрывание пиков нитрата и хлора.

В то же время в фарм-субстанциях, содержащих в молекуле азот, возможно определение таких примесей, как F-, Br- и S-содержащие, определению которых азот не мешает. Поэтому были изучены фарм-субстанции, не содержащие в молекуле определяемых элементов (F, Cl, Br, S) и азота. Данные проведенных анализов представлены в таблице.

Как видно из таблицы, в образцах кортизона и нипагина содержание фтора составляло соответственно  $8,5 \times 10^{-4}$  и  $7,5 \times 10^{-5}$  %. Содержание хлора в образцах кортизона, нипагина и метандростенолона составляло соответственно  $1,0 \times 10^{-4}$ ,  $5,4 \times 10^{-6}$  % и  $3,6 \times 10^{-6}$  %. Содержание этих элементов в остальных фарм-субстанциях было ниже предела обнаружения. Содержание таких элементов как бром и сера во всех изученных субстанциях было ниже предела обнаружения, в случае цитрата натрия содержание всех элементов было ниже предела обнаружения. Суммарное содержание рассматриваемых элементоорганических соединений в фарм-субстанциях на таком низком уровне определено впервые.

Предложенный подход исключает необходимость в выборе условий разделения примесей и активного вещества, что требует либо больших затрат времени, либо вовсе неосуществимо. Он обеспечивает возможность обнаружения всех (известных и неизвестных примесей, содержащих в молекуле определяемые элементы) на уровне  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  %, в пересчете на элемент, при этом выделения примесей и их разделения не требуется.

Таким образом, критерий, основанный на определении суммарного содержания F-, Cl-, Br- и S-органических примесей в фарм-субстанциях

Содержание примесей (%) в фарм-субстанциях, не содержащих азота ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ,  $s_r \leq 0,15$ )

Фарм-субстанция	F	Cl	Br	S
Метандростенолон ( $C_{20}H_{18}O_2$ )	$< 2 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
Нипагин ( $C_8H_8O_3$ )	$7,5 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
Кортизона ацетат ( $C_{21}H_{28}O_5$ )	$8,5 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$
Цитрат натрия ( $Na_3C_6H_5O_7$ )	$< 2 \times 10^{-6}$	$< 2 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$	$< 5 \times 10^{-6}$

может быть использован для быстрого скрининга проб на загрязнение фармсубстанций такими со-

единениями, которые характеризуют как качество препаратов, так и их безопасность.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федосеева М.В. Дис. ... канд. хим. наук. М., 2012. 112 с.
2. Emmenegger C., Wille A., Steinbach A. Sulfur and Halide Determination by Combustion Ion Chromatography. Metrohm. The Application Notebook. 2010. P. 4.
3. Капинус Е.Н. Дис. ... канд. хим. наук. М., 2006. 130 с.

Поступила в редакцию 09.10.14

### FAST DIRECT METHOD FOR TOTAL CONTENT DETERMINATION OF F-, Cl-, Br- AND S-ORGANIC COMPOUNDS IN PHARMACEUTICAL SUBSTANCES WAS DEVELOPED

M.E. Chivarzin, I.A. Revelsky, A.V. Nikoshina, A.N. Bulduzhova, D.A. Chepenansky, A.I. Revelsky

(Division of Analytic Chemistry)

**The method based on straight high temperature oxidation converse and analysis of whole absorbate volume of analytes by ion chromatography. Detection limits were of the method was  $2 \times 10^{-6}$ – $4 \times 10^{-6}$  % depending on the element. The sample mass was about 1 mg.**

**Key words:** pharmaceutical substance quality control, pollutions, ion chromatography.

**Сведения об авторах:** Чиварзин Михаил Евгеньевич – аспирант ИФХЭ РАН (chivarzin@yandex.ru); Ревельский Игорь Александрович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (revelsky@environment.chem.msu.ru); Никошина Анна Валентиновна – сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (nikoshina.anna@gmail.com); Булдыжова Алина Николаевна – аспирант ИФХЭ РАН (alina\_buld@mail.ru); Чепелянский Дмитрий Александрович – сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (chdim@prival.ru); Ревельский Александр Игоревич – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (sorbent@yandex.ru).