

УДК 661.12+543.544

Новые направления в газохроматографическом анализе фармацевтических препаратов*

Н. Сноу

НИКОЛАС СНОУ (Nicholas H. Snow) — профессор кафедры химии и биохимии Университета г. Сетон Холл (США). Область научных интересов: газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография, пробоподготовка, фармацевтический анализ, анализ полимеров с молекулярными отпечатками.

Department of Chemistry and Biochemistry, Seton Hall University, 400 South Orange Avenue, South Orange, NJ 07079, 973-761-9035 (ph), 973-761-9772 (fax), E-mail snownich@shu.edu

Газовая хроматография, оформившаяся как инструментальный метод примерно 50 лет назад [1], стала одним из наиболее широко используемых методов анализа в различных областях промышленности. Высокое разрешение, отличная чувствительность, возможность количественных определений и легкость применения — все эти качества выделяют ее среди остальных аналитических методов. Используя высокоэффективные капиллярные колонки, можно достичь эффективности разделения в сотни тысяч теоретических тарелок и чувствительности на пикограммовом уровне. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией стала мощным рутинным средством разделения и идентификации. Нашла она свое применение и в фармацевтической промышленности. Основное приложение газовой хроматографии в фармацевтической промышленности — это анализ летучих органических примесей в фармацевтических продуктах. На основании литературного поиска можно заключить, что хотя на фармацевтических фирмах проводится большое количество хроматографических анализов, публикуется только незначительная часть этих работ. Из последних публикаций, посвященных некоторым современным приложениям газовой хроматографии, отметим обзор [2]. В этой работе рассматриваются новые приемы в газовой хроматографии, которые можно применить к аналитическим задачам в фармацевтической промышленности.

В настоящее время в качестве метода разделения лекарственных веществ и сырья доминирует ВЭЖХ, а газовая хроматография нашла применение как дополнительный метод подтверждения

результатов ВЭЖХ и как основной метод анализа примесей, в первую очередь легколетучих веществ, таких как остатки растворителей.

В данной статье рассмотрены три аспекта приложения газовой хроматографии в фармацевтической промышленности: быстрый анализ остаточных растворителей, твердофазная микроэкстракция лекарственных веществ и температурно-программируемое введение пробы при анализе фармацевтических препаратов.

Быстрый газохроматографический анализ остаточных растворителей

Анализ остаточных растворителей, которые могут присутствовать в фармацевтических продуктах, промежуточных соединениях и сырье, является в настоящее время основным приложением газовой хроматографии в фармацевтической промышленности. Практически все нормативные акты, утвержденные национальными и международными регулирующими организациями, предписывают проведение такого анализа для всех фармацевтических продуктов, выпускаемых на рынок. В США фармацевтический анализ регламентируется Американской фармакопеей, метод USP 467 [3]. Этот метод содержит методические указания по определению наиболее токсичных растворителей и дает специальные рекомендации по выбору колонок, хроматографов, детекторов и экспериментальных параметров. Аналогичные методы включают фармакопеи других государств, как, например, Европейская фармакопея [4] и Японская фармакопея [5]. Но надо сказать, что ни один из этих методов не является всеобъемлющим, и они

* Перевод с английского докт. хим. наук А.А. Курганова.

многократно критиковались за несоответствие современным методам и технологиям. В 1997 году Международная конференция по гармонизации (МКГ) обнародовала новые нормы, которые объединяют и расширяют нормы, представленные различными национальными фармакопеями и регулирующими организациями. Нормы МКГ охватывают около 80 растворителей и подразделяют их на четыре группы:

- 1) растворители, которые не следует применять (высокотоксичные);
- 2) растворители средней токсичности;
- 3) нетоксичные растворители;
- 4) растворители неизвестной токсичности.

