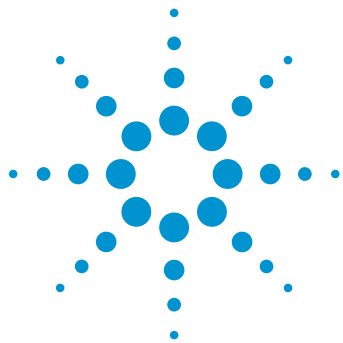




Тестирование комбинированных лекарственных препаратов с фиксированной дозировкой на содержание примесей с помощью решения для анализа примесей – системы Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution

Методические рекомендации

Низкомолекулярные лекарственные средства

Автор

Соня Шнайдер (Sonja Schneider)
Agilent Technologies, Inc.
Вальдбронн, Германия

Аннотация

Система Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution с детекторами на основе диодной матрицы с широким динамическим диапазоном (HDR-DAD) объединяет сигналы от двух детекторов на основе диодной матрицы с кассетными проточными кюветами Max-Light, обладающими различной длиной оптического пути, что позволяет увеличить линейный динамический диапазон для УФ-области. Данное решение может использоваться для обнаружения и количественного определения как основных соединений, так и соединений в следовых количествах за один цикл без выхода за рамки линейного диапазона для УФ-области. При применении одного детектора на основе диодной матрицы с проточной кюветой с длиной оптического пути 10 мм для определения соединений, присутствующих в большой и малой дозах, а также в следовых количествах, обычно требуется два ввода проб с разными вводимыми объемами. В данных методических рекомендациях показано, что для надежного количественного определения соединений с высокой и низкой концентрацией, а также соединений в следовых количествах с помощью системы Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution достаточно одного ввода пробы.



Agilent Technologies

Введение

Комбинированные препараты с фиксированной дозировкой применяются для лечения различных заболеваний. Процентное содержание действующих веществ может быть разным в зависимости от необходимого физиологического воздействия. Если одновременно присутствуют компоненты с большой и малой дозой, при анализе с помощью традиционной ВЭЖХ и УВЭЖХ с детектором на основе диодной матрицы может потребоваться как минимум два ввода пробы. Это позволяет гарантировать, что количественное определение всех соединений выполняется в пределах линейного диапазона детектора, и результаты интегрирования сигнала и количественного определения следовых количеств компонентов являются надежными.

Данные методические рекомендации демонстрируют, что при использовании системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD Impurity Analyzer Solution определение соединений с высокой и низкой концентрацией, а также их примесей может выполняться за один цикл с высоким уровнем чувствительности и без выхода за рамки линейного диапазона для УФ-области.

Экспериментальная часть

Оборудование

Модули системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II использованной для эксперимента:

- Высокоскоростной насос Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Автосамплер Agilent 1290 Infinity II (G7167B)
- Многоколоночный термостат Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Детектор на основе диодной матрицы Agilent 1290 Infinity II (G7117B, 2 шт.), оснащенный кассетными проточными кюветами Max-Light с длиной оптического пути 3,7, 10 и 60 мм

Колонка

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 100 мм, 5 мкм (каталожный номер 959996-902)

Программное обеспечение

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition для систем ЖХ и ЖХ-МС, версия C.01.07 [27]

Растворители и образцы

Растворитель А

Вода + 0,1 % трифторуксусной кислоты

Растворитель В

Ацетонитрил + 0,09 % трифторуксусной кислоты

Проба

Использовался комбинированный лекарственный препарат с фиксированной дозировкой, содержащий следующие ингредиенты: парацетамол и хлорфенамин в соотношении 1:80, витамин С, кофеин и небольшое количество неизвестных примесей (Рис. 1).

