

Chromatographic analysis of new nonionic surfactants of oxyethylation products in the presence of calcium catalyst of rapeseed oil fatty acid methyl esters (RME)

MICHAŁ JAKUB NACHAJSKI¹,
MICHAŁ KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK,¹
MAREK LUKOSEK²,
MARIAN MIKOŁAJ ZGODA¹

¹ Drug form department,
Medical University of Łódź

² Surfactant department Institute
of Heavy Organic Synthesis "Blachownia"
Kędzierzyn-Koźle.

Summary

Various methods of chromatographic analysis (GPC, HPLC, TLC) were used to estimate qualitatively and quantitatively the product of oxyethylation of rapeseed oil acid methyl esters (RME). The investigation enabled to evaluate PEG content in the product. The method of eliminating insignificant quantity of PEG found in oxyethylation products of $n_{TE} \leq 20$ was presented. The data of thin-layer chromatography obtained in the course of research constitute a point of departure for calculating n_{TE} content and HLB level.

Key words: HLB, RME, PEG, product of oxyethylation, chromatographic analysis

INTRODUCTION

Formulation of a new class of surfactants, the products of oxyethylation of hypoallergic lanolin,

Analiza chromatograficzna nowych niejonowych surfaktantów produktów oksyetylenowania, w obecności katalizatora wapniowego estrów metylowych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (EMKOR)

MICHAŁ JAKUB NACHAJSKI¹,
MICHAŁ KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK,¹
MAREK LUKOSEK²,
MARIAN MIKOŁAJ ZGODA¹

¹ Zakład Technologii Postaci Leku
Katedra Farmacji Stosowanej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej
„Blachownia”, Zakład Środków
Powierzchniowo-Czynnych
w Kędzierzynie Koźlu

Streszczenie

Wykorzystano różne metody analizy chromatograficznej (GPC, HPLC, TLC) do oszacowania w aspekcie jakościowym i ilościowym charakteru produktu oksyetylenowania estrów metylowych kwasów oleju rzepakowego EMKOR. Przeprowadzone badania dały możliwość oszacowania zawartości PEG w powstałym produkcie. Przedstawiona została metoda wyeliminowania niewielkiej ilości PEG znajdującej się w produktach oksyetylenowania o $n_{TE} \leq 20$. Uzyskane dane chromatografii cienkowarstwowej, stanowią możliwy punkt wyjścia do oszacowania zawartości n_{TE} i strukturalnego poziomu HLB.

Słowa kluczowe: GPC, HPLC, PEG, analiza chromatograficzna, produkt oksyetylenowania

cholesterol, cholic and ursodeoxycholic acid by application of alkaline catalyst (Na/NaOH) and alternatively calcium catalyst (K-4/XII-0) enabled to estimate the surface activity and first of all to determine their solubility in relation to the selected lipophilic therapeutic agents (acc. to BCS classification group II and III) [1–3].

Irrespective of the catalyst applied, in the process of oxyethylation of rapeseed oil fatty acid methyl esters not only expected oxiranes are obtained, in the structure of which the presence of ethylene oxide hydrophylizes them significantly, but also polyethylene glycols (PEG), which owing to their low toxicity and slight surface activity γ^{25} , do not affect significantly the direction of application of the formulated product [4].

The use of pharmacopeal chromatographic techniques (HPLC, GPC) for the determination of the dispersion of average molecular weight of individuals ($M_{cz, w, \eta}$) and for the estimation of PEG content in oxyethylation products was the basic aim of the investigations [5, 6]. The above part of investigations was completed with the evaluation of homogeneity and identity of oxyethylation products of rapeseed oil fatty acid methyl esters of declared molecule content $n_{TE} \geq 10$ by thin-layer chromatography on Kieselgel 60F₂₅₄ vehicle.

The results of the research are the basis for a complex application characteristics (in accordance with OECD standards) of a new class of nonionic surfactants and also for explaining in quantitative way a micellar process of solubilization of lipophilic therapeutic agents and excipients of $HLB_G \geq 1.0$ taking particularly into consideration rapeseed oil acid methyl esters fractions of higher content of ethylene oxide of $n_{TE} \geq 20$ [7].

The results of the research will be used for designing a model form of preparation with lipophilic therapeutic agents in the prescription of which Rofams will supplement physiological (individual) value of bile A lithogenolitic index (Lindblat coefficient) [8, 9].

EXPERIMENTAL

MATERIAL AND METHODS

1. Gel chromatograph Ultima, Dionex.
2. Evaporate Light Scattering Detector (ELSD), Alltech.
3. ODS column, Astec (250 × 2.1 mm, 250 × 4.6 mm), eluent – 65% aqueous solution of acetonitrile.

WPROWADZENIE

Wytworzenie przez zastosowanie katalizatora alkalicznego (Na/NaOH) i alternatywnie wapniowego (K-4/XII-O) nowej klasy surfaktantów produktów oksyetylowania hipoalergicznego lanoliny, cholesterolu, kwasu cholowego i kwasu ursodeoksycholowego, umożliwiło przez kompleksowo przeprowadzone badania preformulacyjne oszacowanie aktywności powierzchniowej, a przede wszystkim określenie ich zdolności solubilizacyjnych, w stosunku do wybranych lipofilowych środków leczniczych (wg klasyfikacji BCS II i III grupa) [1–3].

W procesie oksyetylowania estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (EMKOR) niezależnie od zastosowanego katalizatora, powstają nie tylko oczekiwane oksirany, w strukturze których obecność tlenku etylenu w znaczący sposób je upolarnia (hydrofilizuje) lecz także polietylenoglikole (PEG), które z racji swojej niskiej toksyczności i nieznacznej aktywności powierzchniowej γ^{25} nie wpływają w istotny sposób na kierunek aplikacji wytworzonego produktu [4].

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było wykorzystanie farmakopealnych technik chromatograficznych (HPLC, GPC), do oznaczenia w produktach oksyetylowania dyspersji średnich mas cząsteczkowych indywiduów ($M_{cz, w, \eta}$), a także do oszacowania zawartości PEG [5, 6]. Powyższy segment badań uzupełniono oceną metodą chromatografii cienokowarstwowej na podłożu Kieselgelu 60F₂₅₄ jednorodności i tożsamości produktów oksyetylowania EMKOR, o deklarowanej w cząsteczce zawartości $n_{TE} \geq 10$.

Rezultaty przeprowadzonych badań stanowią podstawę do kompleksowej, aplikacyjnej charakterystyki – zgodnie z normami OECD – nowej klasy niejonowych surfaktantów, a także wyjaśnienia na sposób ilościowy micelnarnego procesu solubilizacji lipofilowych środków leczniczych i substancji pomocniczych o $HLB_G \geq 1,0$, ze szczególnym uwzględnieniem frakcji EMKOR o wyższych zawartościach tlenku etylenu $n_{TE} \geq 20$ [7].

Opracowane rezultaty badań będą stanowiły podstawę do zaprojektowania modelowej postaci preparatu z lipofilowymi środkami leczniczymi, w recepturze którego Rofamy będą uzupełniać fizjologiczną (osobniczą) wartość indeksu litogenolitycznego żółci A (współczynnik Lindblata) [8, 9].

