

С. В. Кривошеков^{1, 2}, М. С. Ларькина^{1*}, С. С. Власов^{1, 2}, Л. А. Дрыгунова^{1, 2},
А. М. Гурьев¹, М. В. Белоусов¹, М. С. Юсубов^{1, 2}

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В НОВОМ КОНТРАСТНОМ ПРЕПАРАТЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Россия, 634040, Томск, Московский тракт, д. 2;
e-mail: marialarkina@mail.ru

² ФГАОУ ВО НИ ТПУ, Россия, 634050, Томск, проспект Ленина, д. 30.

Предложена методика количественного определения гексафторида серы в новом контрастном препарате методом газовой хроматографии. Детектирование проводили с помощью детектора электронного захвата (ДЭЗ). Для экстракции гексафторида серы из образцов был подобран растворитель гептан. Методика валидирована по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, устойчивость, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Ключевые слова: гексафторид серы; количественное определение; газовая хроматография.

Ведущая роль в выявлении заболеваемости населения принадлежит методам лучевого исследования, среди которых ультразвуковое (УЗ) исследование занимает в России одну из приоритетных позиций, что обусловлено широкой экономической доступностью метода для всех слоев населения, отсутствием инвазивности и лучевой нагрузки на пациента [1]. Стремительное развитие УЗ диагностики связано с внедрением в практику контрастных препаратов, применение которых повышает диагностическую эффективность установления социально-значимых онкологических и кардиологических заболеваний, а также делает УЗ ангиографию конкурентоспособной КТ- и МРТ-ангиографии [2, 3].

В настоящее время в России отсутствует производство контрастных препаратов. На российском рынке в 2014 г. зарегистрирован препарат второго поколения “Соновью” (Sonovue), разработанный компанией Врассо (Швейцария). Данный препарат имеет достаточно высокую стоимость (более 7 тыс. руб./упаковка), в результате чего обладает низкой доступностью для населения.

В настоящее время в нашей стране проходит доклинические исследования новый контрастный препарат для усиления УЗ визуализации, который разработан в результате совместных научных исследований, выполняемых с 2003 г. коллективами кафедр лучевой диагностики и лучевой терапии СибГМУ (зав. каф., проф. В. Д. Завадовская) и химии СибГМУ (зав. каф., проф. М. С. Юсубов) по Федеральным и Федерально-региональным программам Минобразования РФ.

Данный лекарственный препарат представляет собой лиофилизат вспомогательных веществ (фосфолипидов и ПЭГ-4000) для приготовления суспензии для инъекций во флаконе, заполненном действующим веществом — газообразным гексафторидом серы (SF₆).

Одной из ключевых задач при создании нового лекарственного препарата является разработка и валидация методики количественного определения дейст-

вующего вещества — SF₆. Так как определение химическими способами количественного содержания SF₆ является затруднительным, то целесообразнее использовать физико-химические методы, в частности метод газовой хроматографии (ГХ).

Для того чтобы аналитическая методика заняла достойное место в системе обеспечения качества, соответствовала своему назначению, то есть гарантировала достоверные и точные результаты анализа, предусмотрена процедура валидации аналитических методик [4 – 6].

Экспериментальная часть

Хроматографическое определение проводили на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 Plus (Япония), оснащенный детектором электронного захвата (ЭЗД), автосамплером, системой деления потока, программным обеспечением (GC Solution v.2.30.00; Lab-Solution).

Для исследования использовали экспериментальные образцы разрабатываемого контрастного препарата, полученные в центре внедрения технологий СибГМУ. Данный контрастный препарат представляет собой лиофилизат вспомогательных веществ (фосфолипидов и ПЭГ-4000) для приготовления суспензии для инъекций во флаконе, заполненном газообразным SF₆.

Гексафторид серы — “Элегаз повышенной чистоты”, поставляемый компанией ООО “Галополимер Кирово-Чепецк” ТУ 6-02-1249–83 с изм. 1, 2, 3, 4, 5, 6 (табл. 1); вода очищенная; гептан х.ч.; четыреххлористый углерод (CCl₄) х.ч.

