

Практические рекомендации по выбору неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при определении триэтиламина методом газовой хроматографии

А. Н. Иоутси, М. А. Сумцов, А. Т. Сарницкая, А. Н. Блинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Статья поступила 02.06.2017 г. Принята к печати 21.08.2017 г.

Резюме: В статье представлены результаты экспериментальных исследований по выбору неподвижных жидких фаз (стационарных фаз) для газожидкостной хроматографии, которые можно использовать для контроля содержания остаточного органического растворителя триэтиламина в средствах медицинского применения. Выполнена сравнительная оценка величины относительного стандартного отклонения площади пика триэтиламина, его времени удерживания и фактора асимметрии пика для различных фаз и растворителей. Даны рекомендации по выбору хроматографических колонок для определения триэтиламина.

Ключевые слова: контроль качества; газожидкостная хроматография; стационарные фазы; триэтиламин; фактор асимметрии пика.

Библиографическое описание: Иоутси АН, Сумцов МА, Сарницкая АТ, Блинов АН. Практические рекомендации по выбору неподвижной жидкой фазы и геометрических параметров колонки при определении триэтиламина методом газовой хроматографии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(3): 170–174.

Остаточные органические растворители — это растворители, которые используются на любой стадии производства лекарственного средства и полностью не удаляются после завершения технологического процесса. Предельно допустимое содержание органических растворителей в лекарственных средствах определяется степенью их возможного риска для здоровья человека. Поэтому в экспертизе качества средств медицинского применения важным аспектом является контроль содержания остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях и в готовых лекарственных формах. Наиболее распространенным для выполнения такой задачи в данной сфере является метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в сочетании с пламенно-ионизационным детектированием [1, 2].

Среди остаточных органических растворителей многие вещества обладают достаточно высокой полярностью. Определение полярных соединений методом ГЖХ зачастую сопряжено со многими трудностями. Наиболее распространенные — размытый несимметричный хроматографический пик, низкая воспроизводимость площади пика (высокие коэффициент асимметрии пика и относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика соответственно), высокий предел обнаружения. Такие проблемы при определении полярных соединений могут возникать, например, вследствие их адсорбции на поверхности хроматографической колонки [3–6].

Большинство применяемых сейчас в фармацевтическом анализе колонок для газожидкостной хроматографии — кварцевые капиллярные колонки, на внутреннюю стенку которых нанесены различные полимерные покрытия. При нанесении полимерного модификатора поверхности производитель всегда

имеет дело с остаточными силанольными группами кварца. Их деактивация — важная стадия производства хроматографической колонки. Одна и та же стационарная фаза, полученная разными производителями, может приводить к различным результатам одного и того же хроматографического определения. Это можно связать как минимум с разной технологией производства и различными способами деактивации остаточных силанольных групп в частности. Стоит отметить, что подобная деактивация при производстве влияет и на свойства лайнеров для инжектора [7, 8].

Данные проблемы — не редкость и в экспертизе средств медицинского применения в случае определения, например, аминов. В данной области методом ГЖХ приходится определять преимущественно алифатические амины, что гораздо сложнее по сравнению с ароматическими (с точки зрения их реакционной способности и адсорбции на внутренней стенке капиллярной колонки). Для того чтобы снизить нежелательные эффекты, важно подобрать подходящую неподвижную фазу (НФ) для конкретного определяемого соединения (или группы соединений). Стоит сопоставить полярность определяемого соединения и самой НФ, подобрать хроматографическую колонку с подходящими для конкретной цели геометрическими параметрами. Мы предлагаем рассмотреть основные критерии выбора колонки для газохроматографического анализа полярного триэтиламина (ТЭА), поскольку часто трудно выполнить требования о факторе асимметрии его пика и эффективности хроматографической системы в нормативных документах фирм производителей.

Цель данной работы состоит в том, чтобы выбрать неподвижные фазы для определения ТЭА, которые

позволят получить высокие хроматографические параметры его пика на хроматограммах и, как следствие, достоверно определить его содержание.