По содержанию остаточных растворителей МКГ разделяет их на три класса (см. таблицу). Следует заметить, что необходимость соблюдения норм МКГ создает значительно более сложную аналитическую проблему в отношении анализа остаточных

растворителей, чем предшествующие нормативные акты. Согласно данным МКГ, содержание растворителей в фармацевтических продуктах может составлять 2—5000 ppm. Кроме того, анализу и регулированию подлежат многие из тех растворителей, как, например диметилсульфоксид, которые традиционно используются в качестве разбавителей в аналитических методах. В то же время МКГ не выдвигает каких-либо особых требований к колонкам и методам.

Остаточные растворители в фармацевтике обычно определяют путем растворения пробы в соответствующем растворителе и его последующего анализа методом газовой хроматографии с прямым вводом пробы или паровой фазы. Типичная методика с использованием статической экстракции паровой фазы представлена в работе [6]. В этой работе описан общий метод для анализа всех 30 растворителей, применяемых в про-

Таблица

Классификация остаточных растворителей по содержанию в фармацевтических продуктах.

Нормативы Международной конференции по гармонизации

Класс 1 (2—1500 ppm)	Класс 2 (50—4840 ppm)	Класс 3(5000 ppm)
Бензол	Ацетонитрил	Уксусная кислота
Четыреххлористый углерод	Хлорбензол	Ацетон
1,2-Дихлорэтан	Хлороформ	Анизол
1,1-Дихлорэтилен	Циклогексан	Бутанол-1
1,1,1-Трихлорэтан	1,2-Дихлорэтилен	Бутанол-2
	Дихлорметан	Бутилацетат
	Диметоксиэтан	Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир
	N,N-Диметилацетамид	Кумол
	N,N-Диметилформамид	Диметилсульфоксид
	1,4-Диоксан	Этанол
	2-Этоксизтанол	Этилацетат
	Этиленгликоль	Диэтиловый эфир
	Формаид	Этиловый эфир муравьиной кислоты
	Гексан	Муравьиная кислота
	Метанол	Гептан
	2-Метоксиэтанол	Изобутилацетат
	Метилбутилкетон	Изопропилацетат
	Метилциклогексан	Метилацетат
	N-Метилпирролидон	3-Метилпропанол-1
	Нитрометан	Метилэтилкетон
	Пиридин	Метилизобутилкетон
	Сульфолан	2-Метилпропанол-1
	Тетралин	Пентан
	Толуол	Пентанол-1
	1,2,2-Трихлорэтилен	Пропанол-1
	Ксилол	Пропанол-2
		Пропилацетат
		Тетрагидрофуран

изводстве. Разделение осуществляется на длинной капиллярной колонке с толстым слоем неподвижной фазы. Продолжительность одного анализа примерно 1 час. Методика хорошо опробована и широко используется во всем мире для многих приложений. В реальных анализируемых пробах обычно присутствуют от 3 до 6 растворителей из 30, и предложенный общий метод позволяет использовать одни и те же условия анализа независимо от конкретного растворителя и фармацевтического препарата.

Разработаны новые приемы быстрых газохроматографических разделений [7–9]. Многие из них, такие как EZ-Flash™, позволяют использовать широкий набор колонок, и выбор их определяется самим покупателем, что, однако, может привести к проблемам с регулируемыми органами. В других методах, менее пригодных для хроматографирования с быстрым программированием температуры, рекомендуется использование только коротких колонок и модифицированных стандартных устройств.

На рис. 1 показаны результаты быстрого анализа типичной смеси шести остаточных растворителей в фармацевтической пробе с использованием хроматографической системы EZ-Flash™. Анализ заканчивается примерно за 15 с. Временной интервал между двумя анализами, включая ввод пробы с делением потока, составляет примерно 4 мин (сюда же входит время на нагрев и охлаждение колонки с целью очистки). Следует отметить, что разделение смеси полностью происходит за время изотермической части температурного градиента. Это указывает на то, что основная польза от скоростной газовой хроматографии состоит, возможно, в быстром температурном программировании цикла очистки колонки между процедурами анализа.

