

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2014

А. С. Осипов, Е. Б. Нечаева

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК С НИТРИЛЬНЫМИ И ФЕНИЛЬНЫМИ СОРБЕНТАМИ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Установлено, что хроматографические колонки с нитрильными сорбентами Nova-Pak CN HP и Zorbax Eclipse XDB-CN могут быть применены для анализа координационных соединений платины(II). Анализ соединений может быть выполнен как в условиях обращенно-фазовой хроматографии (подвижная фаза ацетонитрил — вода 3:97), так и в условиях нормально-фазовой хроматографии (подвижная фаза ацетонитрил — вода, 96:4). Лучшее разрешение анализируемых компонентов достигнуто в условиях нормально-фазовой хроматографии. Хроматографические колонки с разнообразными фенильными сорбентами и пентафторфенильным сорбентом Discovery HS F5 могут быть использованы для анализа координационных соединений платины только в условиях обращенно-фазовой хроматографии (подвижная фаза ацетонитрил — вода 5:95). Свойства колонок с нитрильными и фенильными сорбентами при анализе координационных соединений платины с использованием подвижных фаз с содержанием ацетонитрила более 90 % значительно отличаются. При высоком содержании ацетонитрила сорбция соединений платины на нитрильных колонках обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом платины и нитрильными группами сорбента. В отличие от этого фенильные группы, как установлено в ходе исследования, практически не обладают подобной способностью.

Ключевые слова: ВЭЖХ; оксалиплатин; карбоплатин.

Координационные соединения платины(II) применяют в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. Механизм противоопухолевого действия координационных соединений платины связан со способностью к бифункциональному алкилированию цепей ДНК, ведущему к подавлению биосинтеза нуклеиновых кислот и гибели злокачественных клеток [1]. В настоящее время из лекарственных средств данной фармакологической группы применяют в основном препараты, содержащие цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин. Структурные формулы этих соединений приведены на рис. 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 Американской и Японской Фармакопеех [2, 3] 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 фармакопеи [4] 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 [5 – 7] применяют колонки аналогичного типа и подвижную фазу ацетонитрил — вода (87:13). Следует отметить, что в этом случае при анализе соединений платины на аминсорбентах имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC). Хроматографические колонки других типов для анализа координационных соединений платины(II) в ведущих международных фармакопеех не описаны. Цель работы — исследовать возможность применения колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины, а также уточнить механизм их хроматографического разделения на данных колонках.

Экспериментальная часть

Работа проводилась на хроматографе "Agilent", серии 1100 (Agilent Technologies, США). Использовались колонки следующих фирм: Advanced

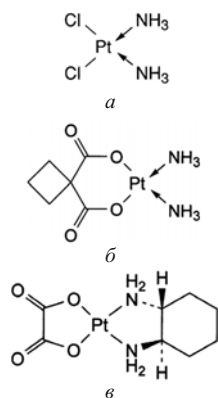


Рис. 1. Структурные формулы координационных соединений платины(II): *a* — цисплатин; *b* — карбоплатин; *в* — оксалиплатин.

Chromatography Technologies (Шотландия), Phenomenex (США), Supelco (США), БиоХимМак (Россия), Waters (США) и Agilent Technologies (США). Детектирование проводили при 220 нм. Скорость потока элюента — 1 мл/мин или 0,72 мл/мин (в зависимости от диаметра колонок). Ввод образцов в объеме 5 или 3,6 мкл (для колонки Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм, 4 мкм). В работе использовали стандартные образцы цисплатина (USP Cisplatin RS), оксалиплатина (USP Oxaliplatin RS) и карбоплатина (USP Carboplatin RS) Фармакопеи США. Анализировали препараты оксалиплатина (“Оксатера”, 100 мг) и карбоплатина (“Карботера”, 50 мг), (производитель — Laboratory TUTEUR S. A. C. I. F. I. A., Аргентина), в лекарственной форме — лиофилизаты для пригото-

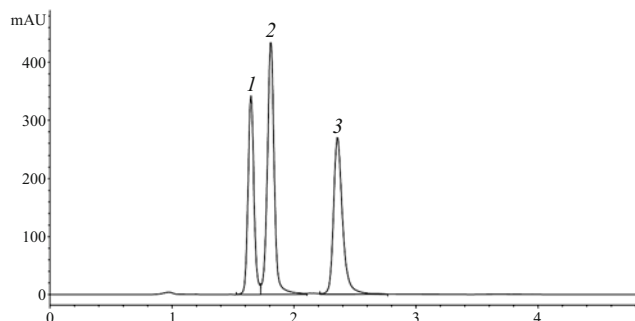


Рис. 2. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм (4 мкм). Условия анализа: подвижная фаза ацетонитрил — вода (3:97); скорость потока — 0,72 мл/мин; детектирование при 220 нм: 1 — цисплатин; 2 — карбоплатин; 3 — оксалиплатин.

