

Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов

А. С. Осипов, О. А. Попова, С. Е. Милкина, Т. Н. Грецкая, * А. И. Сулименкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Резюме. На основании опыта использования метода жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа соединений различной природы исследована возможность применения хроматографической колонки XBridge Amide 150×4,6 мм для разделения эфиров 4-гидроксибензойной кислоты (парабенов). Сравнивались времена удерживания, порядок выхода и разрешение между пиками парабенов и примеси А (4-гидроксибензойная кислота) при использовании подвижных фаз ацетонитрил — фосфатный буфер с содержанием ацетонитрила 7–10 % и подвижных фаз ацетонитрил — вода с содержанием ацетонитрила 96–99 % на указанной колонке. На основании полученных данных установлено, что для разделения гомологов парабенов между собой предпочтительно использование обращенно-фазового варианта хроматографии, а для анализа примеси 4-гидроксибензойной кислоты — хроматографии гидрофильных взаимодействий. При анализе возможных механизмов удерживания соединений на колонке XBridge Amide сделано предположение, что в отличие от аминок групп амидные группы сорбента не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Ключевые слова: ВЭЖХ; жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий; эфиры 4-гидроксибензойной кислоты (парабены); амидный сорбент; определение примесей

Для цитирования: Осипов АС, Попова ОА, Милкина СЕ, Грецкая ТН, Сулименкова АИ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2018; 8(1): 56–60. DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-1-56-60

* **Контактное лицо:** Сулименкова Александра Ильинична; Sulimenkova@expmed.ru

The Use of a Chromatographic Column Packed with Amide Sorbent for the Analysis of Parabens

A. S. Osipov, O. A. Popova, S. E. Milkina, T. N. Gretskaia, * A. I. Sulimenkova

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article investigates the applicability of the amino column XBridge Amide 150×4.6 mm for separation of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) — based on experience with hydrophilic interaction liquid chromatography used for analysis of various compounds. The study analysed the retention times, elution order and resolution between the peaks of parabens and impurity A (4-hydroxybenzoic acid) while using acetonitrile : phosphate buffer mobile phases containing 7–10 % of acetonitrile and acetonitrile : water mobile phases containing 96–99 % of acetonitrile, and the above-mentioned column. It was demonstrated that reversed-phased chromatography was preferable for separation of paraben homologues, while hydrophilic interaction chromatography was preferable for analysis of 4-hydroxybenzoic acid impurity. When analysing potential mechanisms of retention of compounds by the XBridge Amide column it was suggested that, unlike amino groups, amide groups of the sorbent do not have affinity for phenolic hydroxyl groups of parabens in hydrophilic interaction liquid chromatography.

Key words: HPLC; hydrophilic interaction liquid chromatography; 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens); amide sorbent; impurities determination

For citation: Osipov AS, Popova OA, Milkina SE, Gretskaia TN, Sulimenkova AI. The Use of a Chromatographic Column Packed with Amide Sorbent for the Analysis of Parabens. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2018; 8(1): 56–60. DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-1-56-60

* **Contact person:** Sulimenkova Aleksandra Ilyinichna; Sulimenkova@expmed.ru

Парабены, или эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты, применяют как антимиикробные консерванты при изготовлении мягких и жидких лекарственных форм (суспензий, микстур, мазей и кремов). В составе твердых желатиновых капсул парабены могут применяться для предотвращения разрушения желатина микроорганизмами. Наиболее часто в составе лекарственных средств используют метилпарабен (нипагин) и пропилпарабен (нипазол) как отдельно, так и в сочетании друг с другом. Кроме того, следует отметить, что наряду с нейтральными (фенольными) формами парабенов в Фармакопее США описаны натриевые (растворимые) формы парабенов [1, 2].

В монографиях Европейской фармакопеи и Фармакопеи США приведены условия анализа для метил-, этил- и пропилпарабенов в режиме обращенно-фазовой хроматографии на колонках C18 150×4,6 мм (5 мкм). В качестве подвижной фазы применяют смесь водного раствора 6,8 г/л дигидрофосфата калия (KН₂РO₄) с метанолом (35:65), детектирование при длине волны 272 нм. При анализе бутилпарабена, как более массивного гомолога, на той же колонке соотношение компонентов подвижной фазы иное — 50:50, что связано с определенным специфичной примесью изобутилпарабена [3]. Во всех монографиях на парабены нормируется содержание 4-гидроксibenзойной кислоты (примеси А). Необходимо отметить, что в описанных условиях 4-гидроксibenзойная кислота элюируется с колонки до парабенов. В большинстве случаев небольшое время удерживания соединения затрудняет его количественный анализ из-за плохого разделения с пиками «мертвого» объема.

