

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2002

А. Н. Кузьменко¹, В. П. Панов², А. А. Иванов³, О. А. Шпигун³,
А. А. Евграфов¹, В. Ю. Решетняк¹, В. А. Попков¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТРАТ- И АЦЕТАТ-ИОНОВ В ГЕМОКОНСЕРВАНТАХ И ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ИОН-ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹ ММА им. И. М. Сеченова, Москва;

² Гематологический научный центр РАМН, Москва;

³ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Метод ионной хроматографии был открыт в 1975 году [1] и сразу показал себя экспрессным, чувствительным и селективным способом определения неорганических и органических кислот. Первоначально развитие этого метода было связано с применением различных анионообменников, однако затем разработка мелкозернистых, устойчивых к высокому давлению и изменению рН среды полимерных материалов сделала возможным использование метода в виде ион-эксклюзионной хроматографии (ИЭХ).

В настоящее время для ион-эксклюзионной хроматографического определения органических кислот стали использовать сульфированные стиролдивинилбензолные сополимеры. Анионы сильных кислот отталкиваются отрицательно заряженными сульфогруппами, закрепленными на поверхности матрицы, и выходят с “мертвым” объемом, в то время как молекулы слабо ионизированных кислот удерживаются на колонке. Кроме собственно ионной эксклюзии факторами, влияющими на удерживание, могут быть так называемый “ситовой эффект” и гидрофобные взаимодействия. Вклад каждого из них оценить довольно сложно, хотя такие попытки предпринимаются [2].

Выбор кислот в качестве элюентов вполне объясним стремлением максимально перевести слабые кислоты в молекулярную форму. Впервые преимущества кислых элюентов были показаны Туркельсоном и Ричардсом [3]. В ранних работах применяли воду в качестве элюента и фиксируемые хроматографические пики анализируемых кислот были сравнительно широкими и асимметричными, в частности из-за того, что любая кислота может существовать как в молекулярной форме, так и в виде ионов разного состава. В современных работах вода как элюент используется лишь для того, чтобы подчеркнуть неоспоримые преимущества других элюентов [4, 5]. Бензойная кислота в качестве подходящего элюента для хроматографа с кондуктометрическим детектором была выбрана нами, в частности, из-за ее низкой удельной электропроводности [6]. Серная кислота использована нами как элюент в системе с УФ-детектором, она упоминается в ряде работ по ионной эксклюзии [5, 7–9]. Это

прежде всего связано со стабильностью кислоты, ее доступностью и с отсутствием поглощения сульфат-ионов в УФ-диапазоне света.

Детекторами в методе ИЭХ по преимуществу являются кондуктометр или УФ-детектор, использованный в нашей работе. Кондуктометр фиксирует аналитический сигнал по изменению электропроводности проходящего элюента, тогда как при УФ-детектировании сравнивается оптическое поглощение определяемого и элюирующего ионов [10].

Фармацевтические препараты уже давно стали объектами исследования методом ион-эксклюзионной хроматографии. В некоторых странах ВЭЖХ широко используется для контроля качества гемоконсервантов и включена во многие фармакопейные методики [11], тогда как в России для этих целей по-прежнему используют титриметрию [12–14]. В нашей стране наметился резкий рост производства средств инфузионной терапии, однако методы контроля их качества не удовлетворяют современным требованиям [15]. Актуальна задача совершенствования методов контроля качества фармацевтических препаратов данной группы. Цель нашего исследования — изучить возможность использования ИЭХ в анализе качества гемоконсервантов и инфузионных растворов. Обсуждаются процедуры определения цитрат- и ацетат-ионов в препаратах сложных композиций, показана принципиальная возможность совместного определения цитрат-ионов и глюкозы в гемоконсервантах.

Экспериментальная часть

Изучалось хроматографическое поведение цитрат-ионов в поликомпонентных гемоконсервантах отечественного и зарубежного производства, содержащих цитрат-ионы, с целью показать принципиальную возможность совместного определения цитрат-ионов и глюкозы. Для ацетатсодержащих инфузионных растворов отечественного производства предметом изучения стало хроматографическое поведение ацетат-ионов.

