

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПИРТА ЭТИЛОВОГО МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

АДАМЕНКО Г.В., БУРАК И.И., КОЛКОВ М.А.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Целью данного исследования была разработка чувствительной методики количественного определения спирта этилового в комбинированных антисептических спиртосодержащих средствах и спиртовых растворах.

В качестве антисептических средств спирт этиловый применяется в различных концентрациях, и небольшое различие в концентрации оказывает разное бактерицидное действие, поэтому актуальной является разработка чувствительной методики определения содержания спирта этилового в комбинированных антисептических спиртосодержащих средствах и спиртовых растворах.

Работа выполнена с использованием физико-химических и статистических методов.

Для исследования брали пробы спирта этилового трех концентраций (70%, 72% и 94%). Выполнено три серии опытов. В первой серии определяли содержание спирта этилового хроматографическим методом по разработанной нами методике, во второй и третьей сериях проводили количественное определение этих же проб гидрометрическим и пикнометрическим методами. После чего результаты сравнивались и обрабатывались статистически. Обработка производилась в программе Statistica 6.0.

Результаты количественного определения спирта этилового, полученные хроматографическим, пикнометрическим и гидрометрическим методами анализа, являются правильными и не отягощены систематической ошибкой.

По воспроизводимости хроматографический, пикнометрический и гидрометрический методы анализа статистически значимо не отличались друг от друга.

Разработанная методика анализа хроматографическим методом может быть предложена для определения содержания спирта этилового в комбинированных антисептических спиртосодержащих средствах и спиртовых растворах.

Ключевые слова: спирт этиловый, хроматографический метод, гидрометрический метод, пикнометрический метод.

Abstract.

The aim of this study was to develop sensitive technique for the quantitative determination of ethyl alcohol in combined antiseptic agents containing alcohol and alcohol solutions.

As an antiseptic ethyl alcohol is used in various concentrations and a minor difference in its concentrations has a different bactericidal effect, so the development of sensitive method for the determination of ethyl alcohol in combined antiseptic agents containing alcohol and alcohol solutions is urgent.

The research was done with the use of physical-chemical and statistical methods.

For the study ethyl alcohol samples of three concentrations (70%, 72% and 94%) were taken. Three series of experiments were performed. In the first series ethyl alcohol content was determined by chromatography in accordance with our method, in the second and the third series quantification of the same samples was carried out with the help of hydrometric and pycnometric methods. The results were then compared and processed statistically. Processing was carried out in the program Statistica 6.0.

The results of the quantitative determination of ethyl alcohol obtained by chromatographic, pycnometric and hydrometric analysis methods are correct and are not burdened with a systematic error.

By the reproducibility chromatographic, pycnometric and hydrometric methods of analysis statistically did not differ significantly from each other.

The developed technique of analysis by the chromatographic method can be proposed for the determination of ethyl alcohol content in combined antiseptic agents containing alcohol and alcohol solutions.

Key words: ethyl alcohol, chromatographic method, hydrometric method, pycnometric method.

Среди различных групп химических соединений, обладающих антисептическими свойствами, наибольший интерес представляют алифатические спирты, что связано с их низкой стоимостью, а также широким бактерицидным и бактериостатическим действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также на многие виды грибов и вирусов, включая РС-вирусы, вирус гепатита и ВИЧ [1].

Для обработки операционного и инъекционного поля широко применяется спирт этиловый. Спирт этиловый в концентрации 70% оказывает бактерицидное и бактериостатическое действие на грамотрицательные и грамположительные бактерии, некоторые виды грибов. Механизм действия состоит в необратимой коагуляции белков и в мембранотропном действии. Спирт этиловый в концентрации 70% рекомендуется к применению в медицине как наружное антисептическое средство [2].

Спирт этиловый синтетический ректифицированный применяется в качестве кожного антисептика. Спектр его антимикробного действия - бактерии, вирусы, ВИЧ-инфекции, гепатиты, кандиды [2-4].

