

Применение хроматографической колонки с нитрильным сорбентом для анализа гидроксикарбамида методом хроматографии гидрофильных взаимодействий

А. С. Осипов, Е. Б. Нечаева, Л. А. Трухачева

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 26.01.2016 г. Принята к печати 30.08.2016 г.

Резюме: Исследована возможность применения хроматографической колонки Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм) для разделения смеси гидроксикарбамида (гидроксимочевина) и его примеси мочевины. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды. Разделение анализируемых соединений на нитрильных колонках в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 90 %. При хроматографировании на нитрильной колонке Zorbax SB CN наблюдалось изменение очередности элюирования гидроксикарбамида и мочевины по сравнению с элюированием на аминоколонке Zorbax NH₂.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; хроматография гидрофильных взаимодействий; гидроксикарбамид (гидроксимочевина); нитрильный сорбент; фармакопей.

Библиографическое описание: Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение хроматографической колонки с нитрильным сорбентом для анализа гидроксикарбамида методом хроматографии гидрофильных взаимодействий. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (3): 58–61.

ВВЕДЕНИЕ

Гидроксикарбамид (название соединения по Европейской фармакопее), или гидроксимочевина (название по Фармакопее США), применяется в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. Препарат является антиметаболитом. Препарат описан в ведущих зарубежных фармакопеях. Среди зарегистрированных в Российской Федерации лекарственных препаратов для количественного определения гидроксикарбамида (ГК) наиболее часто применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), приведенный в Британской фармакопее [1]. Хроматографирование проводят на колонках с сорбентами C18, в качестве подвижной фазы используют воду. В фармакопейной статье для анализа препаратов ГК рекомендовано использовать хроматографическую колонку Spherisorb ODS2 250×4,6 мм. Также используется методика Европейской фармакопее [2] для количественного определения и определения примесей (иных, чем мочевины) в субстанции ГК. Хроматографирование проводят также на колонках C18, в качестве подвижной фазы применяют смесь метанола и воды (5:95). 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 монографиях Фармакопее США рекомендовано использовать колонки Spherisorb ODS1 250×4,6 мм или Supelcosil LC-18 250×4,6 мм. Во всех фармакопейных хроматографических методиках детектирование проводят при 214 нм.

В большинстве нормативных документов на зарегистрированные в РФ препараты ГК контролируется содержание примеси — мочевины (не более 0,5). Для

этих целей используют либо методику Европейской фармакопее (ТСХ на пластинках с силикагелем; подвижная фаза — смесь пиридина, воды и этилацетата (2:2:10)), либо методику Британской фармакопее (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. В соответствующей монографии Фармакопее США содержание мочевины в капсулах препарата не регламентировано [4]. Применение метода ВЭЖХ для разделения ГК и мочевины в зарубежных фармакопеях не описано. Необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии ГК и мочевины не разделяются. Ранее была показана возможность применения хроматографических колонок с аминок- и диольными сорбентами для разделения смесей ГК и мочевины [5].

Цель работы — исследование возможности применения жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC) для разделения ГК и мочевины на хроматографической колонке с нитрильным сорбентом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на хроматографе Agilent, серии 1100 с диодно-матричным детектором («Agilent Technologies», США). Тестировали колонку с нитрильным сорбентом Zorbax SB CN 150×4,6 мм, 5 мкм, а также колонку с аминоксорбентом Zorbax NH₂ 150×4,6 мм, 5 мкм («Agilent Technologies», США). В работе использовали ацетонитрил для градиентной

