УДК 615.07:543.544.5.068.7
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-162-170

CC BY 4.0

Анализ результатов использования амино-, амидных и нитрильных сорбентов в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий

А. С. Осипов, О. А. Попова*, С. Г. Ларионова

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

Резюме. Обобщены результаты работ, выполненных в 2013–2017 гг. по исследованиям в области жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. На основании анализа результатов, полученных при разделении ряда модельных смесей соединений различной природы, сравнивали свойства хроматографических колонок с амино-, амидными и нитрильными сорбентами. Установлено, что хроматографические колонки с аминосорбентами могут быть использованы для анализа как гидрофильных, так и некоторых гидрофобных соединений, содержащих кислотные (4-гидроксибензойная кислота) или потенциально кислотные группировки (нитрогруппы в нитросоединениях; фенольные гидроксильные группы в изомерах бутилгидроксианизола и парабенах). Показано, что хроматографические колонки с нитрильными и амидными сорбентами обладают сходными между собой свойствами, применимы для анализа гидрофильных соединений (гидроксикарбамид) и координационных соединений платины и не применимы для изомеров бутилгидроксианизола, эфиров пара-гидроксибензойной кислоты и нитроэфиров изосорбида. Сделаны предположения о вероятных механизмах взаимодействия анализируемых соединений с сорбентами. Сделан вывод, что увеличение содержания ацетонитрила в подвижных фазах, сопровождающееся увеличением времени удерживания анализируемых соединений и улучшением разрешения между их пиками, свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий; нитрильные сорбенты; амидные сорбенты; аминосорбенты; хроматографическая колонка

Для цитирования: Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ. Анализ результатов использования амино-, амидных и нитрильных сорбентов в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2018;8(3):162–170. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-162-170

***Контактное лицо:** Попова Ольга Анатольевна; PopovaOA@expmed.ru

Analysis of the Results of Using Amino, Amide and Nitrile Sorbents in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

A. S. Osipov, O. A. Popova*, S. G. Larionova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article summarises the results of studies of hydrophilic interaction liquid chromatography performed from 2013 until 2017. The analysis of results obtained during separation of a number of model mixtures of compounds having different nature helped to compare the characteristics of columns packed with amino, amide and nitrile sorbents. It was demonstrated that columns packed with amino sorbents could be used for the analysis of both hydrophilic compounds and some hydrophobic compounds containing acidic (4-hydroxybenzoic acid) and potentially acidic groups (nitro groups of nitro compounds; phenolic hydroxyl groups of butylhydroxyanisole isomers and parabens). It was discovered that chromatographic columns packed with nitrile and amide sorbents have common properties and can be used for the analysis of hydrophilic compounds (hydroxycarbamide) and platinum coordination compounds, but cannot be used for the analysis of butylhydroxyanisole isomers, esters of p-hydroxybenzoic acid and nitrate esters of isosorbide. The article offers hypotheses about possible mechanisms of interaction between test substances and sorbents. It was concluded that the increase in the acetonitrile content in mobile phases, which increases the retention time of the test substances and results in better resolution between their peaks, illustrates the mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography.

Key words: high-performance liquid chromatography; hydrophilic interaction liquid chromatography; nitrile sorbents; amide sorbents; amino sorbents; chromatographic column

For citation: Osipov AS, Popova OA, Larionova SG. Analysis of the results of using amino, amide and nitrile sorbents in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya=The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2018;8(3):162–170. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-162-170

***Corresponding author:** Olga A. Popova; PopovaOA@expmed.ru

Жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)) — альтернативный метод разделения многих типов полярных и гидрофильных соединений. Данный метод характеризуется нормально-фазовым механизмом разделения, но с использованием обращенно-фазовых растворителей и буферных растворов (ацетонитрил, преимущественно в высоких концентрациях, растворы ацетата аммония, формиата аммония). При необычных условиях хроматографирования (очень большое содержание ацетонитрила в подвижной фазе, свыше 98–99 %) возможно разделение и некоторых гидрофобных соединений. Ранее проведено сравнение свойств хроматографических колонок с амино- и нитрильными сорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [1]. Свойства этих двух типов хроматографических колонок существенно отличаются.

Цель работы — выявление общих закономерностей, характерных для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, на основании анализа результатов, накопленных при разделении смесей соединений различной природы на колонках с амино-, амидными и нитрильными сорбентами.

