

Применение хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения гидроксикарбамида и мочевины

А. С. Осипов, О. А. Попова, С. Г. Ларионова, Е. Ю. Тимошина

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

Статья поступила 14.03.2017 г. Принята к печати 29.05.2017 г.

Резюме: Исследовали возможность применения хроматографической колонки XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм) для разделения смеси гидроксикарбамида (гидроксимочевины) и его примеси мочевины. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды. Разделение анализируемых соединений на амидных колонках в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 93 %. При хроматографировании на амидной колонке XBridge Amide наблюдалось изменение очередности элюирования гидроксикарбамида и мочевины по сравнению с элюированием на диольных и нитрильных хроматографических колонках. Хроматография смесей мочевины и гидроксикарбамида на данных колонках может быть применена для подтверждения пригодности хроматографической системы при анализе мочевины методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий; гидроксикарбамид; мочевина; фармакопей.

Библиографическое описание: Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ, Тимошина ЕЮ. Применение хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения гидроксикарбамида и мочевины. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(2): 81–84.

Гидроксикарбамид (название соединения по Европейской фармакопее), или гидроксимочевину (название по Фармакопее США), применяют в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. Препарат является антиметаболитом. Гидроксикарбамид (ГК) описан в ведущих зарубежных фармакопеех. Для количественного определения ГК применяют хроматографирование на колонках C18, в качестве подвижной фазы наиболее часто используют воду [1] или смесь метанола и воды (5:95) [2]. В Фармакопее США [3, 4] для количественного определения ГК в субстанции и лекарственной форме (капсулы) используют ион-парную хроматографию на колонках C18 (подвижная фаза — смесь буферного раствора с тетрабутиламмония гидросульфатом (рН 5,0) и метанола (85:15)).

В большинстве нормативных документов на зарегистрированные в Российской Федерации препараты ГК контролируется содержание примеси — мочевины (не более 0,5 %). Для этих целей используют либо методику Европейской фармакопеи (ТСХ на пластинках с силикагелем; подвижная фаза — смесь пиридина, воды и этилацетата (2:2:10)), либо методику Британской фармакопеи (ТСХ на пластинках с целлюлозой F; подвижная фаза — смесь уксусной кислоты, воды и бутанола-1 (1:1:4)). В обеих методиках проявляют пластинки солянокислыми растворами диметиламинобензальдегида. Для определения мочевины в субстанции ГК по Фармакопее США применяют нисходящую хроматографию на бумаге (Whatman № 1). Следует отметить, что данный метод весьма длителен и трудоемок и не может быть рекомендован для повседневого, рутинного приме-

нения. В соответствующей монографии Фармакопеи США содержание мочевины в капсулах препарата не регламентировано [4]. Применение метода ВЭЖХ для разделения ГК и мочевины в зарубежных фармакопеех не описано. Необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии ГК и мочевина не разделяются [5]. Ранее была показана возможность применения хроматографических колонок с amino-, диольными и нитрильными сорбентами для разделения смесей ГК и мочевины [5, 6] в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC). Мочевина и ГК являются амидами угольной кислоты, и исследование разделения данных соединений на хроматографической колонке с амидными функциональными группами может представлять определенный теоретический интерес.

Цель работы — исследование возможности применения хроматографической колонки с амидным сорбентом в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения ГК и мочевины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на хроматографе Agilent, серии 1100 с диодно-матричным детектором («Agilent Technologies», США). Исследовали колонку с амидным сорбентом XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм («Waters», Ирландия), колонки с диольными сорбентами: LiChrospher Diol 150×4,0 мм, 5 мкм («MZ-Analysentechnik GmbH», Германия), Inertsil Diol 150×4,0 мм, 5 мкм («GL Sciences Inc», Япония). Детектирование осуществляли при 195 нм. Скорость

потока элюента 1 мл/мин или 0,8 мл/мин (в зависимости от диаметра колонок). Ввод образцов в объеме 10 мкл. В работе использовали данные, полученные на хроматографических колонках Zorbax NH₂ 150×4,6 мм, 5 мкм [5] («Agilent Technologies», США) и Zorbax SB CN 150×4,6 мм, 5 мкм [6] («Agilent Technologies», США). В работе применяли стандартные образцы гидроксикарбамида и мочевины Европейской фармакопеи.

