

УДК 615.07

## ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ С АМИДНЫМ СОРБЕНТОМ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

А.С. Осипов<sup>1\*</sup>, О.А. Попова<sup>1</sup>, Н.В. Рослякова<sup>1</sup>, Л.Л. Кожемякина<sup>1</sup>

**Резюме.** Хроматографическая колонка с амидным сорбентом (XBridge Amide) была использована для анализа координационных соединений Pt (II). Данные соединения могут быть проанализированы с помощью обращенно-фазовой хроматографии [подвижная фаза: ацетонитрил – H<sub>2</sub>O (2:98)] либо посредством жидкостной хроматографии гидрофильным взаимодействием [подвижная фаза: ацетонитрил – H<sub>2</sub>O, (90:10)]. Анализируемые соединения лучше разделялись в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. При использовании подвижных фаз с высоким содержанием ацетонитрила (более 80%) изменяются свойства колонки по отношению к координационным соединениям. Сорбция соединений Pt на амидных сорбентах при большом содержании ацетонитрила обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом Pt и амидными группами сорбентов.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий, карбоплатин, оксалиплатин, Фармакопея США, Европейская Фармакопея.

### APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC COLUMNS WITH AMIDE SORBENT TO THE ANALYSIS OF PLATINUM COORDINATION COMPOUNDS

A.S. Osipov<sup>1\*</sup>, O.A. Popova<sup>1</sup>, N.V. Raslyakova<sup>1</sup>, L.L. Koshimyakina<sup>1</sup>

**Abstract.** It was established that chromatographic column with amide sorbent (XBridge Amide) could be applied to the analysis of Pt (II) coordination compounds. The compounds could be analyzed by both reversed-phase chromatography [mobile phase: MeCN – H<sub>2</sub>O (2:98)] and hydrophilic interaction liquid chromatography [mobile phase: MeCN – H<sub>2</sub>O (90:10)]. The analytes were better resolved for hydrophilic interaction liquid chromatography. The properties of the amide columns differed substantially for analysis of Pt (II) coordination compounds using mobile phases with more 80% MeCN. Sorption of the Pt compounds to the amide columns at high MeCN contents was due to specific coordination interactions between the Pt atom and sorbent amides.

**Keywords:** HPLC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), Carboplatin, Oxaliplatin, United States Pharmacopeia; European Pharmacopeia.

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

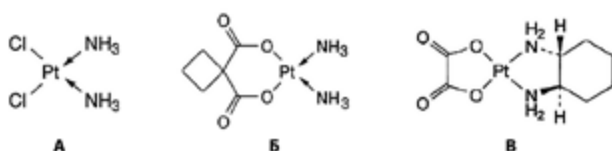
\* адресат для переписки:  
E-mail: Osipov@exrmed.ru  
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31–03

## ВВЕДЕНИЕ

Координационные соединения платины (II) применяют в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. В настоящее время из лекарственных средств данной фармакологической группы применяют в основном препараты, содержащие цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин (рисунок 1). Для контроля качества данных препаратов по показателям «количественное определение» и «посторонние примеси» применяют обращенно-фазовую и различные варианты ион-парной хроматографии на колонках с сорбентами C18 и C8. 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. В Фармакопее США и

Японской фармакопее [1, 2] для количественного определения цисплатина применяют хроматографирование на колонках с аминсорбентом с использованием подвижной фазы: этилацетат – метанол – диметилформамид – вода (25:16:5:5). В соответствующей монографии Британской Фармакопее [3] для количественного определения цисплатина на колонке с аминсорбентом приведена подвижная фаза иного состава: ацетонитрил – вода (90:10). Для количественного определения и определения хроматографической чистоты в субстанции и лекарственной форме карбоплатина [4–6] применяют колонки аналогичного типа и близкую по составу подвижную фазу: ацетонитрил – вода (87:13). Следует отметить, что в этих случаях при анализе соединений платины на аминсорбентах имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Хроматографические колонки других типов

для анализа координационных соединений платины (II) в ведущих зарубежных фармакопеях не описаны. Ранее была показана возможность применения для анализа координационных соединений платины (II), наряду с аминсорбентами [7], хроматографических колонок с диольными, нитрильными или фенильными сорбентами [8–10]. Амино-, диольные и нитрильные группы сорбентов в целом обладают сходными свойствами при разделении координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Причём колонки с диольными и нитрильными сорбентами могут быть использованы (по крайней мере теоретически) как в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий, так и в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Сорбенты с фенильными группами отличаются по свойствам от других исследованных сорбентов. Фенильные группы практически не обладают способностью взаимодействовать с атомами платины анализируемых соединений [9, 10]. Разделение координационных соединений платины по типу жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонках с фенильными сорбентами невозможно.