Спирт является естественным антисептиком, имеет высокую скорость уничтожения бактерий и способен быстро испаряться. Кроме того, спирт обладает бактерицидным действием в отношении большинства грамположительных, грамотрицательных и туберкулезных бактерий, а также хорошо действует против некоторых видов грибков и многих вирусов, включая РС-вирусы, вирус гепатита [5].

Средство «АХД -2000 Специаль», содержащее 75% спирта этилового, обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных (включая микобактерии туберкулеза) и грамотрицательных бактерий, грибов рода *Candida* и *Trichophyton*, вирусов (включая вирусы гепатита В и ВИЧ) для целей дезинфекции, гигиенической обработки рук медицинского персонала, обработки рук хирургов, локтевых сгибов доноров.

95% спирт этиловый также является противомикробным средством, при местном применении оказывает антисептическое действие (денатурирует белки микроорганизмов), которое более выражено по сравнению с 70-80% спиртовыми растворами. Активен в от-

ношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и вирусов. При системном назначении обладает способностью вызывать анальгезию и общую анестезию. Является растворителем для некоторых лекарственных средств, а также экстрагентом для ряда веществ, содержащихся в лекарственном растительном сырье. Применяется для консервации биологического материала, в качестве местно-раздражающего средства.

Широкое применение получил спирт этиловый 72% в комбинации с бриллиантовым зеленым, йодом кристаллическим, хлоргексидином биглюконатом. Увеличение концентрации спирта этилового до 72% увеличивает бактерицидное действие в отношении типовых культур стафилококка, кишечной палочки, синегнойной палочки и кандид.

Изложенное выше позволяет заключить, что в качестве антисептических средств спирт этиловый применяется в различных концентрациях и небольшое различие в концентрации оказывает разное бактерицидное действие, поэтому актуальной является разработка чувствительной методики определения содержания спирта этилового в комбинированных спиртосодержащих средствах и спиртовых растворах.

Методы

Для исследования брали пробы спирта этилового трех концентраций (70%, 72% и 94%). Выполнено три серии опытов. В первой серии определяли содержание спирта этилового хроматографическим методом по разработанной нами методике, во второй и третьей сериях проводили валидацию данной методики гидрометрическим и пикнометрическим методами [6]. После чего результаты сравнивались и обрабатывались статистически. Обработка производилась в программе Statistica 6.0.

В работе использована насадочная металлическая колонка длиной 1 метр с внутренним диаметром 3 мм. Насадка – «Полисорб-1», фракция 0,1-0,2 мм. Условия газохроматографического определения. Хроматограф – «Кристалл-2000М» с пламенно-ионизационным детектором. Температура инжектора – 200°C, колонки – 150°C, детектора – 250°C. Газ-носитель – азот, расход – 35 мл/мин, расход воздуха – 300 мл/мин, расход водорода –

30 мл/мин. Разметку выполняли с использованием прикладного программного обеспечения «Хроматек Аналитик 1.21» и «Хроматек Аналитик 1.5». Времена удерживания составили: для этанола – 27-29 сек, для пропанола – 1 мин 8 сек – 1 мин 10 сек. При определении массовой доли спирта хроматографическим методом 0,440 г препарата взвешивали в мерной колбе вместимостью 50,0 мл и доводили объем раствором внутреннего стандарта до метки (испытуемый раствор). По 2,00 мкл испытуемого раствора и раствора РСО спирта этилового попеременно хроматографировали на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов. Эффективность колонки по этанолу и пропанолу рассчитывали по формуле:

$$n = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2$$

где: t_R – время удерживания вещества, $w_{0.5}$ – ширина пика вещества, измеренная на половине высоты, n – число теоретических тарелок. Эффективность колонки составила: по этанолу – 121 теоретических тарелок, по пропанолу – 156 теоретических тарелок. Критерий разделения рассчитывали по формуле:

$$R_s = \frac{2(t_{Ry} - t_{Rx})}{w_{Sy} + w_{Sx}}$$

где R_s – критерий разделения, t_{Ry} – время удерживания пропанола, сек, t_{Rx} – время удерживания этанола, сек, w_{Sy} и w_{Sx} – ширины пиков пропанола и этанола соответственно, сек.