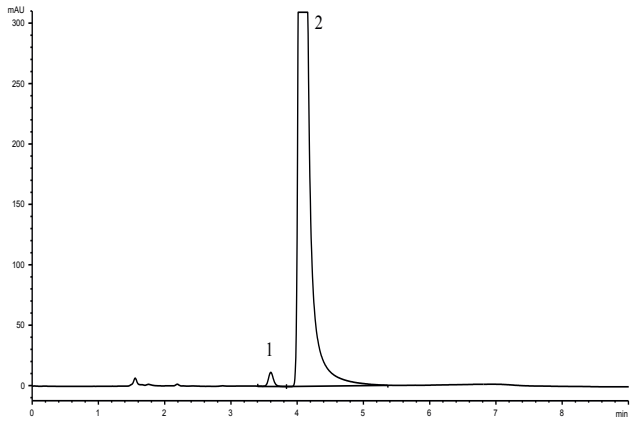
Обзор составлен по результатам работ, проводившихся в 2013–2017 гг. в Испытательном центре экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Анализируемые вещества были представлены следующими группами соединений: гидроксикарбамид и мочевина; координационные соединения платины (II); изомеры бутилгидроксианизола; эфиры пара-гидроксибензойной кислоты; нитроэфиры изосорбида.

Собранные хроматографические данные были получены на колонках Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм), Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм), Nova Pak CN HP 150×3,9 мм (4 мкм), Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм), XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм) и Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4,6 мм. Условия хроматографирования приведены в подписях к рисункам.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ГИДРОКСИКАРБАМИДА

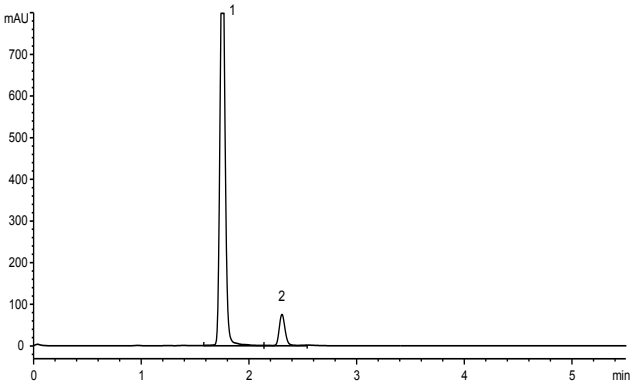
Гидроксимочевина (название по Фармакопее США), или гидроксикарбамид (название соединения по Европейской фармакопее), применяется в медицинской практике в качестве противоопухолевого средства. Согласно действующей нормативной документации производителей в препаратах гидроксикарбамида контролируется содержание примеси — мочевины. Для этой цели применяют 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)) [2, 3]. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения гидроксикарбамида и мочевины в зарубежных фармакопеях не описан. Необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии гидроксикарбамид и мочевина не разделяются.

На хроматографических колонках с нитрильными, амино- и амидными сорбентами гидроксикарбамид и мочевина разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаи-



1 — мочевина, *2* — гидроксикарбамид. *1* — urea, *2* — hydroxycarbamide

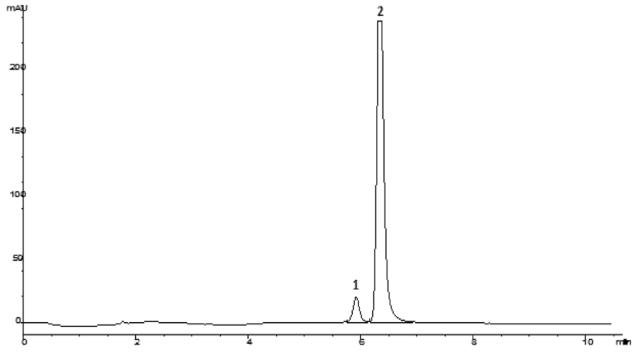
Рис. 1. *Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [4]*
Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (90:10); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм
Fig. 1. *Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [4]*
Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (90:10); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm



1 — гидроксикарбамид, *2* — мочевина. *1* — hydroxycarbamide, *2* — urea

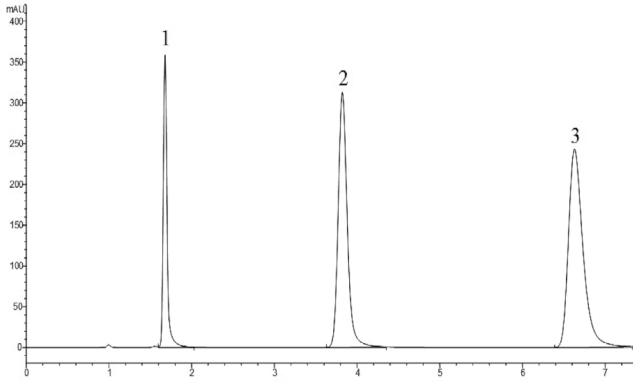
Рис. 2. *Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [5]*
Условия анализа: колонка Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм
Fig. 2. *Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [5]*
Test conditions: column — Zorbax SB CN 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (93:7); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm

модействий при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 90–95 % [4, 5]. С увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличиваются времена удерживания мочевины и гидроксикарбамида, а также улучшается разрешение их пиков; данный факт указывает на то, что на этих колонках имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Следует отметить, что на нитрильной колонке Zorbax SB CN мочевина элюируется после карбамида, а на аминоколонке Zorbax NH_2 и амидной колонке XBridge Amide мочевина элюируется до гидроксикарбамида (рис. 1–3).



1 — мочевина, *2* — гидроксикарбамид. *1* — urea, *2* — hydroxycarbamide

Рис. 3. *Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [4]*
Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм
Fig. 3. *Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [4]*
Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (93:7); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm



1 — цисплатин, *2* — оксалиплатин, *3* — карбоплатин
1 — cisplatin, *2* — oxaliplatin, *3* — carboplatin

Рис. 4. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [12]*
Условия анализа: колонка Nova-Pak CN HP 150×3,9 мм (4 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (95:5); скорость потока — 0,72 мл/мин; детектирование при 220 нм
Fig. 4. *Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [12]*
Test conditions: column — Nova-Pak CN HP 150×3.9 mm (4 μm); mobile phase — acetonitrile–water (95:5); flow rate — 0.72 ml/min; detection at 220 nm

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

Координационные соединения платины (II), такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, также применяют в качестве противоопухолевых средств. Контроль качества этих препаратов проводят методами обращенно-фазовой и ион-парной хроматографии на колонках с сорбентами С18 и С8. При этом содержание ацетонитрила в подвижных фазах варьирует от 1–2 % (обращенно-фазовая хроматография) до 10–20 % (варианты ион-парной хроматографии). Для определения посторонних примесей в цисплатине используют хроматографию на ионообменных колонках [6, 7].

В Британской фармакопее [8] для количественного определения цисплатина на колонке Lichrosorb NH_2 приведена подвижная фаза: ацетонитрил–вода (90:10). Для анализа субстанции и лекарственной формы карбоплатина [9, 10] применяют аналогичного типа хроматографические колонки и подвижную фазу: ацетонитрил–вода (87:13). Следует отметить, что при анализе координационных соединений платины на аминосорбентах имеет место механизм разделения, соответствующий жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Порядок элюирования компонентов анализируемой смеси на колонках с аминосорбентами аналогичен порядку их элюирования на диольной колонке Nucleosil 100-5 OH [11], а также на колонке с нитрильным сорбентом Nova-Pak CN HP [12] и колонке с амидным сорбентом XBridge Amide [13]. На этих колонках было достигнуто лучшее разрешение анализируемых соединений (рис. 4, 5).

Разделение компонентов анализируемой смеси на колонках Nova-Pak CN HP и XBridge Amide возможно как в условиях обращенно-фазовой хроматографии (содержание ацетонитрила в подвижной фазе 2–5 %), так и в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий (содержание ацетонитрила 80–90 %). Следует отметить, что при переходе от хроматографии гидрофильных взаимодействий к обращенно-фазовой хроматографии изменяется очередность элюирования оксалиплатина и карбоплатина (рис. 5 и 6).

Разрешение между пиками координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий выше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

В процессе хроматографирования в условиях гидрофильных взаимодействий разделение анализируемых соединений осуществляется за счет различия в образовании и разрыве координационных связей между атомом платины соединения и амино-, амидными-, цианогруппами и диольными

группами сорбентов хроматографических колонок. В целом, колонки с нитрильными, диольными, амино- и с амидными сорбентами при анализе координационных соединений платины обладают сходными свойствами.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ИЗОМЕРОВ БУТИЛГИДРОКСИАНИЗОЛА

Бутилгидроксианизол (БГА) применяют в качестве антиоксиданта для предотвращения окисления нестабильных лекарственных препаратов. БГА описан в Европейской фармакопее и в Фармакопее США [14, 15]. В Европейской фармакопее указано, что основным антиоксидантом является 2-БГА изомер (2-(1,1–диметилэтил)-4-метоксифенол), а в качестве примеси нормируется содержание 3-БОА изомера (3-(1,1–диметилэтил)-4-метоксифенол). В Фармакопее США содержание 3-БГА изомера не регламентировано. Под количественным содержанием принимают сумму 2- и 3-изомеров БГА. Анализ проводят на хроматографической колонке С18 в условиях обращенно-фазовой хроматографии [15]. В условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 98 % изомеры БГА разделяются на колонке аминосорбентом Zorbax NH_2 [16]. Причем примесь 3-изомера БГА элюируется после основного пика 2-изомера БГА (рис. 7).

