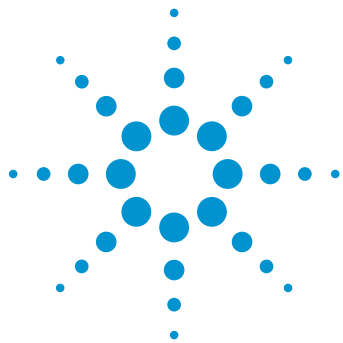




Перенос метода с системы ВЭЖХ Agilent серии 1100 с четырехканальным насосом на систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II

Подтверждение эквивалентности для анализа
антигистаминных препаратов

Рекомендации по применению

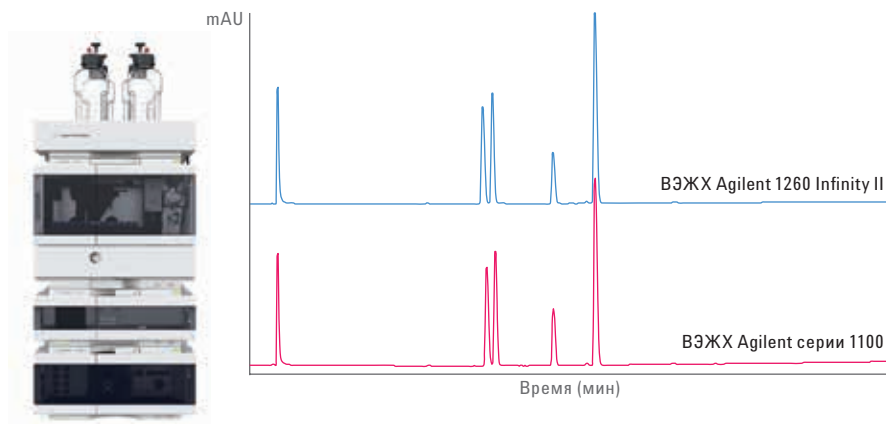
Низкомолекулярные лекарственные вещества

Автор

Соня Кригер (Sonja Krieger)
Agilent Technologies, Inc.
Вальдброн, Германия

Аннотация

Перенос методов традиционной ВЭЖХ с приборов прежних версий на новое оборудование является важной проблемой для любых лабораторий. В данных рекомендациях по применению описан перенос метода традиционной ВЭЖХ для анализа антигистаминных препаратов с системы ВЭЖХ Agilent серии 1100 с четырехканальным насосом на систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II и продемонстрирована воспроизводимость результатов — времен удерживания (ВУ) и разрешения. Метод традиционной ВЭЖХ был перенесен в условия УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению и скорости в соответствии с возможностями системы ВЭЖХ 1260 Infinity II. Это обеспечивает лучшее разделение пиков и сокращает время анализа и расход растворителя.



Agilent Technologies

Введение

Перенос методов между приборами представляет собой важную проблему для любых лабораторий в разных отраслях промышленности¹. Эта процедура является обязательной для валидированных методов в фармацевтической промышленности, но она также важна для контроля качества в других отраслях. Одним из примеров переноса метода между приборами является перенос методов традиционной ВЭЖХ с оборудования прежних версий, такого как система ВЭЖХ Agilent серии 1100, на новые приборы, такие как система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II. В данных рекомендациях по применению описан анализ антигистаминных препаратов с использованием системы ВЭЖХ серии 1100 с четырехканальным насосом. Метод был перенесен на систему ВЭЖХ 1260 Infinity II, при этом были получены эквивалентные результаты по временам удерживания и разрешению. Рабочее давление системы ВЭЖХ 1260 Infinity II в пределах 600 бар позволяет проводить анализы УВЭЖХ, используя колонки Agilent InfinityLab Poroshell. Ниже продемонстрирован перенос анализа антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ в условия УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению и скорости.