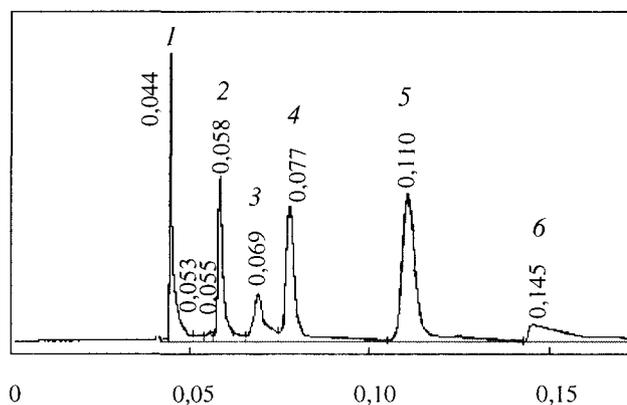


Рис. 1. Результаты быстрого газохроматографического анализа шести растворителей методом EZ-Flash:

1 — этанол; 2 — этилацетат; 3 — бутанол-1; 4 — гептан; 5 — толуол; 6 — N,N-диметилформамид; 7 — диметилсульфоксид (разбавитель).

Газ-носитель — гелий; ввод пробы: деление потока 100:1, давление $\sim 1,5 \cdot 10^3$ Па; капиллярная колонка 5 м \times 0,25 мм \times 0,25 мкм Rtx-5 (подготовлена для скоростной хроматографии, ThermoOrion, Chelmsford, MA); программирование температуры: 20 с при 40 °С, затем подъем температуры до 300 °С за 1 мин; пламенно-ионизационный детектор, 300 °С

Потенциальные возможности скоростной газовой хроматографии с точки зрения эффективности разделения и использования в рутинном анализе ярко демонстрирует хроматограмма, показывающая разделение всего семейства остаточных растворителей класса 2 по МКГ (рис. 2). Разделение проводили на длинной колонке в условиях быстрого программирования температуры. Продолжительность разделения всех 28 компонентов составила примерно 4 мин. Общее время между двумя анализами примерно 8 мин.

Быстрая газовая хроматография потенциально может также значительно увеличить производи-

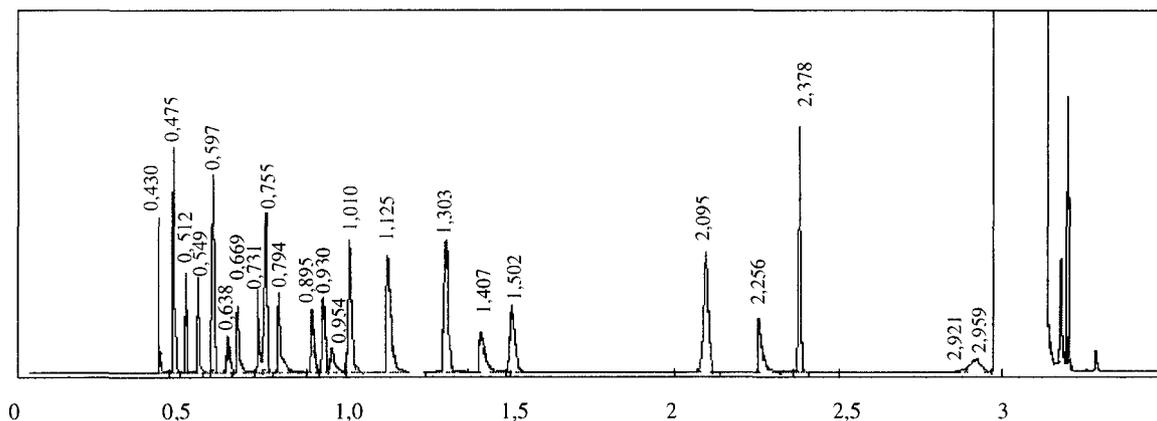


Рис. 2. Результаты быстрого газохроматографического анализа растворителей класса 2.