Ранее было показано, что хроматографические колонки с фенольными и нитрильными сорбентами могут быть использованы для определения парабенов в лекарственных препаратах в условиях обращенно-фазовой хроматографии [4]. В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонке Zorbax NH₂ не удается достичь такой же степени разделения гомологов парабенов между собой, однако появляется возможность уверенно определять примесь 4-гидроксibenзойной кислоты, поскольку в этих условиях анализа [5] данная примесь элюируется с хроматографической колонки после парабенов.

Присутствие фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений, а также в антиоксидантах бутилгидроксианизоле и бутилгидрокситолуоле [6, 7] объясняет определенную схожесть поведения парабенов и этих антиоксидантов на колонках с аминосорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [8]. Можно ожидать такую же схожесть поведения парабенов и на колонке с амидным сорбентом.

Цель работы — исследовать возможность применения хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов, а также уточнить механизм их хроматографического разделения на данных колонках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на хроматографе Agilent 1100 с диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США). Разделение парабенов осуществляли на колонках XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм) (Waters, Ирландия) и Zorbax NH₂ 150×4,6 мм (5 мкм) (Agilent Technologies, США). Детектирование при длине волны 260 нм. Скорость потока элюента составляла 1,0 мл/мин. Объем ввода пробы 5 мкл.

Составы использованных подвижных фаз приведены в таблицах и подписях к рисункам.

В работе использовали стандартные образцы метилпарагидроксibenзоата и этилпарагидроксibenзоата Европейской фармакопеи, стандартный образец пропилпарабена Фармакопеи США, а также *n*-бутил-4-гидроксibenзоат (бутилпарабен) (ABC R GmbH, Германия), 4-гидроксibenзойной кислоты *n*-гептиловый эфир (*n*-гептилпарабен) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия) и 4-гидроксibenзойную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Пробы растворяли в смеси ацетонитрил — вода (95:5) (хроматография гидрофильных взаимодействий) либо ацетонитрил — вода (30:70) (обращенно-фазовая хроматография). Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин (центрифуга Eppendorf minispin, Германия).

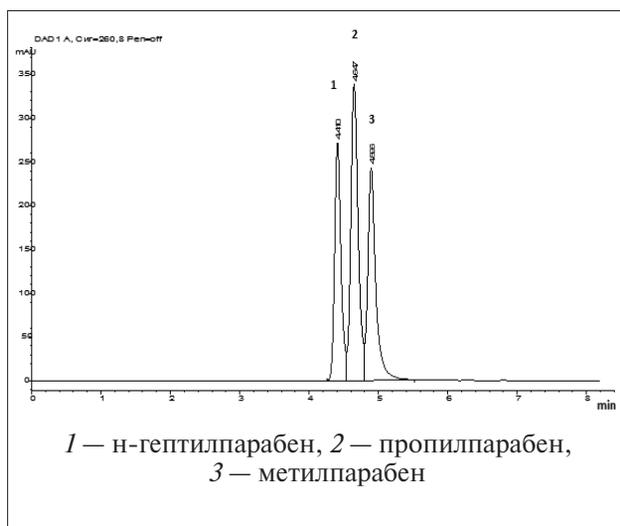
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с амидными сорбентами могут быть, в зависимости от анализируемых соединений, как близки (разделение мочевины и гидроксикарбамида, анализ координационных соединений платины) [9–12], так и значительно отличаться от колонок с аминосорбентами (разделение изомеров бутилгидрокситолуола, анализ органических нитратов) [8, 13, 14].

На рисунке 1 представлена хроматограмма разделения модельной смеси парабенов в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонке XBridge Amide. Следует отметить, что при этом меняется очередность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией (рис. 2) и уменьшается разрешающая способность колонки.

