



**Stephanie Kappes, Alfred Steinbach, and
Katinka Ruth**

WHITE PAPER

Ионная хроматография: универсальный метод анализа в фармацевтической отрасли

Ионная хроматография – это универсальный метод с широким спектром практических применений в фармацевтической отрасли. Здесь мы рассмотрим некоторые актуальные тенденции и последние достижения в её применении.

ИЗМЕРЕНИЯ В РЕГУЛИРУЕМОЙ ОТРАСЛИ

Фармацевтическая промышленность должна соответствовать высоким стандартам качества и безопасности лекарств. Эти стандарты документально подтверждены в фармакопеях как официально признанные фармацевтические правила и опубликованы в качестве юридических инструментов защиты потребителей такими органами, как правительства и медицинские общества. Идентификация лекарства зависит от чувствительных, надежных инструментов и методов, равно как и определение соответствия лекарства применимым нормам.

Ионная хроматография (ИХ) является предпочтительным методом определения активных ингредиентов, вспомогательных веществ и следов примесей, а также метаболитов в виде органических и неорганических ионов или полярных веществ в ряде фармацевтических препаратов, фармацевтических растворах и даже жидкостях организма. Она может определить присутствие нескольких веществ за очень короткое время в одном анализе и даже разделить химически похожие компоненты. Концентрация определяемых веществ может варьироваться от нг/л до процентного содержания. Большой выбор доступных разделительных колонок и систем элюирования делает ИХ пригодным практически для любого типа образца. Мешающих эффектов, вызванных матрицей пробы, можно легко избежать, если правильно подготовить пробу или выбрать подходящий метод детектирования. Инлайн пробоподготовка - это особенность многих современных систем ИХ, поскольку последние достижения в области ионной хроматографии были в основном сосредоточены на простоте использования. Однако удобство является не единственным преимуществом, которое дает автоматизация процесса ИХ: уменьшение ручной работы до минимума также означает снижение вероятности ошибок и загрязнения проб.

В зависимости от требований к анализируемому веществу и матрице на выбор предлагается широкий спектр методов детектирования:

- Кондуктометрическое детектирование с подавлением и без него
- Электрохимическое детектирование
- Спектрофотометрическое детектирование с постколоночной дериватизацией и без нее (спектрофотометрия в ультрафиолетовом и видимом диапазонах)
- Связанные методы детектирования, как IC/MS и IC/ICP-MS.

Образцы в фармацевтической отрасли бывают различных форм, которые требуют различных подходов ионной хроматографии. Далее следует обзор наиболее часто анализируемых типов образцов с соответствующими примерами анализа.

РЕШЕНИЯ В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Термин «фармацевтические растворы» означает изотонические растворы, растворы для гемодиализа или инфузии. Они содержат анионы, катионы, углеводы и органические кислоты, концентрации которых часто отличаются друг от друга на несколько порядков. В контексте производственного мониторинга и окончательного контроля качества требуется метод анализа, позволяющий определять эти ингредиенты с высокой степенью точности. Кроме того, анализ должен быть быстрым и требовать минимальных усилий. Благодаря интеллектуальной аналитической процедуре и инлайн автоматической пробоподготовке, ИХ полностью справляется с этой задачей.

Два примера анализа растворов для гемодиализа показаны на рисунках 1 и 2. Пациентам, страдающим почечной недостаточностью, необходим гемодиализ, чтобы компенсировать потерю кровоочищающей функции почек. Во время этого процесса кровь пациента обменивается растворенными веществами с раствором для гемодиализа через полупроницаемую мембрану. Замененные растворенные вещества включают, среди прочего, отходы, такие как мочевины и фосфаты, которые диффундируют из крови в диализный раствор по градиенту концентрации. Состав диализных растворов сложен, поскольку удаление растворенных веществ из крови изменяет его осмотическую активность, следовательно, обмен должен происходить с контролируемой скоростью, которая достигается за счет правильной концентрации растворенного вещества. Сильное изменение осмотической активности может вызвать синдром нарушения равновесия при диализе, когда из-за низкой концентрации растворенных веществ в крови растворенные вещества вымываются из других частей тела.

Рисунок 1 показывает одновременное определение цитрата и ацетата в разбавленном растворе для гемодиализа. В части А был измерен стандарт аниона; часть В показывает определение образца. Цитрат добавляют в растворы для гемодиализа из-за его антикоагулянтных свойств, а ацетат добавляется в качестве буферного вещества. Он попадает в кровоток пациента во время гемодиализа и стабилизирует значение pH крови. Это необходимо, потому что почки таких пациентов не способны выводить кислотные компоненты, поэтому пациенты часто страдают ацидозом.