Критерий разделения составил 2,15.

Содержание спирта этилового (X) в препарате в процентах по объему вычисляли по формуле:

$$X = \frac{B_1 \times m_0 \times \rho_1 \times W}{B_0 \times m_1 \times \rho_0}$$

где B_1 – среднее значение отношений площадей пиков спирта этилового к площадям пиков спирта пропилового (внутреннего стандарта) из хроматограмм испытуемого раствора;

B_0 – среднее значение отношений площадей пиков спирта этилового к площадям пиков спирта пропилового (внутреннего стандарта) из хроматограмм раствора РСО спирта этилового;

m_0 – масса навески РСО спирта этилового, г;

m_1 – масса навески препарата, взятого для анализа, г;

W – объемная доля спирта этилового, используемого для приготовления РСО спирта этилового, %;

ρ_0 – плотность спирта этилового, используемого для приготовления РСО, г/см³;

ρ_1 – плотность препарата, г/см³.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что типичная хроматограмма представляла следующий вид (рис. 1).

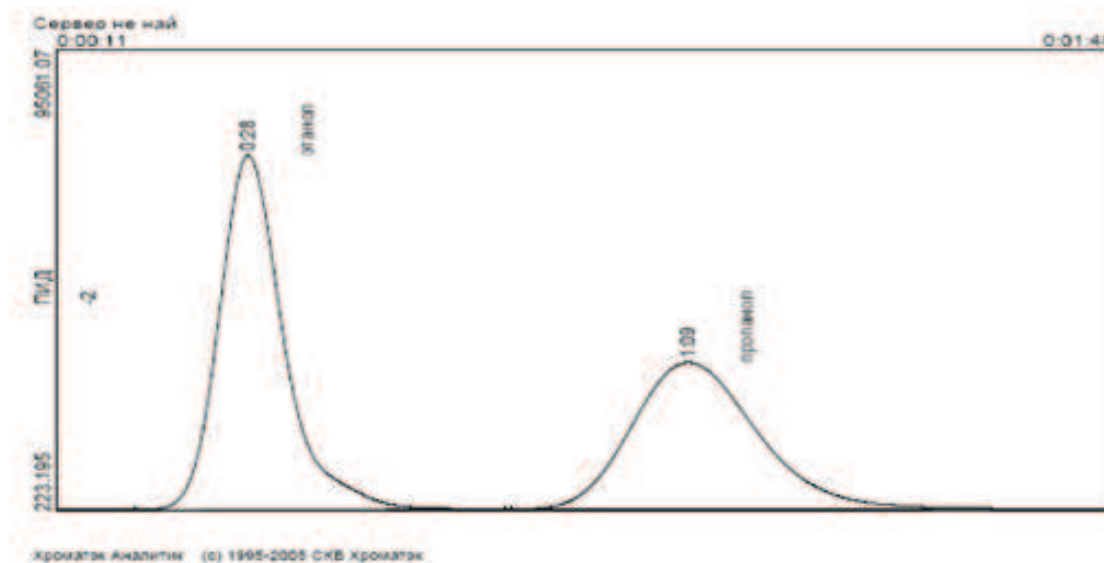


Рисунок 1 - Хроматограмма этанола и пропанола (внутренний стандарт).

