

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ПОЗИЦИОННЫХ ИЗОМЕРОВ БУТИЛГИДРОКСИАНИЗОЛА И ИЗОСОРБИДА МОНОНИТРАТА

А.С. Осипов*, кандидат биологических наук,
О.А. Попова, С.Г. Ларионова, кандидат фармацевтических наук,
Т.Н. Грецкая, кандидат фармацевтических наук, С.Е. Милкина

Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава Российской Федерации;
Российская Федерация, 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 6

Введение. Смеси изомеров бутилгидроксианизола (БОА) и изосорбида мононитрата (ИСМН) целесообразно использовать для изучения свойств хроматографических колонок.

Цель работы – исследование возможности применения хроматографических колонок с амидными, диольными и аминсорбентами для разделения изомеров БОА и ИСМН в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Материал и методы. Использовались стандартные образцы бутилгидрокситолуола и бутилгидроксианизола (смесь изомеров), изосорбида динитрата, изосорбида 2-нитрата, изосорбида 5-нитрата. Исследованы колонки с диольными сорбентами, аминсорбентами и амидным сорбентом в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Результаты. Получены экспериментальные данные о разделении изомеров БОА и ИСМН на различных колонках. Колонки, содержащие диольные сорбенты, не разделяют изомеры БОА в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Колонка, содержащая амидный сорбент, плохо разделяет анализируемые соединения.

Заключение. Все изомеры можно разделить в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонках с аминсорбентами при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 99%.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), бутилгидроксианизол, изосорбида динитрат, изосорбида мононитрат.

*E-mail: Osipov@expmed.ru

ВВЕДЕНИЕ

Бутилгидроксианизол (БОА) применяют в качестве антиоксиданта для предотвращения окисления лабильных лекарственных препаратов. Его описание включено в Европейскую и Американскую фармакопеи [1, 2]. БОА часто совмещают с другим антиоксидантом – бутилгидрокситолуолом (БОТ) [3]. Согласно Европейской фармакопее, основной антиоксидант – 2-изомер БОА [2-(1,1-диметилэтил)-4-метоксифенол]; в качестве примеси нормируется содержание 3-изомера БОА [3-(1,1-диметилэтил)-4-метоксифенол], которого в фармакопейной субстанции должно быть не более 10%. 3-изомер БОА и другие примеси определяют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В соответствующей монографии Американской фармакопеи содержание 3-изомера БОА отдельно не регламентируется. Под количественным содержанием принимают сумму 2- и 3-изомеров БОА (обращенно-фазовая ВЭЖХ, колонка C18). Коммерческие препараты БОА всегда содер-

жат примесь 3-изомера БОА. Необходимо отметить, что Европейская и Американская фармакопеи рекомендуют разные принципы нумерации функциональных групп в молекулах изомеров БОА. В данной статье применена нумерация изомеров БОА, согласно Европейской фармакопее.

Ранее изучалось совместное разделение изомеров БОА, а также БОТ на колонках с нитрильными, фенильными и некоторыми оптически-активными сорбентами при изократическом элюировании в условиях обращенно-фазовой хроматографии [4–6]. На колонке с оптически-активным сорбентом Chiralcel OJ-RH 150×4,6 мм, 5 мкм удалось получить очень хорошее разделение изомеров БОА. На колонках с нитрильными и диольными сорбентами изомеры БОА не разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [7].

Изосорбида мононитрат (ИСМН) и изосорбида динитрат (ИСДН) применяются в медицинской практике для лечения сердечной недостаточности. Действующим веществом ИСМН является 5-ни-

троизомер (5-изомер ИСМН). Содержание примеси 2-нитроизомера ИСМН (2-изомер ИСМН), а также ИСДН контролируются в субстанции и лекарственных препаратах ИСМН [8, 9]. Разделение изомеров ИСМН возможно как в условиях нормально-фазовой, так и обращенно-фазовой хроматографии.

Выбор для исследования изомеров БОА и БОТ, а также изомеров ИСМН и ИСДН обусловлен не только имеющимся опытом по разделению этих соединений [4, 5, 10–12], но также модельным удобством данных смесей для изучения свойств хроматографических колонок. Изомеры БОА обладают аналогичными хроматографическими свойствами; по гидрофобности БОТ значительно отличается от изомеров БОА. Соответственно, ИСДН также существенно отличается по гидрофобности от изомеров ИСМН.