4. Tranferette micropipette 100–1000 μl , BRAND.
5. Sample injector of loop capacity 100 μl .
6. Chromelon ver. 6.80 software.

Research methods

Gel chromatography (GPC) was applied in reversed phase at the critical point of adsorption and in normal phase for the analysis of molecular weights distribution. Polystyrene columns were used and tetrahydrofuran served as a solvent. Qualitative analysis was performed in the same chromatographic conditions comparing retention time of PEG 1000 standard and the obtained oxyethylation products of rapeseed oil methyl esters (Rofams of $n_{\text{TE}} \geq 10$).

Quantitative analysis was carried out by external calibration method selecting sample concentrations which were in the middle part of the calibration curve. The effectiveness of the column separation was determined for the standard: PS 9200 and PS 98300 and it was 4.32. The correction of the analyte retention time was obtained by changing the final time of the analysis so that the retention time of the system peak approached a constant value: 22.350 ± 0.0001 min.

Polyester standards of narrow molecular weight distribution were used to calibrate the system (Polymer Laboratories); standard PS 98300 (Aldrich) and PS 500 (Fluka). The concentrations of calibration solution were prepared in the range of 10–16 mg of the standard in 10 cm^3 of the eluent.

The calculations related to the determination of calibration curve were made using GRAMS-386 software. Chromatographic analysis mTLC of Rofams was performed on DC-Kieselgel 60F₂₅₄ vehicle (Merck) in the conditions described in [10].

PREPARATIVE PART

Oxyethylates of rapeseed oil fatty acids methyl esters

Within research associated with the search for new biodegradable surfactants (excipients for technology of drug and cosmetics forms) a synthesis was performed of oxyethylates of declared ethylene oxide content of $n_{\text{TE}} \geq 10$ (Rofams of $n_{\text{TE}} \geq 10$) by oxyethylation of rapeseed oil acid methyl esters. Table 1 presents the parameters of oxirane synthesis and preliminary results of the analysis of products.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

MATERIAŁ I METODY

1. Chromatograf żelowy Ultimata firmy Dionex.
2. Detektor ELSD (Evaporate Light Scattering Detector) firmy Alltech.
3. Kolumna ODS firmy Astec ($250 \times 2,1$ mm, $250 \times 4,6$ mm) eluent 65% wodny roztwór acetonitrylu.
4. Mikropipeta Tranferette 100–1000 μl firmy BRAND.
5. Dozownik o pojemności pętli 100 μl .
6. Oprogramowanie Chromelon ver 6.80.

Metodyka prowadzenia badań

Do analizy rozkładu mas cząsteczkowych stosowano chromatografię żelową (GPC) w układzie faz odwróconych w krytycznym punkcie adsorpcji, oraz w układzie faz normalnych. Stosowano kolumny polistyrenowe oraz tetrahydrofuran jako rozpuszczalnik. Analizę jakościową wykonano w tych samych warunkach chromatograficznych, przez porównanie czasu retencji wzorca PEG 1000 i otrzymanych produktów oksyetylowania EMKOR (Rofamy o $n_{\text{TE}} \geq 10$).

Analizę ilościową wykonano metodą kalibracji zewnętrznej tak dobierając stężenia prób, aby mieściły się w środkowej części krzywej kalibracji. Skuteczność rozdzielu kolumny wyznaczono dla wzorca: PS 9200 oraz PS 98300 wynosi 4,32. Korekcję czasu retencji analitu uzyskano zmieniając końcowy czas analizy tak, aby czas retencji pików systemowego był stały: $22,350 \pm 0,001$ min.

Do kalibracji układu stosowano poliestrowe wzorce mas cząsteczkowych o wąskiej dystrybucji (Polymer Laboratories); wzorzec PS 98300 (Aldrich) i PS 500 (Fluka). Stężenia roztworów kalibracyjnych przygotowano w zakresie 10–16 mg wzorca w 10 cm^3 eluentu.

Obliczenia związane z wyznaczeniem krzywej kalibracji wykonano wykorzystując program GRAMS-386. Analizę chromatograficzną mTLC Rofamów przeprowadzono na podłożu DC-Kieselgelu 60F₂₅₄ (Merck) w warunkach omówionych w publikacji [10].

CZĘŚĆ PREPARATYWNA

Oksyetylaty estrów metylowych kw. tłuszczowych z oleju rzepakowego

W ramach prac badawczych związanych z poszukiwaniem nowych biodegradowalnych surfaktan-

Rofams of $n_{TE} \geq 10 \div 60$ obtained in the process of synthesis of oxyethylation products are derivatives of significant molecular weight which makes it difficult to analyse them with the use of gas chromatography (GC) techniques. Lack of appropriate reference (standard) substances is a marked difficulty in qualitative analysis. To overcome these difficulties and to obtain reliable information about chemical structure, one of the varieties of mass spectrometry, namely "Maldi TOF", was applied [11].

On the basis of detailed interpretation of spectra it was found out that they include series of bands of pseudomolecular ions proving the presence of the following chemical compounds in the analysed oxyethylates:

$R-COO(CH_2CH_2O)_n-CH_3$ – oxyethylated methyl esters of rapeseed oil fatty acids (rofams);

$R-COO(CH_2CH_2O)_m-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R_1$ – diesters of fatty acids and polyethylene glycols (PEG);

$H-(OCH_2CH_2)_x-O-CH_3$ – oxyethylated methanol;

$R-CO-(OCH_2CH_2)_z-OH$ – oxyethylated fatty acids;

$H-(OCH_2CH_2)_y-OH$ – polyethylene glycols (PEG).

The obtained results were the base for performing quantitative analysis of synthesized oxyethylated. Liquid chromatography analysis techniques were used.

tów (substancje pomocnicze dla technologii postaci leków i kosmetyków), wykonano poprzez oksyetylowanie EMKOR (estry metylowe kwasów oleju rzepakowego) syntezę oksyetylatów o zadeklarowanej zawartości tlenu etylenu $n_{TE} \geq 10$ (Rofamy o $n_{TE} \geq 10$). Parametry syntezy oksysiranów i wstępne wyniki analizy produktów zestawiono w tabeli 1.

Otrzymane w procesie syntezy produkty oksyetylowania – Rofamy o $n_{TE} \geq 10 \div 60$, są pochodnymi o znacznej masie cząsteczkowej, co w istotny sposób utrudnia przeprowadzenie ich analizy za pomocą technik chromatografii gazowej (GC). Znaczącym utrudnieniem w analizie jakościowej jest brak odpowiednich substancji referencyjnych (wzorcowych). Aby pokonać te trudności i uzyskać wiarygodne informacje o budowie chemicznej, zdecydowano się zastosować jedną z odmian spektrometrii masowej o nazwie „Maldi TOF” [11].