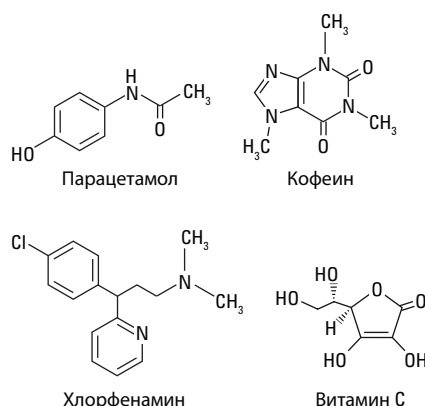


Рис. 1. Ингредиенты комбинированного лекарственного препарата с фиксированной дозировкой: витамин С, парацетамол, кофеин и хлорфенамин.

Таблица 1. Хроматографические условия

Параметр	Значение
Подвижная фаза	А) Вода+ 0,1 % трифторуксусной кислоты В) Ацетонитрил + 0,09 % трифторуксусной кислоты
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 минут — 5 % В 0,5 минуты — 5 % В 6,1 минуты — 40 % В 6,5 минут — 95 % В
Время окончания	8 минут
Время промывки колонки после анализа	5 минут
Объем ввода	1 и 5 мкл для проточной кюветы с длиной оптического пути 10 мм 5 мкл для детектора HDR DAD
Температура колонки	40 °C
Длина волны	254/20 нм; опорное значение: 380/80 нм Ширина пика >0,025 минут (время отклика 0,5 секунды) (10 Гц)

Все используемые растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Свежая вода высшей степени очистки была получена с помощью системы Milli-Q Integral, оборудованной патроном конечной очистки с мембраной с размером пор 0,22 мкм (Millipak). Комбинированный препарат с фиксированной дозировкой был приобретен в местной аптеке.

Пробоподготовка

1. Две капсулы препарата от простуды были вскрыты и растворены в 20 мл дистиллированной воды.
2. В течение 5 минут выполнялась экстракция в ультразвуковой ванне.
3. Фильтрацию производили с помощью нейлонового шприцевого фильтра Agilent Premium Syringe Filter Nylon, 0,45 мкм, 15 мм (каталожный номер 5190–5091).
4. Прозрачную жидкость помещали во флаконы для ЖХ объемом 1,5 мл и хранили в них. Содержимое флаконов включало:
 - 250 нг/мкл хлорфенамина;
 - 20 000 нг/мкл парацетамола;
 - 2 500 нг/мкл кофеина;
 - 15 000 нг/мл витамина С.

5. Раствор, разбавленный водой в соотношении 1:20 содержал:
- 12,5 нг/мкл хлорфенамина;
 - 1 000 нг/мкл парацетамола;
 - 125 нг/мкл кофеина;
 - 750 нг/мл витамина С.

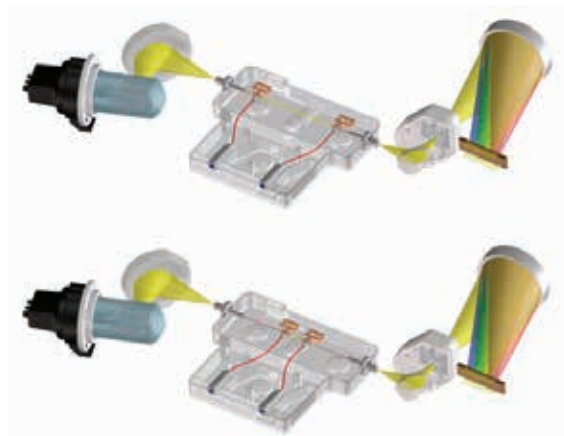
6. Данный раствор был введен в хроматограф.

