

УДК 543.544

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФИРОВ 4-ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

Осипов А.С., Попова О.А., Сулейманов Р.Р., Нездольева М.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: Osipov@expmed.ru

Исследована возможность применения хроматографических колонок с фенильными и нитрильными сорбентами для разделения эфиров 4-гидроксibenзойной кислоты (парабенов) при определении антими-
кробных консервантов в лекарственных препаратах. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацето-
нитрила или метанола и воды. При замене воды на буферный раствор KH_2PO_4 эффективность хроматогра-
фических колонок увеличивается в 1,3 раза. На фенильных и нитрильных колонках n-гептилпарабен имеет
значительно меньшее время удерживания, чем на колонках C18. Хроматография парабенов может быть
удобным инструментом для изучения свойств хроматографических колонок с фенильными и нитрильными
сорбентами. Разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных
взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии. В отличие от
аминогрупп, нитрильные группы практически не обладают сродством к фенольным гидроксильным груп-
пам парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография гидрофильных
взаимодействий, эфиры 4-гидроксibenзойной кислоты (парабены), сорбенты, Фармакопея
США, Европейская фармакопея

APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ANALYSIS 4-HYDROXYBENZOIC ACID ESTERS

Osipov A.S., Popova O.A., Suleymanov R.R., Nezdoleva M.V.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: Osipov@expmed.ru

The possibility of the use of chromatographic columns with phenyl and nitrile sorbents for separation of
4-hydroxy-benzoic acid esters (parabens) was investigated. As the mobile phase used a mixture of acetonitrile or
methanol and water. The use instead water of the buffer solution KH_2PO_4 increases the efficiency of the columns
is 1.3 times. On the phenyl and nitrile columns n-heptilpaben has a significantly lower retention time than C18
columns. Chromatography of parabens can be a useful tool for studying the properties of chromatographic columns
with phenyl and nitrile sorbents. Resolution between the peaks of parabens in a hydrophilic interaction liquid
chromatography significantly less than in conditions of reversed-phase chromatography. In contrast to the amino
groups, nitrile groups have practically no affinity to the phenolic hydroxyl groups of parabens in a hydrophilic
interaction liquid chromatography.

Keywords: high performance liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC),
4-hydroxybenzoic esters (parabens), sorbents, United States Pharmacopeia, European Pharmacopeia

Эфиры пара гидроксibenзойной кисло-
ты (название соединений по Европейской
фармакопее), или парабены (название со-
единений по Фармакопее США), применяют
главным образом при изготовлении суспен-
зий и микстур, а также в парфюмерной про-
мышленности в качестве антимикробных
консервантов. В этой статье для краткости
изложения материала использовали наи-
менование Фармакопеи США. Кроме того,
парабены могут вводиться в состав твердых
желатиновых капсул для предотвращения
разрушения желатина микроорганизмами.
Наиболее часто применяют метилпарабен
(нипагин) и пропилпарабен (нипазол), их
обычно используют совместно в соотноше-
нии по массе 4:1. Кроме того, бутилпарабен
применяют в качестве пластификатора при

изготовлении лекарственных форм. Условия
хроматографирования парабенов полно-
стью гармонизированы в соответствующих
фармакопейных статьях Европейской фар-
макопеи и Фармакопеи США. Следует, од-
нако, отметить, что наряду с нейтральными
(фенольными) формами парабенов в Фар-
макопее США описаны натриевые (раство-
римые) формы парабенов [6, 7]. В моногра-
фиях зарубежных фармакопей приведена
методика хроматографирования парабенов
на колонках C18 150×4,6 мм (5 мкм) при
длине волны 272 нм. В качестве подвиж-
ной фазы применяют смесь 6,8 г/л KH_2PO_4
в воде – метанол (35:65). Скорость потока –
1,3 мл/мин. Данные условия хроматогра-
фирования применяют при анализе метил-,
этил- и пропилпарабенов. При анализе бу-

тилпарабена соотношение компонентов подвижной фазы – 50:50. Изменение состава подвижной фазы вызвано необходимостью определения примеси в консерванте – изобутилпарабена [5]. *Н*-гептилпарабен не описан в фармакопейных статьях, его применяют в качестве внутреннего стандарта при количественном определении такролимуса в мазях и некоторых других препаратов. В данном случае применение внутреннего стандарта компенсирует эффект

неполной экстракции препаратов из гидрофобной мазевой основы. В этом исследовании, *н*-гептилпарабен использовали только как гидрофобное соединение при изучении свойств хроматографических колонок с фенильными и нитрильными сорбентами.