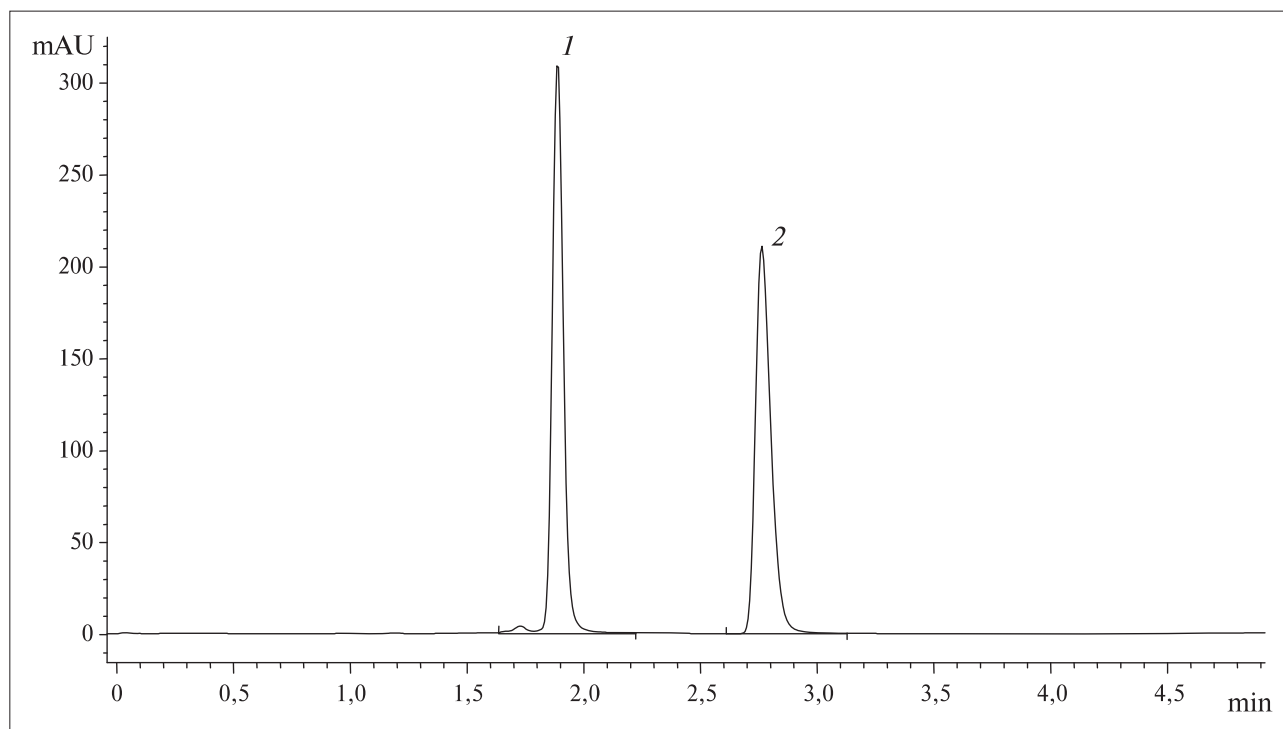


Рис. 1. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов мочевины и гидроксикарбамида. Условия анализа: колонка Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза — ацетонитрил–вода (95:5); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование — 200 нм. 1 — гидроксикарбамид; 2 — мочевина

хроматографии («Merck», Германия). Детектирование осуществляли при 214, 200 и 195 нм. Ввод образцов в объеме 10 мкл. В работе использовали 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 нитрильными сорбентами могут быть, в зависимости от анализируемых объектов, как близки [6, 7], так и кардинально отличаться от колонок с аминсорбентами [8]. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси стандартных образцов мочевины и ГК. 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

Таблица 1

ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ И РАЗРЕШЕНИЕ МЕЖДУ ПИКАМИ МОЧЕВИНЫ И ГИДРОКСИКАРБАМИДА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ*

Наименование колонки; состав подвижной фазы, скорость потока	Время удерживания мочевины (мин)	Время удерживания ГК (мин)	Эффективность колонки по пику мочевины (т. т.)	Разрешение между пиками мочевины и ГК
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (80:20), 1 мл/мин	2,80	3,00	7940	1,47
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (85:15), 1 мл/мин	3,11	3,38	8850	1,91
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (90:10), 1 мл/мин	3,61	4,09	9370	2,95
Zorbax SB CN 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (93:7), 1 мл/мин	2,31	1,76	8470	5,58
Zorbax SB CN 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (95:5), 1 мл/мин	2,77	1,89	7110	7,61
Zorbax SB CN 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил — вода (98:2), 1 мл/мин	4,82	2,38	3620	11,17

* Средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования

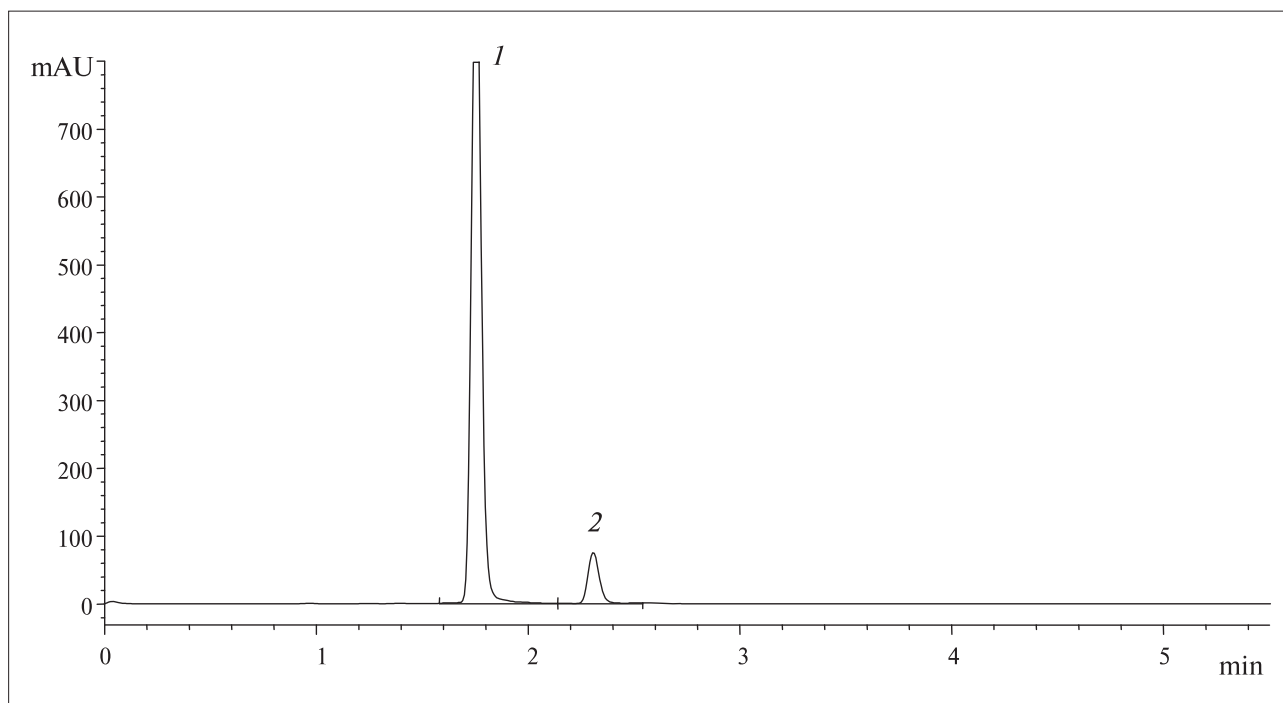


Рис. 2. Хроматограмма препарата «Гидроксикарбамид-ЛЭНС», капсулы 500 мг с добавкой мочевины. Условия анализа: колонка Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза — ацетонитрил—вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование — 200 нм. 1 — гидроксикарбамид; 2 — мочевина

жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Кроме того, на колонке Zorbax SB CN меняется очередность элюирования ГК и мочевины (рис. 1) по сравнению с колонкой Zorbax NH₂. При переводе длины волны детектирования с 214 нм на 200 нм площадь пика, а следовательно, и чувствительность определения по мочеvine возрастает в 26 раз, чувствительность определения ГК возрастает в 6,9 раз. В дальнейшем с уменьшением длины волны с 200 до 195 нм площадь пика мочевины возрастает только в 2,4 раз, а площадь пика ГК в 1,4 раз. Следует отметить, что столь значительное увеличение чувствительности определения при уменьшении длины волны детектирования сопряжено с использованием ацетонитрила высокой степени чистоты.