Na podstawie szczegółowej interpretacji widm stwierdzono, że występują w nich serie pasm jonów pseudomolekularnych, świadczących o obecności w analizowanych oksyetylatach następujących związków chemicznych:

$R-COO(CH_2CH_2O)_n-CH_3$ – oksyetylowane estry metylowe kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (rofamy);

$R-COO(CH_2CH_2O)_m-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R_1$ – diestry kwasów tłuszczowych i polietylenoglikoli (PEG);

TABLE 1. Oxyethylates of rapeseed oil fatty acid methyl esters (RME); Catalyst K-4/XII-O

TABELA 1. Oksyetylaty estrów metylowych kwasów tłuszczowych z oleju rzepakowego (EMKOR); Katalizator K-4/XII-O

Sample No Nr pr.	Synthesis temp. °C Temp. syntezy °C	Av. lev. of oxyethylation Nśr (Śr. st. oksyetylacji)	Synthesis time (dosage)/min. Czas syntezy (dozowanie) min.	Vav/mol/ molxh	Tzm (BDG)/°C
58/09	170	10	383	1.56	56.0
65/09	185	10	291	2.06	55.5
62/09	185	20	386	3.10	65.0
371/03	185	20	287	4.18	78.5
376/03	185	30	354	8.15	82.5
19/04	185	40	336	7.00	86.0
22/04	185	50	451	6.64	88.0
31/04	185	60	550	6.54	90.0

Purification of the technical product of RME catalytic oxyethylation and mTLC testing of their homogeneity

There were weighed 2.0–2.05 g of technical Rofam of the determined average content of $n_{TE} \geq 10 \div 60$ and dissolved in 50 cm³ mobile phase A (isopropanol 4 parts by volume, n butanol 2 parts by volume, isobutanol-2-ol 2 parts by volume, methyl ethyl ketone 2 parts by volume, without 25% ammonia).

Active carbon (5.0 g) was added into light yellow solution and heated under reflux condenser for 15 min. Hot solution of 45–50°C was infiltrated separating adsorbent. The solvent (medium) was distilled off the obtained solution at 26–32 mm Hg. The purified product was subjected to chromatographic analysis on DC-Kieselgel 60F₂₅₄ Merc vehicle preparing basic solutions of polymer concentration of 0.09–0.1 g in 50 cm³ mobile phase.

Using a micropipette 0.05–0.1 cm³ of the basic solution was placed on a chromatoplate. The plates were developed at 25°C ± 0.1, then dried and detected in a chamber with J₂ (sublimating iodine). The retention factor R_f (R_f = b/a) was the base for calculating R_M value (its logarithmic function) from the following equation:

$$R_M = \log \frac{1 - R_f}{R_f} = \log \left[\frac{1}{R_f} - 1 \right]$$

RESULTS AND DISCUSION

Chromatographic quantitative analysis m.HPLC and m.GPC of RME oxyethylation products of average content of $n_{TE} \geq 10$

The determination of the content of polyethylene glycols (PEG) was carried out by HPLC method in the system of normal phases using aerosol detector (ELSD). The obtained results are presented in Table 2. The results indicate that together with the increase of the level of oxyethylation of rapeseed oil fatty acid methyl esters, besides Rofams and other products, the content of polyethylene glycols (PEG) increases; at the average level of oxyethylation of $n_{TE} \approx 60$ the share of PEG slightly exceeds 30%.

Gel (GPC) and liquid chromatography in the system of reversed phases in critical adsorption point and chromatography in normal phases were applied to determine the share of the fraction in the oxyethylation product of RME. Polystyrene columns were

H—(OCH₂CH₂)_x—O—CH₃ – oksyetylenowany metanol;

R—CO—(OCH₂CH₂)_z—OH – oksyetylenowane kwasy tłuszczowe;

H—(OCH₂CH₂)_y—OH – polietylenoglikole (PEG).

Uzyskane rezultaty stanowiły podstawę do wykonania analizy ilościowej zsyntetyzowanych oksyetylatów, za pomocą technik analizy chromatografii cieczowej.

Oczyszczanie technicznego produktu katalitycznego oksyetylenowania EMKOR i badanie mTLC ich jednorodności

Odważono 2,0–2,05 g technicznego Rofamu o oznaczonej średniej zawartości $n_{TE} \geq 10 \div 60$ i rozpuszczono w 50 cm³ fazy ruchomej A (izopropanol 4 cz. obj., n butanol 2 cz. obj. izobutanol II rzędowy 2 cz. obj., metylo-etyloketon-2 cz. obj. bez 25% amoniaku).

Do jasnożółtego roztworu dodano 5,0 g węgla aktywnego i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 15 min. Gorący roztwór o temp 45°–50° C przesączono oddzielając adsorbent. Z otrzymanego roztworu przy 26–32 mmHg oddestylowano rozpuszczalnik (medium). Oczyszczony produkt poddano analizie chromatograficznej na podłożu DC-Kieselgel 60F₂₅₄Merc, przygotowując roztwory podstawowe o stężeniu 0,09–0,1 g polimeru w 50 cm³ fazy ruchomej.

Na płytkę chromatograficzną nakładano mikropipetą 0,05–0,1 cm³ roztworu podstawowego. Płytki rozwijano w temp. 25°C ± 0,1, a po ich wysuszeniu wywoływano w komorze z J₂ (sublimujący jod). Współczynnik opóźnienia R_f (R_f = b/a) stanowił podstawę do wyliczenia z zależności:

$$R_M = \log \frac{1 - R_f}{R_f} = \log \left[\frac{1}{R_f} - 1 \right]$$

Wielkości R_M tj. jego logarytmicznej funkcji.

WYNIKI

Chromatograficzna analiza ilościowa m. HPLC i m. GPC produktów oksyetylenowania EMKOR o średniej zawartości $n_{TE} \geq 10$

Oznaczenie zawartości polietylenoglikoli (PEG) przeprowadzono metodą chromatografii HPLC,

TABLE 2. Average molecular weights (M_n , M_w) and their distribution and PEG content determined by HPLC methodTABELA 2. Oznaczone metodą HPLC średnie masy cząsteczkowe (M_n , M_w) i ich rozkład oraz zawartość PEG

Sample Nazwa próbki	$M_n^{1)}$	M_n	$M_w^{2)}$	D (M_w/M_n)	PEG content % Zawartość PEG %
Rofam R-10 58/09/BD	736.5	1307	1626	1.24	5.98
Rofam R-10 65/09/BD	736.5	1378	1856	1.35	5.68
Rofam R-15 74/09/BD	957.67	1540	2040	1.32	10.46
Rofam R-20 62/09/BD	1177.92	1641	2495	1.52	12.80
Rofam R-20 371/03	1177.92	1426	2487	1.74	17.32
Rofam R-30 376/03	1618.42	817	1780	2.17	22.13
Rofam R-40 19/04	2058.92	919	2245	2.44	26.72
Rofam R-50 22/04	2499.42	2697	5127	1.90	26.53
Rofam R-60 31/04	2939.92	2270	5264	2.32	30.70

used and tetrahydrofuran as a solvent and eluent. GPC chromatograms of the tested oxyethylates are demonstrated in figure 1, whereas Table 3 presents average molecular weights (M_{CZ}) determined in maximal peak as well as their distribution coefficients (D).