Цель работы – исследование возможности применения хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для определения антимикробных консервантов в лекарственных препаратах.

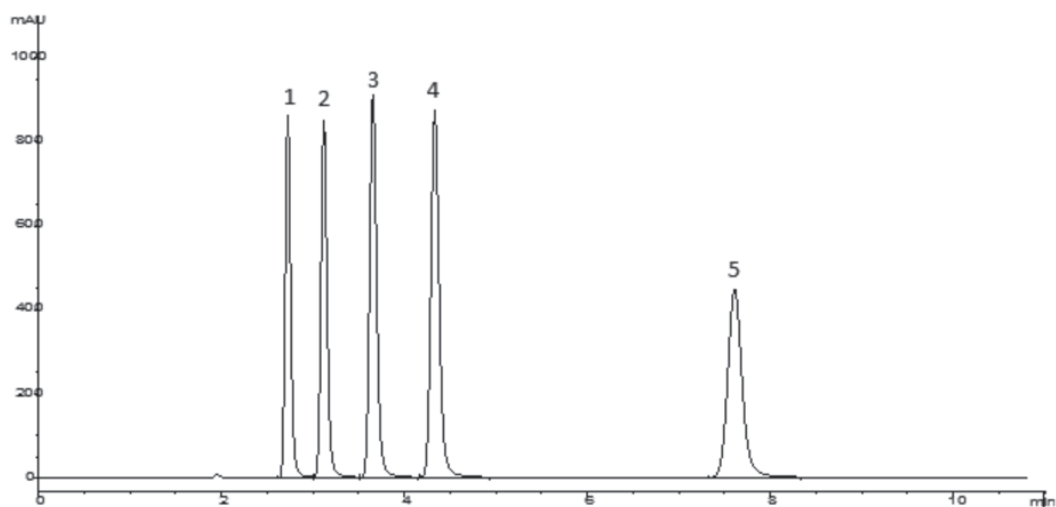


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Spherisorb Phenyl 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза – ацетонитрил – 50 мМ KH_2PO_4 (рН 4,6) (40:60); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм. 1 – метилпарабен, 2 – этилпарабен, 3 – пропилпарабен, 4 – бутилпарабен, 5 – *н*-гептилпарабен

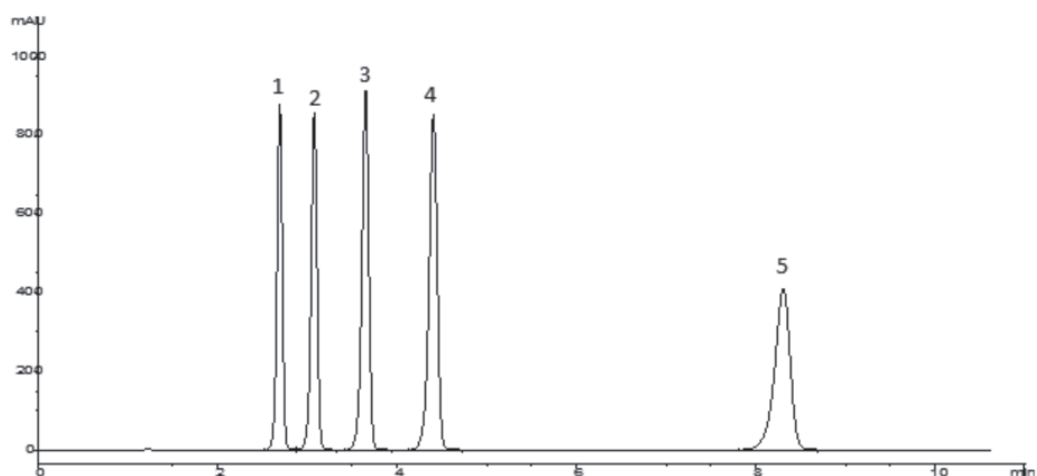


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза – ацетонитрил – вода (40:60); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм. 1 – метилпарабен, 2 – этилпарабен, 3 – пропилпарабен, 4 – бутилпарабен, 5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

Времена удерживания и разрешение между пиками метил-, этил-, пропил- и бутилпарабена при различных условиях хроматографирования*