Методика количественного определения. Во флакон с экспериментальным образцом с помощью шприца вводится 5 мл воды. Далее содержимое флакона встряхивают в течение 60 с. Затем из флакона производят отбор аликвоты образовавшейся суспензии в объеме 2 мл. Аликвоту помещают в делительную воронку, добавляют 2 мл гептана и встряхивают в течение 40 с.

Таблица 1
Характеристика гексафторида серы повышенной чистоты
(ТУ 6-02-1249–83 с изм. 1, 2, 3, 4, 5, 6)

Параметр	Норма
Массовая доля SF ₆ , %, не менее	99,9
Массовая доля примесей (кислород, азот, воздух), %, не более	0,04
Тетрафторметан, %, не более	0,04
Массовая доля воды, %, не более	0,0015
Кислотность в пересчете на массовую долю HF, %, не более	0,00003
Массовая доля гидролизуемых фторидов в пересчете на массовую долю HF, %, не более	0,0001
Токсичность*	нетоксичен

* Испытания на токсичность проводятся на белых мышках.

По окончании экстракции отбирают часть гептанового слоя объемом 1,5 мл и добавляют 0,5 мл раствора внутреннего стандарта В₃, смесь перемешивают и хроматографируют. Концентрация внутреннего стандарта CCl₄ в исследуемых образцах составляет 0,00005 мкл/мл.

Условия проведения анализа:

1. колонка GsBP-1 (30 м × 0,32 мкм × 0,25 мм);
2. скорость потока 1,5 мл/мин;
3. температура 70 °С;
4. подвижная фаза — гелий;
5. деление потока 1:36.

После хроматографирования расчет концентрации SF₆ в исследуемой пробе ведется по градуировочному графику (рис. 1).

Концентрация SF₆ в контрастном препарате с учетом разведения и экстракции по методике определения рассчитывается по следующей формуле:

$$X = A \cdot 1,34,$$

где X — концентрация SF₆ в контрастном препарате, мкл/мл; A — концентрация SF₆ в исследуемой пробе, найденная по градуировочному графику, мкл/мл; 1,34 — коэффициент пересчета концентрации с учетом разведения и экстракции контрастного препарата, рассчитывается как отношение объема аликвоты лекарственного препарата (2 мл) к объему аликвоты гептана (1,5 мл), взятого на анализ.

Приготовление раствора внутреннего стандарта В₃ для анализа контрастного препарата. 25 мкл CCl₄ помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят гептаном до метки (раствор В₁). Далее аликвоту

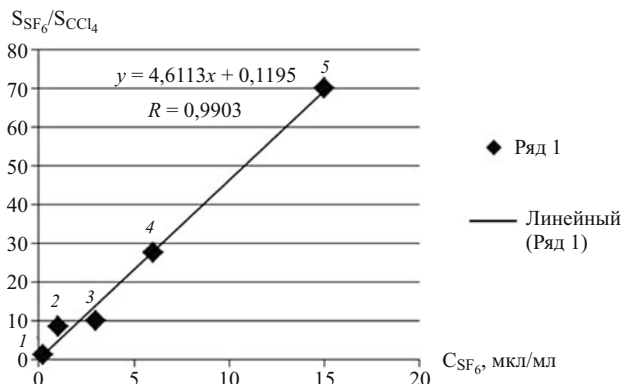


Рис. 1. График зависимости отношения площади пика гексафторида серы к площади пика тетрахлорметана от концентрации гексафторида серы в образце.

250 мкл раствора В₁ (1 мкл/мл CCl₄) помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят гептаном до метки (раствор В₂). Отбирают аликвоту 0,5 мл раствора В₂ (0,01 мкл/мл CCl₄), помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят гептаном до метки. В результате последнего разбавления получают раствор внутреннего стандарта В₃ с концентрацией CCl₄ 0,0002 мкл/мл.