The share of particular fractions was determined by GPC chromatography (as above) in the tested oxyethylates and their molecular weight was estimated. Selected GPC chromatograms of RME oxyethylation product are presented in figure 2.

Table 3 presents molecular weights (M_{CZ}) of the components of fractions separated from RME oxyethylation products estimated in maximum of individual peaks of the chromatogram and their per cent share.

It was observed during the determination of mGPC composition (fractions) of RME oxyethylation product that in the same conditions of the analysis oxyethylates of average content of $n_{TE} = 30$ and 40 do not give satisfactory separation of particular individuals (fractions). For the remaining products of average content of $n_{TE} = 10, 15, 20, 50$ and 60 very good (highly satisfactory) separations were obtained (fig. 1), which enabled a reliable quantitative analysis of particular fractions.

w układzie faz normalnych z zastosowaniem detektora aerozolowego (ELSD). Uzyskane rezultaty zestawiono w tabeli 2. Wyniki wskazują, że wraz ze wzrostem stopnia oksyetylowania estrów metylowych kw. oleju rzepakowego, obok Rofamów i innych produktów wzrasta zawartość polietylenoglikoli (PEG); przy średnim stopniu oksyetylowania $n_{TE} \approx 60$ udział PEG przekracza nieznacznie 30%.

Do oznaczania udziału frakcji w produkcie oksyetylowania EMKOR zastosowano chromatografię żelową (GPC) i cieczową w układzie faz odwróconych w krytycznym punkcie adsorpcji oraz chromatografię w układzie faz normalnych, stosując kolumny polistyrenowe oraz tetrahydrofuran jako rozpuszczalnik i eluent. Chromatogramy GPC badanych próbek oksyetylatów przedstawiono na rycinie 1, zaś w tabeli 3 zestawiono średnie masy cząsteczkowe (M_{CZ}) oznaczone w maksimum pików oraz ich współczynniki dystrybucji (D).

Techniką chromatografii GPC j. w. oznaczono udział poszczególnych frakcji w badanych oksyetylatach, a także oszacowano ich masę cząsteczkową. Wybrane chromatogramy GPC produktu oksyetylowanego EMKOR przedstawiono na rycinie 2.

W tabeli 3 zestawiono masy cząsteczkowe (M_{CZ}) składowych wydzielonych frakcji z produktów oksy-

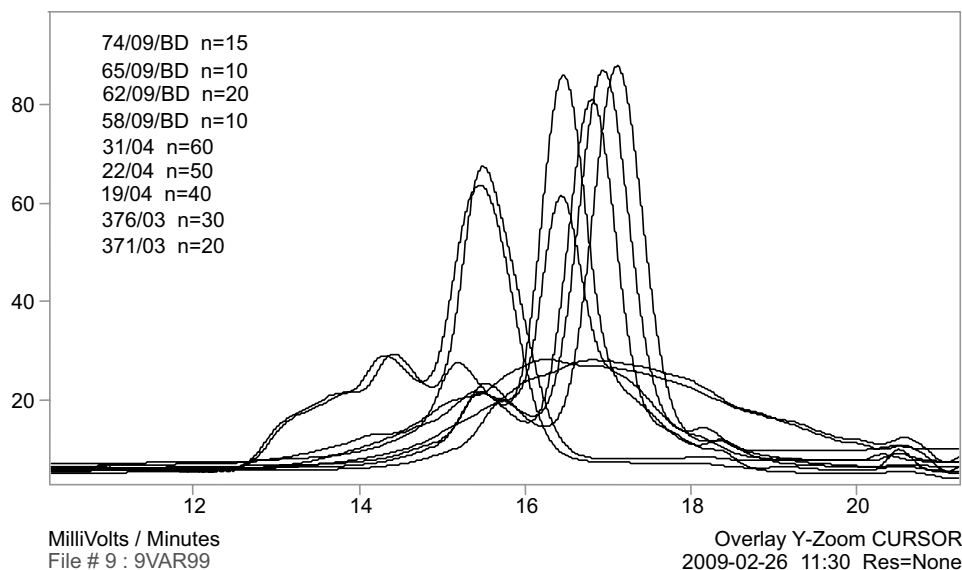


FIG. 1. Comparison of GPC chromatograms of oxyethylate samples of rapeseed methyl esters

Ryc. 1. Porównanie chromatogramów GPC próbek oksyetylatów rzepakowych estrów metylowych

The peaks of maximum content of a fraction presented on chromatograms were interpreted as oxyethylates of rapeseed oil acid methyl esters (oleic acid), whereas the preceding peak was attributed to diester oxyethylates.

The data in Table 3 indicate that in the oxyethylation product of RME oxyethylates of methyl esters constitute from 60.18% to 80.07%, whereas the same oxyethylates contain diesters respectively from 15.2% to 22.38%. In total, oxyethylation products of RME constitute depending on the average content of n_{TE} from 80.3% at $n_{TE} = 60$ to 96.92% at $n_{TE} = 20$ (Tab. 3).

Determination of m.TLC chromatography homogeneity of Rofams – the oxyethylation products of RME

Oxyethylation product of RME of average content of $n_{TE} \geq 10$ was purified with the use of an absorbent (active carbon) and mobile phase components but without ammonia, as in [10]. Rofams of average content of n_{TE} from 12 to 18 were included into homogeneity testing [1, 2]. Through the modification of the developing system (the mobile phase) of type A (Tab. 4 significant variation of R_f coefficient was obtained for the investigated products).

The calculated values of R_f ($x \pm t_s$ for $n = 10$ and R_M) (Tab. 5) served as a basis for examining the course of the relation between R_f and the determined m^1H -NMR content of n_{TE} ; $R_f = f(n_{TE})$, Table 5 and 6, fig. 3 and 4. It results from the numerical values of R_f presented in Tab. 5 and 6 that up to the content of n_{TE}

etylenowania EMKOR, oszacowane w maksimum poszczególnych pików chromatogramu oraz ich procentowe udziały.

Podczas oznaczania m. GPC składu (frakcje) produktu oksyetylenowania EMKOR zaobserwowano, że w tożsamy warunkach analizy oksyetylaty o średniej zawartości $n_{TE} = 30$ i 40 nie dają zadowalającego rozdziału (separacji) poszczególnych indywidualów (frakcje). Dla pozostałych produktów o średniej zawartości $n_{TE} = 10, 15, 20, 50$ i 60 uzyskano bardzo dobre (wysokie zadowalające – rycina 2) rozdziały, które umożliwiły w sposób wiarygodny przeprowadzenie analizy ilościowej poszczególnych frakcji.

Zaprezentowane na chromatogramach piki o maksymalnej zawartości frakcji, zinterpretowano jako oksyetylaty estrów metylowych kw. oleju rzepakowego (kw. olejowy), natomiast pik poprzedzający przypisano oksyetylatom dwustrów.