Газ-носитель — гелий; ввод пробы: 300 °С, деление потока 80:1, давление $\sim 3 \cdot 10^3$ Па, колонка 25 м \times 0,25 мм \times 0,25 мкм HP-5MS; программирование температуры: 40 °С/1 мин, 5 °С/мин до 45 °С, 160 °С/мин до 300 °С; пламенно-ионизационный детектор, 300 °С, 100 Гц

тельность анализа остаточных растворителей в фармацевтических препаратах. Но здесь решающее значение имеет пробоподготовка, и возможности скоростной газовой хроматографии будут в значительной степени ограничены в случае сложной длительной пробоподготовки. В связи с этим заметим, что часто пользователи сами вносят некоторые изменения в системы для скоростной газовой хроматографии, поскольку в оригинальной форме они оказываются неработоспособными в условиях, предписываемых нормативными требованиями регулирующих органов.

Пробоподготовка методом твердофазной экстракции

Для целей пробоподготовки все возрастающий интерес вызывает экстракция твердофазными экстрагентами. Доминирующая роль здесь принадлежит твердофазной микроэкстракции [10]. Эта операция детально описана в работе Павлицына (Pavlizyn) [11], а также в многочисленных публикациях (более 500), собранных в руководстве, изданном фирмой «Supelco, Inc.» [12].

Имеющийся опыт использования твердофазной микроэкстракции в анализе лекарственных препаратов относится в основном к клинической и судебно-медицинской практике. Но данный метод может быть использован и в анализе лекарственных препаратов в фармацевтической промышленности. Заметим, что твердофазная микроэкстракция была эффективно использована именно при анализе остаточных растворителей [13].

Развитием этой техники пробоподготовки являются экстракция сорбентом, заполненным в капилляр, [14] и сорбционная экстракция при перемешивании [15]. Основная проблема применения этих методов в фармацевтической промышленности связана с тем, что обычная система пробоподготовки, имеющаяся в продаже, плохо приспособлена для работы в строгих нормированных условиях и, чтобы удовлетворять этим нормам, она должна быть автоматизирована. Недавно была представлена эффективная автоматизированная система пробоподготовки для твердофазной микроэкстракции Combi-PAL (CNI Ind., Швейцария). Следует заметить, что система Combi-PAL также пригодна для парофазной и жидко-жидкостной экстракции с последующим введением пробы в хроматографическую колонку посредством шприца.

Пример использования твердофазной микроэкстракции в анализе фармацевтических препаратов продемонстрировали Карайц и Сноу [16], которые изучали процесс деградации дифенгидрамина (обезболивающее средство) с проведением анализа по схеме твердофазная микроэкстракция — газовая хроматография/масс-спектрометрия. Показано, что твердофазная микроэкстракция является эффективным средством извлечения

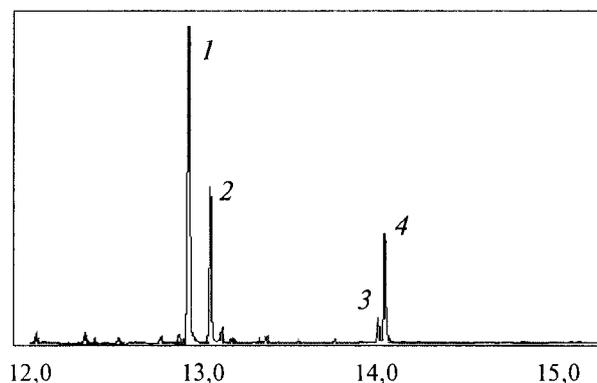


Рис. 3. Результаты хромото-масс-спектрометрического анализа эстрогенов, модифицированных триметилхлорсиланом (ТМС) после экстракции на волокно:

1 — 17-β-эстрадиол-ТМС; 2 — 17-β-эстрадиол-ди-ТМС; 3 — син-норгестримат-ТМС; 4 — анти-норгестримат-ТМС

как основного вещества, так и продуктов разложения при исследовании деградации (термической, кислотной и основной).