ления растворов для инфузий. Подготовка проб: готовили водные растворы препаратов с концентрацией действующих веществ, равной 1 мг/мл, полученные растворы разбавляли подвижными фазами до концентрации действующих веществ, равной 0,2 мг/мл. Испытуемые растворы фильтровали через мембранный капроновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (БиоХимМак, Россия).

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведены результаты хроматографирования координационных соединений платины на колонках с нитрильными сорбентами. Разделение компонентов анализируемой смеси на колонках Nova-Pak CN HP и Zorbax Eclipse XDB-CN возможно как в условиях

Таблица 1

Времена удерживания (*T*) координационных соединений платины и разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина на колонках с нитрильными сорбентами *

Наименование колонки, скорость потока, состав подвижной фазы	<i>T</i> , мин			Разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина
	цисплатина	карбоплатина	оксалиплатина	
Диасфер 110 C10CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (5:95)	1,94	2,25	2,86	3,93
Диасфер 110 C10CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, метанол — вода (5:95)	1,93	2,62	3,43	4,65
Диасфер 110 C10CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, метанол — вода (10:90)	1,89	2,34	2,79	3,10
Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм, 4 мкм, 0,72 мл/мин, ацетонитрил — вода (3:97)	1,65	1,81	2,36	4,95
Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм, 4 мкм, 0,72 мл/мин, метанол — вода (3:97)	1,65	1,83	2,89	7,08
Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм, 4 мкм, 0,72 мл/мин, ацетонитрил — вода (90:10)	1,63	2,72	2,27	3,80
Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм, 4 мкм, 0,72 мл/мин, ацетонитрил — вода (95:5)	1,68	6,63	3,82	11,40
Zorbax Eclipse XDB-CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (3:97)	1,81	2,02	2,32	2,04
Zorbax Eclipse XDB-CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, метанол — вода (3:97)	1,81	2,05	2,46	3,27
Zorbax Eclipse XDB-CN 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (96:4)	1,64	3,68	2,86	4,10

* средняя величина 5 определений для каждого условия хроматографирования.

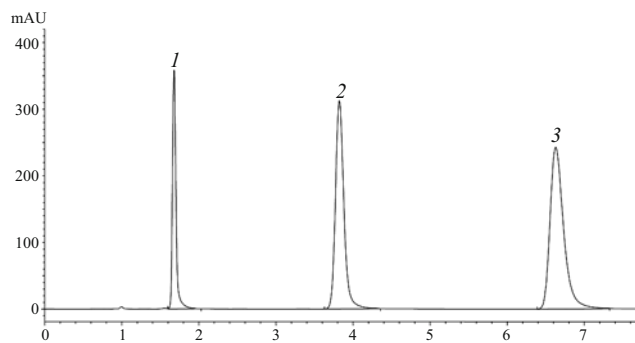


Рис. 3. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке Nova-Pak CN HP 150 × 3,9 мм (4 мкм). Условия анализа: подвижная фаза ацетонитрил — вода (95:5); скорость потока — 0,72 мл/мин; детектирование при 220 нм: 1 — цисплатин, 2 — оксалиплатин, 3 — карбоплатин.

обращенно-фазовой (содержание ацетонитрила или метанола в подвижной 3 %), так и в условиях нормально-фазовой хроматографии (содержание ацетонитрила 95 – 96 %). При использовании подвижной фазы, содержащей 90 – 95 % метанола, координационные соединения платины в условиях нормально-фазовой хроматографии не разделялись.

Разделение координационных соединений платины в условиях нормально-фазовой хроматографии значительно лучше. Следует отметить, что при переходе от обращенно-фазовой к нормально-фазовой хроматографии меняется очерёдность элюирования оксалиплатина и карбоплатина (рис. 2, 3).