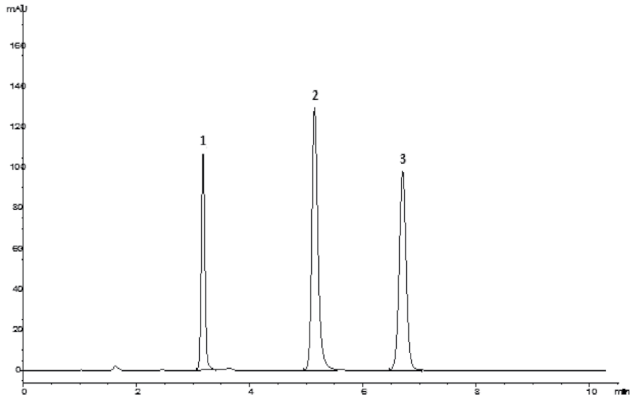
При хроматографировании анализируемых соединений на амидной колонке XBridge Amide примесь 3-изомера БГА элюируется до основного пика 2-изомера БГА, и возможно разделение лишь изомеров БГА [17], без присутствия в анализируемой смеси другого антиоксиданта бутилгидрокситолуола (БГТ). Так, при хроматографировании на данной колонке смеси антиоксидантов время удерживания 3-изомера БГА и БГТ одинаковое — 1,97 мин (подвижная фаза ацетонитрил–вода (99,5:0,5)).

На колонках с нитрильными сорбентами не происходит разделение изомеров БГА ни в условиях обращенно-фазовой хроматографии (при содержании ацетонитрила или метанола в подвижной фазе 20–45 %), ни в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (при содержании ацетонитрила в подвижной фазе свыше 95 %) [16].

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ГОМОЛОГИЧЕСКОГО РЯДА ПАРАБЕНОВ

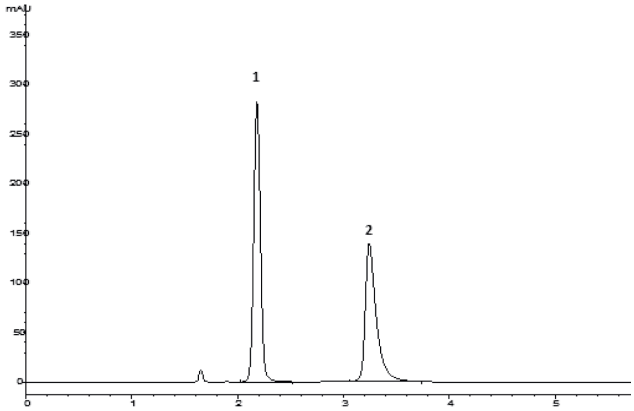
Эфиры пара-гидроксибензойной кислоты (название соединений по Европейской фармакопее), или парабены (название соединений по Фармакопее США) из-за присущей им антимикробной активности применяются в качестве консервантов при производстве лекарственных средств. Условия хроматографирования парабенов по методикам Европейской фармакопеи и Фармакопеи США совпадают [18, 19]. Анализ согласно указанным монографиям проводится методом обращенно-фазовой хроматографии на колонках С18 150×4,6 мм (5 мкм) с подвижной фазой водный раствор 6,8 г/л KH_2PO_4–метанол (35:65).

Из-за присутствия фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений можно ожидать схожести поведения парабенов и антиоксиданта БГА на колонках с иными типами сорбентов в условиях жидкостной хроматографии



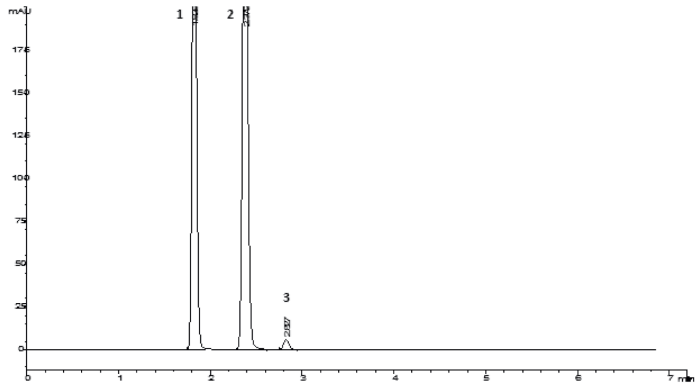
1 — цисплатин, *2* — оксалиплатин, *3* — карбоплатин
1 — cisplatin, *2* — oxaliplatin, *3* — carboplatin