Приведем пример хромото-масс-спектрометрического анализа эстрогенных гормонов с использованием твердофазной экстракции [17]. Эстрогены из противозачаточных таблеток экстрагировали на кондиционированные полиакрилатные волокна (85 мм, Supelco, Беллафонте, ПА), затем выделенные на волокне эстрогены модифицировали триметилхлорсиланом, полученные производные десорбировали и анализировали на системе газовой хроматограф/масс-спектрометр (рис. 3).

Автоматический анализ был проведен с использованием автоматического пробоотборника модели FOCUS (ATAS, Файерфид, ОХ) на приборе модели 6890/5973, снабженном системой обработки данных (Agilent Technologies, Вилмингтон, ДЕ). Газовый хроматограф был оборудован устройством ввода пробы с программированием температуры, модель Optic II PTV (ATAS, Файерфид, ОХ). Для разделения использовалась капиллярная колонка 15 м × 0,25 мм × 0,1 мм DB-5HT (J+W Scientific, Folsom, CA). Анализ начинался при 40 °С (3 мин), затем температура поднималась со скоростью 20 °С/мин до 300 °С. Полное время анализа составило 18 мин. В качестве газа-носителя использовался гелий. Условия ввода пробы в колонку: давление ~1,5 · 10³ Па, 250 °С, расход газа-носителя 150 мл/мин (с делением потока). Температура интерфейса к масс-спектрометру составляла 280 °С.

Экстракцию эстрогенов проводили путем погружения в водный раствор пробы волокна при 50 °С на 5 мин. Перемешивание достигалось за счет вращения пробника. Следующую стадию — модификацию эстрогенов на волокне — осуше-

ствляли в герметичном пробнике для парофазного анализа, куда помещалось 500 мкл чистого бис(триметилсилил)трифторацетата; волокно выдерживали в течение 10 мин при 50 °С. Соотношение количеств производного и исходного вещества контролировалось температурой и продолжительностью реакции при пост-экстракционной модификации.

Основное преимущество данного метода — возможность автоматизированного анализа полярных лекарственных веществ при легко контролируемых условиях модификации, в отличие от анализа с обычными методами модификации, когда неизбежно возникает проблема воспроизводимости результатов.

Введение пробы с программированием температуры инжектора

При анализе фармацевтических препаратов методом газовой хроматографии обычно сталкиваются с той проблемой, что вследствие контакта пробы с устройством ввода или с неподвижной фазой, в результате термического разложения или просто из-за недостаточной летучести анализируемое вещество не может эффективно транспортироваться через хроматографическую систему и, следовательно, не будет обнаружено детектирующим устройством. Реализация классических методов введения пробы, с делением потока и без деления, является одной из основных составляющих этой проблемы. О серьезности этой проблемы говорит тот факт, что Гроб [18] посвятил 600 страниц вопросам оптимизации устройств ввода пробы.

Для преодоления трудностей введения пробы в отсутствие деления потока Вогт [19] в 1979 г. предложил метод введения пробы с программированием температуры инжектора. Однако до конца 1980-х годов, пока инжекторы с программированием температуры не стали коммерчески доступными, метод оставался мало распространенным и даже сегодня он еще не получил широкого применения. Принцип метода состоит в том, что проба вводится в охлажденный инжектор (обычно это стеклянный лайнер, заполненный сорбентом), который затем быстро нагревается (8 °С/с) без деления потока, что вызывает десорбцию пробы и переносит ее в колонку. По данному методу введения пробы опубликовано практическое руководство [20].

Основными преимуществами метода введения пробы замораживанием перед традиционным способом введения проб в горячий инжектор (с делением потока или без деления) являются отсутствие дискриминации компонентов пробы в игле шприца и уменьшение разложения пробы в инжекторе. Кроме того, при программировании температуры инжектора появляется возможность достичь более высокой температуры, чем темпе-

ратура колонки, которая обычно ограничена ~350 °С. Стандартный инжектор с программированием температуры может нагреваться до 600 °С. Это позволяет вводить в колонку значительно большую пробу или пробу менее летучего соединения, чем это возможно в случае обычного инжектора. В сочетании с инжектором, функционирующим при программировании температуры, может использоваться колонка с тонким слоем стационарной фазы, что улучшает испарение труднолетучих компонентов.