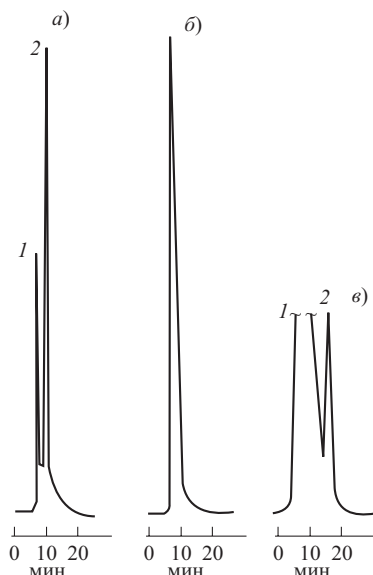


Рис. 1. Хроматограммы растворов: а) “Циглюфад”: 1 — фосфат-ион; 2 — цитрат-ион; б) “Глюгицир”; в) “Рингера — ацетат”: 1 — фосфат-ион; 2 — ацетат-ион.

Определение цитрат-ионов

Аналитические исследования выполняли на ионном хроматографе отечественного производства “Цвет 3006”. Для разделения кислот в ионной форме использовали колонку размером 8 × 300 мм, заполненную смолой Aminex Q 15S. Элюент — 5 мМ раствор бензойной кислоты с рН 4,12. Скорость подачи элюента (F) — 0,7 мл/мин. Объем вводимой пробы — 100 мкл. Детектор — стандартный кондуктометр. Для указанных целей возможно использование любого аналогичного класса отечественного или импортного прибора, в частности, хроматографической системы серии “Стайер” с кондуктометрическим детектированием производства ЗАО “НПКФ Аквилон”.

Объектами исследования служили следующие гемоконсерванты: “Циглюфад” (АКО “Синтез”, г. Курган), “Глюгицир” (АКО “Синтез”, г. Курган), ЦФГА-1 (“Трин Кросс, Медикал Корп.”, Корея), и ЦФГА-1 (“Бакстер”, Мексика). Ниже дан состав указанных препаратов. “Циглюфад”: глюкоза безводная 30 г; лимонная кислота 1,365 г; гидроцитрат натрия двузамещенный 14 г; натрий фосфорнокислый 12-водный 7,5 г; аденин 0,34 г; вода до 1 л.

“Глюгицир”: гидроцитрат натрия двузамещенный 20 г; глюкоза безводная 30 г; вода до 1 л.

ЦФГА-1: лимонная кислота безводная 3,27 г; цитрат натрия (водный) 26,3 г; бифосфат натрия (водный) 2,22 г; глюкоза 31,9 г; аденин 0,275 г; вода до 1 л.

Пробы готовили десятикратным разбавлением препарата в деионизованной воде, в этом случае определяемая концентрация цитрат-ионов находится в области линейности градуировочного графика. Стандартный раствор лимонной кислоты готовили путем растворения моногидрата лимонной кислоты (ч.д.а) в деионизованной воде.

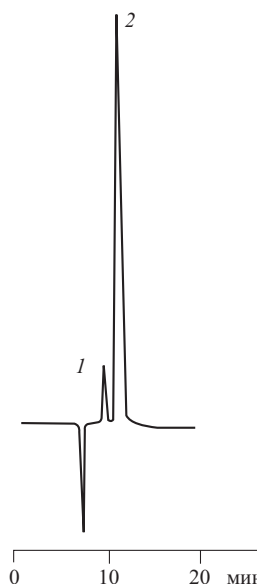


Рис. 2. Хроматограмма раствора “Циглюфад”. Разбавление 1:10. 1 — глюкоза; 2 — цитрат-ион.

Типичная хроматограмма, полученная при анализе образцов раствора “Циглюфад”, представлена на рис. 1, а. Первый пик на хроматограмме соответствует сигналу фосфат-ионов, его появление соответствует времени прохождения “мертвого” объема. Наличие фосфат-ионов в фосфат-содержащих гемоконсервантах не препятствует качественному и количественному определению цитрат-ионов. На хроматограмме раствора “Глюгицир” (рис. 1, б) этот пик отсутствует, поскольку препарат не содержит фосфат-ионов. Время удерживания цитрат-ионов — 9 мин.