Цель работы – исследование возможности применения хроматографических колонок с амидными, диольными и аминсорбентами для разделения изомеров БОА и ИСМН в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на хроматографе «Agilent», серии 1100 (Agilent Technologies, США). Исследовали колонки с диольными сорбентами: Lichrospher diol 150×4,0 мм, 5 мкм (MZ-Analysentechnik GmbH, Гер-

мания), Inertsil diol 150×4,0 мм, 5 мкм (GL Sciences Inc, Япония); колонки с аминсорбентами: Zorbax NH₂ 150×4,6 мм, 5 мкм, (Agilent Technologies, США), Luna NH₂ 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США); колонку с амидным сорбентом XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм (Waters, Ирландия). Детектирование выполняли при длине волны 280 нм (анализ антиоксидантов) или 210 нм (анализ нитратов изосорбида). Скорость потока элюента – 1 или 0,8 мл/мин (в зависимости от диаметра колонок). Ввод образцов в объеме 10 мкл.

В работе использовали: стандартные образцы бутилгидрокситолуола и бутилгидроксианола (смесь изомеров) (Sigma, США); изосорбида динитрата (40%, смесь с лактозой) (Schwarz pharma, Германия), изосорбида 2-нитрата, изосорбида 5-нитрата (стандарты Европейской фармакопеи, CRS). Стандартные образцы антиоксидантов растворяли в ацетонитриле до концентрации 1 мг/мл, затем разводили до концентрации 0,25 мг/мл подвижными фазами. Навески стандартных образцов нитратов изосорбида (10 мг, в пересчете на действующее вещество) растворяли в смеси ацетонитрил – вода (3:1) до концентрации 1 мг/мл, затем разводили до концентрации 0,2 мг/мл ацетонитрилом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При хроматографировании БОТ и изомеров БОА (табл.1) для колонок Lichrospher diol и Inertsil

Таблица 1

ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ И РАЗРЕШЕНИЕ МЕЖДУ ПИКАМИ БОТ, 2-ИЗОМЕРА БОА И 3-ИЗОМЕРА БОА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ*

Условия анализа: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Время удерживания, мин			Разрешение между пиками	
	БОТ	2-изомер БОА	3-изомер БОА	БОТ и 2-изомер БОА	2-изомер БОА и 3-изомер БОА
Lichrospher diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2); 0,8 мл/мин	2,04	2,14 изомеры не разделяются	2,14 изомеры не разделяются	1,01	–
Inertsil diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1 мл/мин	1,76	2,01 изомеры не разделяются	2,01 изомеры не разделяются	2,61	–
Inertsil diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2); 0,8 мл/мин	1,80	2,06 изомеры не разделяются	2,06 изомеры не разделяются	2,76	–
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1мл/мин	1,87	2,10	1,88 не разделяется с БОТ	2,34	1,17
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5); 1мл/мин	1,95	2,20	1,99 не разделяется с БОТ	2,42	1,16
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1мл/мин	1,76	2,08	2,30	3,63	2,33
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5); 1мл/мин	1,83	2,38	2,83	6,14	4,38
Luna NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5); 1мл/мин	2,17	2,89	3,35	5,85	3,35
Luna NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,7:0,3); 1мл/мин	2,18	2,92	3,40	6,02	3,42

Примечание. Здесь и в табл.2: * – средняя величина 5 определений для каждого условия хроматографирования.

diol подтверждены полученные ранее данные о невозможности разделения изомеров БОА на колонках с диольными сорбентами в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий [7]. При хроматографировании анализируемых соединений на амидной колонке XBridge Amide примесь 3-изо-

мера БОА элюируется до основного пика 2-изомера БОА, причем возможно разделение лишь изомеров БОА без присутствия в анализируемой смеси БОТ (см. табл. 1). На колонках с аминсорбентами достигнуто хорошее разделение БОТ и изомеров БОА, причем примесь 3-изомера БОА элюируется

после основного пика 2-изомера БОА (рис. 1). Условия анализа: колонка Zorbax NH₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; подвижная фаза – ацетонитрил – вода (95,5:0,5); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 280 нм. В отличие от обращенно-фазовой хроматографии [4] на колонках C18, значительное различие в гидрофобности БОА и БОТ не оказывает существенного влияния на различие во временах удерживания анализируемых соединений.