Принцип работы системы Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution

Система Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution более чем в три раза расширяет линейный динамический диапазон для УФ-области (типичная величина - 6,7 единиц оптической плотности при 265 нм), по сравнению с системой 1290 Infinity II DAD с кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм (более 2,0 ед. оптической плотности при 265 нм). Путем объединения сигналов от двух детекторов на основе диодной матрицы с кассетными кюветами Max-Light, обладающими различной длиной оптического пути, решение для детектирования с широким динамическим диапазоном позволяет за один цикл обнаруживать и выполнять количественный анализ компонентов со значительно отличающейся концентрацией. Два детектора на основе диодной матрицы в системе 1290 Infinity II DAD объединены в один кластер (Рис. 2). Один детектор системы 1290 Infinity II снабжен кюветой с длиной оптического пути 60 мм (для анализа соединений с меньшей концентрацией), а второй — кюветой с длиной оптического пути 3,7 мм (для анализа соединений с высокой концентрацией). В тракте ячейка с длиной оптического пути 60 мм должна находиться раньше ячейки с длиной оптического пути 3,7 мм. Выходной сигнал представляет собой объединенный сигнал, нормированный к длине оптического пути 10 мм.

Программное средство для работы с широким динамическим диапазоном (HDR) настраивается во время настройки прибора. Оба детектора объединяют в один кластер и вводят объем задержки — объем капилляра, соединяющего детекторы. В пользовательском интерфейсе эти два детектора отображаются как один (Рис. 3).

Детектор 1 с проточной кюветой, длина оптического пути которой составляет 60 мм, для обнаружения соединений с низкой концентрацией



Детектор 2 с проточной кюветой, длина оптического пути которой составляет 3,7 мм, для обнаружения соединений с высокой концентрацией

Рис. 2. Соединенные детекторы на основе диодной матрицы Agilent 1290 Infinity II DAD

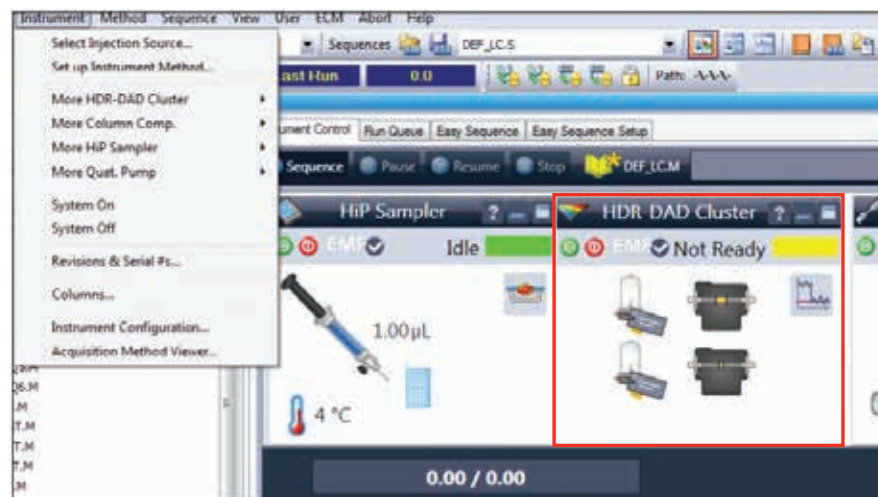


Рис. 3. Активация средства управления HDR в программном обеспечении Agilent ChemStation

Результаты и обсуждение

Для оценки различий в рабочих характеристиках систем Agilent 1290 Infinity II DAD и Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution были проведены следующие эксперименты:

- Анализ комбинированного препарата с фиксированной дозировкой с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II с одним детектором на основе диодной матрицы и кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм при использовании двух вводов проб в объеме 1 и 5 мкл для определения лекарственных ингредиентов с высокой и низкой концентрацией и прочих компонентов в следовых количествах.
- Анализ комбинированного препарата с фиксированной дозировкой с помощью системы Agilent 1290 Infinity II в варианте ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution при использовании одного ввода пробы объемом 5 мкл для определения лекарственных ингредиентов с высокой и низкой концентрацией и прочих компонентов в следовых количествах с типичным линейным диапазоном для УФ-области 6,7 единиц оптической плотности (AU).

