

УДК 615.07

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ПАРАБЕНОВ

А.С. Осипов^{1*}, О.А. Попова¹, А.И. Сулименкова¹, М.В. Нездольева¹

Резюме. Исследована возможность применения хроматографической колонки Zorbax NH₂, 150×4,6 мм (5 мкм), для разделения эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты (парабенов). Разделение анализируемых соединений на колонках с аминоресорбентами в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 95%. Разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии. В отличие от аминогрупп нитрильные группы колонки Zorbax XDB CN практически не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Хроматографическая колонка Zorbax NH₂ может быть использована для определения нормируемой примеси в парабенах – эфирах 4-гидроксibenзойной кислоты [подвижная фаза: ацетонитрил – 1% уксусная кислота в воде (80:20)].

Ключевые слова: ВЭЖХ, жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий, эфиры 4-гидроксibenзойной кислоты (парабены); Фармакопея США, Европейская Фармакопея.

APPLICATION OF HYDROPHILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR PARABENS ANALYSIS

A.S. Osipov^{1*}, O.A. Popova¹, A.I. Sulimenkova¹, M.V. Nezdoliev¹

Abstract. There are results of the possibility of applying a chromatographic column Zorbax NH₂ 150×4,6 mm (5 μm) to separate the esters of 4-hydroxybenzoic acid (parabens). Separation of test compounds on the column with aminosorbents in hydrophilic interaction chromatography is possible at a content of more than 95% of acetonitrile in the mobile phase. The resolution between peaks of parabens in a hydrophilic interaction liquid chromatography is substantially less than in a reverse-phase chromatography. In contrast to the amino nitrile groups Zorbax XDB CN columns practically haven't affinity for the phenolic hydroxyl groups of parabens in a hydrophilic interaction liquid chromatography. Chromatography column Zorbax NH₂ can be used to detect a normalized impurity in paraben – 4-hydroxybenzoic acid [mobile phase: acetonitrile – 1% acetic acid in water (80:20)].

Keywords: HPLC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), 4-Hydroxybenzoic Esters (Parabens), United States Pharmacopeia; European Pharmacopeia.

¹ – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 6

¹ – Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 6, Shchukinskaya str., Moscow, 127051, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Osipov@exrmed.ru
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31-03

ВВЕДЕНИЕ

Эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты (название соединений по Европейской Фармакопее), или парабены (название соединений по Фармакопее США), применяют главным образом при изготовлении суспензий и микстур, а также в парфюмерной промышленности в качестве антимикробных консервантов. Наиболее часто применяют метилпарабен (нипагин) и пропилпарабен (нипазол), их обычно используют совместно в соотношении по массе 4:1. Кроме того, бутилпарабен применяют в качестве пластификатора при изготовлении лекарственных форм. Условия хроматографирования парабенов полностью гармонизированы в соответствующих фармакопейных статьях Европейской Фармакопеи и Фармакопеи США. Следует, однако, отметить, что наряду с нейтральными (феноль-

ными) формами парабенов в Фармакопее США описаны натриевые (растворимые) формы парабенов [1, 2]. В монографиях зарубежных фармакопей приведена методика хроматографирования парабенов на колонках C18, 150×4,6 мм (5 мкм), при длине волны 272 нм. В качестве подвижной фазы применяют смесь 6,8 г/л КН₂РO₄ в воде – метанол (35:65). Скорость потока – 1,3 мл/мин. Данные условия хроматографирования применяют при анализе метил-, этил- и пропилпарабенов. При анализе бутилпарабена соотношение компонентов подвижной фазы – 50:50. Изменение состава подвижной фазы вызвано необходимостью определения специфичной примеси в консерванте – изобутилпарабена [3]. Во всех монографиях на парабены нормируется содержание 4-гидроксibenзойной кислоты (примеси А). Следует отметить, что в условиях предложенных фармакопейных методик

4-гидроксibenзойная кислота элюируется с колонки до парабеов (относительное время удерживания – 0,1 относительно бутилпарабена). Данные хроматографические методики являются примером обращенно-фазовой хроматографии.

По причине присутствия фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений и в антиоксидантах бутилгидроксианизоле и бутилгидрокситолуоле [4, 5] можно ожидать схожести поведения парабеов и этих антиоксидантов на колонках с аминсорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [6].

Цель работы – исследование возможности применения жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) для анализа парабеов в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась с использованием хроматографа Agilent, серия 1100, с диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США). Разделение парабеов осуществляли на следующих колонках: Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм); Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); Zorbax NH₂, 150×4,6 мм (5 мкм) (Agilent Technologies, США).