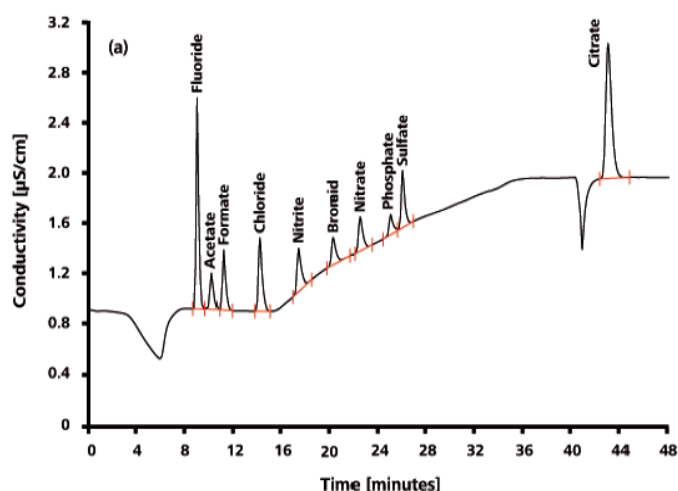


Рисунок 1А. Ионохроматографический анализ на колонке Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 с градиентным элюированием Na_2CO_3 с последовательным подавлением фоновой электропроводности и кондуктометрическим детектированием. Анионный стандарт, включая ацетат и цитрат.

Помимо цитрата и ацетата, хроматограмма выявляет присутствие хлорида, близкого к физиологическому. При использовании физиологических концентраций растворенных веществ градиент концентрации снижается до минимума, и достигается динамическое равновесие между кровью и диализным раствором. Тем самым предотвращается потеря некоторых растворенных веществ, включая хлорид.

Рисунок 2 показывает определение катионов в концентрате для гемодиализа после автоматизированной стадии Инлайн разбавления. Подобно хлоридам, катионы присутствуют в концентрациях, близких к физиологическим, чтобы избежать их утечки из крови пациента путем осмоса.

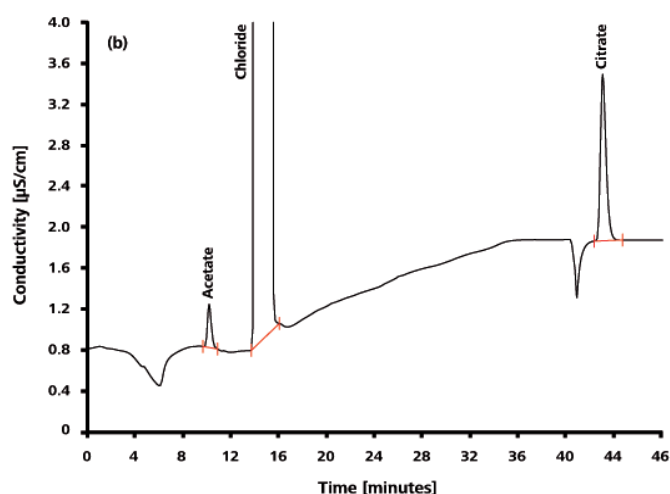


Рисунок 1Б. Ионохроматографический анализ на колонке Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 с градиентным элюированием Na_2CO_3 с последовательным подавлением фоновой электропроводности и кондуктометрическим детектированием. Ацетат и цитрат в растворе для гемодиализа.

АКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ

Методами ионной хроматографии могут быть определены активные фармацевтические субстанции (АФС) в таких лекарственных средствах, как гентамицин, неомицин, цефадроксил или хлорид бетанехола в соответствии с положениями Фармакопеи США и Европейской фармакопеи. Описание требований к точности, разделению и извлечению определяемых компонентов подробно даны в фармакопеях. На рис. 3 представлена хроматограмма ионного анализа гентамицина – антибиотика, принадлежащего к группе аминогликозидов. Аминогликозиды являются бактерицидными антибиотиками, которые блокируют биосинтез бактериального белка, связываясь с рибосомами, тем самым вызывая ошибки при переводе с рибонуклеиновой информационной кислоты на ДНК. Гентамицин состоит из нескольких тесно связанных соединений, а именно гентамицина C₁, гентамицина C_{1a} и гентамицина C₂, C_{2a} и C_{2b}. Несмотря на их структурное сходство, ионная хроматография обеспечивает хорошее разделение различных компонентов гентамицина.