В первом эксперименте использовали систему Agilent 1290 Infinity II DAD с кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм. Для определения всех компонентов и следовых количеств примесей в пределах линейного диапазона

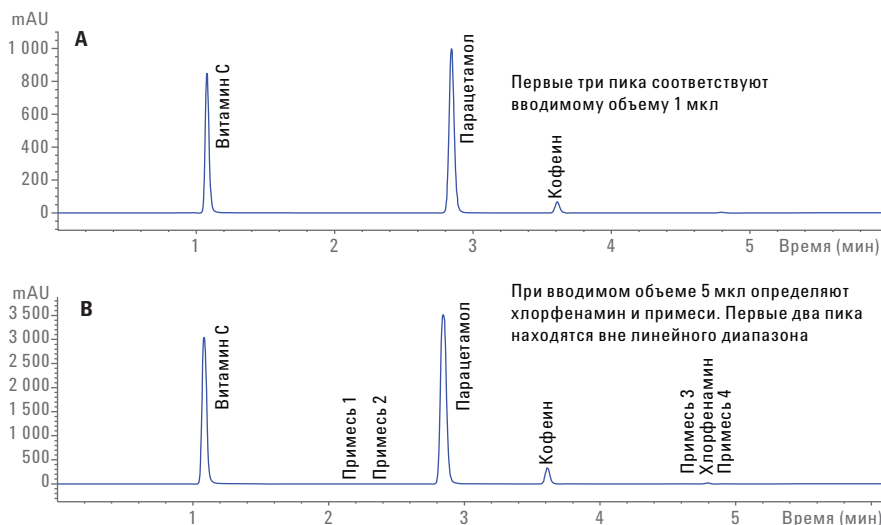


Рис. 4. Хроматограммы препарата при двух вводах пробы различного объема, полученные с помощью системы Agilent 1290 Infinity II DAD с кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм.

для УФ-области понадобилось два ввода проб (Рис. 4 и 5). Определение витамина С, парацетамола и кофеина выполнялось при вводимом объеме 1 мкл. Максимальная высота пика составила примерно 1 000 mAU, что находится в рамках линейного диапазона для УФ-области детектора на основе диодной матрицы системы Agilent 1290 Infinity II DAD. Остальные соединения определялись при вводимом объеме 5 мкл. Для парацетамола и витамина С максимальная высота пика в этом случае достигла 3000 и 3500 mAU и, таким образом, оказалась за пределами линейного диапазона для УФ-области.

На рис. 5 показаны увеличенные хроматограммы для вводимых объемов 1 мкл (красного цвета) и 5 мкл (синего цвета), полученные с помощью системы Agilent 1290 Infinity II DAD. Надежные идентификация и определение хлорфенамина и содержащихся в следовых количествах примесей были возможны только при вводимом объеме 5 мкл. При анализе хлорфенамина высота пика для вводимого объема 1 мкл составила всего 3,8 mAU, а при вводимом объеме 5 мкл — примерно 19 mAU.