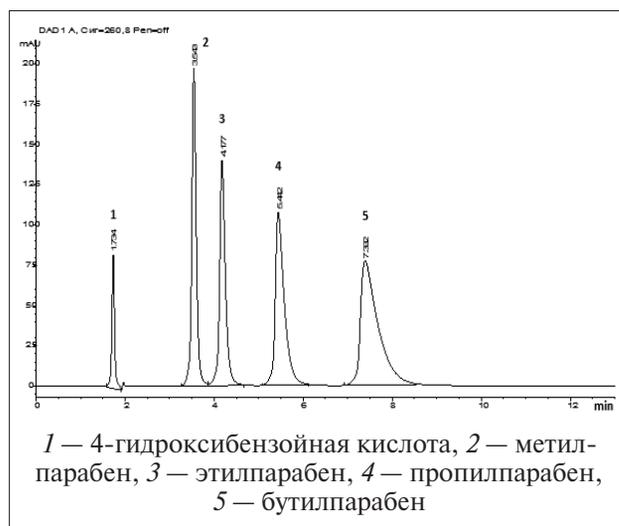
В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси парабенов в условиях обращенно-фазовой хроматографии на амидной колонке XBridge Amide. С уменьшением содержания ацетонитрила в подвижной фазе закономерно возрастают времена удерживания анализируемых парабенов. Нормируемая в парабенах примесь (4-гидроксibenзойная кислота) элюируется с колонки в этом режиме до парабенов (рис. 2).

При сравнении полученных результатов с результатами предыдущих исследований [5] становится очевидно, что колонка с амидным сорбентом по степени разделения парабенов, которая может быть достигнута в режиме хроматографии гидрофильных



1 — н-гептилпарабен, 2 — пропилпарабен,
3 — метилпарабен

Рис. 1. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабинов. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—1 мМ KH_2PO_4 (99:1); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм



1 — 4-гидроксibenзойная кислота, 2 — метилпарабен, 3 — этилпарабен, 4 — пропилпарабен, 5 — бутилпарабен

Рис. 2. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабинов и 4-гидроксibenзойной кислоты. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—4 мМ KH_2PO_4 в воде (7:93); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм

Таблица 1

ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ И РАЗРЕШЕНИЕ МЕЖДУ ПИКАМИ МЕТИЛ-, ЭТИЛ-, ПРОПИЛ- И БУТИЛПАРАБЕНА НА КОЛОНКЕ XBridge Amide В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ*

Состав подвижной фазы	Разрешение между пиками метил- и этилпарабена	Разрешение между пиками пропил- и бутилпарабена	Время удерживания метилпарабена, мин	Время удерживания пропилпарабена, мин	Время удерживания бутилпарабена, мин
Ацетонитрил—4 мМ KH_2PO_4 (10:90)	2,33	3,34	3,02	4,04	5,02
Ацетонитрил—4 мМ KH_2PO_4 (7:93)	3,36	3,85	3,54	5,45	7,40

* Средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

взаимодействий, уступает в этом колонке с аминокорбентом (рис. 3).

Таким образом, применение хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонке с амидным сорбентом XBridge Amide для анализа гомологического ряда парабинов оказывается практически невозможным. Однако в описанных условиях амидная колонка пригодна для определения примеси 4-гидроксibenзойной кислоты в парабенах. Данная примесь в этих условиях элюируется позже парабинов, которые в режиме гидрофильных взаимодействий очень слабо удерживаются хроматографической колонкой (рис. 4). Анализ 4-гидроксibenзойной кислоты на колонке с амидным сорбентом XBridge Amide в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий может быть предложен как альтернативный вариант определения этой примеси в парабенах.

В таблице 2 приведены сравнительные результаты времени удерживания, эффективности колонки и коэффициента асимметрии 4-гидрок-

сibenзойной кислоты в зависимости от соотношения ацетонитрил—вода в подвижной фазе. Следует отметить, что с увеличением доли ацетонитрила увеличивается время удерживания 4-гидроксibenзойной кислоты, данный факт характерен для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

При анализе 4-гидроксibenзойной кислоты проявляется различие в свойствах хроматографических колонок с амино- и амидными сорбентами. Аминсорбент Zorbax NH_2 представляет собой ионообменник, на котором для элюирования 4-гидроксibenзойной кислоты необходимо применять подвижные фазы, содержащие 20–30 водных частей 1 % уксусной кислоты [5]. Амидный сорбент XBridge Amide не обладает подобными свойствами и практически не обладает сродством к фенольным гидроксильным группам парабинов. На этом сорбенте для элюирования 4-гидроксibenзойной кислоты в составе подвижной фазы достаточно только 1–2 % воды (табл. 2).