При хроматографировании карбоплатина на колонке Диасфер-110 C10CN не наблюдается существенно-го увеличения времени удерживания соединения с

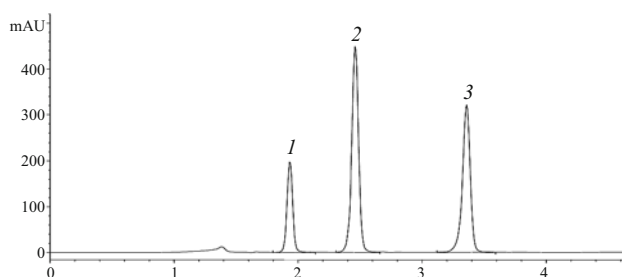


Рис. 4. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке Discovery HS F5 150 × 4,6 мм, 3 мкм. Условия анализа: подвижная фаза ацетонитрил — вода (5:95); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование при 220 нм: 1 — цисплатин, 2 — карбоплатин, 3 — оксалиплатин.

увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Минимальное время удерживания карбоплатина (1,21 – 1,35 мин для всех типов колонок) наблюдается при использовании подвижных колонок, содержащих около 60 % ацетонитрила. При хроматографировании на колонке Диасфер-110 C10CN время удерживания карбоплатина возрастает только на 1,17 мин при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе с 60 до 95 %, что недостаточно для полного разделения соединений платины в условиях нормально-фазовой хроматографии. Приемлемое разделение компонентов анализируемой смеси осуществляется только в условиях обращенно-фазовой хроматографии (табл. 1). Данный факт, вероятно, является следствием того, что в сорбенте Диасфер-110 C10CN нитрильная группа связана не с пропильной группой, а с алкильной C10. Необходимо отметить, что по результатам проведённых ранее исследований сорбент Диасфер-110 C10CN по свойствам более близок к сорбен-

Таблица 2

Времена удерживания (T) координационных соединений платины и разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина на колонках с фенильными сорбентами *

Наименование колонки, скорость потока, состав подвижной фазы	T, мин			Разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина
	цисплатина	карбоплатина	оксалиплатина	
Discovery HS F5 150 × 4,6 мм, 3 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (3:95)	—	2,83	4,09	9,24
Discovery HS F5 150 × 4,6 мм, 3 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (5:95)	1,93	2,46	3,36	8,42
Discovery HS F5 150 × 4,6 мм, 3 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (10:90)	1,84	1,97	2,49	6,20
Luna Phenyl — Hexyl 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (5:95)	1,85	2,51	4,68	14,95
Luna Phenyl — Hexyl 150 × 4,6 мм, 5 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (10:90)	1,78	1,92	2,80	8,06
Synergi Polar RP 150 × 4,6 мм, 4 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (5:95)	1,97	2,44	4,45	13,87
Synergi Polar RP 150 × 4,6 мм, 4 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (10:90)	1,89	2,00	2,91	7,97
Ace 3 Phenyl 150 × 4,6 мм, 3 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (5:95)	1,98	2,57	4,58	17,80
Ace 3 Phenyl 150 × 4,6 мм, 3 мкм, 1 мл/мин, ацетонитрил — вода (10:90)	1,94	2,10	2,94	6,87

* средняя величина 5 определений для каждого условия хроматографирования.

там C18, чем к типичным нитрильным сорбентам [8 – 10].

Применявшиеся в ходе исследования фенильные колонки также имеют свои особенности. Сорбент колонки Ace 3 Phenyl представляет собой традиционный фенильный сорбент. В сорбенте колонки Luna Phenyl-Hexyl фенильная группа связана с алкильной C6. Сорбентом колонки Synergi Polar RP является фенильная фаза с гидрофильным эндкепингом поверхности силикагеля, специально разработанная для максимального удерживания полярных и ароматических соединений. В отличие от указанных выше колонок, сорбент колонки Discovery HS F5 содержит пентафторфенильную группу.