Z danych zestawionych w tabeli 3 wynika, że w produkcie oksyetylenowania EMKOR oksyetylaty estrów metylowych stanowią od 60.18% do 80.07%, zaś te same oksyetylaty zawierają odpowiednio dwu-estry od 15,2% do 22,38%. Sumarycznie produkty oksyetylenowania EMKOR, stanowią w zależności od średniej zawartości n_{TE} od 80.3% przy $n_{TE} = 60$ do 96,92% przy $n_{TE} = 20$ (tabela 3).

Oznaczanie m.TLC jednorodności chromatograficznej Rofamów produktów oksyetylenowania EMKOR

Analogicznie jak w publikacji [10] przy użyciu adsorbenta (węglu aktywnego) i składowych fazy ru-

TABLE 3. Molecular weights – M_{cz} and per cent share of particular fractions of oxyethylates of rapeseed oil fatty acid methyl esters (RME)TABELA 3. Oznaczone w maksimum piku masy cząteczkowe – M_{cz} oraz udziały procentowe poszczególnych frakcji oksyetylatów estru metylowego kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (EMKOR)

Rofam type Rofam–typ	Sample Nazwa próbki	Teoretical n_{TE} Teoretyczna wartość n_{TE}	Fraction Fracje	Retention time Czas retencji min	M_{cz} in peak maximum M_{cz} w szczycie piku	Fraction content Zawartość frakcji
Rofam R-10	AB 9084;58/09	10	1	13.49–16.24	2853	15.02
			2	16.24–18.20	1385	80.57
			3	18.20–20.03	601	4.12
			4	20.03–21.24	127	0.29
Rofam R-10	AB 9086;65/09	10	1	13.38–16.11	3183	18.42
			2	16.11–17.95	1527	75.11
			3	17.95–19.80	701	5.63
			4	19.80–20.82	144	0.84
Rofam R-15	AB 9086;65/09	15	1	12.11–16.03	3263	19.52
			2	16.03–18.19	1552	77.40
			3	18.19–19.63	618	2.60
			4	19.63–20.98	127	0.48
Rofam R-20	AB 9085;6209	20	1	12.28–15.77	3793	22.38
			2	15.77–18.13	1984	74.03
			3	18.13–19.51	605	2.17
			4	19.51–20.89	132	1.42
Rofam R-20	AB 9079; 371/03	20	1	12.79–15.75	3386	24.44
			2	15.75–17.08	2009	52.13
			3	17.08–17.91	1325	14.30
			4	17.91–19.53	732	7.37
Rofam R-30	AB 9080; 376/03	30	1	12.74–18.68	1668	85.10
			2	18.68–19.84	451	11.22
			3	19.84–20.32	186	2.0
			4	20.32–20.92	125	1.68
Rofam R-40	AB 9081; 19/04	40	1	12.61–14.35	6924	5.19
			2	14.35–15.41	3788	12.78
			3	15.41–16.67	2210	29.57
			4	16.67–18.97	1349	42.89
			5	18.97–19.94	295	6.69
			6	19.94–20.32	172	1.19
Rofam R-50	AB 9082;22/04	50	1	12.31–13.54	15719	8.25
			2	13.54–13.97	9462	7.12
			3	13.97–14.88	5974	19.69
			4	14.88–17.53	3235	61.54
			5	17.53–18.69	715	1.63
			6	18.69–20.12	327	1.01
Rofam R-60	AB 9083;	60	1	12.31–13.87	9489	14.22
			2	13.87–14.79	6277	20.12
			3	14.79–17.00	3311	60.18
			4	17.00–17.60	1438	1.10
			5	17.60–18.79	773	1.70
			6	18.79–20.12	332	0.85

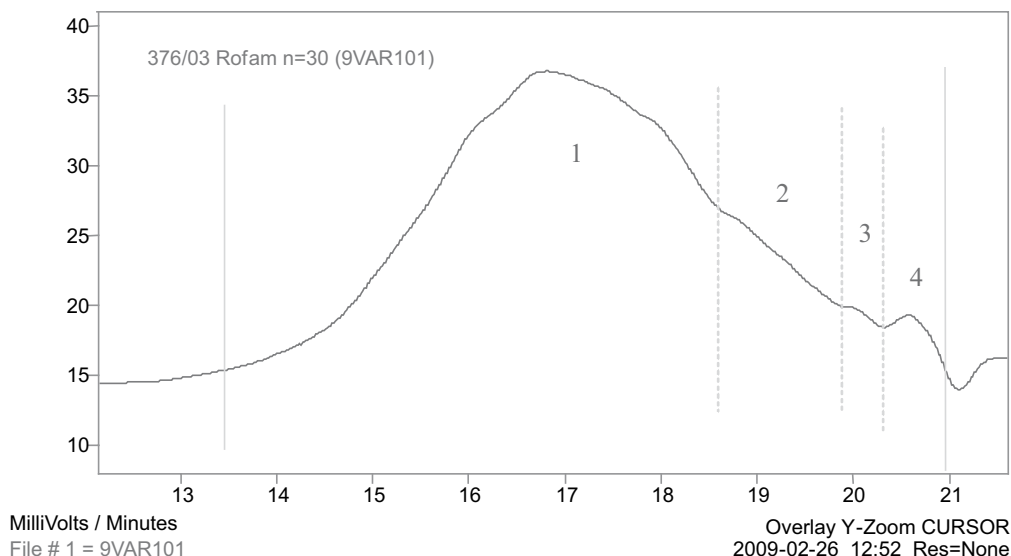


FIG. 2 . GPC chromatogram of the sample of oxyethylated methyl ester of $n_{TE} = 30$
 GPC chromatogram of oxyethylated methyl ester sample of $n_{TE} = 40$
 Ryc. 2. Chromatogram GPC próbki oksyetylowanego estru metylowego o $N_{sr} = 30$
 Chromatogram GPC próbki oksyetylowanego estru metylowego o $N_{sr} = 40$

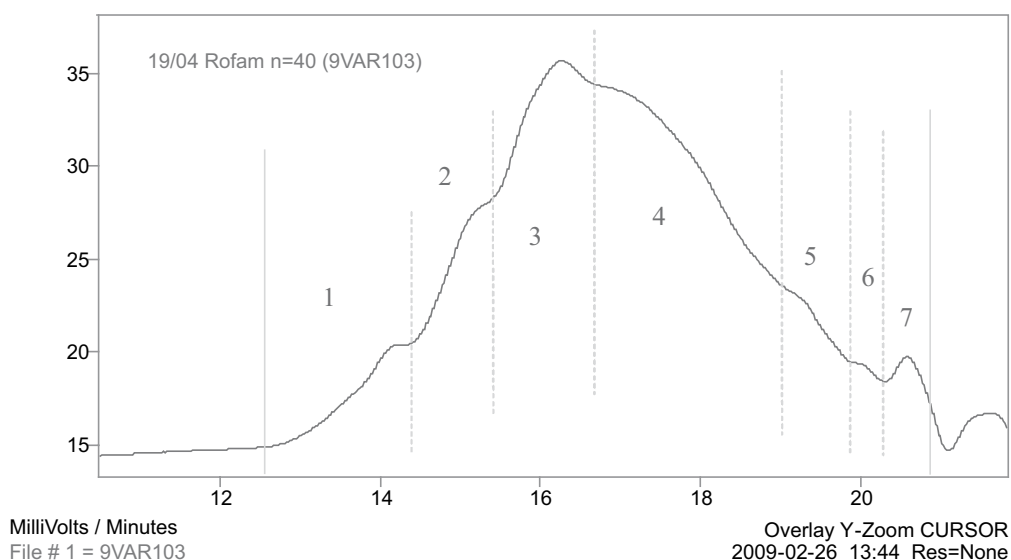


TABLE 4. Composition of mobile phases used for the chromatographic analysis with calculated dielectric constant

