

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, 6

1 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 6, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Osipov@expmed.ru
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31 03

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ

А.С. Осипов^{1*}, Е.Б. Нечаева¹, Л.А. Трухачёва¹

Резюме. Исследована возможность применения хроматографических колонок с аминсорбентами для анализа нитроглицерина и разделения изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды. Разделение анализируемых соединений на колонках с аминсорбентами в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 95%. Лучшее разделение изомеров изосорбида мононитрата наблюдалось на колонке Zorbax NH₂, 150×4,6 мм, при содержании ацетонитрила в подвижной фазе 99,8%. Разделение изосорбида динитрата и изосорбида мононитратов на колонках с аминсорбентами приводило к изменению последовательности элюирования этих соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией.

Ключевые слова: ВЭЖХ, глицерина тринитрат (нитроглицерин), изосорбида динитрат, изосорбида мононитрат.

APPLICATION OF HYDROPHILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ORGANIC NITRATE ANALYSIS

A.S. Osipov^{1*}, E.B. Nechaeva¹, L.A. Truhacheva¹

Abstract. The possibility of the use of chromatographic columns with amino sorbents for the analysis of nitroglycerin and separation of isosorbide dinitrate and isomers of isosorbide mononitrate was investigated. As the mobile phase used a mixture of acetonitrile and water. Separation of analytes on amino columns in condition of the hydrophilic interaction liquid chromatography possible with acetonitrile content in the mobile phase, more 95%. Best separation isomers of isosorbide mononitrate on column Zorbax NH₂, 150×4,6 mm was achieved with acetonitrile content in the mobile phase 99,8%. Separation of isosorbide dinitrate and isosorbide mononitrates on columns with amino sorbents resulted in changing the sequence of elution of these compounds compared to reversed-phase chromatography.

Keywords: HPLC, HILIC, Glyceryl Trinitrate (Nitroglycerin), Isosorbide Dinitrate, Isosorbide Mononitrate.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства, содержащие органические нитраты, применяют в медицинской практике для лечения сердечной недостаточности. В настоящее время в основном применяют препараты, содержащие следующие действующие вещества: тринитрат глицерина (нитроглицерин), изосорбида динитрат (ИСДН) и изосорбида 5-мононитрат (ИСМН). Анализ препаратов и субстанции нитроглицерина обычно проводят на хроматографических колонках с сорбентами C18 в условиях обращенно-фазовой хроматографии с использованием смесей метанола с водой (1:1) либо ацетонитрила и воды (1:1) в качестве подвижных фаз [1, 2]. Для анализа близких по фармакологическому действию препаратов ИСМН и ИСДН наряду с обращенно-фазовой хроматографией [3–5] применяют нормально-фазовую хроматографию. В этом случае анализ проводят на колонках с аминсорбентами, в качестве

подвижной фазы используют смесь безводного этанола и 2,2,4-триметилпентана (15:85) [6]. Действующим веществом ИСМН является 5-нитроизомер ИСМН (5-изомер ИСМН). Содержание примеси 2-нитроизомера ИСМН (2-изомер ИСМН), а также ИСДН контролируется в субстанции и лекарственных препаратах ИСМН [3, 4]. Ранее было показано, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии для анализа органических нитратов могут быть применены колонки с фенильными и нитрильными сорбентами и их модификации [7, 8]. Однако необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии органические нитраты не разделяются на хроматографических колонках с аминсорбентами [8].

Препараты органических нитратов пролонгированного действия часто представляют собой сложную аналитическую матрицу, и иные, не фармакопейные, методы анализа лекарственных препара-