Колонка. Состав подвижной фазы	Разрешение между пиками метил- и этил- парабена	Разрешение между пиками пропил- и бу- тилпарабена	Время удер- живания метил-пара- бена, мин	Время удерживания пропил-пара- бена, мин	Время удерживания н-гептил- парабена, мин
Zorbax XDB C18 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – 50 мМ KH ₂ PO ₄ (4:6)	9,78	16,08	2,94	6,07	69,58
Zorbax XDB C18 150×4,6 мм (5 мкм) метанол – 50 мМ KH ₂ PO ₄ (55:45)	9,29	16,15	3,14	8,17	57,33
Zorbax XDB C18 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – вода (4:6)	6,51	13,30	2,65	6,105	61,57
Zorbax SB Phenyl 150×4,6 мм (3,5 мкм) Ацетонитрил – вода (4:6)	6,87	10,76	3,17	5,29	22,1
Spherisorb Phenyl 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – вода (4:6)	3,01	3,89	2,67	4,24	7,51
Spherisorb Phenyl 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – 50 мМ KH ₂ PO ₄ (4:6)	3,51	4,60	2,73	6,35	7,60
Spherisorb Phenyl 150×4,6 мм (5 мкм) метанол – 50 мМ KH ₂ PO ₄ (4:6)	5,79	6,88	3,31	6,24	40,88
Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – вода (4:6)	3,43	5,09	2,72	3,65	8,30
Диасфер Фенил 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – 50 мМ KH ₂ PO ₄ (4:6)	5,64	8,26	3,58	5,86	22,06
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – 2 мМ KH ₂ PO ₄ (95:5)	1,04	–	5,31	4,94	4,48
Zorbax NH ₂ 150×4,6 мм (5 мкм) Ацетонитрил – 2 мМ KH ₂ PO ₄ (98:2)	1,07	–	10,3	9,60	8,70

Пр и м е ч а н и е . *средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась с использованием хрома-тографа Agilent, серия 1100 с диодно-матричным детектором («Agilent Technologies», США). Раз-деление парабенов осуществляли на следующих колонках: Zorbax XDB C18 150×4,6 мм (5 мкм), Zorbax SB Phenyl 150×4,6 мм (3,5 мкм), Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм), Zorbax NH₂ 150×4,6 мм

(5 мкм) («Agilent Technologies», США), Spherisorb Phenyl 150×4,6 мм (5 мкм) («Waters», США) и Диа-сфер Фенил 150×4,6 мм (5 мкм) («БиоХимМак», Россия). В работе использовали стандартные об-разцы метил-, этил-, пропилпарабенов Европейской фармакопеи, стандартный образец бутилпарабена Фармакопеи США. Стандартный образец 4-гидрок-сibenзойной кислоты *n*-гептиловый эфир (*n*-гептил-парабен) («Dr. Ehrenstorfer GmbH», Германия).

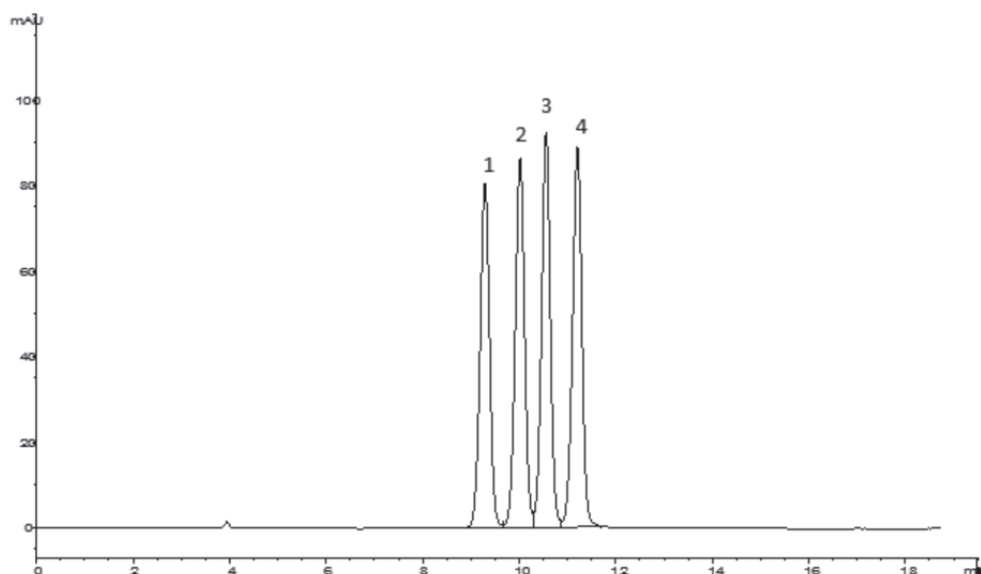


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабен. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 , 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза – ацетонитрил – 2мМ KH_2PO_4 (98:2); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм: 1 – *n*-гептилпарабен, 2 – бутилпарабен, 3 – этилпарабен, 4 – метилпарабен