Гистамин — это эндогенный биогенный амин, выполняющий функцию нейромедиатора в нервной системе и местного медиатора в кишечнике, коже и иммунной системе². Он вызывает сложные физиологические изменения, которые происходят с участием четырех рецепторов: первый гистаминовый рецептор (H1-рецептор) в значительном количестве экспрессируется по всему организму и отвечает за большинство вызванных гистамином аллергических симптомов². Антигистаминные препараты (антагонисты H1-рецептора) уже давно используются при лечении тошноты, рвоты и аллергии².

Экспериментальная часть

Оборудование

Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II, состоящая из следующих модулей:

- четырехканальный насос Agilent 1260 Infinity II (G7111B);
- автосамплер Agilent 1260 Infinity II Vialsampler (G7129A) со встроенным термостатом колонок (опция #063) и возможностью охлаждения проб (опция #100);
- детектор на диодной матрице Agilent 1260 Infinity II WR (G7115A) со стандартной проточной кюветой 10 мм (G1315-60022).

Система ВЭЖХ Agilent серии 1100, состоящая из следующих модулей:

- четырехканальный насос Agilent 1100 (G1311A);
- дегазатор Agilent 1100 (G1379A);
- автосамплер Agilent 1100 (G1313A);
- термостат колоночного отделения Agilent 1100 (G1316A);
- детектор на диодной матрице Agilent 1100 (G1315B) со стандартной проточной кюветой, 10 мм (G1315-60022).

Программное обеспечение

Agilent CDS OpenLAB версии 2.1 (доступность планируется на сентябрь 2016 г.)

Колонки

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4,6 × 150 мм, 5 мкм (кат. № 883975-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 150 мм, 2,7 мкм (кат. № 693975-302T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 50 мм, 2,7 мкм (кат. № 699975-302T)

Реактивы

Все применяемые растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Ацетонитрил был приобретен у компании Merck, (Дармштадт, Германия). Вода высшей степени очистки была получена в системе Milli-Q Integral, оборудованной мембранным картриджем с размером пор 0,22 мкм (Millipak, EMD Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США). Дигидрофосфат калия, гидрохлорид трипеленамина, малеат хлорфенирамина, тетракаин и гидрохлорид прометазина были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Штайнхайм, Германия).

Проба

Смесь антигистаминных препаратов трипеленамина, хлорфенирамина, тетракаина и прометазина в концентрации 50 мкг/мл готовили в смеси 25 мМ водного раствора дигидрофосфата калия, pH 3, и ацетонитрила (в объемном соотношении 90/10).

Методики

Таблица 1. Условия хроматографирования для анализа методом традиционной ВЭЖХ

Параметр	Описание
Колонка	Agilent ZORBAX SB-C18, 4,6 × 150 мм, 5 мкм
Растворитель	А) 25 мМ дигидрофосфата калия в воде, pH 3 В) ацетонитрил
Градиент	10% В при 0 мин, 55% В при 25 мин
Время элюирования	25 мин
Время промывки колонки после анализа	10 мин
Скорость потока	1,5 мл/мин
Температура	40 °С
Объем ввода	10,0 мкл
Детектирование	204/4 нм, опорная длина волны 360/100 нм, скорость передачи данных 10 Гц

Таблица 2. Условия хроматографирования для анализа УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению

Параметр	Описание
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 150 мм, 2,7 мкм
Растворитель	А) 25 мМ дигидрофосфата калия в воде, pH 3 В) ацетонитрил
Градиент	10% В при 0 мин, 55% В при 13,3 мин
Время элюирования	13,3 мин
Время промывки колонки после анализа	6 мин
Скорость потока	1,2 мл/мин
Температура	40 °С
Объем ввода	4,25 мкл
Детектирование	204/4 нм, опорная длина волны 360/100 нм, скорость передачи данных 40 Гц

Таблица 3. Условия хроматографирования для анализа УВЭЖХ, оптимизированные по скорости

Параметр	Описание
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 50 мм, 2,7 мкм
Растворитель	А) 25 мМ дигидрофосфата калия в воде, pH 3 В) ацетонитрил
Градиент	10% В при 0 мин, 55% В при 2,13 мин
Время элюирования	2,13 мин
Время промывки колонки после анализа	1 мин
Скорость потока	2,5 мл/мин
Температура	40 °С
Объем ввода	4,25 мкл
Детектирование	204/4 нм, опорная длина волны 360/100 нм, скорость передачи данных 80 Гц