Таблица 1 - Величины площадей пиков спирта этилового и пропанола и их отношение в пробе «Спирт этиловый 94%»

Испытуемый раствор			Стандартный раствор		
Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение	Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение
444	377	1,17	327	392	0,83
458	393	1,16	340	403	0,84
479	381	1,25	323	366	0,88
462	362	1,27	328	368	0,89
429	380	1,13	316	400	0,78
Среднее		1,20	Среднее		0,84
Параллельное определение					
547	418	1,30	354	413	0,85
552	394	1,39	374	415	0,90
552	424	1,30	349	411	0,85
562	423	1,32	345	403	0,85
539	419	1,28	365	428	0,85
Среднее		1,32	Среднее		0,86

Таблица 2 – Величины площадей пиков спирта этилового и пропанола и их отношение в пробе «Спирт этиловый 72%»

Испытуемый раствор			Стандартный раствор		
Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение	Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение
323	397	0,81	340	403	0,84
356	421	0,84	324	368	0,88
347	411	0,84	347	405	0,85
376	441	0,85	367	427	0,86
344	402	0,85	350	408	0,85
Среднее		0,84	Среднее		0,86
Параллельное определение					
343	423	0,81	354	418	0,84
342	418	0,81	368	432	0,85
349	427	0,81	357	418	0,85
301	367	0,82	346	398	0,86
335	409	0,81	340	399	0,85
Среднее		0,81	Среднее		0,85

Значение площадей пиков и их отношений для пробы «Спирт этиловый 94%» и стандартного раствора приведены в таблице 1.

Величины для расчета: $V_1 - 1,20$, $m_0 - 0,294$ г, $\rho_1 - 0,8154$, $W - 96,4\%$ (об/об), $V_0 - 0,84$, $m_1 - 0,439$ г, $\rho_0 - 0,8058$. Подставляя полученные значения в формулу получали величину содержания спирта в пробе, которая составила 92,4% (об/об).

Величины для расчета в параллельном определении: $V_1 - 1,32$, $m_0 - 0,300$ г, $\rho_0 - 0,8058$. Подставляя полученные значения в формулу получали величину содержания спирта в пробе, которая составила 93,7% (об/об). Среднее

значение двух параллельных определений составило 93,0% (об/об).

Значение площадей пиков и их отношений для пробы «Спирт этиловый 72%» и стандартного раствора приведены в таблице 2.

Величины для расчета: $V_1 - 0,84$, $m_0 - 0,300$ г, $\rho_1 - 0,8804$, $W - 96,4\%$ (об/об), $V_0 - 0,86$, $m_1 - 0,439$ г, $\rho_0 - 0,8058$. Подставляя полученные значения в формулу, получали величину содержания спирта в препарате, которая составила 71,8% (об/об).

Величины для расчета в параллельном определении: $V_1 - 0,82$, $m_0 - 0,300$ г, $\rho_1 - 0,8804$, $W - 96,4\%$ (об/об), $V_0 - 0,86$, $m_1 - 0,433$ г, $\rho_0 -$

0,8058. Подставляя полученные значения в формулу, получали величину содержания спирта в препарате, которая составила 69,8% (об/об). Среднее значение двух параллельных определений составило 71,0% (об/об).

Значение площадей пиков и их отношений для пробы «Спирт этиловый 70%» и стандартного раствора приведены в таблице 3.

Величины для расчета: $V_1 - 0,79$, $m_0 - 0,300$ г, $\rho_{01} - 0,8856$, $W - 96,4\%$ (об/об), $V_0 - 0,85$, $m_1 - 0,430$ г, $\rho_0 - 0,8058$. Подставляя полученные значения в формулу, получали величину содержания спирта в препарате, которая составила 68,2% (об/об).

Величины для расчета: $V_1 - 0,79$, $m_0 - 0,300$ г, $\rho_1 - 0,8856$, $W - 96,4\%$ (об/об), $V_0 - 0,85$, $m_1 - 0,433$ г, $\rho_0 - 0,8058$. Подставляя получен-

ные значения в формулу, получали величину содержания спирта в препарате, которая составила 68,5% (об/об). Среднее значение двух параллельных определений составило 68,3% (об/об).

Далее проводили определение спирта этилового в тех же пробах пикнометрическим и гидрометрическим методами. Результаты, полученные пикнометрическим и гидрометрическим методами, приведены в таблицах 4 и 5. Средние результаты, полученные тремя методами анализов, приведены в таблице 6.