Методики определения ТЭА в субстанциях и лекарственных препаратах в значительной степени предполагают шприцевой ввод жидких проб в хроматографическую систему. Поэтому полезно исследовать, как выбор растворителя для приготовления анализируемых растворов ТЭА влияет на некоторые хроматографические параметры его пика (асимметрию, воспроизводимость площадей и времен удерживания).

Не стоит забывать о многообразии хроматографического оборудования, доступного разнообразия колонок, лайнеров и т.д. Все это различается и развито не в одинаковой степени на заводах, предприятиях и фармацевтических фирмах. Таким образом, авторы статей не могут претендовать на полное воспроизведение хроматографических параметров для пика ТЭА, полученных с помощью нашего оборудования и оснащения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триэтиламин (аналитический стандарт, «Merck», Германия), N,N-диметилформамид (химически чистый, «Fluka», США), хлороформ (особой чистоты, «Компонент-Реактив», Россия), гидроксид натрия (чистый для анализа, «Sigma-Aldrich», США). Для приготовления растворов использовали весы аналитические («Mettler Toledo», Германия), систему очистки воды Milli-Q Integral 5 («Millipore», Франция). Для газохроматографического анализа использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный автосэмплером Agilent 7683B («Agilent Technologies», США).

В качестве подвижной фазы использовали гелий. В качестве НФ использовали хроматографические капиллярные колонки, которые, как правило, рекомендуют к использованию в нормативных документах предприятий-производителей:

— DB-624 (30 м × 0,32 мм × 1,8 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Agilent Technologies», США) и VF-1301ms (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм, «Agilent Technologies», Нидерланды) с модификатором капилляра 6 % цианопропилфенил- / 94 % диметилполисилоксан;

— DB-5 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; 30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Agilent Technologies», США) с модификатором капилляра 5 % дифенил- / 95 % диметилполисилоксан;

— DB-1-ms, DB-1 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм), HP-1 (30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм, «Agilent Technologies», США) с 100 % диметилполисилоксаном в качестве модификатора капилляра;

— Stabilwax (30 м × 0,32 мм × 1,00 мкм, «Restek», США) со 100 % полиэтиленгликолем в качестве модификатора капилляра;

— Rtx-5 Amine (30 м × 0,32 мм × 1,5 мкм; 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм, «Restek», США) для определения аминокислот [9].

В работе использовали растворы ТЭА в N,N-диметилформамиде (ДМФА), деионизованной воде и

хлороформе с концентрацией 0,08 мг/мл. Данная концентрация соответствует порядку предельно допустимого содержания ТЭА (не более 0,05 %). Приготовление растворов ТЭА в воде и ДМФА осуществляли путем растворения точной навески в соответствующем растворителе. Раствор в хлороформе получали экстракцией ТЭА хлороформом из водного раствора с добавлением 1 М раствора гидроксида натрия. Все растворы хранили при температуре 4 °С.

Около 1,5 мл раствора ТЭА перед анализом помещали в вials для автосемплера и осуществляли ввод 0,2 мкл жидкой фазы в хроматографическую колонку. Для анализа использовали хроматографические условия, указанные в нормативных документах фирм-производителей. Регистрировали хроматограммы и проводили обработку результатов с помощью программного обеспечения ChemStation.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При работе с таким полярным азотсодержащим соединением, как ТЭА, высокое влияние на качество пиков на хроматограммах и результат хроматографического определения оказывает различие в полярности модифицирующих пленок НФ для ГЖХ.

Если фазы на основе 100 % диметилполисилоксана (DB-1) или содержащие 5 % дифенилполисилоксана (DB-5) являются неполярными, то включение цианопропилфенилполисилоксана в состав модифицирующей капилляр пленки (6 % в DB-624) приводит к увеличению полярности соответствующих НФ. Стационарные фазы на основе полиэтиленгликоля (100 % полиэтиленгликоль в DB-WAX) — высокополярные НФ.

Стоит также учитывать природу растворителей, в которых готовят растворы ТЭА. Вода — полярный протонный растворитель, способный в зависимости от условий и определяемых соединений служить как донором, так и акцептором протонов для молекул аналита, сольватировать его. Кроме того, при использовании такого растворителя нельзя исключать образование водородных связей с поверхностью сорбента и, как следствие, изменение его хроматографических свойств. ДМФА и хлороформ — апротонные растворители с различной полярностью.