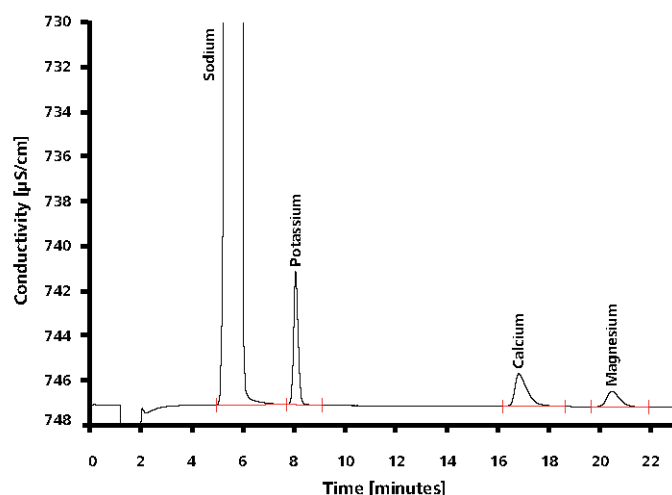


Рисунок 2. Катионы в разбавленном концентрате для гемодиализа с использованием колонки Metrosep C 4 - 150/4.0 и кондуктометрического детектирования без подавления.

ПРИМЕСИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Помимо анализа АФС, с помощью ИХ можно также определять примеси в фармацевтических продуктах. Даже небольшие концентрации примесей могут вызвать серьезные побочные эффекты. Например, при синтезе антигипертензивного ирбесартана в качестве примеси в следовых количествах может быть обнаружен азид. Последний очень токсичен для человека, поэтому его концентрация в ирбесартане подлежит строгому контролю. Фармакопея США рекомендует определение азидов ионной хроматографией после прямого ввода пробы в соответствии с USP 621. В этом методе подвижная фаза, состоящий из элюента и подходящего органического растворителя, используется для удаления АФС из аналитической колонки. Однако эта процедура утомительна, требует много времени и не может быть автоматизирована.

Определение азидов является более селективным, более чувствительным и, прежде всего, более быстрым с применением метода Инлайн Удаления Матрицы, когда мешающая фармацевтическая матрица образца отделяется от целевого аналита в процессе автоматизированной пробоподготовки. На хроматограмме показан анализ образца ирбесартана с добавлением азидов различных концентраций (см. Рисунок 4).

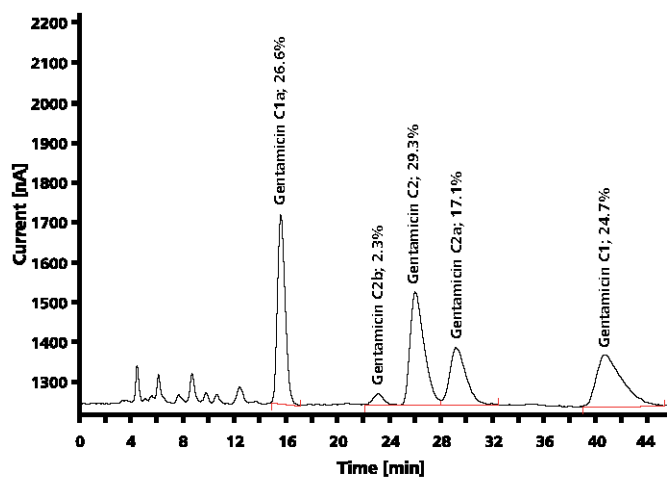


Рисунок 3. ИХ анализ антибиотика гентамицина с применением импульсного амперометрического детектирования; колонка: Polymer Laboratories RP-S; элюент: 60 г/л Na_2SO_4 , 1.75 г/л октансульфонат натрия, 1.34 г/л NaH_2PO_4 , 8 мл/л ТГФ ($\text{pH} = 3$, H_3PO_4); послеколоночная реакция: добавка 300 ммол/л NaOH .

ВЫСОКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БЛАГОДАря ИЗВЛЕЧЕНИЮ МАТРИЦЫ

Детектором проводимости регистрирует сигнал после последовательного подавления. В таблице 1 перечислены средние значения параметров определения азида, которые были получены после проведения трех измерений, в том числе средняя проводимость, измеренная детектором, и относительное стандартное отклонение. Определение азида в ирбесартане с предшествующим удалением матрицы удовлетворяет всем требованиям регулирующих органов, которые касаются селективности метода, его пределов обнаружения и количественного определения, точности, линейности, допустимой погрешности и надежности. Таким образом, его можно использовать как более быструю и более чувствительную альтернативу предлагаемому определению в соответствии с USP 621.