Приготовление насыщенного раствора SF₆. Во флакон объемом 10 мл вносят 3 мл гептана, затем барботируют SF₆ в течение 2 мин. Полученный насыщенный раствор имеет концентрацию 1608 мкл/мл, которую определяют гравиметрически при 25 °С при 1 атм. [7].

Приготовление стандартных растворов SF₆ для построения градуировочного графика. Готовят 5 стандартных растворов (стандартные растворы 1, 2, 3, 4 и 5) с концентрациями SF₆ в диапазоне от 0,2 до 15,0 мкл/мл путем разбавления насыщенного раствора SF₆ с последующим добавлением в каждый раствор внутреннего стандарта (раствор В₃).

Приготовление растворов внутреннего стандарта для построения градуировочного графика. Разбавлением раствора В₂ готовят серию растворов (А₁, А₂, А₃) с концентрацией внутреннего стандарта 0,001, 0,0005 и 0,005 мкл/мл соответственно, которые при приготовлении калибровочных растворов добавляют в необходимом количестве для достижения концентрации CCl₄ в них 0,00005 мкл/мл.

Приготовление калибровочных растворов. Калибровочный раствор 1 (КР1). В мерную колбу на 100 мл помещают с помощью автоматического дозатора 12,4 мкл насыщенного раствора SF₆ в гептане, за-

Приготовление модельных растворов для определения правильности

Таблица 2

Номер модельного раствора	Объем, мкл			Суммарный объем, мкл	Условное содержание SF ₆ , %
	гептанового раствора препарата	раствора добавки SF ₆	раствора CCl ₄ (внутренний стандарт)		
1	1460/1460/1460	40/40/40	500	2000	80
2	1389/1389/1387,6	111/111/112,4			100
3	1278/1276,8/1277,6	222/223,2/222,4			120

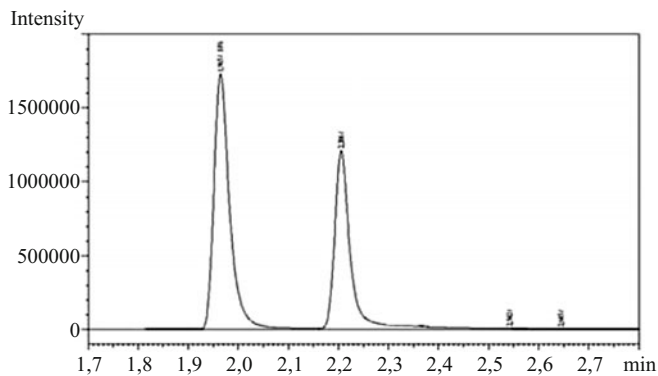


Рис. 2. ГЖ хроматограмма SF₆ (первый пик) с внутренним стандартом — CCl₄ (второй пик)

тем добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта А₃ и доводят гептаном до метки ($C_{SF_6} = 0,2$ мкл/мл).

Калибровочный раствор 2 (КР2). В мерную колбу на 25 мл помещают с помощью автоматического дозатора 16 мкл насыщенного раствора SF₆, затем добавляют 1,25 мл раствора внутреннего стандарта А₁ и доводят гептаном до метки ($C_{SF_6} = 1,0$ мкл/мл).

Калибровочный раствор 3 (КР3). В мерную колбу на 10 мл помещают с помощью автоматического дозатора 18,6 мкл насыщенного раствора SF₆, затем добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта А₂ и доводят гептаном до метки ($C_{SF_6} = 3,0$ мкл/мл).

Калибровочный раствор 4 (КР4). В мерную колбу на 10 мл помещают с помощью автоматического дозатора 37,2 мкл насыщенного раствора SF₆, затем добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта А₂ и доводят гептаном до метки ($C_{SF_6} = 6,0$ мкл/мл).

Калибровочный раствор 5 (КР5). В мерную колбу на 10 мл помещают с помощью автоматического дозатора 93 мкл насыщенного раствора SF₆, затем добавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта А₂ и доводят гептаном до метки ($C_{SF_6} = 15,0$ мкл/мл).