При рассмотрении влияния геометрических параметров колонки на хроматографическое поведение ТЭА наблюдали закономерность: при одной и той же длине колонки с ростом толщины модифицирующей пленки возрастает время удерживания ТЭА. Фактор асимметрии для многих сорбентов снижается с увеличением толщины модифицирующей пленки (табл. 1, 2). Для величины эффективности хроматографической системы не наблюдалось какой-либо строгой зависимости от полярности рассмотренных видов стационарных фаз.

Для всех растворителей и большинства сорбентов наилучшие результаты по асимметрии и воспроизводимости площади пика и времени удерживания ТЭА были получены при параметрах колонки 30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм. Фактор асимметрии пика ТЭА составил для различных колонок 1,06–2,45 при использовании хлороформа в качестве растворителя и 1,06–2,42 для ДМФА. Что касается воспроизводимости площади пика, ДМФА зарекомендовал себя

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЛОНКИ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРИЭТИЛАМИНА (РАСТВОРИТЕЛЬ ХЛОРОФОРМ)

Колонка	Геометрические параметры колонки, м×мм×мкм	Хроматографические параметры				
		t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
DB-624	30×0,32×0,25	2,61	12800	6,91	3,86	0,18
	30×0,32×1,80	6,52	28900	4,20	7,50	0,11
	30×0,53×3,00	9,42	108900	2,45	4,06	0,19
DB-5	30×0,32×0,25	5,43	10100	18,9	0,21	0,79
	30×0,32×1,00	9,21	498800	1,68	7,69	0,002
	30×0,53×3,00	6,68	160400	1,94	0,70	0,05
WAX	30×0,32×1,00	—	—	—	—	—
DB-1	30×0,32×0,25	4,27	56900	11,88	1,77	0,04
	30×0,32×1,00	5,58	28700	10,55	1,22	0,05
	30×0,53×3,00	7,39	279700	1,06	1,66	0,02

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЛОНКИ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРИЭТИЛАМИНА (РАСТВОРИТЕЛЬ N,N-ДИМЕТИЛФОРМАМИД)

Колонка	Геометрические параметры колонки, м×мм×мкм	Хроматографические параметры				
		t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
DB-624	30×0,32×0,25	2,54	22000	9,75	0,52	0,15
	30×0,32×1,80	6,50	31800	4,41	7,79	0,06
	30×0,53×3,00	9,39	111000	2,42	1,80	0,08
DB-5	30×0,32×0,25	5,29	13500	21,2	3,36	0,05
	30×0,32×1,00	9,20	436000	1,70	6,01	0,004
	30×0,53×3,00	6,66	165800	1,88	1,13	0,02
WAX	30×0,32×1,00	4,45	2500	2,76	3,37	0,22
DB-1	30×0,32×0,25	4,21	53100	9,60	1,48	0,14
	30×0,32×1,00	5,50	34700	8,57	1,96	0,02
	30×0,53×3,00	7,39	281600	1,06	4,81	0,01

наиболее удачно (при низком факторе асимметрии пика) на колонках DB-5 и DB-624 ($RSD = 1,13\%$ и $1,80\%$ соответственно). Подобные результаты с ис-

пользованием хлороформа были получены на сорбентах DB-5 ($RSD = 0,70\%$) и DB-1 ($RSD = 1,66\%$). Однако в большинстве случаев эффективность хроматографической системы оказывается выше при использовании ДМФА в качестве растворителя. Однако оба растворителя — ДМФА и хлороформ — позволяют выполнить требования к эффективности хроматографической системы и симметрии пика, выставляемые фирмами-производителями.