После чего результаты сравнивали и обрабатывали статистически, используя параметрический критерий ANOVA. Установлено, что указанные методы статистически значительно не отличались ($p < 0,05$).

Таблица 3 - Величины площадей пиков спирта этилового и пропанола и их отношение в пробе «Спирт этиловый 70%»

Испытуемый раствор			Стандартный раствор		
Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение	Площадь пика этанола	Площадь пика пропанола	Отношение
322	410	0,78	352	415	0,84
336	426	0,78	349	407	0,85
334	427	0,78	349	408	0,85
340	432	0,78	355	415	0,85
331	423	0,78	350	411	0,85
Среднее		0,78	Среднее		0,85
Параллельное определение					
331	418	0,79	356	419	0,84
325	408	0,79	350	411	0,85
335	423	0,79	344	404	0,85
469	594	0,78	348	409	0,85
312	392	0,79	358	420	0,85
Среднее		0,79	Среднее		0,85

Таблица 4 - Результаты количественного определения содержания спирта этилового в об/об пикнометрическим методом

№ пробы	Проба спирт этиловый 94%	Проба спирт этиловый 72%	Проба спирт этиловый 70%
1	93,1	70,8	68,8
2	93,4	71,2	68,5
3	92,8	71,3	68,6
Среднее	93,1	71,1	68,6

Таблица 5 - Результаты количественного определения содержания спирта этилового в об/об гидрометрическим методом

№ пробы	Проба спирт этиловый 94%	Проба спирт этиловый 72%	Проба спирт этиловый 70%
1	93,2	71,4	68,7
2	92,7	71,1	68,9
3	93,4	70,7	68,6
Среднее	93,1	71,1	68,7

Таблица 6 – Среднее значение количественного определения спирта этилового в об/об тремя методами определения

Проба	Гидрометрический метод	Пикнометрический метод	Хроматографический метод
Спирт этиловый 94%	93,1	93,1	93,0
Спирт этиловый 72%	71,1	71,1	71,0
Спирт этиловый 70%	68,7	68,6	68,3

Заключение

Результаты количественного определения спирта этилового, полученные хроматографическим, пикнометрическим и гидрометрическим методами анализа являются правильными и не отягощены систематической ошибкой. По воспроизводимости хроматографический, пикнометрический и гидрометрический методы анализа статистически значимо не отличались друг от друга. Разработанная методика анализа хроматографическим методом может быть предложена для определения содержания спирта этилового в комбинированных антисептических спиртосодержащих средствах и спиртовых растворах.

Литература

1. Красильников, А. П. Справочник по антисептике / А. П. Красильников. – Минск : Выш. шк., 1995. – 367 с.
2. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М. : Новая Волна, 2011. – 1216 с.
3. Сушков, С. А. Курс лекций по общей хирургии для студентов 3 курса лечебно-профилактического факультета. Ч. 1 / С. А. Сушков, В. В. Становенко, Л. А. Фролов. – 2-е изд. – Витебск, ВГМУ, 2002. – 268 с.
4. Тимофеев, Н. С. Асептика и антисептика / Н. С. Тимофеев, Н. Н. Тимофеев. – 2-е изд. перераб. и доп. – Ленинград : Медицина, 1989. – 240 с.
5. Рекомендации по мытью и антисептике рук. Перчатки в системе инфекционного контроля / под ред. акад. РАЕН Л. П. Зуевой. – СПб. : Санкт-Петербургский учебно-методический центр инфекционного контроля, 2000. – 20 с.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 3 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / под общ. ред. Г. В. Годовальникова. – Минск : МГПТК полиграфии, 2010. – 656 с.

Поступила 22.09.2014 г.

Принята в печать 07.10.2014 г.

Сведения об авторах:

Адаменко Г.В. – аспирант кафедры общей гигиены и экологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Бурак И.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей гигиены и экологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Колков М.А. – к.ф.н., доцент кафедры аптечной технологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра общей гигиены и экологии. Тел.: +375 (212) 37-08-28 – Бурак Иван Иванович.