Описанный метод особенно перспективен для практики анализа полимеров и добавок к полимерам. Примеры подобных разделений можно найти в работах Ван Лишоута с сотр. [21] и Ланкастера с сотр. [22]. В [21] сообщается об использовании инжектора при температуре около 600 °С, что позволяет десорбировать полимерные добавки из матрицы. При этом колонку нагревали до 425 °С. В качестве примера на рис. 4 приведена хроматограмма добавок в полимере, полученная хромато-масс-спектрометрическим методом с применением инжектора с программированием температуры.

Число публикаций, посвященных применению инжекторов с программированием температуры в анализе фармацевтических препаратов в промышленности, невелико, но имеется много публикаций по анализу лекарственных веществ этим методом в различных клинических и биологических матрицах (см., например, [23]). В работе [24] изучали условия и некоторые параметры ввода пробы (линейность, стабильность) при анализе лекарственных веществ из биологических жидкостей. В экспериментах использовали различные сорбенты для заполнения инжектора и различные растворители для ввода большого

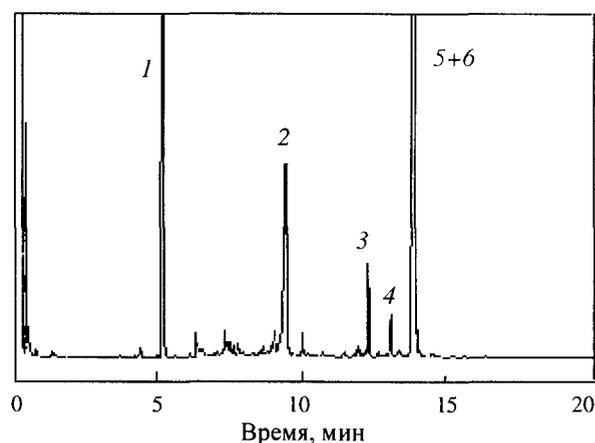


Рис. 4. Результаты анализа полимерных добавок хромато-масс-спектрометрическим методом с применением инжектора с программированием температуры:

1 — ионол СР; 2 — дрезинат; 3 — неизвестное вещество; 4 — циклический тример РВТ; 5 — ирганокс 1076; 6 — ирганокс PS800

объема пробы лекарства, экстрагированного из плазмы твердофазной экстракцией Установлено, что большой объем пробы может улучшить чувствительность анализа При этом отмечается, что растворители и условия пробоподготовки должны выбираться очень тщательно, так как большой объем пробы приводит к усилению сигнала от примесей и загрязнений

Введение пробы прямо на колонку методом замораживания в фармацевтическом анализе продемонстрировано на ряде прекрасных примеров Сандрой и сотр [25] Они пришли к выводу, что введение пробы этим методом является лучшим тестом на определение, можно ли пробу анализировать газохроматографически, если другие методы в данном случае непригодны

Рассматриваемый метод введения пробы на колонку дает отличные результаты, но он может оказаться непригодным при условии соблюдения жестких требований, предписываемых регулирующими нормативами Многие фармацевтические пробы содержат примеси и посторонние вещества, которые могут испортить колонку при использовании метода ввода пробы замораживанием В одной из немногих опубликованных работ, непосредственно посвященной промышленному фармацевтическому анализу, [26] опробовали несколько методов введения пробы, включая замораживание пробы в колонке, для анализа нестойких эпоксидов В результате пришли к выводу о значительном снижении термического разложения эпоксида при использовании метода замораживания, что удалось установить при введении пробы без деления потока