Результаты и обсуждение

В данных рекомендациях по применению описан анализ антигистаминных препаратов с использованием традиционной методики ВЭЖХ на системе ВЭЖХ серии 1100 с четырехканальным насосом. Этот метод был перенесен на систему ВЭЖХ 1260 Infinity II с подтверждением эквивалентности результатов. Кроме того, метод традиционной ВЭЖХ для анализа антигистаминных препаратов был перенесен в условия УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению и скорости в соответствии с возможностями системы ВЭЖХ 1260 Infinity II.

На рис. 1 представлены результаты анализа четырех антигистаминных препаратов трипеленамина, хлорфенирамина, тетракаина и прометазина, проведенного методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ серии 1100. Была получена превосходная воспроизводимость времен удерживания и площади пиков (табл. 4).

На рис. 2 представлены результаты анализа антигистаминных препаратов, проведенного методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ 1260 Infinity II, а в табл. 5 представлены соответствующие значения для времен удерживания и площади пиков. По воспроизводимости времен удерживания и площади пиков система ВЭЖХ 1260 Infinity II превосходит систему ВЭЖХ серии 1100. Кроме того, разрешение пиков было немного лучше.

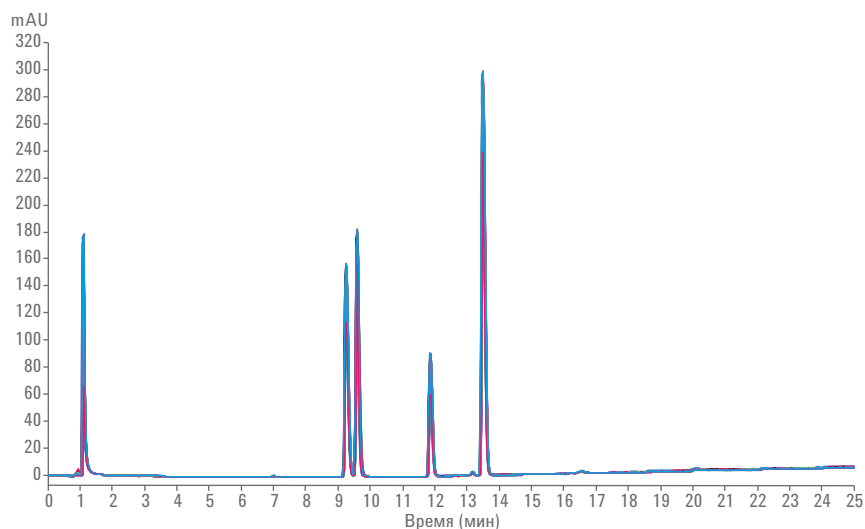


Рис. 1. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Agilent серии 1100; наложение 10 последовательных циклов

Таблица 4. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Agilent серии 1100; воспроизводимость времен удерживания и площади пиков определяли по 10 последовательным циклам

Соединение	ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Площадь	ОСО площади (%)	Разрешение
Трипеленамин	9,26	0,05	1 033,5	0,26	64,6
Хлорфенирамин	9,60	0,05	1 048,3	0,28	2,0
Тетракаин	11,86	0,05	577,2	0,26	13,8
Прометазин	13,49	0,03	2 014,5	0,25	9,1