Результаты исследования и их обсуждение

Некоторые результаты хроматографирования парабен приведены в табл. 1. Следует отметить, что отклик детектора при 260 нм в 1,64 раза больше, чем при детектировании парабен при 272 нм, учитывая невысокое содержание парабен в лекарственных препаратах и желатиновых капсулах, детектирование при 260 нм более предпочтительно. Эффективность колонок при применении подвижных фаз (метанол – 50 мМ KH_2PO_4 или ацетонитрил – 50 мМ KH_2PO_4) в среднем в 1,3 раз больше, чем при применении аналогичных по содержанию органики подвижных фаз без буферного компонента. Не было выявлено особых преимуществ в использовании в качестве органических компонентов подвижных фаз ацетонитрила либо метанола. Необходимо отметить только заметное увеличение времени удерживания бутилпарабена, и особенно *n*-гептилпарабена, при использовании подвижных фаз, содержащих метанол на хроматографических колонках с фенильными сорбентами. Хотя разрешение между пиками низших гомологов парабен при этом возрастает, не наблюдается заметного увеличения их времен удерживания. Время удерживания *n*-гептилпарабена

на колонках с фенильными и нитрильными сорбентами значительно меньше, чем на колонке Zorbax XDB C18 (табл. 1, рис. 1, 2). Данный факт объясняется тем, что при сорбции парабен на этих сорбентах ключевую роль имеют π - π взаимодействия между бензольными кольцами анализируемых соединений и функциональными группами сорбентов. В отличие от этого, на сорбентах C18 главным образом имеют место гидрофобные взаимодействия между поверхностью сорбента и анализируемыми соединениями, поэтому время удерживания сильно зависит от длины алифатических цепей анализируемых соединений. Аналогичный эффект повышения селективности фенильных и нитрильных сорбентов к ароматическим группировкам и к системам сопряженных двойных связей наблюдался при анализе антиоксидантов бутилгидроксианизола и бутилгидрокситолуола [1, 4], а также сорбиновой кислоты [3]. По причине присутствия фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений, также можно ожидать схожести поведения парабен и антиоксидантов на колонках с аминсорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [2]. На рис. 3 приведена хроматограмма разделения модель-

ной смеси парабенов в данных условиях хроматографирования, при этом меняется очерёдность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращённо-фазовой хроматографией. Следует отметить, что разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращённо-фазовой хроматографии (таблица). Так, при использовании в качестве подвижных фаз смесей ацетонитрила и воды, время удерживания метилпарабена на колонке Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм) возросло только с 1,64 мин до 1,73 мин при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе с 90 % до 99,9 %.

Заключение

Хроматографические колонки с фенильными и нитрильными сорбентами могут быть использованы для определения парабенов в лекарственных препаратах. Исследования по хроматографии в гомологическом ряду парабенов также могут быть полезным инструментом для изучения физико-химических свойств фенильных и ни-

трильных сорбентов. Разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращённо-фазовой хроматографии.

Список литературы

1. Ноздрин К.В., Великородный А.А., Осипов А.С., Родионова Г.М. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксанизола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии. *Фармация*. – 2007; (5): 7–10.
2. Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Миронова М.М., Ковалева Е.Л. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксанизола. *Химико-фармацевтический журнал*. – 2015; 49(3): 50–2.
3. Осипов А.С., Нечаева Е.Б. Применение капроновой и циклогексанкарбоновой кислот для анализа бензойной и сорбиновой кислот. *Химико-фармацевтический журнал*. – 2013. 47(2): 51–3.
4. Осипов А.С., Орлов Е.Н. Применение колонок с оптически-активными сорбентами для разделения позиционных изомеров. *Химико-фармацевтический журнал*. – 2012. – № 46(5). – С. 28–31.
5. British Pharmacopoeia 2012. Monograph: Butyl Hydroxybenzoate. <https://www.pharmacopoeia.com>.
6. European Pharmacopoeia ed. 8.0. Monograph: Methyl parahydroxybenzoate. http://www.edqm.eu/medias/fichiers/index_english.pdf.
7. United States Pharmacopoeia 39 ed. Monograph: Methylparaben Sodium. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/products/usp2008p2supplement3.pdf.