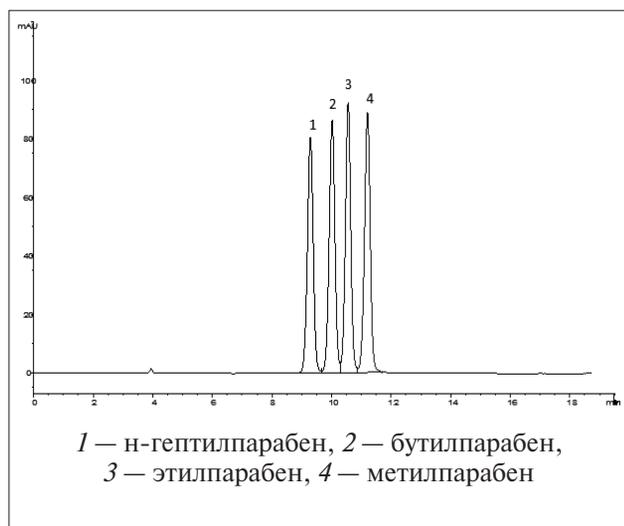


Рис. 3. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов [5].

Условия анализа: колонка Zorbax NH₂ 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—2 мМ КН₂РO₄ (98:2); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм

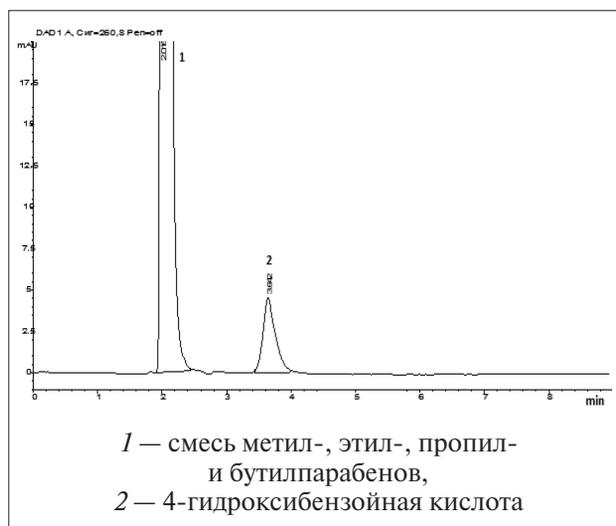


Рис. 4. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов и 4-гидроксibenзойной кислоты.

Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—вода (97:3); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм

Таблица 2

ПАРАМЕТРЫ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ 4-ГИДРОКСIBENЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА КОЛОНКЕ XBridge Amide*

Состав подвижной фазы	Время удерживания 4-гидроксibenзойной кислоты (мин)	Эффективность колонки по пику 4-гидроксibenзойной кислоты (ГТ)	Коэффициент асимметрии пика 4-гидроксibenзойной кислоты
Ацетонитрил—вода (96:4)	2,96	4300	1,28
Ацетонитрил—вода (98:2)	5,22	2630	1,56
Ацетонитрил—вода (99:1)	6,55	2180	1,95

* Средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий на колонке XBridge Amide оказывается неэффективной для анализа гомологического ряда парабенов. Разрешение между пиками парабенов в этих условиях существенно меньше, чем при использовании обращенно-фазовой хроматографии. Однако указанная колонка с амидным сорбентом пригодна в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для определения примеси 4-гидроксibenзойной кислоты в парабенах. Смена режима элюирования приводит к смене порядка выхода компонентов с колонки, и нормируемая примесь удерживается дольше парабенов, которые, практически не разделяясь, элюируются в начале хроматограммы.