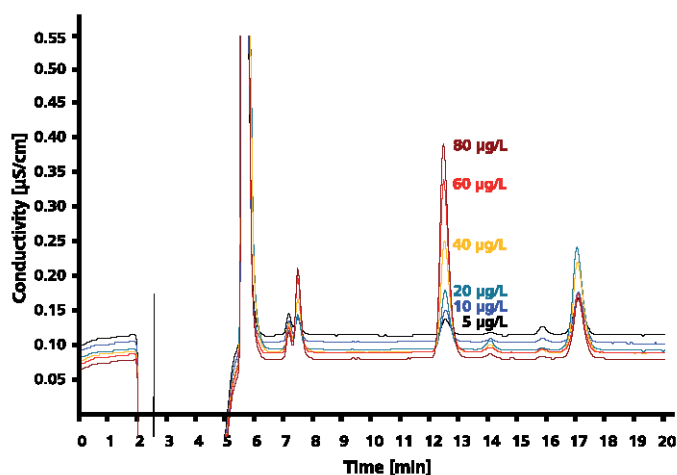


Рисунок 4. Образец ирбесартана с добавлением 5-80 мкг/л азида; колонка: Metrosep A Supp 10 - 250/4.0; элюент: 5 ммоль/л Na_2CO_3 , 5 ммоль/л NaHCO_3 ; Инлайн извлечение матрицы образца с применением раствора 70:30 (V/V) метанол/вода.

РАДИОИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Радиоионная хроматография предназначена для определения радиохимической чистоты радиофармпрепаратов. Это радиоактивные вещества, которые используются в медицинских целях, в основном для диагностики, но также для лечения и профилактики некоторых заболеваний. $[^{18}\text{F}]$ фтордезоксиглюкоза и $[^{18}\text{F}]$ фторхолин - два известных примера радиоактивных меток, которые используются в диагностике с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Они помечены радионуклидом $[^{18}\text{F}]$ фтора. Во время радиоактивного распада этого нестабильного изотопа протон в ядре $[^{18}\text{F}]$ фтора превращается в нейтрон. Это сопровождается испусканием нейтрино и позитрона. Последний соединяется с электроном в окружающей ткани, что приводит к аннигиляции обеих частиц и испусканию двух фотонов (гамма-лучей) в противоположных направлениях, каждый с энергией 0,511 МэВ. На основе данных, полученных при обнаружении совпадений пары фотонов, вычисляется местоположение ее излучения в теле пациента. Это местоположение точно совпадает с местоположением исходной молекулы радиоактивной метки и, таким образом, раскрывает информацию о его активности.

Чистота радиоактивных индикаторов имеет решающее значение. Высокоэнергетические гамма-лучи, испускаемые при сочетании позитрона с электроном, вредны для человеческого тела. При использовании чистой радиоактивной метки, что позволяет избежать инъекции свободного $[^{18}\text{F}]$ фтора или других радиоактивных загрязнителей, количество вводимого пациенту радиоактивного вещества может быть сведено к минимуму.

Контроль качества радиоактивных индикаторов осуществляется с помощью радио ИХ в коротком промежутке времени между их синтезом и записью трехмерного ПЭТ-сканирования. Последовательность разделения в радио ИХ такой же, как и в обычной ИХ, за исключением того факта, что он происходит за свинцовыми дверями. Что действительно отличает радио ИХ от обычной ИХ, так это этап обнаружения, на котором к установке подключается детектор радиоактивности. Хроматограмма радиоактивности показывает наличие – или, в идеале, отсутствие – радиоактивных примесей.

Таблица 1. Точность и степень извлечения азида

Площадь пика			
	Среднее значение, мкСм/см	Относительное стандартное отклонение, %	Сходимость, %
5 мкг/л добавки	± 5.00	1.96	101.71
30 мкг/л добавки	± 0.30	0.14	103.38