Результаты хроматографирования смеси ИСДН и изомеров ИСМН в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий

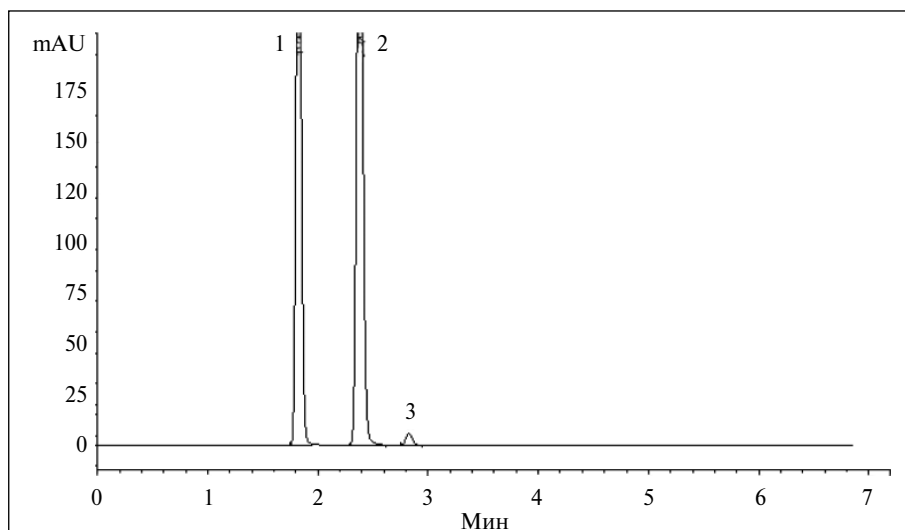


Рис. 1. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов БОА и БОТ: 1 – БОТ; 2 – 2-изомер БОА; 3 – 3-изомер БОА

Таблица 2

ВРЕМЯ 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, мин			Разрешение между пиками	
	ИСДН	2-изомер ИСМН	5-изомер ИСМН	ИСДН и 2-изомер ИСМН	2-изомер ИСМН и 5-изомер ИСМН
Lichrospher diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2); 0,8 мл/мин	1,96	2,20 изомеры не разделяются	2,20 изомеры не разделяются	2,56	–
Inertsil diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1 мл/мин	1,73	1,99	2,07	2,73	0,85
Inertsil diol 150×4,0 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2); 0,8 мл/мин	1,76	2,02	2,10	2,76	0,88
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1мл/мин	1,98	2,36	2,43	4,22	0,67
XBridge Amide 150×4,6 мм, 3,5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2); 1мл/мин	2,02	2,60	2,75	4,68	0,93
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1мл/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); 1мл/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); 1мл/мин	2,22	3,87	4,57	13,20	4,55
Luna NH ₂ 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1); 1мл/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); 1мл/мин	2,18	3,02	3,46	9,12	3,12

(табл. 2) показали, что изомеры ИСМН либо совсем не разделяются на колонке Lichrospher diol, либо практически не разделяются на колонках Inertsil diol и XBridge Amide. Напротив, на колонках Zorbax NH₂ и Luna NH₂ нитраты изосорбида уверенно разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Лучшее разделение анализируемых соединений было достигнуто на колонке Zorbax NH₂. 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 при 210 нм. Полученная хроматограмма (рис. 2) полностью аналогична хроматограмме, полученной в нормально-фазовых условиях разделения [8]. С увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе улучшается разрешение между пиками ИСДН и изомеров ИСМН и увеличиваются их времена удерживания. По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией на колонках C18 (подвижные фазы: смеси метиловый спирт – вода или ацетонитрил – вода) меняется очередность элюирования ИСДН и 5-изомера ИСМН, но последовательность элюирования 2-изомера и 5-изомера ИСМН остается той же, что и для обращенно-фазовой хроматографии (рис. 3) [12]. Условия анализа: колонка Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4,6 мм; подвижная фаза – метиловый спирт – вода (10:90); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 210 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на хроматографических колонках с аминсорбентами возможно разделение обеих смесей анализируемых соединений в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. На колонке с амидным сорбен-