Анализировали препарат Гидроксикарбамид-ЛЭНС, капсулы 500 мг (ОАО «Верофарм», Россия). Подготовка проб: содержимое капсулы (600 мг) растворяли в 50 мл смеси ацетонитрила и воды (1:4), затем разводили ацетонитрилом до концентрации 1 мг/мл. Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминокислотными и диольными сорбентами могут быть, в зависимости от анализируемых объектов, как близки [7, 8], так и кардинально отличаться от колонок с нитрильными сорбентами [9, 10]. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси стандартных образцов мочевины и ГК на амидной колонке XBridge Amide и диольных колонках LiChrospher Diol и Inertsil Diol. Для сравнения приведены результаты хроматографирования мочевины и

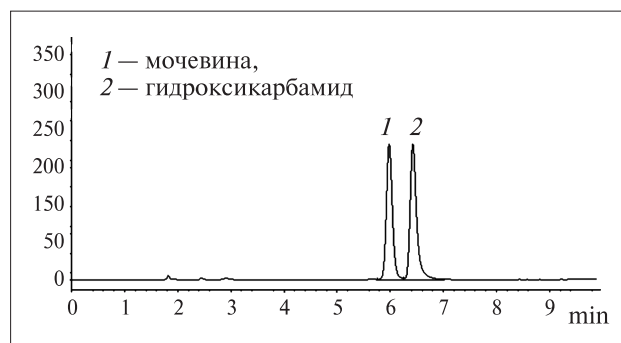


Рис. 1. Хроматограмма смеси стандартных образцов мочевины и гидроксикарбамида. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза — ацетонитрил–вода (95:5); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 195 нм

ГК, полученные на колонке Zorbax NH₂ [5]. Увеличение времен удерживания мочевины и ГК, а также улучшение их разделения с возрастанием доли ацетонитрила в подвижной фазе указывает, что на данных колонках имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (рис. 1). Кроме того, на колонке XBridge Amide меняется очередность элюирования ГК и мочевины (табл. 1, рис. 2) по сравнению с колонками LiChrospher Diol, Inertsil Dio и Zorbax SB CN. На основании этих фактов можно заключить следующее: на амидных и аминсорбентах мочевины

Таблица 1

ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ (T), ЭФФЕКТИВНОСТЬ И РАЗРЕШЕНИЕ МЕЖДУ ПИКАМИ МОЧЕВИНЫ И ГК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ*

Наименование колонки; состав подвижной фазы, скорость потока	T (мин) мочевины	T (мин) ГК	Эффективность колонки по пику мочевины (теоретические тарелки)	Разрешение между пиками мочевины и ГК
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил–вода (90:10), 1 мл/мин	4,24	4,43	14610	1,49
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил–вода (97:3), 1 мл/мин	8,18	9,01	11750	2,62
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил–вода (90:10), 1 мл/мин	3,61	4,09	4670	2,95
Inertsil Diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил–вода (97:3), 0,8 мл/мин	7,26	6,03	6980	4,06
Inertsil Diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил–вода (98:2), 0,8 мл/мин	8,70	6,68	6370	5,52
LiChrospher Diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил–вода (95:5), 0,8 мл/мин	4,27	3,62	11060	5,86
LiChrospher Diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил–вода (97:3), 0,8 мл/мин	5,68	3,93	11150	9,11

* Средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования

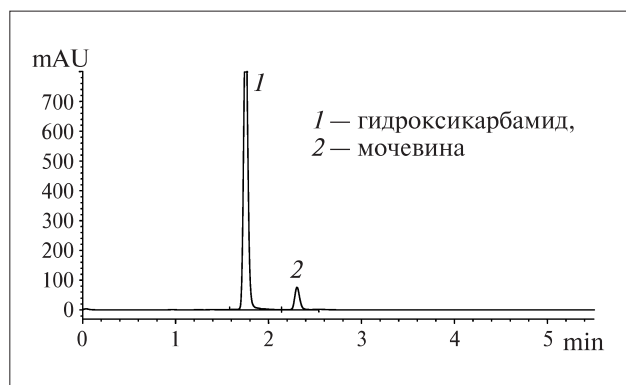


Рис. 2. Хроматограмма препарата «Гидроксикарбамид-ЛЭНС», капсулы 500 мг с добавкой мочевины. Условия анализа: колонка Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза — ацетонитрил—вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 195 нм [6]

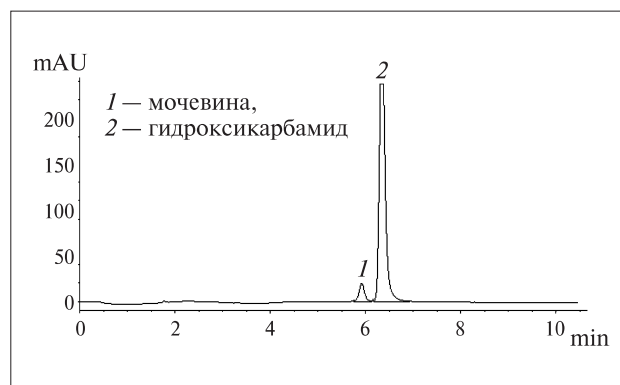


Рис. 3. Хроматограмма препарата «Гидроксикарбамид-ЛЭНС», капсулы 500 мг с добавкой мочевины. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза — ацетонитрил—вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 195 нм

элюируется с колонки до ГК, на нитрильных и диольных — после ГК.