TABELA 4. Skład faz ruchomych wykorzystanych do analizy chromatograficznej, wraz z obliczona stałą dielektryczną

Mobile phase components Składowe fazy ruchomej	Mobile Phase/Układ rozwijający					
	A1	B2	C3	D4	E5	F6
1. Isopropanol	4 p.by v	3.5 p by v	3.5 p by v	1.5 p by v		8.5 p by v
2. N-butanol		5 p by v				
3. 2-ol-butanol	2 p.by v		5 p by v	7 p by v	8.5 p by v	
4. Methyl-ethyl ketone-MEK	2 p.by v					
5. 25% NH ₃ H ₂ O	2 p by v	1.5 p by v	1.5 p by v	1.5 p by v	1.5 p by v	1.5 p by v
Dielectric constant- E_M	27.08	24.99	23.99	23.49	23.11	24.77

* Calculated $E_M(25\% \text{NH}_3\text{H}_2\text{O}) = 64.51$.

Constant dielectric mixture $E_M = E_A \cdot x_A + E_B \cdot x_B + \dots E_n \cdot x_n$

TABLE 5. Numerical values of hydrophilic-lipophilic balance (HLB_G and HLB_{Req}) and R_f R_M of Rofams determined using developing systems D, E and F

TABELA 5. Liczbowe wartości równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB_G i HLB_{Req}) oraz R_f R_M Rofamów wyznaczonych przy zastosowaniu układów rozwijających D, E i F

Rofam type Typ rofamu	HLB_{Gryfin}	HLB_{Req}	Mobile phase D Faza rozwijająca D		Mobile phase E Faza rozwijająca E		Mobile phase F Faza rozwijająca F	
			R_f	R_M	R_f	R_M	R_f	R_M
Rofam $n_{TE} = 10$	13.58	16.63	0.896	-0.9352	0.874	-0.8411	0.917	-1.0433
Rofam $n_{TE} = 12$	14.66	16.76	0.885	-0.8862	0.820	-0.6297	0.830	-0.8650
Rofam $n_{TE} = 13$	14.77	16.78	0.857	-0.7776	0.801	-0.6047	0.804	-0.6129
Rofam $n_{TE} = 14$	14.89	16.79	0.841	-0.7234	0.790	-0.5754	0.774	-0.5346
Rofam $n_{TE} = 16$	15.53	16.88	0.819	-0.6556	0.771	-0.5272	0.772	-0.4144
Rofam $n_{TE} = 17$	15.73	16.91	0.803	-0.6102	0.752	-0.4817	0.699	-0.3659
Rofam $n_{TE} = 18$	15.92	16.93	0.784	-0.5598	0.729	-0.4297	0.687	-0.3414
Rofam $n_{TE} = 20$	15.91	16.73	0.768	-0.5198	0.716	-0.4015	0.663	-0.2938
Rofam $n_{TE} = 30$	16.97	16.93	0.648(*0.304)	-0.2650	0.610(*0.264)	-0.1942	0.497(*0.256)	-0.1707
Rofam $n_{TE} = 40$	17.10	16.95	0.568(*0.304)	-0.1188	0.504(*)	-0.0069	0.422(*)	0.1366
Rofam $n_{TE} = 50$	17.87	17.10	0.546(*0.304)	-0.0801	0.449(*)	-0.0889	0.364(*)	0.2423
Rofam $n_{TE} = 60$	18.20	17.16	0.522	-0.0382	0.434(*)	-0.1153	0.289(*)	0.3909

$$R_M = \log \left[\frac{1}{R_f} - 1 \right]$$

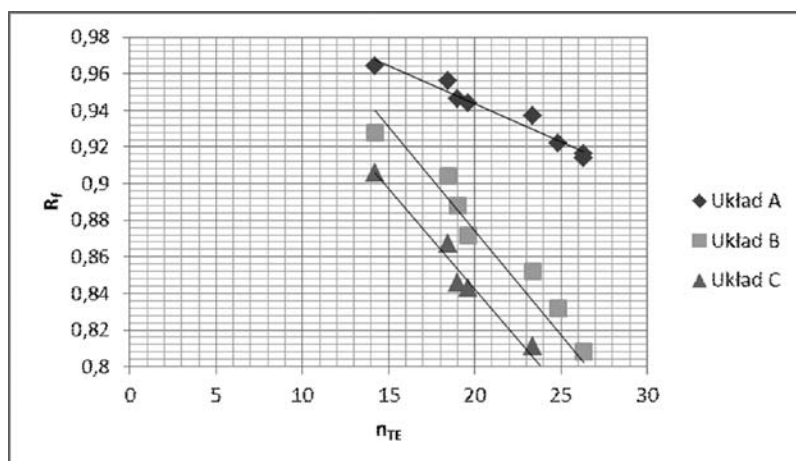


FIG. 3. The relationship between R_f and the n_{TE} for the mobile phase A, B and C

RYC. 3. Przebieg zależności między R_f a n_{TE} dla układów rozwijających A, B oraz C

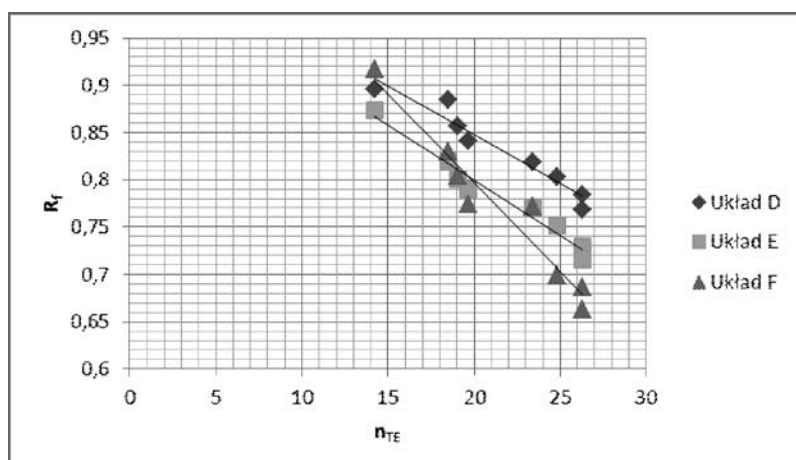


FIG. 4. The relationship between R_f and the n_{TE} for the mobile phase D, E and F

RYC. 4. Przebieg zależności między R_f a n_{TE} dla układów rozwijających D, E oraz F

TABLE 7. Regression equations describing the course of the relation between R_M and the content of oxyethylene segments n_{TE} and HLB_G in the structure of Rofams determined by 1H NMR method

TABELA 7. Równania regresji opisujące przebieg zależności między R_M a oznaczoną metodą 1H NMR zawartością segmentów oksyetylenowych n_{TE} i HLB_G w strukturze Rofamów.