*Авторы не заявили о конфликте интересов
The authors did not declare a conflict of interest*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Monograph: Methyl Parahydroxybenzoate. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017. Available from: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
2. Monograph: Methylparaben Sodium. United States Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017. Available from: <http://app.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=40&nf=35&s=2&officialOn=December 1, 2017>
3. Monograph: Butyl Hydroxybenzoate. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
4. Осипов АС, Попова ОА, Сулейманов РР, Нездольева МВ. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты. Успехи современного естествознания 2016; 11(2): 256–60. [Osipov AS, Popova OA, Suleymanov RR, Nezdozieva MV. Application of HPLC Analysis Esters of 4-hydroxybenzoic Acid. Advances in Current Natural Sciences 2016; 11(2): 256–60 (In Russ.)]
5. Осипов АС, Попова ОА, Сулименкова АИ, Нездольева МВ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа парабенов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2017; (1): 104–7. [Osipov AS, Popova OA, Sulimenkova AI, Nezdozieva MV. The Use of Liquid Chromatography of Hydrophilic Interactions for the Analysis of Parabens. Drug Development and Registration 2017; (1): 104–7 (In Russ.)]

6. Ноздрин КВ, Великородный АА, Осипов АС, Родионова ГМ. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксианизола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии. Фармация 2007; (5): 7–10. [Nozdryn KV, Velikородnyi AA, Osipov AS, Rodionova GM. Optimization of Chromatographic Conditions for Butylhydroxyanisole and Butylhydroxytoluene in the Joint Presence. Pharmacy 2007; (5): 7–10 (In Russ.)]
7. Осипов АС, Орлов ЕН. Применение колонок с оптически-активными сорбентами для разделения позиционных изомеров. Химико-фармацевтический журнал 2012; 46(5): 28–31. [Osipov AS, Orlov EN. Separation of Positional Isomers Using Chiral Chromatography Columns. Pharmaceutical Chemistry Journal 2012; 46(5): 288–91]
8. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксианизола. Химико-фармацевтический журнал 2015; 49(3): 50–2. [Osipov AS, Nechaeva EB, Mironova MM, Kovaleva EL. Use of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography to Separate Butylhydroxyanisole Isomers. Pharmaceutical Chemistry Journal 2015; 49(3): 203–5]
9. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины. Химико-фармацевтический журнал 2013; 47(6): 51–3. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of a Chromatographic Column with a Diol Sorbent for the Analysis of Platinum Coordination Compounds. Pharmaceutical Chemistry Journal 2013; 47(6): 51–3]
10. Осипов АС, Попова ОА, Рослякова НВ, Кожемякина ЛЛ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа координационных соединений платины. Разработка и регистрация лекарственных средств 2017; (2): 152–5. [Osipov AS, Popova OA, Roslyakova NV, Kozhemyakina LL. The Use of an Amide Sorbent Chromatographic Column for Analysis of Platinum Coordination Compounds. Drug Development and Registration 2017; (2): 152–5 (In Russ.)]
11. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа гидроксикарбамида. Разработка и регистрация лекарственных средств 2015; (2): 140–4. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Analysis Hydroxycarbamide. Drug Development and Registration 2015; (2): 140–4 (In Russ.)]
12. Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ, Тимошина ЕЮ. Применение хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения гидроксикарбамида и мочевины. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(2): 81–4. [Osipov AS, Popova OA, Larionova SG, Timoshina EYu. Hydrophilic Interaction Chromatography Used for Separation Hydroxycarbamide and Urea. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(2): 81–4 (In Russ.)]
13. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2016; (3): 108–11. [Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Analysis of Organic Nitrates. Drug Development and Registration 2016; (3): 108–11 (In Russ.)]
14. Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ, Грецкая ТН, Милкина СЕ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения позиционных изомеров бутилгидроксианизола и изосорбида мононитрата. Фармация 2017; 66(5): 14–8. [Osipov AS, Popova OA, Larionova SG, Gretskaia TN, Milkina SE. The Use of Liquid Chromatography of Hydrophilic Interactions to Separate the Positional Isomers of Butylhydroxyanisole and Isosorbide Mononitrate. Pharmacy 2017; 66(5): 14–8 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Попова Ольга Анатольевна. Начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Осипов Алексей Сергеевич. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук

Милкина Светлана Евгеньевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Грецкая Татьяна Николаевна. Главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук

Сулименкова Александра Ильинична. Ведущий эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Статья поступила 24.10.2017

Article was received 24 October 2017

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Olga A. Popova. Head of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Alexey S. Osipov. Chief Expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Svetlana E. Milkina. Chief Expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Tatiana N. Gretskaia. Chief Expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality. Candidate of Pharmaceutical Sciences

Aleksandra I. Sulimenkova. Leading Expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality

Принята к печати 14.02.2018

Accepted for publication 14 February 2018