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 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере колонки Zorbax SB CN показано, что хроматографические колонки с нитрильными сорбентами могут быть использованы для определения

примеси мочевины в препаратах гидроксикарбамида. Хроматография смесей мочевины и гидроксикарбамида на данных колонках может быть применена для подтверждения пригодности хроматографической системы при анализе мочевины методом ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. British Pharmacopoeia 2012. Monograph: Hydroxycarbamide Capsules.
2. European Pharmacopoeia. Edition 8.0. Monograph: Hydroxycarbamide.
3. The United States Pharmacopoeia 38. Monograph: Hydroxyurea.
4. The United States Pharmacopoeia 38. Monograph: Hydroxyurea Capsules.
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, Победин ОА. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины. Химико-фармацевтический журнал 2013; **47**(6): 51–3.
7. 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.
8. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксанизола. Химико-фармацевтический журнал 2015; **49**(3): 50–2.

ОБ АВТОРАХ

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

Осипов Алексей Сергеевич. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

Нечаева Екатерина Борисовна. Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

Трухачева Людмила Андреевна. Ведущий эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Осипов Алексей Сергеевич; Osipov@expmed.ru

CHROMATOGRAPHIC COLUMN WITH NITRILE SORBENT USED IN THE ANALYSIS OF HYDROXYCARBAMIDE BY HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY

A. S. Osipov, E. B. Nechaeva, L. A. Truhacheva

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

Abstract: The possibility of using chromatographic columns Zorbax SB CN 150×4,6 mm (5 μm) for separation of hydroxycarbamide (hydroxyurea) and its impurity urea has been investigated. The mixture of acetonitrile and water has been used as a mobile phase used. Separation of analytes on nitrile columns under the conditions of hydrophilic interaction liquid chromatography is possible only when the content of acetonitrile in the mobile phase is more than 90 %. When performing chromatographic procedure with Zorbax SB CN on nitrile column, the change in elution order of hydroxycarbamide and urea has been detected, compared to the elution order on amino column Zorbax NH₂.

Key words: high-performance liquid chromatography; hydrophilic interaction liquid chromatography; hydroxycarbamide (hydroxyurea); nitrile sorbent; pharmacopoeia.

For citation: 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.

REFERENCES

1. British Pharmacopoeia 2012. Monograph: Hydroxycarbamide Capsules.
2. European Pharmacopoeia. Edition 8.0. Monograph : Hydroxycarbamide.
3. The United States Pharmacopoeia 38. Monograph: Hydroxyurea.
4. The United States Pharmacopoeia 38. Monograph: Hydroxyurea Capsules.
5. Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. The use of hydrophilic interaction liquid chromatography for analysis of hydroxyurea. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2015; (2): 140–4 (in Russian).
6. Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. The use of column chromatography with diol sorbent for analysis of diesel platinum coordination compounds. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2013; **47**(6): 51–3 (in Russian).
7. Osipov AS, Nechaeva EB. The use of chromatographic columns with nitrile and phenyl sorbents for the analysis of coordination compounds of platinum. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2014; **48**(8): 45–8 (in Russian).
8. Osipov AS, Nechaeva EB, Mironova MM, Kovaleva EL. The use of liquid chromatography of hydrophilic interactions for separation of butylhydroxyanisole isomers. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2015; **49**(3): 50–2 (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 laboratory of chemical and pharmaceutical products № 2 of Test Center of quality expertise of medicines.

Candidate of Biological Sciences.

Nechaeva EB. Deputy chief of Test Center of quality expertise of medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Truhacheva LA. Leading expert of laboratory of chemical and pharmaceutical products № 2 of Test Center of quality expertise of medicines.

Candidate of Pharmaceutical Sciences.