**Рисунок 1.** Структурные формулы координационных соединений платины (II):

**А** – цисплатин, **Б** – карбоплатин, **В** – оксалиплатин

Цель работы: исследовать возможность применения хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа координационных соединений платины, а также уточнить механизм их хроматографического разделения на данных колонках. Необходимо отметить, что хроматографические колонки с амидными сорбентами (амидами органических кислот) достаточно редки для жидкостной хроматографии и выпускаются ограниченным кругом хроматографических фирм, в частности фирмой Waters.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на хроматографе Agilent, серии 1100 (Agilent Technologies, США). Испытывали колонку XBridge Amide 150x4,6 мм; 3,5 мкм (Waters, Ирландия). Детектирование проводили при 220 нм. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Ввод образцов в объёме 5 мкл. Температура колонки – 20 °С. Температура автосемплера – 12 °С. В работе использовали стандартные образцы цисплатина (EP Cisplatin CRS, сер. 6), оксалиплатина (EP Oxaliplatin CRS, сер. 4) Европейской Фармакопеи, а также стандартный образец карбоплатина (USP Carboplatin RS, сер. H1F175)

Фармакопеи США. Стандартные образцы соединений платины вводили в хроматограф в растворителях, близких по составу к используемым подвижным фазам.

Анализировали лекарственные препараты «Карботера» (карбоплатин) 150 мг, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий во флаконах (серия СА647В, лаборатория «ТЮТОР С.А.С.И.Ф.И.А.», Аргентина), и «Плаксат» (оксалиплатин) 100 мг, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий во флаконах (серия ВС09004D, «С.К. Синдан-Фарма С.Р.Л.», Румыния). Подготовка проб: первоначально лекарственные препараты растворяли в воде до концентрации действующих веществ 1 мг/мл.

Препарат «Плаксат» (лиофилизат оксалиплатина) растворяли во флаконе в деминерализованной воде и количественно переносили раствор препарата в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки деминерализованной водой.

Препарат «Карботера» (лиофилизат карбоплатина) растворяли во флаконе в деминерализованной воде и количественно переносили раствор препарата в мерную колбу вместимостью 150 мл (мерная колба нестандартной вместимости), доводили до метки деминерализованной водой.

Затем полученные водные растворы препаратов разводили ацетонитрилом до концентрации действующих веществ 0,2 мг/мл (5 мл водного раствора препарата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, перемешивали с 15 мл ацетонитрила и доводили до метки тем же растворителем). Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин (центрифуга ELMi CM 50, Латвия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования координационных соединений платины на колонке с амидным сорбентом XBridge Amide, а также на колонках с нитрильными сорбентами Nova-Pak CN HP и Zorbax Eclipse XDB-CN, полученные ранее [10]. Очередность элюирования компонентов анализируемой смеси на колонке XBridge Amide имела аналогичный характер, что и на колонках с нитрильными сорбентами. Увеличение времени удерживания с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе от 80 до 90 частей, а также увеличение разрешения между пиками оксалиплатина и карбоплатина свидетельствует о том, что на колонке XBridge Amide разделение координационных соединений платины протекает по нормально-фазовому механизму жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

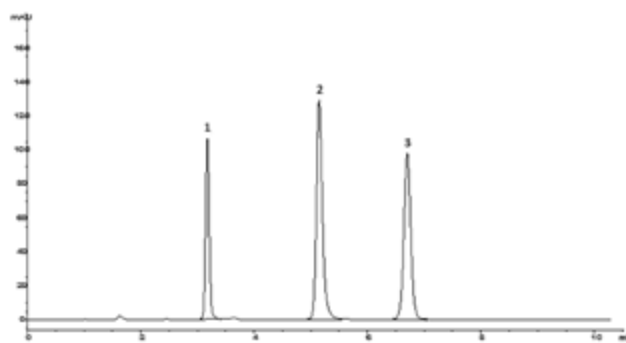
Разделение компонентов анализируемой смеси на колонке XBridge Amide возможно как в услови-

ях обращенно-фазовой (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 меняется очерёдность элюирования оксалиплатина и карбоплатина (рисунки 2 и 3). Также необходимо отметить, что в обращенно-фазовых условиях не было достигнуто разделения пиков цисплатина и карбоплатина на колонке XBridge Amide. В целом, разделение координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий значительно лучше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

При высоком содержании ацетонитрила в подвижных фазах сорбция соединений платины на амидных, диольных, нитрильных и аминоколонках обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом платины и амино-, диольными, нитрильными или амидными группами сорбентов. При низком содержании ацетонитрила и, соответственно, высоком содержании воды в подвижных фазах атомы платины анализируемых соединений полностью гидратированы молекулами воды. В этом случае сорбция координационных соединений осуществляется за счёт гидрофобных взаимодействий лигандов данных

соединений и алкильными группировками, расположенными на поверхности сорбента.

При хроматографировании на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм) с использованием подвижной фазы «ацетонитрил – вода» (85:15) было подтверждено заявленное изготовителем количественное содержание оксалиплатина и карбоплатина в лекарственных препаратах. При этом использовались стандарты EP Oxaliplatin CRS и USP Carboplatin RS.