Рис. 5. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [13]*
Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (85:15); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм
Fig. 5. *Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [13]*
Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (85:15); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 220 nm



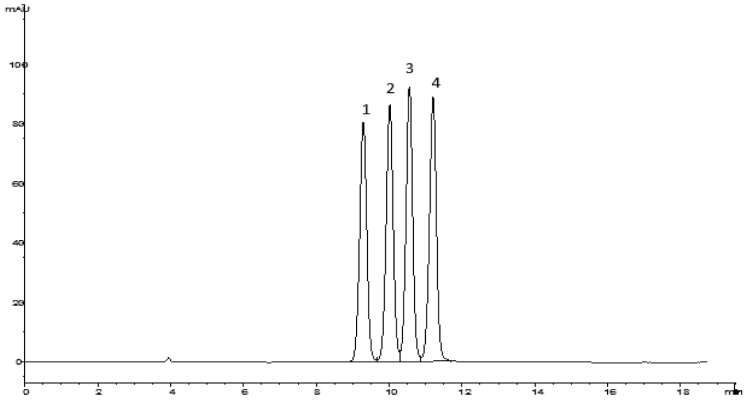
1 — смесь цисплатина с карбоплатином, *2* — оксалиплатин
1 — mixture of cisplatin and carboplatin, *2* — oxaliplatin

Рис. 6. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [13]*
Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (2:98); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм
Fig. 6. *Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [13]*
Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (2:98); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 220 nm



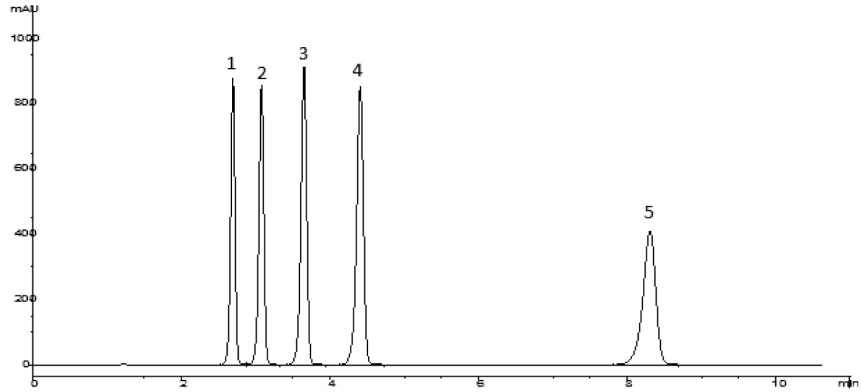
1 — бутилгидрокситолуол (БГТ), *2* — 2-изомер бутилгидроксианизола (2-БГА), *3* — 3-изомер бутилгидроксианизола (3-БГА)
1 — butylhydroxytoluene (BHT), *2* — 2-isomer of butylhydroxyanisole (2-BHA), *3* — 3-isomer of butylhydroxyanisole (3-BHA)

Рис. 7. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов БГА и БГТ [17]. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (99,5:0,5); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 280 нм*
Fig. 7. *Chromatogram of the model mixture of BHT and BHA reference standards [17]. Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (99.5:0.5); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 280 nm*



1 — н-гептилпарабен, *2* — бутилпарабен, *3* — этилпарабен, *4* — метилпарабен
1 — n-heptylparaben, *2* — butylparaben, *3* — ethylparaben, *4* — methylparaben

Рис. 8. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов [20]. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–водный раствор 2 мМ KH_2PO_4 (98:2); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм*
Fig. 8. *Chromatogram of the model mixture of reference standards of parabens [20]. Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water solution 2 mM KH_2PO_4 (98:2); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm*

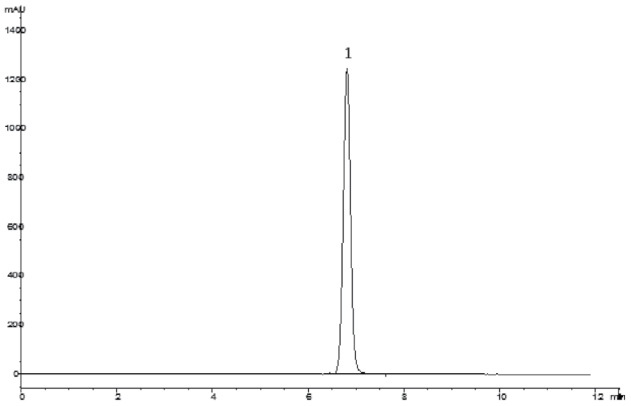


1 — метилпарабен, *2* — этилпарабен, *3* — пропилпарабен, *4* — бутилпарабен, *5* — н-гептилпарабен
1 — methylparaben, *2* — ethylparaben, *3* — propylparaben, *4* — butylparaben, *5* — n-heptylparaben