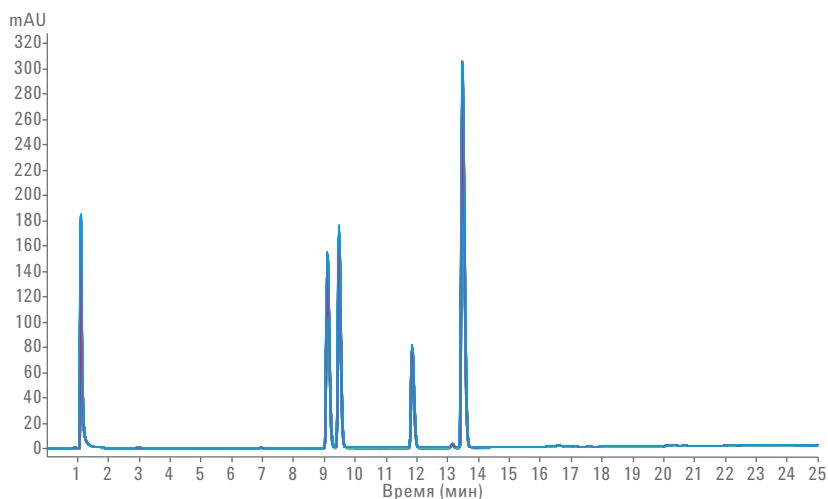


Рис. 2. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; наложение 10 последовательных циклов

На рис. 3 и в табл. 6 сравниваются времена удерживания антигистаминных препаратов, проанализированных на системах ВЭЖХ серии 1100 и ВЭЖХ 1260 Infinity II. Было отмечено отличное согласование времен удерживания (максимальное отклонение составляло –1,7%). Это подтверждает эквивалентность системы ВЭЖХ 1260 Infinity II относительно системы ВЭЖХ серии 1100 для анализа антигистаминных препаратов.

Таблица 5. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; воспроизводимость времен удерживания и площади пиков определяли по 10 последовательным циклам

Соединение	ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Площадь	ОСО площади (%)	Разрешение
Трипеленамин	9,10	0,01	1 018,9	0,21	63,3
Хлорфенирамин	9,48	0,02	1 007,0	0,21	2,3
Тетракаин	11,84	0,02	508,9	0,17	14,5
Прометазин	13,48	0,01	2 017,1	0,14	9,2

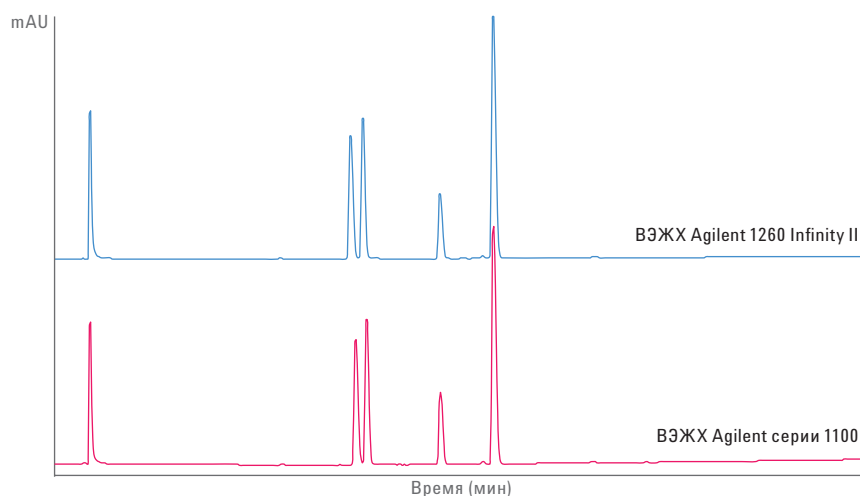


Рис. 3. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системах ВЭЖХ Agilent серии 1100 с четырехканальным насосом и Agilent ВЭЖХ 1260 Infinity II

Таблица 6. Анализ антигистаминных препаратов методом традиционной ВЭЖХ на системах ВЭЖХ Agilent серии 1100 и ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; сравнение значений времен удерживания

Соединение	Отклонение ВУ (мин)	Отклонение ВУ (%)
Трипеленамин	–0,16	–1,7
Хлорфенирамин	–0,12	–1,3
Тетракаин	–0,02	–0,2
Прометазин	–0,02	–0,1

Управление прибором и анализ данных осуществлялись посредством ПО Agilent CDS OpenLAB версии 2.1. На рис. 4 показан фрагмент анализа данных в ПО CDS OpenLAB версии 2.1. Программное обеспечение CDS OpenLAB версии 2.1 представляет собой единый программный комплекс для жидкостной и газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Оно имеет новый, простой пользовательский интерфейс и предоставляет расширенную техническую поддержку для создания отчетов о соответствии. Это программное обеспечение позволяет формировать настраиваемые и интерактивные отчеты, создавая шаблоны простым перетаскиванием, а также просматривать только необходимые данные.