**Рисунок 2.** Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм).

Условия анализа: подвижная фаза – ацетонитрил – вода (85:15); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм.

1 – цисплатин, 2 – оксалиплатин, 3 – карбоплатин

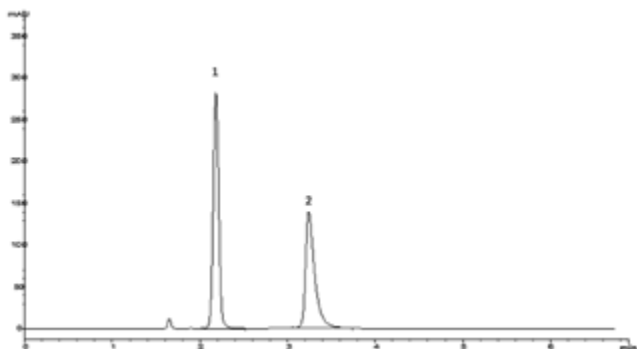
**Таблица 1.**

**Времена удерживания (Т) координационных соединений платины и разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина на колонках с различными типами сорбентов\***

Наименование колонки; скорость потока; состав подвижной фазы	Т, мин цисплатина	Т, мин оксалиплатина	Т, мин Карбоплатина	Разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (80:20)	2,82	3,88	4,72	5,21
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (85:15)	3,18	5,15	6,71	7,74
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (90:10)	3,98	7,37	11,70	11,08
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (5:95)	2,12	2,87	2,12 (не разделяется с цисплатином)	6,06
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (2:98)	2,18	3,24	2,18 (не разделяется с цисплатином)	7,45
Nova-Pak CN HP 150x3,9 мм, 4 мкм; 0,72 мл/мин; ацетонитрил – вода (90:10)	1,63	2,28	2,73	3,80
Nova-Pak CN HP 150x3,9 мм, 4 мкм; 0,72 мл/мин; ацетонитрил – вода (3:97)	1,65	2,36	1,82	4,95
Zorbax Eclipse XDB-CN 150x4,6 мм, 5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (3:97)	1,81	6,63	2,02	3,27

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





**Рисунок 3.** Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм).

Условия анализа: подвижная фаза – ацетонитрил – вода (2:98); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм.

1 – цисплатин совместно с карбоплатином, 2 – оксалиплатин

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере хроматографической колонки XBridge Amide показано, что колонки с амидными сорбентами могут быть использованы для анализа карбоплатина и оксалиплатина в лекарственных препаратах. Разделение компонентов анализируемой смеси на колонках с амидными сорбентами может

осуществляться как по механизму хроматографии гидрофильных взаимодействий, так и по обращенно-фазовому механизму.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Cisplatin for Injection // United State Pharmacopoeia 39.
2. Monograph: Cisplatin // Japanese Pharmacopoeia XVI.
3. Monograph: Cisplatin Injection // British Pharmacopoeia 2012.
4. Monograph: Carboplatin // European Pharmacopoeia edition 8.0..
5. Monograph: Carboplatin for Injection // United State Pharmacopoeia 39.
6. Monograph: Carboplatin Injection // British Pharmacopoeia 2012.
7. А.С. Осипов, В.П. Бобылев В.П., Е.Б. Нечаева и др. Применение ВЭЖХ для анализа соединений платины в лекарственных препаратах // Биомедицина. 2010. № 5. С. 107–109.
8. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, О.А. Победин. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. Т. 47. № 6. 2013. С. 51–53.
9. Е.Б. Нечаева, А.С. Осипов, О.А. Победин. Применение хроматографических колонок с фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Вестник НЦЭСМП, 2014. № 4. С. 3–7.
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.



## ZIRBUS Sublimator 25

### ПОЛУПРОМЫШЛЕННЫЕ СУБЛИМАЦИОННЫЕ СУШИЛКИ

Двухкамерная система с разделением сушильной и конденсаторной камер

Функция автоматической стерилизации на месте

Функция автоматической очистки на месте CIP

Проведение IQ/OQ валидационных работ

#### Конденсор:

- Температура конденсора:  $\geq -80$  °C
- Объем конденсора: 95 л
- Максимальная производительность до 25 кг/24 ч
- Скорость охлаждения: от +20 до -40 °C за 30 мин
- Встроенный датчик измерения T в конденсоре

#### Сушильная камера:

- Объем прямоугольной сушильной камеры: 211 л
- Специальный порт для проведения валидации DN25
- Управление: с помощью цифрового сенсорного дисплея 7,0"
- Датчик вакуума Пирани
- Оттаивание с помощью горячего газа
- Воздушное охлаждение за счет каскадной системы из 2 компрессоров

СУБЛИМАЦИОННЫЕ СУШКИ ОТ ZIRBUS –  
НЕМЕЦКОЕ КАЧЕСТВО И 25-ЛЕТНИЙ  
ОПЫТ ТЕХНОЛОГИЙ!