тов могут быть более предпочтительны. Таким образом, целью исследования являлось определение возможности применения альтернативных методов анализа органических нитратов, в частности жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC) на хроматографических колонках с амино- и нитрильными сорбентами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на хроматографе Agilent серии 1100 (Agilent Technologies, США). Тестировали колонки с аминсорбентами Lichrospher NH₂, 250×4,6 мм, 5 мкм (Merck, Германия), Zorbax NH₂, 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США), Luna NH₂, 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), а также колонку с нитрильным сорбентом Zorbax SB CN, 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Детектирование осуществляли при 210 нм (детектор DAD G1515B). Скорость потока элюента – 1,0 мл/мин. Ввод образцов в объёме 5 мкл. В работе использовали стандарт нитроглицерина [стандарт фирмы Egis, Венгрия, с содержанием действующего вещества 10,0% (смесь с лактозой), серия 005280698], а также стандартные образцы 5-изомера ИСМН (серия 4), 2-изомера ИСМН (серия 3) и ИСДН (серия 3) Европейской Фармакопеи. Подготовка проб: навеску стандарта (5 мг в пересчёте на действующее вещество) растворяли в 5 мл смеси ацетонитрил – вода (3:1), затем доводили до объёма 50 мл ацетонитрилом и перемешивали.

Анализировали препарат «Нитроглицерин», таблетки сублингвальные, 0,5 мг (изготовитель ООО «Озон», Россия, серия 020314, срок годности до 03.2017). Подготовка проб: 1 таблетку помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 5 мл ацетонитрила, обрабатывали ультразвуком 7 мин при периодическом перемешивании до полной дезинтеграции таблетки. Анализ проводили на 10 образцах. Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об./мин в течение 7 мин (центрифуга ELMi CM 50, Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминсорбентами могут быть в зависимости от анализируемых объектов как близки [9, 10], так и кардинально отличаться от колонок с нитрильными сорбентами [11]. Зависимость времени удерживания нитроглицерина от состава подвижной фазы изучали на колонке Zorbax NH₂, 150×4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды в соотношении 90:10 (фаза 1), 95:5 (фаза 2), 98:2 (фаза

3), 99:1 (фаза 4) и 99,5:0,5 (фаза 5). С увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе время удерживания нитроглицерина последовательно возрастает с 1,93 мин (фаза 1) до 2,19 мин (фаза 5), что свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В отличие от этого при хроматографировании на нитрильной колонке Zorbax SB CN время удерживания нитроглицерина не только не возрастает, но даже несколько уменьшается с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе – 1,84 мин (фаза 1) против 1,81 мин (фаза 5). Более того, даже при применении подвижной фазы ацетонитрил – вода (99:1) ИСДН и изомеры ИСМН не разделяются и элюируются с данной колонки одним пиком (1,69 мин). В отличие от аминогрупп нитрильные группы не обладают заметным сродством к нитрогруппам и гидроксильным группам анализируемых соединений в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Напротив, на колонках Zorbax NH₂ и Luna NH₂ нитраты изосорбида уверенно разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси стандартных образцов ИСДН и изомеров ИСМН. Причём с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличивается разрешение между пиками ИСДН и изомеров ИСМН (рисунок 1). По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией на колонках C18 (подвижные фазы: смеси метанол – вода или ацетонитрил – вода) меняется очерёдность элюирования ИСДН и 5-изомера ИСМН. Однако последовательность элюирования 2-изомера и 5-изомера ИСМН остаётся той же, что и для обращенно-фазовой хроматографии [12, 13] (рисунок 2).

При применении подвижной фазы ацетонитрил – вода (99,8:0,2) селективность сорбента Zorbax NH₂ к паре 2-изомер ИСМН / 5-изомер ИСМН составляет 1,18. Для сравнения [14]: селективность сорбента L1 (Zorbax ODS) в условиях обращенно-фазовой хроматографии [подвижная фаза: метанол – вода (25:75)] к данной паре изомеров ниже – 1,11. В условиях нормально-фазовой хроматографии [15] при применении подвижной фазы безводный этанол – 2,2,4-триметилпентан (15:85) селективность аминсорбента (Lichrosorb NH₂) к паре 2-изомер ИСМН / 5-изомер ИСМН составляет 1,37. Таким образом, разделение изомеров ИСМН в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий по крайней мере не хуже, чем разделение в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

Основываясь на предварительном исследовании по хроматографии нитроглицерина на колонке Zorbax NH₂, 150×4,6 мм, 5 мкм, для анализа таблеток нитроглицерина применили более длинную хрома-