Детектирование осуществляли при 260 и 272 нм (детектор DAD G1515B). Скорость потока элюента – 1,0 мл/мин. Ввод образцов в объеме 5 мкл. В работе использовали стандартные образцы метил-пара-гидроксibenзоата (серия 4,0; 99,8%), этил-пара-гидрок-

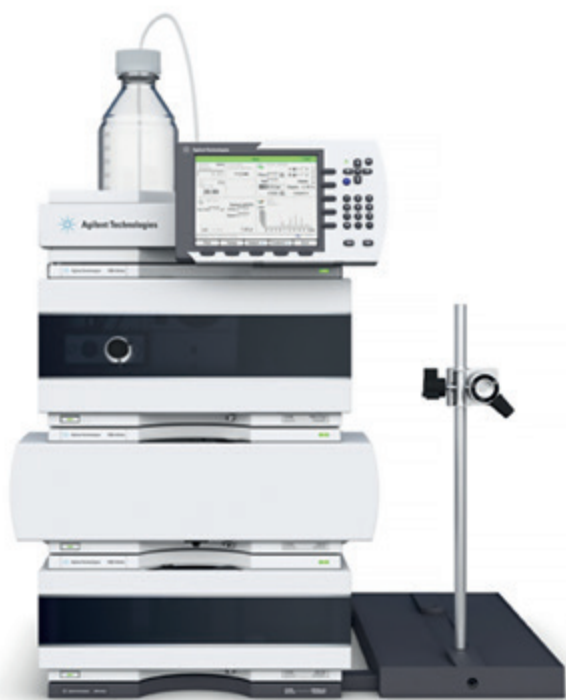
сibenзоата (серия 2,8; 99,8%) Европейской Фармакопеи, стандартный образец пропилпарабена (серия J1J025; 100,0%) Фармакопеи США. Стандартный образец *n*-бутил-4-гидроксibenзоата (бутилпарабен), 99,0%, серия 1028679 (ABCR GmbH, Германия). Стандартный образец 4-гидроксibenзойной кислоты *n*-гептилового эфира (*n*-гептилпарабен), 99,0%, серия 20608 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия). Стандартный образец 4-гидроксibenзойной кислоты, 99,0%, серия STBC6703V (Sigma-Aldrich, США). Стандартные образцы растворяли в смеси ацетонитрил – вода (95:5) (хроматография гидрофильных взаимодействий) либо ацетонитрил – вода (50:50) (обращенно-фазовая хроматография). Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин (центрифуга ELMi CM 50, Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминсорбентами могут быть в зависимости от анализируемых объектов как близки [7, 8], так и кардинально отличаться от колонок с нитрильными сорбентами [6, 9]. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси парабеов в условиях обращенно-фазовой хроматографии [на колонках Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм), и Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм)] и хроматографии гидрофильных взаимодействий [на колонке Zorbax NH₂, 150×4,6 мм (5 мкм)].

Следует отметить, что отклик детектора при 260 нм в 1,6 раза больше, чем при детектировании парабеов при 272 нм; учитывая невысокое содержание парабеов в лекарственных препаратах, детектирование при 260 нм более предпочтительно.

На рисунке 1 приведена хроматограмма разделения модельной смеси парабеов в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Следует отметить, что при этом меняется очерёдность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией. Также необходимо отметить, что разрешение между пиками анализируемых парабеов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии (таблица 1, рисунок 2). Полученные данные указывают, что применение данной разновидности хроматографии для анализа гомологического ряда парабеов нерационально. Напротив, на колонке с аминсорбентом Zorbax NH₂ нормируемая примесь в парабенах – 4-гидроксibenзойная кислота – может быть уверенно проанализирована (рисунок 3). Данная примесь элюируется позже парабеов, которые в условиях анализа 4-гидроксibenзойной кислоты практически не удерживаются хроматографической колонкой. В свою очередь, в условиях разделения парабе-



ВЭЖХ Agilent 1260

нов при проведении гидрофильной хроматографии 4-гидроксibenзойная кислота не вымывается с хроматографической колонки за время проведения измерений. Следует отметить, что с увеличением доли ацетонитрила в подвижной фазе и, соответственно, сокращением доли уксусной кислоты увеличивается время удерживания 4-гидроксibenзойной кислоты (таблица 2), что указывает на ионообменный вариант жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В результате этого процесса 4-гидроксibenзойная кислота вытесняется с аминогрупп сорбента уксусной кислотой.

Таблица 1.

Времена удерживания и разрешение между пиками метил-, этил-, бутил- и *n*-гептилпарабена при различных условиях хроматографирования*

Колонка, состав подвижной фазы	Разрешение между пиками метил- и этилпарабена	Разрешение между пиками бутил- и гептилпарабена	Время удерживания метилпарабена, мин	Время удерживания бутилпарабена, мин	Время удерживания <i>n</i> -гептилпарабена, мин
Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 50 мМ KH_2PO_4 (4:6)	9,78	16,08	2,94	6,07	69,58
Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – вода (4:6)	3,43	5,09	2,72	3,65	8,30
Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (95:5)	1,57	1,94	5,31	4,79	4,48
Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (98:2)	1,95	2,07	11,29	10,02	9,29