ПО Agilent InfinityLab использовалось совместно с ВЭЖХ 1260 Infinity II. Фитинги Agilent InfinityLab Quick Connect (кат. № 5067-6166, с капилляром 0,17 × 105 мм) и фитинги Agilent Quick Turn (кат. № 5067-5966) позволяют устанавливать колонку легко и быстро, не используя никаких инструментов. Благодаря этому соединение колонок у любого пользователя всегда получается безупречным. Установка ВЭЖХ 1260 Infinity II на стойку Agilent InfinityLab Flex Bench (кат. № 5043-1252) позволяет эффективно использовать рабочее пространство лаборатории и иметь удобный доступ к прибору.

Рабочее давление системы ВЭЖХ 1260 Infinity II в пределах 600 бар позволяет проводить анализы УВЭЖХ, используя колонки InfinityLab Poroshell. При заказе системы ВЭЖХ 1260 Infinity II заказчик имеет возможность выбрать разные колонки InfinityLab Poroshell, которые по умолчанию поставляются вместе с системой, например колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 150 мм, 2,7 мкм (кат. № 693975-302T), или колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 50 мм, 2,7 мкм (кат. № 699975-302T). Эти колонки позволяют перенести метод анализа антигистаминных препаратов в условия УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению и скорости соответственно.