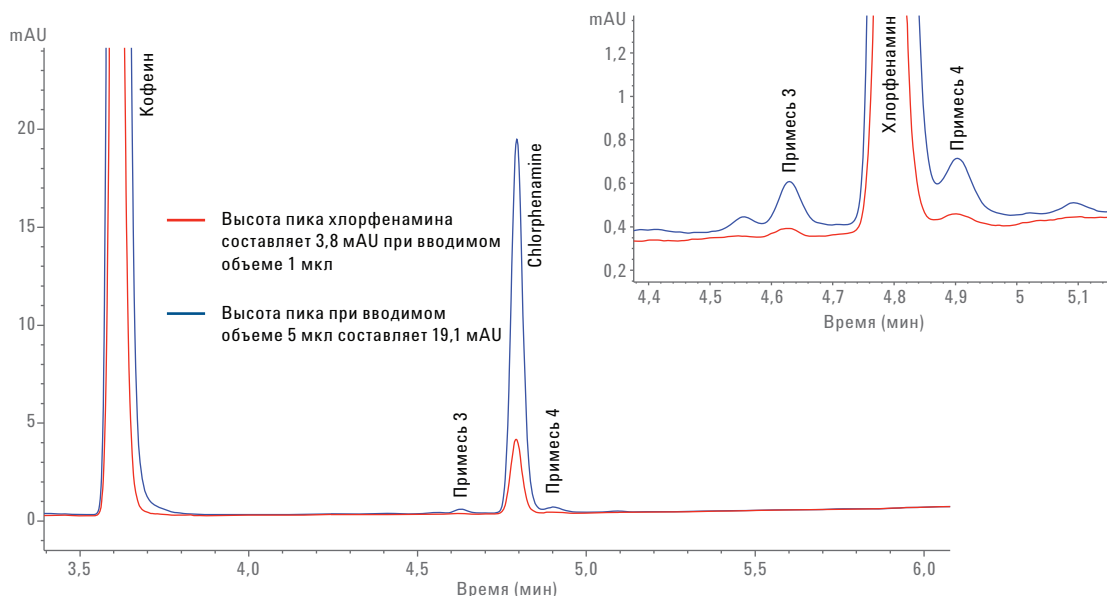


Рис. 5. Увеличенные хроматограммы для вводимых объемов 1 мкл (красного цвета) и 5 мкл (синего цвета), полученные с использованием системы Agilent 1290 Infinity II DAD с кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм

Данная процедура облегчила интегрирование пиков и, следовательно, обеспечила более надежный результат количественного анализа. Примеси 3 и 4 поддаются анализу только при вводимом объеме 5 мкл, а примеси 1 и 2 элюируются на более раннем участке хроматограммы.

Во втором эксперименте 5 мкл комбинированного препарата с фиксированной дозировкой были проанализированы с помощью системы Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD Impurity Analyzer Solution. На рис. 6 показано наложение хроматограмм, полученных с использованием системы Agilent 1290 Infinity II DAD при вводимом объеме 5 мкл (красного цвета) и системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD (синего цвета). При использовании сигнала системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD все пики находились в пределах линейного диапазона и поддавались количественному определению, тогда как при использовании кассетной юветы Max-Light с длиной оптического пути 10 мм сигналы для витамина С и парацетамола достигали насыщения. Сигнал детектора системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD достигает величины 4350 mAU, что находится в пределах линейного диапазона данной системы для УФ-области, который составляет около 6700 mAU. Таким образом, количественное определение витамина С, парацетамола и кофеина может быть осуществлено без проблем, связанных с насыщением сигналов.

На рис. 7 показаны увеличенные хроматограммы для вводимого объема 5 мкл, полученные с использованием системы с обычным детектором на основе диодной матрицы и с использованием системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD. Как и ожидалось, сигнал системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD позволил оценить содержание хлорфенамина и примесей 1–4 одновременно с определением соединений в высокой концентрации.

Для систем Agilent 1290 Infinity II DAD и Agilent 1290 Infinity II HDR DAD был оценен предел обнаружения соединений при соотношении сигнал–шум, равном 3 (Таблица 2). Пределы обнаружения для сигнала, предоставляемые системой Agilent 1290 Infinity II HDR DAD были примерно на 30–50 % ниже, чем у сигнала системы 1290 Infinity II DAD.