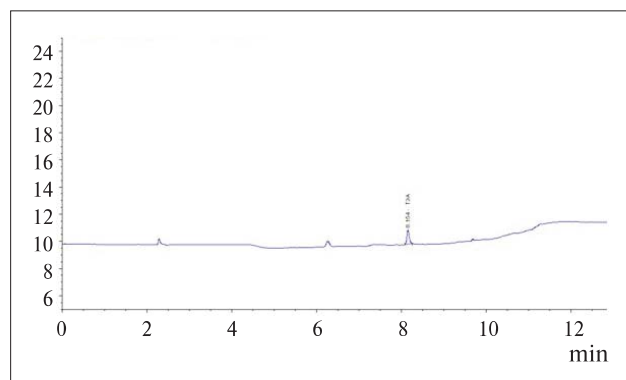


Рис. 1. Хроматограмма раствора триэтиламина в воде на колонке Rtx-5 Amine (30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм). Температурный режим: 60 °С в течение 7 мин, подъем до 220 °С со скоростью 40 °С/мин с задержкой 3 мин, скорость потока газа-носителя 25,0 см/сек, деление потока 5:1

Таблица 3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТРИЭТИЛАМИНА НА КОЛОНКЕ RTX-5 AMINE (30 м × 0,53 мм × 3,00 мкм)

Растворитель	t_R , мин	NN, ТТ	As	RSD(S), % $n = 5$	RSD(t_R), % $n = 5$
Хлороформ	8,12	107200	1,15	5,07	0,07
ДМФА	8,12	105400	1,11	2,97	0,04
Вода	8,15	103600	1,55	26,09	0,005

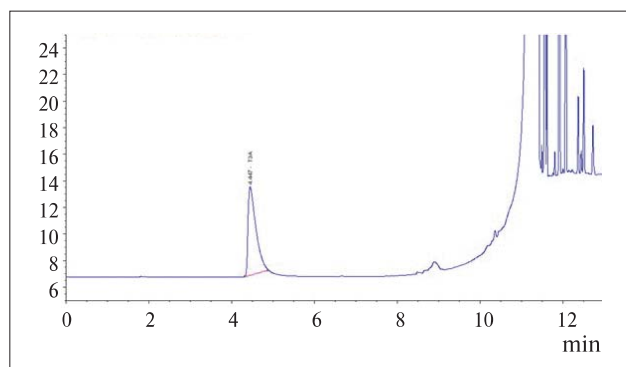


Рис. 2. Хроматограмма раствора триэтиламина в *N,N*-диметилформамиде на колонке *Stabilwax* (30 м × 0,32 мм × 1,0 мкм). Температурный режим: 50 °С в течение 7 мин, подъем до 200 °С со скоростью 40 °С/мин с задержкой 3 мин, скорость потока газа-носителя 29,4 см/сек, деление потока 5:1

В водных растворах идентифицировать пик ТЭА на хроматограммах удалось только для колонок DB-5 (30 м × 0,53 мм × 3,0 мкм), DB-1 и Rtx-5 Amine, то есть на неполярных НФ, где суммарное воздействие воды на аналит и сорбент менее выражено (рис. 1).

Хроматографические параметры пика ТЭА, полученные на колонке Rtx-5 Amine для работы с полярными соединениями, позволяют рекомендовать ее для определения ТЭА (табл. 3).

Для колонки *Stabilwax* с полярным полимерным модификатором полиэтиленгликолем фактор асимметрии пика ТЭА и RSD площади пика выше, чем у остальных колонок.

При использовании водного раствора ТЭА его пик не был идентифицирован. Это согласуется с предположением о взаимодействии воды с поверхностью сорбента, а также возможным ее влиянием на сам ТЭА. В случае хлороформного экстракта пик ТЭА очень несимметричный и не разрешается с пиком хлороформа до базовой линии. Это затрудняет интегрирование пика на хроматограмме и расчет его концентрации в растворе.

Только при использовании раствора ТЭА в ДМФА удалось идентифицировать пик данного аминосоединения с фактором асимметрии 2,76 и RSD площади пика 3,37 % (рис. 2).

ВЫВОДЫ

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать колонки типа DB-1, DB-5 и Rtx-5 Amine для контроля содержания ТЭА в средствах медицинского применения. С использованием данных колонок получено RSD площади пика ТЭА от 0,52 % ($n = 5$), фактор асимметрии пика — от 1,11. Для получения высоких хроматографических параметров предпочтительно использовать колонки с геометрией 30 м × 0,53 мм и высокой толщиной модифицирующей пленки (конкретная величина зависит от типа фазы и производителя).