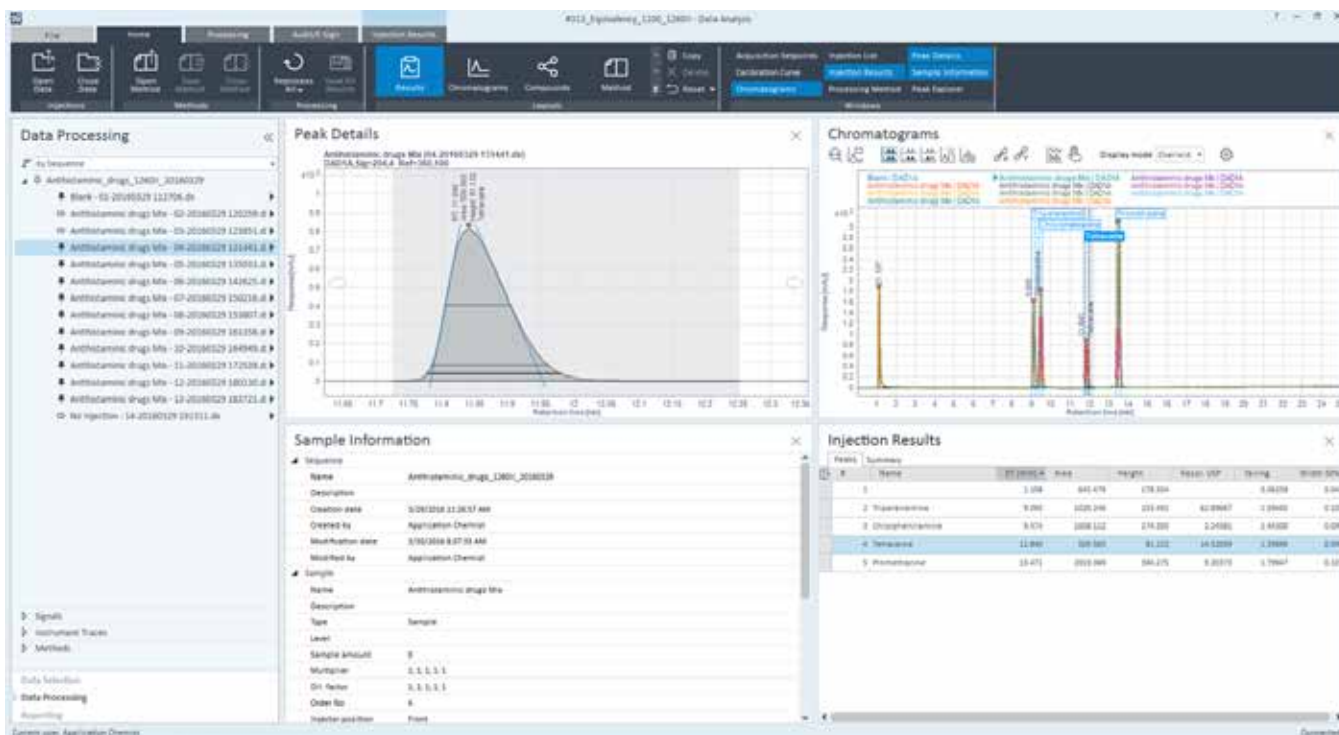


Рис. 4. Фрагмент анализа данных в ПО Agilent CDS OpenLAB версии 2.1

На рис. 5 и в табл. 7 представлены результаты анализа антигистаминных препаратов в условиях УВЭЖХ, оптимизированных по разрешению. Чтобы в полной мере реализовать возможности широкого диапазона давления системы ВЭЖХ 1260 Infinity II, колонку InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 150 мм, 2,7 мкм, можно использовать при относительно высокой скорости потока — 1,2 мл/мин. В этих условиях степень разрешения трипеленамина и хлорфенирамина повысилась с 2,3 (метод традиционной ВЭЖХ) до 5,4 (метод УВЭЖХ, оптимизированный по разрешению). Также можно было сократить время анализа на 47% и уменьшить расход растворителя на 57%.

С установленной колонкой InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 50 мм, 2,7 мкм, анализ антигистаминных препаратов можно проводить в условиях УВЭЖХ, оптимизированных по скорости, как показано на рис. 6 и в табл. 8. В сравнении с методом традиционной ВЭЖХ степень разрешения трипеленамина и хлорфенирамина повысилась с 2,3 до 2,9. При этом можно было значительно сократить время анализа (на 91%) и уменьшить расход растворителя (на 86%).

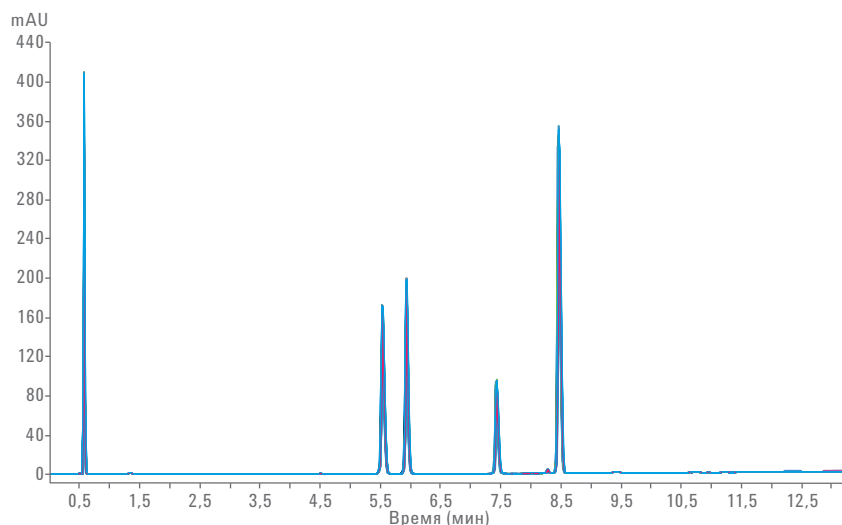


Рис. 5. Анализ антигистаминных препаратов методом УВЭЖХ, оптимизированный по разрешению, на системе ВЭЖХ Agilent. 1260 Infinity II; наложение 10 последовательных циклов

Таблица 7. Анализ антигистаминных препаратов методом УВЭЖХ, оптимизированный по разрешению, на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; воспроизводимость времен удерживания и площади пиков определяли по 10 последовательным циклам