Mobile phase Układ rozwijający	Regression equation – type Równanie regresji – typ	Correlation coefficient r' Współczynnik korelacji „ r ”	Direction coefficients of the equations Współczynniki kierunkowe równań	
			a $\pm$ da	b $\pm$ bd
A	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9750	-2.6422 ± 0.2550	1.0881 ± 0.1746
	$1/R_M = a + b \cdot n_{TE} +$	0.9786	-0.5443 ± 0.0728	-0.0140 ± 0.0021
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9811	-3.6615 ± 0.3608	0.1628 ± 0.0225
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9792	-8.2247 ± 1.0433	5.9611 ± 0.8686
B	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9549	-2.9193 ± 0.5153	1.6105 ± 0.3527
	$R_M = a + b \cdot 1/n_{TE} +$	0.9697	0.2216 ± 0.1546	-20.6790 ± 3.6704
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9720	-4.4605 ± 0.6613	0.2431 ± 0.0413
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9715	-11.2886 ± 1.8388	8.9125 ± 1.5308
C	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9818	-2.6931 ± 0.5153	1.5172 ± 0.2064
	$R_M = a + b \cdot 1/n_{TE} +$	0.9810	0.2506 ± 0.1120	-19.0764 ± 2.6528
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9890	-4.1189 ± 0.3827	0.2273 ± 0.0239
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9859	-10.4783 ± 1.1889	8.3127 ± 0.9898
D	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9742	-2.6707 ± 0.3552	1.4901 ± 0.2064
	$R_M = a + b \cdot 1/n_{TE} +$	0.9664	0.2160 ± 0.1444	-18.6242 ± 3.4216
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9786	-4.0613 ± 0.5230	0.2227 ± 0.0327
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9744	-10.2755 ± 1.5859	8.1301 ± 1.3202
E	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9843	-2.4959 ± 0.2697	1.4662 ± 0.1846
	$R_M = a + b \cdot 1/n_{TE} +$	0.9728	0.3408 ± 0.1291	-18.2316 ± 3.0572
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9845	-3.8480 ± 0.4373	0.2181 ± 0.0273
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9728	3.0584 ± 0.5777	-54.2924 ± 9.1063
F	$R_M = a + b \cdot \log n_{TE}$	0.9698	-3.2379 ± 0.5212	2.0143 ± 0.3568
	$R_M = a + b \cdot 1/n_{TE} +$	0.9769	0.6784 ± 0.1658	-25.5345 ± 3.9269
	$R_M = a + b \cdot HLB_G$	0.9798	-5.1436 ± 0.6959	0.3026 ± 0.0435
	$R_M = a + b \cdot \log HLB$	0.9793	-13.6445 ± 1.9383	-76.0244 ± 11.7146

≤ 20 , the purified oxyethylation product of RME-Rofams are characterized by one R_f coefficient, which proves their significant homogeneity independently of the mobile phase composition and its polarity.

However, Rofams of $n_{TE} \geq 20$ have basically two individuals differing significantly with R_f coefficient (two coloured stains), which prove that they are a mixture of oxyethylated methyl esters and diesters of rapeseed oil fatty acids and also of polyethylene glycols (PEG).

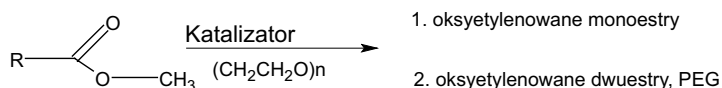
The numerical values of R_f , R_M and HLB (Griffin and ^1H NMR methods), calculated and presented in Table 5 and 6, were the base for examining the relation between R_M and structural quantity of n_{TE} and HLB_G determined basing on ^1H NMR spectra (universal system of classification of nonionic surface-active compounds); $R_M = f(n_{TE}, HLB)$.

The course of regression equations at confidence level $p = 0.05$ with high numerical values of the correlation coefficient (Tab. 7) indicates that they can be used to calculate the number of oxyethylene segments n_{TE} in the structure of Rofam as well as the application level of hydrophilic-lipophilic balance (HLB_G).

It results from the above statement that on Silicagel 60F₂₅₄ vehicle, the highest values of the correlation coefficient were found for the equations of the type $y = a + bx$, $y = a + b \log x$ and $y = a + b/x$ independently of the polarity of the developing system.

CONCLUSIONS

1. The results of the chromatographic analysis in the qualitative and quantitative aspect indicate that despite the application of a selective catalyst of the process of oxyethylation, the obtained product is a complex mixture in which oxyethylated methyl ester and also diesters with increasing content of polyethylene glycols (PEG) are the basic components according to the schema:



2. Importantly, the number of polyethylene glycols (PEG) increases systematically together with the content of oxyethylene segments in the molecule of Rofams which is typical for a cascade technology of conducting the process of polarisation of ester lipophilic structure.
3. The experimental data demonstrate that in the

chomej ale bez amoniaku, oczyszczono produkt oksyetylowania EMKOR o średniej zawartości $n_{TE} \geq 10$. Do badania jednorodności włączono Rofamy o oznaczonej średniej zawartości n_{TE} od 12 do 18 [1, 2]. Przez modyfikację układu rozwijającego (faza ruchoma) typu A, uzyskano istotne zróżnicowanie współczynnika R_f dla badanych produktów (tabela 4).

Wyznaczone liczbowe wartości R_f ($\#x \pm t_s$ dla $n = 10$) i wyliczone R_M , tabeli 5, stanowiły podstawę do prześledzenia przebiegu zależności między współczynnikiem R_f a oznaczoną m ^1H NMR zawartością n_{TE} ; $R_f = f(n_{TE})$ (tabele 5 i 6, ryciny 3 i 4). Z zestawionych w tabelach 5 i 6 liczbowych wartości R_f wynika, że do zawartości $n_{TE} \leq 20$ oczyszczony produkt oksyetylowania EMKOR – Rofamy, niezależnie od składu fazy ruchomej i jej polarności charakteryzują się jednym współczynnikiem R_f , co świadczy o ich daleko idącej jednorodności.

Natomiast Rofamy o $n_{TE} \geq 20$ posiadają zasadniczo dwa różniące się istotnie współczynnikiem R_f indywidua (dwie barwne palmy), które świadczą o tym, że są one mieszaniną oksyetylowanych estrów metylowych i dwuestrów kw. tłuszczowych oleju rzepakowego, a także polietylenoglikoli (PEG).