* * *

Газовая хроматография как техника инструментального анализа используется уже более 50 лет, но ее потенциал еще не полностью реализован В фармацевтической промышленности для анализа лекарственных форм и примесей применяется ВЭЖХ, а газовая хроматография служит в основном для определения остаточных растворителей в продуктах, полупродуктах и сырье Новые варианты, такие как скоростная газовая хроматография, новые методы пробоподготовки, температурно-программируемая инъекция или введение пробы прямо на колонку могут расширить возможности газохроматографического анализа Основная проблема на пути внедрения этих новых методов и приемов в аналитическую практику фармацевтики связана с необходимостью адаптации их к жестким нормативным требованиям, гарантирующим качество фармацевтических продуктов Применение новых методов, которые стали теперь коммерчески доступными, наряду с исследовательскими данными и данными, подтверждающими компетентность этих ме-

тодов, которые тоже теперь доступны, позволяет надеяться, что газовая хроматография в скором времени займет значительно более солидное место в фармацевтической промышленности, чем то, которое она имеет сегодня

Автор выражает благодарность фирме «Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, LLC» за оказанную финансовую помощь и консультации при выполнении данной работы

ЛИТЕРАТУРА

- 1 James A T, Martin A J P *Biochem J*, 1952, v 50, p 679
- 2 Sandra P, David F, Szucs R *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, v 21, № 9/10, p 662—671
- 3 United States Pharmacopeia, *Organic Volatile Impurities* 2002, p 467
- 4 European Pharmacopeia, *Organic Volatile Impurities* 2002
- 5 Japanese Pharmacopeia, *Organic Volatile Impurities* 2002
- 6 De Smet M, Roels K, Vanhoof L, Lauwers W *Pharm Forum*, 1995, v 21, № 2, p 501—514
- 7 Dalluge J, Ou-aissa R, Vreuls J J e a J *High Resolut Chromatogr*, 1999, v 22, № 8, p 459—464
- 8 Van Lieshout M, Derks R, Janssen H-G, Cramers C *Ibid*, 1998, v 21, № 11, p 583—586
- 9 Korytar P, Janssen H-G e a *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, v 21, № 9/10, p 558—572
- 10 Arthur C L, Pawliszyn J *Anal Chem*, 1990, v 62, p 2145
- 11 Pawliszyn J *Solid Phase Micro-extraction Theory and Practice* New York John Wiley and Sons, 1997
- 12 *Applications of Solid Phase Micro-extraction*, Bellfonte, PA Supelco, 2002
- 13 Scypinski S, Smith A In *Solid Phase Micro extraction A Practical Guide* Ed S A S Wercinski New York Dekker, 1999, p 111
- 14 Mol H G J, Janssen H-G, Cramers C A, Brinkman U A Th *J Microcol Sep*, 1995, v 7, № 3, p 247—57
- 15 Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C *Ibid*, 1999, v 11, p 737
- 16 Karaisz K, Snow N *Ibid*, 2001, v 13, p 1—7
- 17 Snow N H In *Applications of Solid Phase Micro extraction* Ed J Pawliszyn London Royal Society of Chemistry, 1999, p 486—496
- 18 Grob K Jr, *Split and Splitless Injection in Capillary Gas Chromatography Third Edition* New York John Wiley and Sons, 1995
- 19 Vogt W, Jacob K, Obwexer H W *J Chromatogr*, 1979, v 174, p 437—449
- 20 Janssen H-G *Large Volume Injection Techniques* At <http://www.gerstelus.com>
- 21 Van Lieshout M H P M, Janssen H-G, Cramers C A e a *J High Resolut Chromatogr*, 1996, v 19, p 193—199
- 22 Lancaster J S, Lynch T P, McDowell P G *Ibid*, 2000, v 23, № 7/8, p 479—484
- 23 Teske J, Engewald W *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, v 21, № 9—10, p 584—593
- 24 Van Hout M W J, de Zeeuw R A, Franke J P, de Jong G J *J Chromatogr B*, 1999, v 729, p 199—210
- 25 Reference 2, op cit
- 26 Klick S J *Chromatogr A*, 1995, v 689, p 69