Калибровочные растворы 1, 2, 3, 4 и 5 хроматографируют каждый по 3 раза, затем подсчитывают сред-

нюю площадь пиков SF₆ и CCl₄. На основании полученных данных строят градуировочный график.

Результаты и их обсуждение

Специфичность. В результате исследования на хроматограмме наблюдалось 2 пика, соответствующие SF₆ и CCl₄ (рис. 2). Сопутствующие вещества, присутствующие в образцах, не мешают определению анализируемых веществ, так как детектор электронного захвата не чувствителен к ним. Вследствие этого обеспечивается специфичность данной методики.

Правильность. Для определения правильности использовали метод добавок. Для этого готовили 3 модельных раствора, используя раствор добавки SF₆ с концентрацией 5,0 мкл/мл (табл. 2).

Для оценки правильности полученные результаты подвергали статистической обработке (табл. 3, 4).

Как видно из данных, представленных в табл. 4, величина относительной ошибки не превышает 5 %. Из этого следует, что полученные с помощью данной методики результаты имеют несущественное отклонение. Следовательно, данная методика удовлетворяет такому параметру как правильность.

Линейность. Параметр линейность определяли путем измерения 5 стандартных растворов SF₆ с концентрациями 0,2; 1,0; 3,0; 6,0 и 15,0 мкл/мл. Концентрация внутреннего стандарта CCl₄ в каждом стандартном растворе составляла 0,00005 мкл/мл. Каждый стандартный раствор хроматографировали по 3 раза, затем подсчитывали среднюю площадь пиков SF₆ и CCl₄. На основании полученных данных построили градуировочный график (рис. 1).

В ходе определения линейности методики установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации SF₆ от 0,2 до 15,0 мкл/мл и описывается уравнением $y = 4,6113x + 0,1195$. Коэффициент корреляции равен 0,9903, что свидетельствует о линейной зависимости значений отношения пло-

Таблица 3

Результаты определения правильности методики

Условное содержание SF ₆ , %	Теоретическое содержание SF ₆ в препарате, мкл/мл	Найдено SF ₆ , мкл/мл	Ошибка		Процент нахождения SF ₆ , %
			абсолютная, мкл/мл	относительная, %	
80	2,220/2,217/2,223	2,229/2,210/2,208	- 0,009/0,007/0,015	0,41/0,32/0,67	100,41/99,68/99,33
100	2,775/2,771/2,779	2,760/2,763/2,788	0,015/0,008/- 0,009	0,54/0,29/0,32	99,46/99,71/100,32
120	3,330/3,326/3,335	3,341/3,332/3,315	- 0,011/- 0,006/0,020	0,33/0,18/0,60	100,33/100,18/99,40

Таблица 4

Оценка правильности методики определения содержания гексафторида серы в препарате

f	\bar{x}	G $G_{\text{таб.}(f=8, p=0,95)} = 2,126$	S	$S_{\bar{x}}$	p	$t_{(8, 0,95)}$	Δx	$\epsilon, \%$
8	99,87		1,31	0,41	0,15	0,95	2,31	0,34

Примечание: f — число степеней свободы; \bar{x} — значение среднего результата; G — критерий Граббса; S — стандартное отклонение; p — доверительная вероятность; $t_{(8;0,95)}$ — критерий Стьюдента (табличное значение); $\epsilon, \%$ — относительная ошибка; Δx — доверительный интервал среднего значения; $S_{\bar{x}}$ — стандартное отклонение среднего результата.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики определения содержания гексафторида серы в контрастном препарате

Аналитик	\bar{x}	G $G_{\text{таб.}(f=8; p=0,95)} = 2,126$	S	$S_{\bar{x}}$	$t_{(8, 0,95)}$	Δx	$\varepsilon, \%$	$S_{\bar{x}}, \%$
№ 1	2,41	1,90	0,07	0,025	2,26	0,056	2,32	2,9
№ 2	2,36	1,54	0,10	0,032	2,26	0,067	2,85	4,2
№ 1 (в другой день)	2,43	1,70	0,08	0,025	2,26	0,062	2,56	3,3

Примечание: \bar{x} — значение среднего результата; G — критерий Граббса; S — стандартное отклонение; p — доверительная вероятность; $t(p, f)$ — критерий Стьюдента (табличное значение); $S_{\bar{x}}, \%$ — коэффициент вариации; $\varepsilon, \%$ — относительная ошибка; Δx — доверительный интервал среднего значения; $S_{\bar{x}}$ — стандартное отклонение среднего результата.