Рис. 9. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов [25]. Условия анализа: колонка Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (40:60); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм*
Fig. 9. *Chromatogram of the model mixture of reference standards of parabens [25]. Test conditions: column — Zorbax XDB CN 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (40:60); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm*

гидрофильных взаимодействий. На рисунке 8 приведена хроматограмма разделения модельной смеси парабенов на колонке Zorbax NH_2, при этом меняется очередность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией [20].

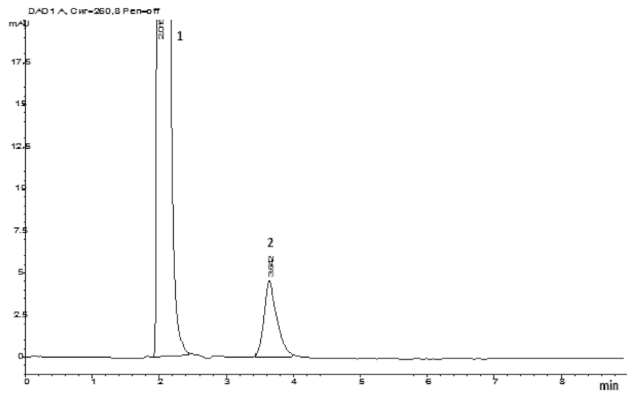
Следует отметить, что разрешение между пиками парабенов на колонках с аминосорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных



1 — 4-гидроксибензойная кислота. *1* — 4-hydroxybenzoic acid

Рис. 10. *Хроматограмма стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты [25]. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–1 % уксусная кислота в воде (80:20); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм*

Fig. 10. *Chromatogram of 4-hydroxybenzoic acid reference standard [25]. Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–1 % acetic acid in water (80:20); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm*



1 — смесь метил-, этил-, пропил- и бутилпарабенов, *2* — 4-гидроксибензойная кислота
1 — mixture of methyl-, ethyl-, propyl-, and butylparabens, *2* — 4-hydroxybenzoic acid

Рис. 11. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов и 4-гидроксибензойной кислоты [20]. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (97:3); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм*

Fig. 11. *Chromatogram of the model mixture of paraben and 4-hydroxybenzoic acid reference standards [20]. Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (97:3); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm*

взаимодействий ниже, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии (рис. 9).

На колонке с амидным сорбентом XBridge Amide парабены практически не могут быть разделены в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [21]. В отличие от аминогрупп нитрильные и амидные группы не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенов. Хроматографические колонки с амино- и амидными сорбентами могут быть применены для определения примеси в парабенах 4-гидроксибензойной кислоты в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (рис. 10, 11).

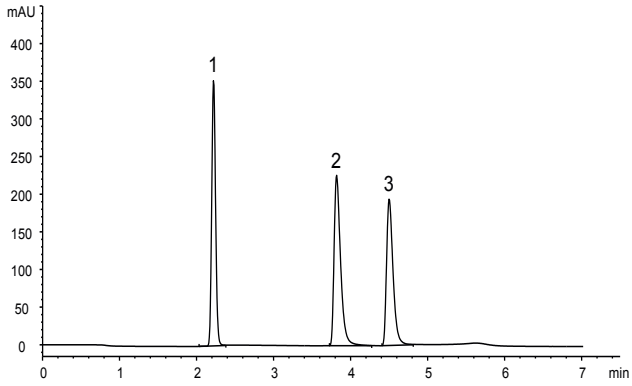
При определении 4-гидроксибензойной кислоты проявляется отличие в свойствах хроматографических колонок с амино- и амидными сорбентами. Аминосорбент Zorbax NH_2 представляет собой ионообменник, и для элюирования 4-гидроксибензойной кислоты с колонки необходимо применять подвижные фазы, содержащие 20–30 водных частей 1 % уксусной кислоты. Уксусная кислота вытесняет 4-гидроксибензойную кислоту с аминогрупп сорбента. Амидный сорбент XBridge Amide не обладает ионообменными свойствами, для элюирования 4-гидроксибензойной кислоты в составе подвижной фазы достаточно только 1–2 % воды [25].