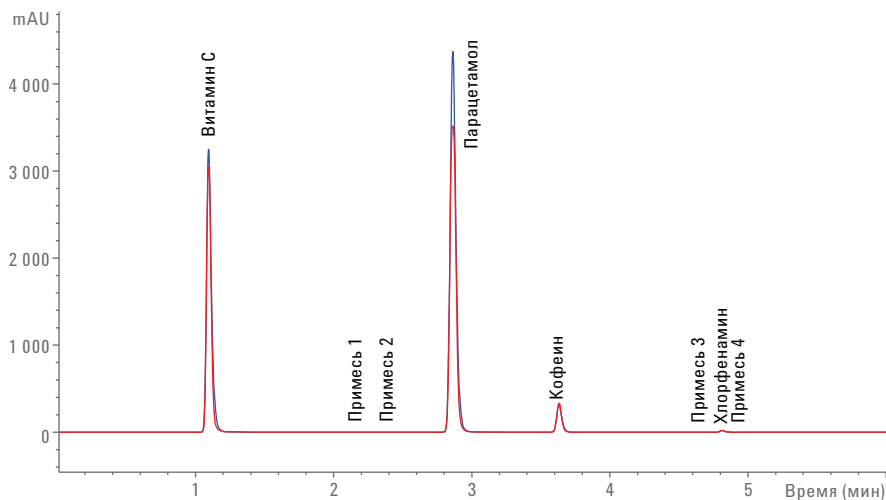


Рис. 6. Наложение хроматограмм при для системы Agilent 1290 Infinity II DAD при вводимом объеме 5 мкл (красного цвета) и для системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD (синего цвета).

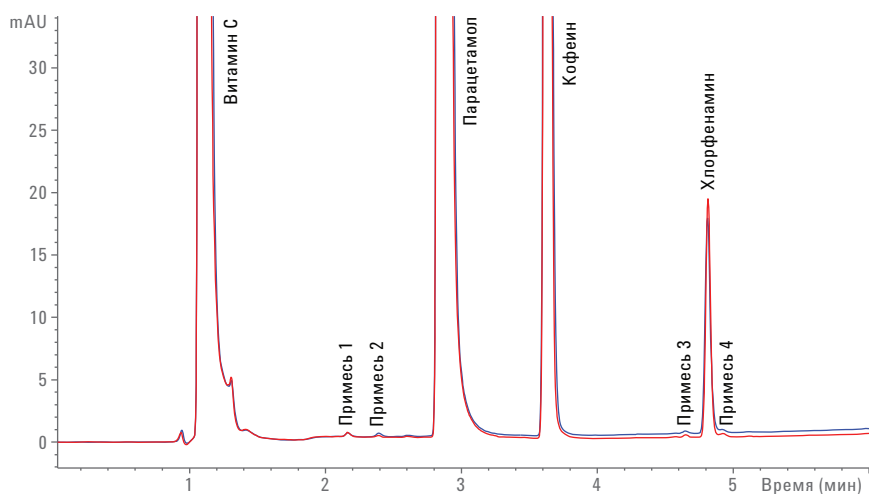


Рис. 7. Увеличенное наложение хроматограмм, полученных с помощью системы Agilent 1290 Infinity II DAD с вводимым объемом 5 мкл, и с помощью системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD (синего цвета).

Таблица 2. Чувствительность

	Предел обнаружения системы Agilent 1290 Infinity II DAD (нг на колонке)	Предел обнаружения системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD (нг на колонке)	Степень улучшения (%)
Витамин С	44,8	26,6	40
Парацетамол	51,5	26,4	49
Кофеин	67,5	47,2	30
Хлорфенамин	118,5	84,4	29

Выводы

При использовании системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD Impurity Analyzer Solution для определения препаратов с низкой и высокой концентрацией, а также дополнительных примесей в комбинированном лекарственном препарате с фиксированной дозировкой требовался один цикл. Для полного определения всех компонентов с помощью детектора на основе диодной матрицы системы Agilent 1290 Infinity II DAD с кассетной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм требовалось два ввода пробы с различным вводимым объемом, чтобы избежать насыщения сигналов для препаратов с большой концентрацией.

К тому же пределы обнаружения решения для системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD Impurity Analyzer Solution были ниже по сравнению с системой Agilent 1290 Infinity II DAD. При использовании системы Agilent 1290 Infinity II HDR DAD Impurity Analyzer Solution предел обнаружения хлорфенамина оказался на 30 % ниже.

www.agilent.com/chem

Информация в этом документе может быть изменена
без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США 1 мая 2015 г.
5991-5743RU



Agilent Technologies