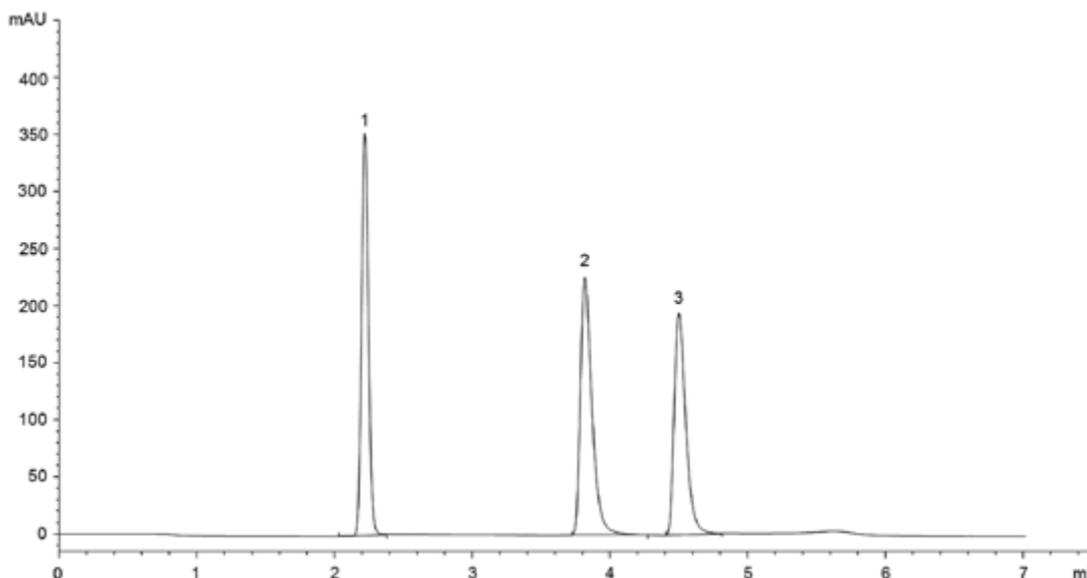


Рисунок 1. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата. Условия анализа: колонка Zorbax NH₂, 150×4,6 мм, (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – вода (99,8:0,2); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 210 нм.

1 – изосорбида динитрат, 2 – 2-изомер изосорбида мононитрата, 3 – 5-изомер изосорбида мононитрата

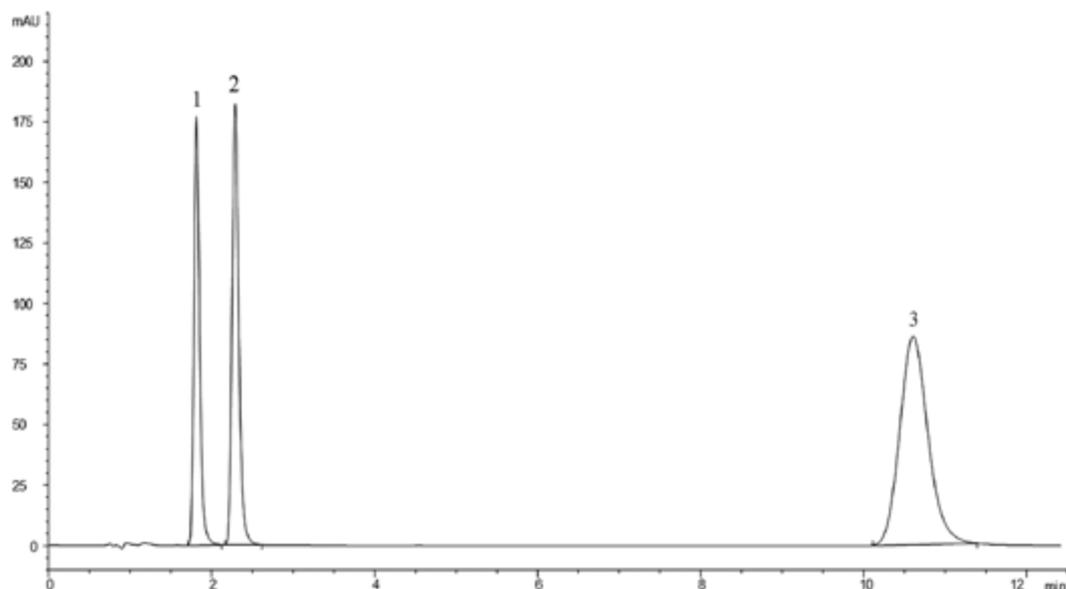


Рисунок 2. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов и изомеров изосорбида мононитрата и изосорбида динитрата.