Для оценки сходимости результатов анализа сопоставлены данные для препаратов “Глюгицир” и “Циглюфад”, где содержание цитрат-ионов в пересчете на безводную лимонную кислоту равно 14,6 и 11,59 г/л, соответственно.

Образец препарата “Глюгицир” серии 157 07 2000 последовательно хроматографировали 7 раз в идентичных условиях при степени разбавления 1:10.

Образец препарата “Циглюфад” серии 511 2000 исследован в тех же условиях. Результаты анализов представлены в табл. 1. Как следует из данных таблицы, величина относительного стандартного отклонения для проб второго препарата (0,013) выше, чем для проб первого (0,007), что можно объяснить фактором влияния фосфат-ионов в препарате “Циглюфад”.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа были изучены образцы пяти различных серий препарата “Глюгицир” (155072000 – 159 07 2000), при этом каждый из них был подвергнут двукратному хроматографированию в аналогичных условиях. Результаты измерений даны в табл. 2. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,013.

Определение ацетат-ионов

Условия хроматографирования растворов, содержащих ацетат-ионы, аналогичны определению цитрат-

Таблица 1
Сходимость результатов определения цитрат-ионов методом ИЭХ в образцах растворов “Глюгицир” и “Циглюфад” ($n = 7$).

Название раствора	Найденная концентрация гидроцитрата натрия, г/л	Метрологические характеристики
“Глюгицир”	20,1	$\bar{X} = 20,0$ $S^2 = 0,018$ $S = 0,135$ $S_r = 0,007$
	20,1	
	19,8	
	20,0	
	20,1	
	20,0	
	19,8	
“Циглюфад”	16,0	$\bar{X} = 16,2$ $S^2 = 0,043$ $S = 0,208$ $S_r = 0,013$
	16,0	
	16,1	
	16,4	
	16,5	
	16,2	
	16,0	

ионов. Объектами исследования служили инфузионные растворы “Рингера — ацетат” (ОАО “Медполимер”, г. Санкт-Петербург) и “Ацесоль” (ОАО “Биохимик”, г. Саранск). Ниже представлен состав данных препаратов.

“Рингера — ацетат”: хлорид натрия 5,91 г; хлорид калия 0,30 г; хлорид кальция безводный 0,22 г; хлорид магния безводный 0,095 г; ацетат натрия безводный 2,82 г; вода до 1 л.

“Ацесоль”: хлорид натрия 5,0 г; хлорид калия 1,0 г; ацетат натрия безводный 2,0 г; вода до 1 л.

Типичная хроматограмма, полученная при анализе раствора “Рингера — ацетат”, представлена на рис. 1, в. Время удерживания ацетат-ионов составляет 15,5 мин. Как и в случае цитратсодержащих растворов, первый широкий пик соответствует неорганическим анионам. Наличие хлорид ионов не мешает определению ацетат-ионов. При анализе данного раствора разбавление не потребовалось, т.к. определяемая концентрация ацетат-ионов находится в области линейности градуировочного графика.

Для оценки сходимости метода раствор “Рингера — ацетат” серии 05 12 2000 был подвергнут 7-кратному хроматографированию. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3
Сходимость результатов определения ацетат-ионов методом ИЭХ ($n = 7$) в образцах растворов “Рингера — ацетат”

Найденная концентрация ацетата натрия, г/л	Метрологические характеристики
2,95	$\bar{X} = 2,98$ $S^2 = 0,0016$ $S = 0,039$ $S_r = 0,013$
3,00	
3,05	
2,95	
3,00	
2,95	
2,95	

Таблица 2
Воспроизводимость результатов определения цитрат-ионов методом ИЭХ в образцах растворов “Глюгицир”

№ серии	Найденная концентрация гидроцитрата натрия, г/л	Метрологические характеристики
155 07 2000	20,1	$\bar{X} = 20,4$ $S^2 = 0,041$ $S = 0,202$ $S_r = 0,010$
	20,1	
156072000	20,2	
	20,2	
157 07 2000	20,5	
	20,5	
158072000	20,6	
	20,5	
159 07 2000	20,4	
	20,4	

Для оценки воспроизводимости образцы пяти различных серий препарата “Рингера — ацетат” (01 12 2000, 02 12 2000, 03 12 2000, 04 12 2000, 05 12 2000) дважды хроматографированы в тех же условиях. Результаты измерений представлены в табл. 4. Относительное стандартное отклонение не превышает 0,013.