При использовании водных растворов пик ТЭА наиболее размыт и RSD его площади достигает в отдельных случаях 45 % (для колонки DB-1). В случае колонки DB-WAX пик вообще не идентифицируется. Растворители хлороформ и ДМФА позволяют получить высокую воспроизводимость площадей и времен удерживания пика ТЭА, а также добиться достаточно низкого фактора асимметрии пика ТЭА (до 1,8).

Выбор того или иного растворителя следует делать, учитывая свойства и особенности конкретного лекарственного препарата (или фармацевтической субстанции).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Kataoka H. Gas chromatography with selective detectors for amines. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–31.
4. Duff KJ. Gas and liquid chromatography, column selection for, in drug analysis. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–51.
5. Tian J, Chen G, He Z. Overcoming matrix effects: GC method development for the determination of triethylamine and dimethyl sulfoxide in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2014; 52(1): 36–41.
6. Namiesnik J, Jastrzebska A, Zygmunt B. Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. J Chromatogr A 2003; 1016(1): 1–9.
7. de Zeeuw J. Peak tailing in GC trace analysis [Internet]. Available from: <https://goo.gl/yc7G7Z>.
8. How column inertness improves the chromatography of basic compounds [Internet]. Available from: <https://goo.gl/zVLU5N>.
9. Rtx-5 Amine columns [Internet]. Available from: <https://goo.gl/cxMM5r>.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Иоутси Анна Николаевна. Эксперт 2-й категории сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.
 Сумцов Михаил Александрович. Начальник сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.
 Сарницкая Анастасия Тарасовна. Ведущий эксперт сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Блинов Антон Николаевич. Эксперт 1-й категории сектора ГЖХ контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Иоутси Анна Николаевна; Youtsis@expmed.ru

RECOMMENDATIONS FOR SELECTION OF A LIQUID STATIONARY PHASE AND GEOMETRIC PARAMETERS OF THE COLUMN WHEN DETERMINING TRIETHYLAMINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

A. N. Ioutsy, M. A. Sumtsov, A. T. Sarnitskaya, A. N. Blinov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract: The article summarises the results of experimental studies that compared liquid stationary phases used in GC for determination of triethylamine residual solvent in medicinal products. It discusses the results of comparative evaluation of triethylamine peak area RSDs, retention times and tailing factors for different phases and solvents. The authors give recommendations concerning selection of chromatographic columns for triethylamine determination.

Key words: quality control; gas chromatography; stationary phase; triethylamine; tailing factor.

For citation: Ioutsy AN, Sumtsov MA, Sarnitskaya AT, Blinov AN. Recommendations for selection of a liquid stationary phase and geometric parameters of the column when determining triethylamine by gas chromatography. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; (3): 170–174.

REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. I. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
2. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
3. Kataoka H. Gas chromatography with selective detectors for amines. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–31.
4. Duff KJ. Gas and liquid chromatography, column selection for, in drug analysis. In: Encyclopedia of Analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2006. P. 1–51.
5. Tian J, Chen G, He Z. Overcoming matrix effects: GC method development for the determination of triethylamine and dimethyl sulfoxide in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2014; 52(1): 36–41.
6. Namiesnik J, Jastrzebska A, Zygmunt B. Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. J Chromatogr A 2003; 1016(1): 1–9.
7. de Zeeuw J. Peak tailing in GC trace analysis [Internet]. Available from: <https://goo.gl/yc7G7Z>.
8. How column inertness improves the chromatography of basic compounds [Internet]. Available from: <https://goo.gl/zVLU5N>.
9. Rtx-5 Amine columns [Internet]. Available from: <https://goo.gl/cxMM5r>.

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Ioutsy AN. 2nd professional category expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Chemical Sciences.

Sumtsov MA. Head of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Sarnitskaya AT. Leading expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Blinov AN. 1st professional category expert of the GC Sector of the Laboratory for Control and Coordination of Testing of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

CONTACT E-MAIL

Ioutsy Anna Nikolaevna; Youtsy@expmed.ru