Соединение	ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Площадь	ОСО площади (%)	Разрешение
Трипеленамин	5,53	0,05	523,7	0,05	97,2
Хлорфенирамин	5,93	0,03	515,5	0,10	5,4
Тетракаин	7,43	0,04	260,6	0,09	21,0
Прометазин	8,46	0,03	1 028,2	0,04	13,6

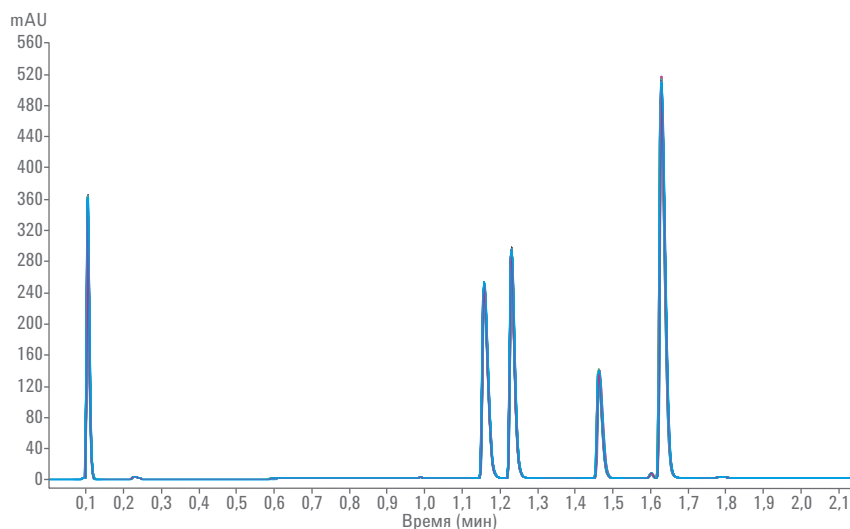


Рис. 6. Анализ антигистаминных препаратов методом УВЭЖХ, оптимизированный по скорости, на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; наложение 10 последовательных циклов

Выводы

Перенос метода традиционной ВЭЖХ для анализа антигистаминных препаратов с системы ВЭЖХ Agilent серии 1100 с четырехканальным насосом на систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II показал максимальное отклонение времен удерживания –1,7% и немного лучшее разрешение. Это подтверждает эквивалентность системы ВЭЖХ 1260 Infinity II относительно системы ВЭЖХ серии 1100 с четырехканальным насосом для анализа антигистаминных препаратов. Рабочее давление системы ВЭЖХ 1260 Infinity II в пределах 600 бар позволяет проводить анализ УВЭЖХ, используя колонки Agilent InfinityLab Poroshell. Благодаря переносу метода традиционной ВЭЖХ в условия УВЭЖХ, оптимизированные по разрешению и скорости, улучшилось разделение пиков и при этом сократилось время анализа и уменьшился расход растворителя.

Литература

1. Agilent 1290 Infinity with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, part number G4220-90314, **2015** [Agilent 1290 Infinity с интеллектуальной системой эмуляции методик, руководство пользователя Agilent Technologies, каталожный номер G4220-90314, **2015 г.**].
2. Panula, *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC VIII. Histamine Receptors, *Pharmacological Reviews* **2015**, 67, 601–655 [Панула и соавт., Международный союз базовой и клинической фармакологии. XC VIII. Гистаминовые рецепторы, *Pharmacological Reviews* **2015 г.**, 67, с. 601–655].

Таблица 8. Анализ антигистаминных препаратов методом УВЭЖХ, оптимизированный по скорости, на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II; воспроизводимость времен удерживания и площади пиков определяли по 10 последовательным циклам

Соединение	ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Площадь	ОСО площади (%)	Разрешение
Трипеленамин	1,16	0,00	254,4	0,19	53,0
Хлорфенирамин	1,23	0,00	252,1	0,23	2,9
Тетракаин	1,46	0,05	126,7	0,25	9,8
Прометазин	1,63	0,04	500,0	0,19	6,4

www.agilent.com

Только для исследовательских целей.
Не для использования в диагностических процедурах.

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Опубликовано в США 1 июня 2016 г.
5991-6914RU



Agilent Technologies