щадей SF_6 к площадям CCl_4 от концентрации SF_6 в пробе.

Сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Сходимость определяли на основании статистической обработки результатов, полученных при анализе 10 образцов контрастного препарата одной серии. Внутрилабораторная прецизионность доказана в результате использования данных, сходимости вместе с набором данных, полученных при выполнении методики другим аналитиком и в другой день (табл. 5).

Из результатов, полученных при статистической обработке, видно, что относительная ошибка имеет значение менее 5 %, а коэффициент вариации — менее 7 %.

Устойчивость методики. Для установления устойчивости проводили по 3 определения экспериментальных образцов контрастного препарата одной серии при стандартных условиях (температура колонки 70 °С, скорость потока 1,5 мл/мин) и при изменении условий анализа (температура колонки 80 °С, скорость потока 1,5 мл/мин и при температуре колонки 60 °С, скорости потока 1,5 мл/мин). Влияние параметров оценивали с помощью следующих характеристик: время удерживания, коэффициент асимметрии, число теоретических тарелок, площадь пика и полученное значение содержания SF_6 в контрастном препарате. Изменение температуры незначительно влияло на параметры хроматографической системы, что указывает на надежность методики при ее использовании в указанных условиях.

Таким образом, газохроматографическая методика количественного определения SF_6 в новом контраст-

ном препарате прошла процедуру валидации по таким показателям как специфичность, линейность, правильность, устойчивость, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (Государственный контракт от “17” марта 2014 г. № 14.N 08.12.0027). Также авторы выражают благодарность инженеру-исследователю Центра управления научно-исследовательским оборудованием НИ ТПУ Золотухиной Н. Ю. за помощь в подготовке экспериментальных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Куликов, К. Вольф, *Ультразвуковая диагностика сосудистых заболеваний*, МЕДпресс-информ, Москва (2011).
2. C. Greis, *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, **45**, 301 – 308 (2005).
3. M. X. Lin, H. X. Xu, M. D. Lu, et al., *J. Eur. Radiol.*, **19**, 358 – 369 (2009).
4. ГОСТ РФ ИСО 5725 – 2002. *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений*, Госстандарт, Москва (2002).
5. Н. В. Юргель (ред.), *Руководство для предприятий фармацевтической промышленности*, Спорт и Культура, Москва (2007).
6. В. В. Береговых (ред.), *Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по изготовлению лекарственных средств*, Литтерра, Москва (2008).
7. А. А. Опаловский, Е. У. Лобков, *Успехи химии*, **XLIV**(2), 193 – 213 (1975).

Поступила 29.06.15

VALIDATION OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SULFUR HEXAFLUORIDE IN A NEW CONTRAST AGENT BY GAS CHROMATOGRAPHY

S. V. Krivoshchekov^{1,2}, M. S. Lar'kina^{1*}, S. S. Vlasov^{1,2}, L. A. Drygunova^{1,2}, A. M. Gur'ev¹, M. V. Belousov¹, and M. S. Yusubov^{1,2}

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

² Tomsk State Polytechnic University, Tomsk 634050, Russia

* e-mail: marialarkina@mail.ru

A new method for the quantitative determination of sulfur hexafluoride in a new contrast agent is described, which employs gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) and makes use of a selected solvent (heptane) for the extraction of sulfur hexafluoride from samples. The proposed method was validated in terms of selectivity, calibration curve linearity, accuracy, robustness, stability, and the inter- and intra-laboratory precision.

Keywords: sulfur hexafluoride; quantitative determination; gas chromatography.