В ходе исследования было установлено, что препарат Гидроксикарбамид-ЛЭНС содержит около 0,05 % мочевины. Для подтверждения селективности определения к раствору препарата был добавлен стандарт мочевины до концентрации 0,05 мг/мл. Хроматограмма данной искусственной смеси представлена на рисунке 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере колонки XBridge Amide показано, что хроматографические колонки с амидными сорбентами могут быть использованы для определения примеси мочевины в препаратах гидроксикарбамида. В ходе исследования было выявлено, что при анализе гидроксикарбамида амидный сорбент колонки XBridge Amide обладает сходными свойствами с аминсорбентом колонки Zorbax NH₂. Хроматография смесей мочевины и гидроксикарбамида на данных колонках может быть применена для подтверждения пригодности хроматографической системы при анализе мочевины методом ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Hydroxycarbamide Capsules. British Pharmacopoeia 2016.

2. Monograph: Hydroxycarbamide. European Pharmacopoeia. 8th ed.
3. Monograph: Hydroxycarbamide. The United States Pharmacopoeia. 39th ed.
4. Monograph: Hydroxyurea Capsules. The United States Pharmacopoeia. 39th ed.
5. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа гидроксикарбамида. Разработка и регистрация лекарственных средств 2015; (2): 140–4.
6. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение хроматографической колонки с нитрильным сорбентом для анализа гидроксикарбамида методом ВЭЖХ. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (3): 58–61.
7. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины. Химико-фармацевтический журнал 2013; 47(6): 51–3.
8. Осипов АС, Нечаева ЕБ. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины. Химико-фармацевтический журнал 2014; 48(8): 45–8.
9. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксианизола. Химико-фармацевтический журнал 2015; 49(3): 50–2.
10. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2016; (3): 108–11.

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.
 Осипов Алексей Сергеевич. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2
 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.
 Попова Ольга Анатольевна. Начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2
 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.
 Ларионова Светлана Геннадьевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2
 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.
 Тимошина Елена Юрьевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2
 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Осипов Алексей Сергеевич; Osipov@expmed.ru

HYDROPHYLIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY USED FOR SEPARATION OF HYDROXYCARBAMIDE AND UREA

A. S. Osipov, O. A. Popova, S. G. Larionova, E. Yu. Timoshina

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 investigates the possibility of using the chromatographic column XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm) for separation of hydroxycarbamide (hydroxyurea) and its impurity (urea). The mobile phases used were the mixtures of acetonitrile and water. The separation of analytes on an amide column by hydrophilic interaction liquid chromatography is feasible if the proportion of acetonitrile in the mobile phase accounts for more than 93 %. When performing chromatographic separation on the amide column XBridge Amide, a change in the elution order of hydroxycarbamide and urea was observed, as compared to the elution on nitrile and diol columns. This type of columns can be used for chromatographic separation of a mixture of hydroxycarbamide and urea in order to perform system suitability testing when analyzing urea by HPLC.

Key words: high performance liquid chromatography; hydrophilic interaction liquid chromatography; hydroxycarbamide; hydroxyurea; pharmacopoeia.

For citation: Osipov AS, Popova OA, Larionova SG, Timoshina EYu. Hydrophilic interaction chromatography used for separation of hydroxycarbamide and urea. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(2): 81–84.

REFERENCES

1. Monograph: Hydroxycarbamide Capsules. British Pharmacopoeia 2016.
2. Monograph: Hydroxycarbamide. European Pharmacopoeia. 8th ed.
3. Monograph: Hydroxycarbamide. The United States Pharmacopoeia. 39th ed.
4. Monograph: Hydroxyurea Capsules. The United States Pharmacopoeia. 39th ed.
5. Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Hydrophilic interaction liquid chromatography used for the analysis of hydroxycarbamide. Drug Development and Registration 2015; (2): 140–4 (in Russian).
6. Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Chromatographic column with nitrile sorbent used in the analysis of hydroxycarbamide by hydrophilic interaction liquid chromatography. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (3): 58–61 (in Russian).
7. Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of a chromatographic column with a diol sorbent for the analysis of platinum coordination compounds. Pharmaceutical Chemistry Journal 2013; 47(6): 51–3 (in Russian).
8. Osipov AS, Nechaeva EB. Application of chromatographic columns with nitrile and phenyl sorbents to the analysis of platinum coordination compounds. Pharmaceutical Chemistry Journal 2014; 48(8): 45–8 (in Russian).
9. Osipov AS, Nechaeva EB, Mironova MM, Kovaleva EL. Use of hydrophilic interaction liquid chromatography to separate butylhydroxyanisole isomers. Pharmaceutical Chemistry Journal 2015; 49(3): 50–2 (in Russian).
10. Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Hydrophilic interaction liquid chromatography used for the analysis of organic nitrates. Drug Development and Registration 2016; (3): 108–11 (in Russian).

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.

Osipov AS. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Popova OA. Head of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality.

Larionova SG. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Timoshina EYu. Chief expert of the Laboratory of Chemico-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

CONTACT E-MAIL

Osipov Alexey Sergeevich; Osipov@expmed.ru