Примечание: * – средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

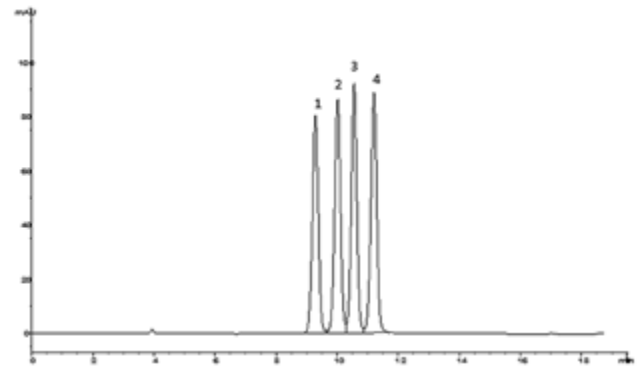


Рисунок 1. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (98:2); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – *n*-гептилпарабен, 2 – бутилпарабен, 3 – этилпарабен, 4 – метилпарабен

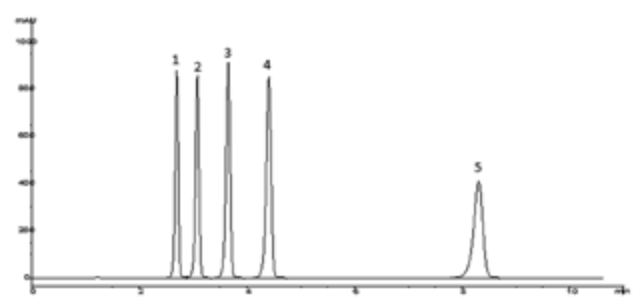


Рисунок 2. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – вода (40:60); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – метилпарабен, 2 – этилпарабен, 3 – пропилпарабен, 4 – бутилпарабен, 5 – *n*-гептилпарабен

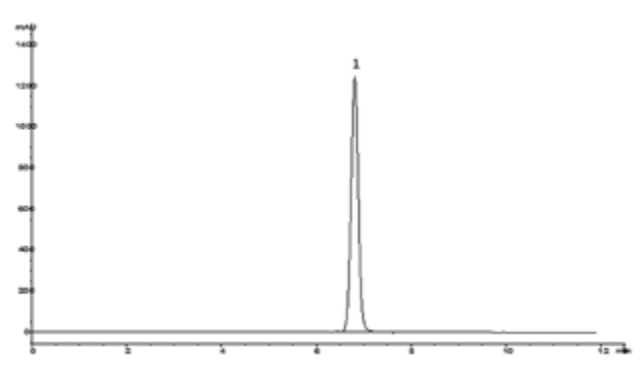


Рисунок 3. Хроматограмма стандартного образца 4-гидроксibenзойной кислоты. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – 1% уксусная кислота в воде (80:20); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – 4-гидроксibenзойная кислота

Таблица 2.

Параметры хроматографирования 4-гидроксibenзойной кислоты*

Колонка, состав подвижной фазы	Время удерживания 4-гидроксibenзойной кислоты, мин	Эффективность колонки по пику 4-гидроксibenзойной кислоты (теоретич. тарелок)	Коэффициент асимметрии пика 4-гидроксibenзойной кислоты
Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (70:30)	4,95	8780	0,97
Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (80:20)	6,81	10040	1,01
Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (90:10)	19,91	11010	1,01

Примечание: * – средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

В отличие от аминогрупп нитрильные группы практически не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенатов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Так, при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе с 90% до 99,9% время удерживания метилпарабена на колонке Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм), возрастало только с 1,64 мин до 1,73 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа парабенатов нерационально. Разрешение между пиками парабенатов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Напротив, на колонке с аминсорбентом Zorbax NH₂ в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий нормируемая примесь в парабенах – 4-гидроксibenзойная кислота – может быть уверенно проанализирована. Данная примесь элюируется позже парабенатов, которые в условиях анализа 4-гидроксibenзойной кислоты практически не удерживаются хроматографической колонкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Methyl parahydroxybenzoate // European Pharmacopoeia, ed. 8.0.
2. Monograph: Methylparaben Sodium // United States Pharmacopoeia, 39 ed.
3. Monograph: Butyl Hydroxybenzoate // British Pharmacopoeia, 2012.
4. К.В. Ноздрин, А.А. Великородный, А.С. Осипов, Г.М. Родионова. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксизанола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии // Фармация. 2007. № 5. С. 7–10.
5. А.С. Осипов, Е.Н. Орлов. Применение колонок с оптически активными сорбентами для разделения позиционных изомеров // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 5. С. 28–31.
6. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, М.М. Миронова, Е.Л. Ковалёва. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксизанола // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 3. С. 50–52.
7. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, О.А. Победин. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2013. Т. 47. № 6. С. 51–53.
8. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 8. С. 45–48.
9. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Л.А. Трухачёва. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3. С. 108–111.



**Ведущий мировой производитель
пресс инструмента **Теперь в России****

ШИРОКИЙ АССОРТИМЕНТ ПРЕСС ИНСТРУМЕНТА

- Срок поставки по РФ от 6 недель
- Профессиональная консультация от ведущих специалистов
- Индивидуальный инжиниринг пресс инструмента
- Точность изготовления и износостойкость
- Низкие эксплуатационные затраты
- Комплектующие и узлы для обслуживания инструмента

CELEBRATING
40 YEARS
OF TABLETING EXCELLENCE IN...



+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 (800) 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct.ru

Pharmcontract
group of companies

Эксклюзивный представитель Natoli Engineering в России