Некоторые параметры хроматографирования на этих колонках приведены в табл. 2. Необходимо отметить, что хотя исследованные колонки в достаточной степени отличаются по своим свойствам, результаты хроматографирования на них координационных соединений платины сходны. В отличие от хроматографирования на колонках с аминсорбентами, где применяются подвижные фазы с содержанием ацетонитрила 87 – 95 % [5 – 7, 11], разделение компонентов анализируемой смеси на фенильных колонках происходит при содержании ацетонитрила в подвижной фазе не более 3 – 5 %. Однако следует отметить, что при содержании ацетонитрила в подвижной фазе менее 5 %, не формируется пик цисплатина правильной формы на большинстве фенильных колонках. Исключение составляет колонка Synergi Polar RP. Эффективность всех протестированных колонок по пикам карбоплатина и оксалиплатина варьирует от 8600 до 14400 теоретических тарелок в зависимости от типа колонки и состава подвижной фазы. Порядок элюирования компонентов анализируемой смеси осуществляется в соответствии с возрастанием гидрофобности анализируемых соединений по механизму обращенно-фазовой хроматографии (рис. 4).

При хроматографировании на колонке Discovery HS F5 150 × 4,6 мм, 3 мкм с использованием подвижной фазы ацетонитрил — вода (5:95) было подтверждено заявленное изготовителем количественное содержание оксалиплатина и карбоплатина в лекарственных

препаратах. При этом использовались стандарты USP Oxaliplatin RS и USP Carboplatin RS.

Необходимо отметить, что хроматографические колонки с нитрильными и фенильными сорбентами обладают определенной схожестью в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Это обусловлено возможностью специфической сорбции за счёт π - π взаимодействиями между π -связями функциональных групп сорбентов и системами сопряжённых двойных связей или нитрогрупп анализируемых соединений [8 – 10]. Свойства этих колонок при анализе координационных соединений платины с использованием подвижных фаз с содержанием ацетонитрила более 90 % значительно отличаются. При высоком содержании ацетонитрила сорбция соединений платины на нитрильных колонках обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом платины и нитрильными группами сорбента. В отличие от этого фенильные группы, как установлено в ходе исследования, практически не обладают подобной способностью. Время удерживания карбоплатина с возрастанием доли ацетонитрила в подвижной фазе от 60 до 95 % увеличивается только на 0,32 – 0,36 мин в зависимости от типа фенильной колонки.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2010), сс. 989 – 991.
2. United State Pharmacopoeia 34. *Monograph: Cisplatin for Injection*.
3. Japanese Pharmacopoeia 2007. *Monograph: Cisplatin*.
4. British Pharmacopoeia 2009. *Monograph: Cisplatin Injection*.
5. European Pharmacopoeia edition 7.2. *Monograph: Carboplatin*.
6. United State Pharmacopoeia 34. *Monograph: Carboplatin for Injection*.
7. British Pharmacopoeia 2009. *Monograph: Carboplatin Injection*.
8. К. В. Ноздрин, А. А. Великородный, А. С. Осипов, Г. М. Родионова, *Фармация*, № 5, 7 – 10 (2007).
9. Е. Б. Нечаева, А. С. Осипов, Н. Б. Дёмина, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 4, 47 – 50 (2008).
10. А. С. Осипов, Е. Н. Орлов, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 11, 28 – 32 (2010).
11. А. С. Осипов, П. В. Бобылев, Е. Б. Нечаева и др., *Биомедицина*, № 5, 107 – 109 (2010).

Поступила 24.09.12

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC COLUMNS WITH NITRILE AND PHENYL SORBENTS FOR THE ANALYSIS OF PLATINUM COORDINATION COMPOUNDS

A. S. Osipov and E. B. Nechaeva

State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

It is established that the chromatographic columns with nitrile sorbents Nova-Pak CN HP and Zorbax Eclipse XDB-CN can be applied to the analysis of coordination compounds of platinum(II). Analysis of these compounds can be carried out both in a reversed-phase chromatography regime (mobile phase: acetonitrile – water (3 : 97)) and under conditions of normal phase chromatography (mobile phase: acetonitrile – water (96 : 4)). Better resolution of analytes was achieved in the normal-phase chromatography regime. Chromatographic columns with various phenyl sorbents and pentafluorophenyl sorbent Discovery HS F5 can be used for the analysis of platinum coordination compounds only in the reversed-phase chromatography regime (mobile phase: acetonitrile – water (5:95)). The properties of columns with phenyl and nitrile sorbents in the assay of platinum coordination compounds using mobile phases with acetonitrile content above 90% are significantly different. In the presence of a high content of acetonitrile, the adsorption of platinum compounds on nitrile columns is determined by specific interactions between the platinum atom and nitrile groups of the sorbent. In contrast, the phenyl groups have been found to possess practically no such ability.

Keywords: HPLC; oxaliplatin; carboplatin