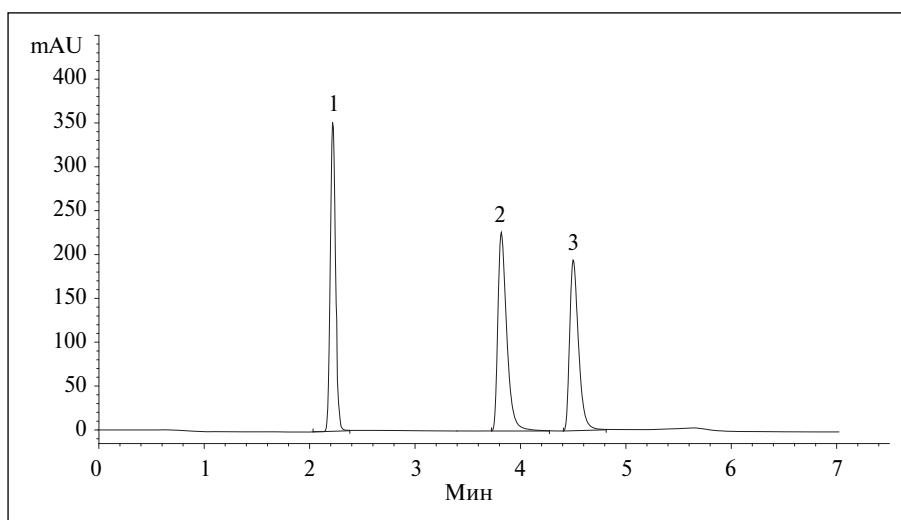


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изосорбида динитрата и изомеров изосорбида моонитрата: 1 – изосорбида динитрат; 2 – 2-изомер изосорбида моонитрата; 3 – 5-изомер изосорбида моонитрата

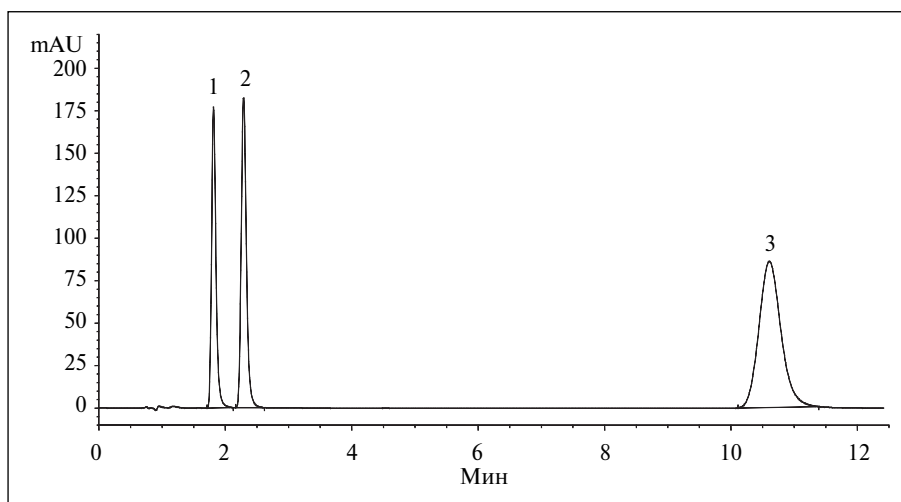


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изомеров изосорбида моонитрата и изосорбида динитрата: 1 – 2-изомер изосорбида моонитрата; 2 – 5-изомер изосорбида моонитрата; 3 – изосорбида динитрат. (Иллюстрация из [13])

том XBridge Amide возможно только разделение изомеров БОА, причем в отличие от аминсорбентов 3-изомер БОА элюируется с хроматографической колонки до 2-изомера БОА. Различие в гидрофобности анализируемых соединений не оказывает существенного влияния на их хроматографическую подвижность в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Большое значение имеет возможность взаимодействия между гидроксильными группами, нитро-, фенольными гидроксильными группами анализируемых соединений и функциональными группами сорбентов хроматографических колонок.

ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia edition 8.0. Monograph: Butylated Hydroxyanisole.
2. The United States Pharmacopoeia 39 – National Formulary 34. Monograph: Butylated Hydroxyanisole.
3. Гузев К.С., Ноздрин В.И. Новые отечественные лекарственные средства с ретиноидами. М.: ФНПП «Ретиноиды», 2003; 112.
4. Ноздрин К.В., Великородный А.А., Осипов А.С., Родионова Г.М. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксанизола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии. Фармация, 2007; 5: 7–10.
5. Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Победин О.А., Бобылев П.В. Применение хроматографических колонок с фенильными сорбентами для разделения изомеров бутилгидроксанизола. Разработка и регистрация лекарственных средств, 2013; 4: 82–6.
6. Осипов А.С., Орлов Е.Н. Применение колонок с оптически-активными сорбентами для разделения позиционных изомеров. Химико-фармацевтический журнал, 2012; 46 (5): 28–31.
7. Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Миронова М.М., Ковалева Е.Л. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров
8. British Pharmacopoeia, 2012. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate.
9. The United States Pharmacopoeia, 39. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate.
10. Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Демина Н.Б., Кеменова В.А. Применение хроматографических колонок отечественного производства для анализа препаратов органических нитратов. Химико-фармацевтический журнал, 2008; 42 (1): 46–9.
11. Нечаева Е.Б., Осипов А.С., Демина Н.Б. Анализ лекарственных препаратов из группы органических нитратов на хроматографических колонках с различными типами сорбентов. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии, 2008; 4: 47–50.
12. Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Орлов Е.Н. Применение монолитной колонки Chromolith SpeedROD RP-18e для разделения нитратов изосорбида. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии, 2012; 8: 20–3.