Таблица 2. Примеры применения ИХ в фармацевтической отрасли

Фармпрепарат или вспомогательное вещество	Определяемый компонент
Акампросат кальция	Ацетат
Ацифлуорфен натрия	Ацетат
Адреналин	Адреналин
Амисульприд	Диметил- и диэтилсульфат
Раствор антикоагулянта	Фосфат, Цитрат
Оксид мышьяка (III)	Арсенат, арсенит
Атовакуон	Ацетат
Аторвастатин кальциевая соль	Цианид, тетрабутиламмоний
Сульфобутиловый эфир-β-циклодекстрин	β-циклодекстрин
Бетанехол хлорид	Бетанехол, натрий, кальций, продукт разложения (НРТА)
Бромидная соль	Хлорид
Бусульфан	Метансульфоновая кислота
Глюконат кальция	Оксалат
Кальциевая соль	Борат
Камфорсульфоновая кислота	Камфорсульфоновая кислота
Карбамазепин	Хлорид, бромид
Карбидопа	ЭДТА, гидразин, дисульфит натрия
Цефадроксил	Цефадроксил
Цефдинир	Железо, ЭДТА
Цефепима гидрохлорид	N-метил-пирролидин
Цефтазидим натрия	Натрий
Клопидогрель безилат	Анионы, карбонат, катионы
Колесевелам	Четвертичные алкиламины
Коповидон	Ацетат, формиат
Дазатиниб	Этилендиамин
Декстрометорфан HBr	Муравьиная кислота
(2,3-Дихлорфенил) оксоацетонитрил	Цианид, тетрабутиламмоний
Диклофенак натрия	Натрий, калий
Дициклопропилметиламин	Дициклопропилметиламин
Доксазозин, метансульфоновая кислота	Бромид
Дроспиренон	Пропаргиловый спирт
Эноксапарин натрия	Сульфат
Эзомепразол магния	Тартрат
Фебуксостат	Гидроксиламин
Фелодипин	Силикат натрия
Фенофибрат	Лаурилсульфат натрия
Ферумокситол (контрастный усилитель)	Цитрат
Фторурацил	Фторид
Габапентин	Хлорид
Гадопентетовая кислота	Гадолиний
Гентамицина сульфат (см. страницу 17)	Гентамицин
Натриевая соль глицинкарбоната	Карбонат
Глимепирид	Транс-4-метилциклогексиламин
Гвайфенезин	Эпихлоргидрин

Фармпрепарат или вспомогательное вещество	Определяемый компонент
Гепарин натрия	Глюкозамин и галактозамин
Ибандроновая кислота	Ибандронат, фосфит, фосфат
Индинавирсульфат	Этилсульфат
Индометацин натрия	2-этилгексановая кислота
Ирбесартан	Цианид, азид
Ибупрофен	Ибупрофен, валерофенон
Ламотриджин	Цианид
Карбонат лантана(III)	Нитрат
Леветирацетам	Тетрабутиламмоний
Левифлоксацин	Фторид
Линезолид	Морфолин
Лозартан	Азид
Меропенем	ЭДТА, диметиламин
Метформина гидрохлорид	Диметиламин
(Моно) сульфирам (темозол)	Цианид
Монтелукаст натрия	Метансульфоновая кислота, ацетат
Мультивитаминные таблетки	Катионы, Витамин С
Микофенолата мофетил	Морфолин
Небиволола гидрохлорид	Монометиламин
Неомицин сульфат	Неомицин
Оксалиплатин	Хлорид
Пиоглитазона гидрохлорид	Пиперидин
Пиперациллин	Хлорид
Пиперазин	Пиперазин, N-метилпиперазин
Зубная паста RA-Thermoseal	Калий, цинк
Рибитол	Рибитол (адонитол)
S-Аденозилметионин	Сульфат
Севеламер	Связывающая способность фосфата
Суксаметония хлорид	Холина хлорид
Тадалафил	Метанольный метиламин
Тербинафин	Монометиламин, тетрабутиламмоний
Топирамат	Углеводы, сульфаты и сульфаматы
Триклозан	Калий
Тимолол	Хлорит
Тартрат варениклина	Трифторметансульфоновая кислота
Вориконазол	Камфорсульфоновая кислота
Зингизол	Калия, цинк
Золедроновая кислота	Фосфит, фосфат

Метод обнаружения:

Кондуктометрический с подавлением,

Кондуктометрическое без подавления,

Кондуктометрический с и без подавления,

Амперометрическое,

Спектрофотометрическое

РЕЗЮМЕ

Сегодня ионная хроматография покрывает различные области применения в фармацевтической промышленности. Примеры около 40 применений перечислены в таблице 2. Этот метод стал чрезвычайно универсальным из-за большого количества различных колонок, вариантов элюентов и градиентов, методов подготовки проб и возможностей автоматизации, доступных пользователю.

ООО «Метром РУС»
Официальное представительство в России, Москва
info@metrohm.ru
+7 (495) 967 99 31
metrohm.ru