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА НИТРАТОВ ИЗОСОРБИДА

Лекарственные средства, содержащие нитроэфиры изосорбида и применяемые в кардиологической практике, представлены в настоящее время препаратами изосорбида динитрата (ИСДН) и изосорбида 5-мононитрата (ИСМН). Действующим веществом ИСМН является 5-нитро изомер ИСМН (5-изомер ИСМН). Содержание примеси 2-нитро изомера ИСМН (2-изомер ИСМН), а также ИСДН контролируется в субстанции и лекарственных препаратах ИСМН [21, 22].

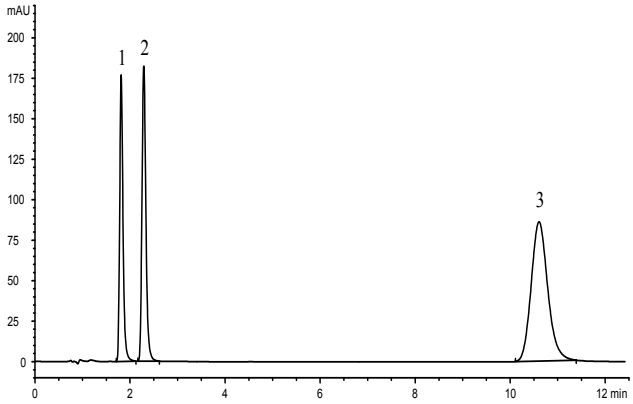
Для анализа ИСМН и ИСДН наряду с нормально-фазовой хроматографией применяют обращенно-фазовую хроматографию. Кроме этого, на колонках с аминосорбентами нитраты изосорбида уверенно разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [23]. Следует также отметить, что с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличивается разрешение между пиками ИСДН и изомеров ИСМН. По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией на колонках С18 (подвижные фазы: смеси метанол–вода или ацетонитрил–вода) меняется очередность элюирования ИСДН и 5-изомера ИСМН. Однако последовательность элюирования 2-изомера и 5-изомера ИСМН остается той же, что и для обращенно-фазовой хроматографии (рис. 12, 13).

Необходимо также отметить, что даже при применении подвижной фазы ацетонитрил–вода (99:1) ИСДН и изомеры ИСМН не разделяются и элюируются с колонки Zorbax SB CN одним пиком (1,69 мин). Аналогично невозможно разделить ИСДН и изомеры ИСМН на амидной колон-



1 — изосорбида динитрат, *2* — 2-изомер изосорбида мононитрата, *3* — 5-изомер изосорбида мононитрата
1 — isosorbide dinitrate, *2* — 2-isomer of isosorbide mononitrate, *3* — 5-isomer of isosorbide mononitrate

Рис. 12. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата [23]*
Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм, (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (99,5:0,5); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 210 нм
Fig. 12. *Chromatogram of the model mixture of isosorbide dinitrate and isomers of isosorbide mononitrate reference standards [23]*
Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 µm); mobile phase — acetonitrile–water (99.5:0.5); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 210 nm



1 — 2-изомер изосорбида мононитрата, *2* — 5-изомер изосорбида мононитрата, *3* — изосорбида динитрат
1 — 2-isomer of isosorbide mononitrate, *2* — 5-isomer of isosorbide mononitrate, *3* — isosorbide dinitrate

Рис. 13. *Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов и изомеров изосорбида мононитрата и изосорбида динитрата [24]*
Условия анализа: колонка Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4,6 мм; подвижная фаза: метанол–вода (10:90); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 210 нм
Fig. 13. *Chromatogram of the model mixture of isomers of isosorbide mononitrate and isosorbide dinitrate reference standards [24]*
Test conditions: column — Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4.6 mm; mobile phase — methanol–water (10:90); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 210 nm

ке XBridge Amide [17]. В отличие от аминогрупп нитрильные и амидные группы не обладают сродством к нитро- и гидроксильным группам этих соединений в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на накопленных за период 2013–2017 гг. данных, следует отметить, что если с увеличением содержания ацетонитрила в подвижных фазах резко увеличивается время удерживания анализируемых соединений и улучшается разрешение между их пиками — это свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминосорбентами отличаются от колонок с нитрильными и амидными сорбентами. Хроматографические колонки с аминосорбентами могут быть применены для анализа как гидрофильных соединений, так и некоторых гидрофобных соединений, содержащих кислотные или потенциально кислотные группировки (нитросоединения, бутилгидроксианизол, парабены). В результате исследований было установлено, что хроматографические колонки с нитрильными и амидными сорбентами, из всех рассмотренных в работе групп соединений, применимы только для анализа гидрофильных соединений (гидроксикарбамид) и координационных соединений платины.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.
Acknowledgements. The study was performed with no external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Осипов АС, Попова ОА, Грецкая ТН, Сулименкова АИ, Нездолеева МВ. Применение колонок с амино- и нитрильными сорбентами в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2017;(1):9–14. [Osipov AS, Popova OA, Gretskaya TN, Sulimenkova AI, Nezdolieva MV. Use of columns with amine and nitrile sorbents for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2017;(1):9–14 (In Russ.)]
2. Monograph: Hydroxycarbamide Capsules. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
3. Monograph: Hydroxycarbamide. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
4. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа гидроксикарбамида. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2015;(2):140–4. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the analysis hydroxycarbamide. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration.* 2015;(2):140–4 (In Russ.)]
5. 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. [Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Application of a chromatographic column with a nitrile sorbent for hplc analysis hydroxycarbamide. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsin-*

skogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. 2016;(3):58–61 (In Russ.)]
6. Monograph: Cisplatin for Injection. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
7. Monograph: Cisplatin. Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo; 2011.
8. Monograph: Cisplatin Injection. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
9. Monograph: Carboplatin. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
10. Monograph: Carboplatin for Injection. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
11. 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. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of a chromatographic column with a diol sorbent for the analysis of platinum coordination compounds. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J.* 2013;47(6):337–9]
12. 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. [Osipov AS, Nechaeva EB. Application of chromatographic columns with nitrile and phenyl sorbents to the analysis of platinum coordination compounds. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J.* 2014;48(8):548–51]
13. Осипов АС, Попова ОА, Рослякова НВ, Кожемякина ЛЛ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа координационных соединений платины. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017;(2):152–5. [Osipov AS, Popova OA, Roslyakova NV, Koshimaykina LL. The use of an amide sorbent chromatographic column for analysis of platinum coordination compounds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration.* 2017;(2):152–5 (In Russ.)]
14. Monograph: Butylated Hydroxyanisole. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
15. Monograph: Butylated Hydroxyanisole. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
16. 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. [Osipov AS, Nechaeva EB, Mironova MM, Kovaleva EL. Use of hydrophilic interaction liquid chromatography to separate butylhydroxyanisole isomers. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J.* 2015;49(3):203–5]
17. Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ, Грецкая ТН, Милкина СЕ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения позиционных изомеров бутилгидроксианизола и изосорбида мононитрата. *Фармация.* 2017;66(5):14–8. [Osipov AS, Popova OA, Larionova SG, Gretskaya TN, Milkina SE. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of positional isomers butylhydroxyanisole and isosorbide mononitrate. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2017;66(5):14–8 (In Russ.)]
18. Monograph: Methyl parahydroxybenzoate. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
19. Monograph: Methylparaben Sodium. United States Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
20. Осипов АС, Попова ОА, Милкина СЕ, Грецкая ТН, Сулименкова АИ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2018;8(1):56–60. [Osipov AS, Popova OA, Milkina SE, Gretskaya TN, Sulimenkova AI. The use of a chromatographic column packed with amide sorbent for the analysis of parabens. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2018;8(1):56–60 (In Russ.)]
21. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate. United States Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
22. Monograph: Isosorbide Mononitrate Tablets. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
23. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016;(3):108–11. [Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for analysis of organic nitrates. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration.* 2016;(3):108–11 (In Russ.)]
24. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Орлов ЕН. Применение монолитной колонки Chromolith SpeedROD RP-18e для разделения нитратов изосорбида. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2012;(8):20–3. [Osipov AS, Nechaeva EB, Orlov EN. Application of monolithic column Chromolith SpeedROD RP-18e for separate isosorbide nitrates. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2012;(8):20–3 (In Russ.)]
25. Осипов АС, Попова ОА, Сулименкова АИ, Нездольева МВ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа парабенов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017;(1):104–7. [Osipov AS, Popova OA, Sulimenkova AI, Nezdolieva MV. Application of hydrophylic interactions liquid chromatography for parabens analysis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration.* 2017;(1):104–7 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Осипов Алексей Сергеевич, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Попова Ольга Анатольевна, начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0003-2933-5632

Ларионова Светлана Геннадьевна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0002-1891-3567

Статья поступила 23.01.2018
Принята к печати 22.08.2018

AUTHORS

Alexey S. Osipov, Cand. Sci. (Biol.), chief expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia

Olga A. Popova, Head of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0003-2933-5632

Svetlana G. Larionova, Cand. Sci. (Pharm.), chief expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0002-1891-3567

Article was received 23 January 2018
Accepted for publication 22 August 2018