Поступила 4 апреля 2017 г.

USE OF HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF POSITIONAL BUTYLHYDROXYANISOLE AND ISOSORBIDE MONONITRATE ISOMERS

A.S. Osipov, PhD; O.A. Popova; S.G. Larionova, PhD; T.N. Gretskeya, PhD; S.E. Milkina

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 6, Shchukinskaya St., Moscow 123182, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. A mixture of butylhydroxyanisole (BHA) and isosorbide mononitrate (ISMN) isomers should be used to study the properties of chromatographic columns.

Objective: to investigate whether chromatographic columns packed with amide, diol, and amino sorbents for hydrophilic interaction liquid chromatography can be used to separate BHA and ISMN isomers.

Material and methods. Standard samples of butylhydroxytoluene and BHA (a mixture of isomers), isosorbide dinitrate, isosorbide-2-nitrate, and isosorbide-5-nitrate were used. Columns packed with diol, amino, and amide sorbents used for hydrophilic interaction liquid chromatography were studied.

Results. The authors obtained experimental data on the separation of BHA and ISMN isomers using different columns. The columns containing diol sorbents failed to separate BHA isomers when hydrophilic interaction chromatography was employed. The compounds in question were badly separated when a column containing an amide-sorbent was used.

Conclusion. All isomers can be separated by hydrophilic interaction chromatography using amino-sorbent columns containing acetonitrile in the mobile phase greater than 99%.

Key words: high performance liquid chromatography, butylhydroxyanisole, isosorbide dinitrate, isosorbide mononitrate.

REFERENCES

1. European Pharmacopoeia, 8.0 edition. Monograph: Butylated Hydroxyanisole.
2. The United States Pharmacopoeia, 39. National Formulary 34. Monograph: Butylated Hydroxyanisole.
3. Guzev K.S., Nozdrin V.I. New domestic medicines with retinoids. PhNPP «Retinoids». Moscow, 2003; 112 (in Russian).
4. Nozdrin K.V., Velikorodnyi A.A., Osipov A.S., Rodionova G.M. Optimization of chromatographic conditions for separation butylhydroxyanisole and butylhydroxytoluene in the joint presence. Farmatsiya, 2007; 5: 7–10 (in Russian).
5. Osipov A.S., Nechaeva, E.B., Pobedin O.A., Bobylev P.V. The use of chromatographic columns with phenyl sorbents for separation isomers of butylhydroxyanisole. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv, 2013; 4: 82–6 (in Russian).
6. Osipov A.S., Orlov E.N. Separation of positional isomers using chiral chromatography columns. Pharmaceutical chemistry journal, 2012; 46 (5): 288–91 (in Russian).
7. Osipov A.S., Nechaeva E.B., Mironova M.M., Kovaleva E.L. Use of hydrophilic interaction liquid chromatography to separate butylhydroxyanisole isomers. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal, 2015; 49 (3): 203–5 (in Russian).
8. British Pharmacopoeia, 2012. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate.
9. The United States Pharmacopoeia, 39. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate.
10. Osipov A.S., Nechaeva E.B., Demina N.B., Kemenova V.A., Velikaya E.V. Use of chromatography columns of Russian origin for analysis of organic nitrate preparations. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal, 2008; 42 (1): 44–7 (in Russian).
11. Nechaeva E.B., Osipov A.S., Demina N.B. Analysis of drugs from the group of organic nitrates on chromatographic columns with different types of sorbents. Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii, 2008; 4: 47–50 (in Russian).
12. Osipov A.S., Nechaeva E.B., Orlov E.N. Application of monolithic column Chromolith SpeedROD RP-18e for separate isosorbide nitrates. Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii, 2012; 8: 20–3 (in Russian).