Условия анализа: колонка Chromolith SpeedROD RP-18e, 50×4,6 мм; подвижная фаза: метанол – вода (10:90); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 210 нм.

1 – 2-изомер изосорбида мононитрата, 2 – 5-изомер изосорбида мононитрата, 3 – изосорбида динитрат (иллюстрация взята из работы [13])

тографическую колонку Lichrospher NH₂, 250×4,6 мм, 5 мкм [подвижная фаза: ацетонитрил – вода (98:2)]. При хроматографировании на данной колонке время удерживания нитроглицерина – 3,68 мин. Эффективность колонки по пику данного соединения составила 18000–19000 теоретических тарелок. Коэффициент асимметрии пика нитроглицерина – 1,0. Содержание

нитроглицерина в таблетке – 0,495 мг (99%) – среднее значение 10 определений однородности дозирования (RSD% = 2,68).

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации и последующей валидации альтернативной хроматографической методики определения органических нитратов.

Таблица 1.

Времена удерживания и разрешение между пиками ИСДН, 2-изомера ИСМН и 5-изомера ИСМН при различных условиях хроматографирования*

Условия анализа: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Время удерживания ИСДН	Время удерживания 2-изомера ИСМН	Время удерживания 5-изомера ИСМН	Разрешение между пиками ИСДН и 2-изомера ИСМН	Разрешение между пиками 2-изомера ИСМН и 5-изомера ИСМН
Zorbax NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (90:10), 1 мл/мин	2,00	2,25	2,38	–	–
Zorbax NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (98:2), 1 мл/мин	2,16	2,69	2,86	5,56	1,79
Zorbax NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1), 1 мл/мин	2,19	2,84	3,09	6,20	2,29
Zorbax NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5), 1 мл/мин	2,20	3,35	3,63	9,64	3,32
Zorbax NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2), 1 мл/мин	2,22	3,87	4,57	13,20	4,55
Luna NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1), 1 мл/мин	2,17	2,72	3,35	7,95	2,79
Luna NH ₂ , 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5), 1 мл/мин	2,18	3,02	3,46	9,12	3,12

Примечание: *средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования показано, что хроматографические колонки с аминокорбентами могут быть использованы для анализа органических нитратов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. При анализе нитратов изосорбида жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий является более удобной альтернативой нормально-фазовой хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Diluted Nitroglycerin // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
2. Monograph: Glyceryl Trinitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
3. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
4. Monograph: Isosorbide Mononitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
5. Monograph: Isosorbide Dinitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
6. Monograph: Diluted Isosorbide Dinitrate // European Pharmacopoeia, 8.0 ed. 2014.
7. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Н.Б. Дёмина и др. Применение хроматографических колонок отечественного производства для анализа препаратов органических нитратов // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 1. С. 46–49.
8. Е.Б. Нечаева, А.С. Осипов, Н.Б. Дёмина. Анализ лекарственных препаратов из группы органических нитратов на хроматографических колонках с различными типами сорбентов // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 4. С. 47–50.
9. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, О.А. Победин. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2013. Т. 47. № 6. С. 51–53.
10. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 8. С. 45–48.
11. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, М.М. Миронова, Е.Л. Ковалёва. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксианизола // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 3. С. 50–52.
12. А.С. Осипов, Е.Н. Орлов. Применение нитроалканов для анализа примесей в лекарственных препаратах нитратов изосорбида методом ВЭЖХ // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 11. С. 28–32.
13. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Е.Н. Орлов. Применение монолитной колонки Chromolith SpeedROD RP-18e для разделения нитратов изосорбида // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 8. С. 20–23.
14. Monograph: Isosorbide Mononitrate Extended – Release Tablets // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
15. Monograph: Isosorbide Dinitrate Sublingual Tablets // British Pharmacopoeia, 2009.