Wyliczone i zestawione w tabelach V i VI liczbowe wartości R_f , R_M i HLB (m. Gryffina i m. ^1H NMR) stanowiły podstawę do prześledzenia zależności między R_M , a oznaczoną w oparciu o widma ^1H NMR strukturalną ilością n_{TE} i HLB_G (uniwersalny system klasyfikacji niejonowych związków powierzchniowo czynnych); $R_M = f(n_{TE}, HLB)$.

Przebieg równań regresji na poziomie ufności $p = 0,05$ przy wysokich liczbowych wartościach współczynnika korelacji wskazują, że mogą one zostać wykorzystane do oszacowania zawartości segmentów oksyetylowanych n_{TE} w strukturze Rofamu, a także aplikacyjnego poziomu równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB_G) (tab. 7).

Z powyższego zestawienia wynika, że na podłożu Silicagel 60F₂₅₄ niezależnie od polarności układu rozwijającego najwyższe liczbowe wartości współczynnika korelacji, odnotowano dla równań typu $y = a + bx$, $y = a + b \log x$ oraz $y = a + b/x$.

WNIOSKI

1. Uzyskane rezultaty analizy chromatograficznej w aspekcie jakościowym i ilościowym wskazują, że mimo zastosowania selektywnego katalizatora procesu oksyetylowania otrzymany produkt stanowi złożoną mieszaninę, w której pod-

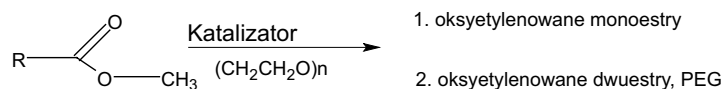
oxyethylation product of RME – Rofams to the content in the molecule of $n_{TE} \leq 20$ the produced quantity of PEG can be eliminated by purifying the product on active carbon, which is confirmed by independently conducted chromatographic studies.

4. The description of the relation $R_M = f(n_{TE}, HLB)$ with regression equations at high correlation coefficient $r \leq 0.965$ points to the possibility of the use of coefficient R_f for the evaluation of the content of n_{TE} and structural level of HLB.

LITERATURE

- [1] ZGODA M. M., HRECZUCH W., WOSKOWICZ M., NACHAJSKI M. J., KOŁODZIEJCZYK M. K.: Surfactants from the group of fatty acids polyoxyethylenated esters. Part I. Hydrophylic-lipophilic equilibrium (HLB), solubility parameter and a type of surface activity of the rape oil fatty acids methyl esters oxyethylenation products. POLIMERY., (2003), 5, 48–53.
- [2] ZGODA M. M., WOSKOWICZ M., NACHAJSKI M., KOŁODZIEJCZYK M. K., LUKOSEK M., JERZYKIEWICZ W.: Surfactants from the group of fatty acids polyethylenated esters. Part II. Basic viscometric values and solubility parameter in relation to hydrophilic-lipophilic balance of the products of oxyethylenation of rape oil fatty acids methyl esters. POLIMERY., (2005), nr 11–12, 873–880.
- [3] LEESMAN G. D., OBERLE R. L., AMIDON G. L.: The use of error functions in characterizing gastric emptying in humans. Pharm. Res., (1991), 8, 254–268.
- [4] NACHAJSKI M. J., ZGODA M. M.: Selected rofams as a micellar solubilizers for diclofenac and naproxen in the environment of the standard vehicle for eye drops. Polimery w Medycynie, (2005), T.XXXV, 3, 36–47.
- [5] ZGODA M. M., PIESZYŃSKI J.: Surfactants from the group of propylene and ethylene oxide copolymers. Part XII., Acta Pol. Pharm.-Drug Research, (1994), Vol. 51, No. 4–5, 413–422.
- [6] ZGODA M. M., PIESZYŃSKI J., GAWŁOWSKA E., CIECHOWICZ J.: Tensides from the group of propylene oxide and the ethylene oxide copolymers. Part XIII. Acta Pol. Pharm.-Drug Research, (1995), Vol. 52, No.2, 257–264.
- [7] PIOTROWSKA-OPUSZYŃSKA W., KIKOLSKI P., BOLIŃSKA A.: Badania biodegradowalności pier-

stawową składową jest oksyetylenowany ester metylowy, a także dwuestry z narastającą zawartością polietylenoglikoli (PEG) wg schematu:



2. Znamienny dla prowadzonego procesu jest fakt, że ilość polietylenoglikoli (PEG) systematycznie rośnie wraz z zawartością segmentów oksyetylenowych w cząsteczce Rofamów, co jest typowe dla kaskadowej technologii prowadzenia procesu upolarnienia lipofilowej struktury estru.
3. Z uzyskanych danych eksperymentalnych wynika, a potwierdziły to niezależnie przeprowadzone badania chromatograficzne, że w produkcji oksyetylenowania EMKOR – Rofamach do zawartości w cząsteczce $n_{TE} \leq 20$ powstającą ilość PEG można wyeliminować przez oczyszczenie produktu na węglu aktywnym.
4. Opisanie zależności $R_M = f(n_{TE}, HLB)$ równaniami regresji przy wysokich współczynnikach korelacji $r \leq 0,965$, wskazuje na możliwość wykorzystania współczynnika R_f do oszacowania zawartości n_{TE} i strukturalnego poziomu HLB.

Adres autorów

Uniwersytet Medyczny
Katedra Farmacji Stosowanej
Zakład Technologii Postaci leku
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
tel. (42) 677 92 41, w. 241
e-mail: michal.nachajski@umed.lodz.pl

Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego własnego o numerze rejestracyjnym NN209 145736 finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Decyzja Nr 1457/B/H03/2009/36)

- wotnych substancji powierzchniowo czynnych dla potrzeb certyfikacji – skuteczne narzędzie dla ochrony środowiska. POLLENA-TŚPK., (1997), Vol. 41, 5, 209–216.
- [8] ZGODA M. M., KARCZEWSKI T.: Właściwości makrocząsteczek w płynach ustrojowych górnego odcinka przewodu pokarmowego. DIAGN. LAB., (1993), Vol. 29, 163–171.
- [9] ZGODA M. M., KARCZEWSKI T.: Tenzydy z grupy kopolimerów tlenu propylenu i tlenu etylenu. Acta Polon. Pharm.- Drug Research., (1990), Vol. 47, 5–6, 61–70.
- [10] ZGODA M. M., NACHAJSKI M. J.: A chromatographic and surface-activity analysis of the fractions of Rokopols, block Copolymers of propylene oxide and ethylene oxide separated from the technical product. Polimery w Medycynie, (2008), T. XXXVIII, 3, 17–29.
- [11] Meyer Th., Waidelich D., Frahm A.W.: Polyoxyethylene- $\Delta^{9,11}$ -didehydrostearate and glycerol – polyoxyethylene $\Delta^{9,11}$ -didehydrostearate: two new components of the non-ionic emulsifier Cremphor®EL., J. Pharm. Biomedical Anal., (2002), Vol. 30, Issue 2, 263–269.

Corresponding author Michał Nachajski
Drug Form Department Medical University
ul. J. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
tel/fax 48 42 677 9240
e-mail: michal.nachajski@umed.lodz.pl