Нами проведено сопоставление воспроизводимости результатов определения цитрат- и ацетат-ионов двумя методами: ИЭХ и титрометрии. В обоих случаях обработку результатов анализа проводили по единой методике при количестве проб, равном 5. В случае ИЭХ, как было показано, S_r не превышает 0,013, тогда как для титрометрии $S_r = 0,029$. Дополнительно мы сравнили результаты, полученные методом ИЭХ, с литературными данными для метода титрометрии, в которых количество проб колеблется от 20 до 25, а случайные результаты отбрасываются ($> 3\sigma$). Но и в этом случае метод ИЭХ показал лучшие результаты по воспроизводимости.

Совместное определение цитрат-ионов и глюкозы

Современные хроматографические методы позволяют совместно определять сахара и карбоновые кислоты. В этой связи исследованы сорбенты, которые позволяют разделять глюкозу и цитрат-ион с высокой селективностью. Наиболее оптимальным сорбентом является Aminex A-5.

Таблица 4
Воспроизводимость результатов определения ацетат-ионов методом ИЭХ в образцах растворов “Рингера — ацетат”

№ серии	Найденная концентрация ацетата натрия, г/л	Метрологические характеристики
01 12 2000	3,00	$\bar{X} = 3,06$ $S^2 = 0,0012$ $S = 0,035$ $S_r = 0,011$
	3,05	
02 12 2000	3,00	
	3,05	
03 12 2000	3,05	
	3,16	
04 12 2000	3,05	
	3,11	
05 12 2000	3,00	
	3,11	

Исследования проводили на ионном хроматографе Kontron (Италия) с УФ-детектором. Элюент: 20 мМ H₂SO₄. Скорость подачи элюента (F) — 0,8 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 190 нм, поскольку чувствительность определения цитрат-ионов практически не зависит от λ в диапазоне 190 – 210 нм, а чувствительность определения глюкозы при этой λ максимальна. Хроматограмма, полученная при анализе раствора “Циглюфад”, приведена на рис. 2. Время анализа не превышает 12 мин.

Аналитические характеристики методики определения цитрат-ионов и глюкозы при их совместном присутствии с использованием ИЭХ будут предметом следующей публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Small, T. S. Stevens, and W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**(11), 1801 – 1809 (1975).
2. K. L. Ng, B. K. Glod, G. W. Dicoski, P. R. Haddad, *J. Chromatogr.*, **A 920**, 41 – 49(2001).
3. V. T. Turkelson, M. Richards, *Anal. Chem.*, **50**(11), 1420 – 1423 (1978).
4. K. Ohta, *J. Chromatogr.*, **A920**, 181 – 191 (2001).
5. K. Ohta, K. Tanaka, P. R. Haddad, *J. Chromatogr.*, **A 782**(1), 33 – 40 (1997).
6. А. Л. Медведь, А. А. Иванов, О. А. Шпигун, *Журн. аналит. хим.*, **52**(1), 47 – 53 (1997).
7. R. Pecina, G. Bonn, E. Burtscher, O. Bobleter., *J. Chromatogr.*, **A 850**(1 + 2), 245 – 258 (1984).
8. K. Tanaka, H. Chikara, W. Hu, K. Hasebe, *J. Chromatogr.*, **A850**(1 + 2), 187 – 196 (1999).
9. L. Yang, L. Lin, B. A. Osken, M. A. Nussbaum., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**(3), 487 – 493 (2000).
10. О. А. Шпигун, Ю. А. Золотов, *Ионная хроматография*, изд. Моск. унив-та, Москва (1990), гл. 6.
11. Раствор антикоагулянта ЦФГА-1 ФС-42-4776-95, “Грин Кросс Медикал. Корп.” Корея.
12. Консервант крови “Глюгицир” ФС-42-2678-96.
13. Раствор для инфузий “Рингера — ацетат” ФС-42-0080033500.
14. Раствор для инъекций “Ацесоль” ВФС-42-3539-99.
15. В. П. Панов, *Тез. докл. V Межд. конгр. “Парентеральное и энтеральное питание”*, Москва (2001), с. 64.

Поступила 05.03.02