

## HPLC separation of bioactive components of anti-inflammatory syrup on stationary phases with embedded polar groups

O.A. Syrotchuk<sup>1</sup>, I.P. Didukh<sup>1</sup>, S.F. Kuras<sup>1</sup>, V.N. Zaitsev<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> SE «Central laboratory for quality control of medicines and medical products» Kudriavskaya Str., 10 G, 04053;

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Str., 64, Kyiv, 01033;

\*e-mail: zaitsev@univ.kiev.ua

Received: June 05, 2015; Accepted: December 23, 2015

*For better separation of water-soluble biologically-active compounds by RP-HPLC in mobile phases with high content of water, new C18-type stationary phases with embedded polar groups (EPG-C18) were studied and the results were compared with those obtained on conventional C18 phases. Typical active ingredients of anti-inflammatory syrup, such as: paracetamol, phenylpropanolamine, caffeine and chlorpheniramine maleate were selected for investigation because of difficulties of their separation and also wide range of the polarity. It is demonstrated that complete HPLC separation of the components of the syrup cannot be achieved on any from studied C18 phases in 0.025M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=9/1) mobile phase with pH interval 2.5-7.0. Contrary complete separation of the components can be easily achieved on EPG-C18 column. Because of essential changing of the retention time of the components with pH it has been assumed that separation of the compounds on EPG-C18 column includes both dispersion and dipole-dipole interactions of the embedded groups with polar group of the analytes.*

**Keywords:** paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine, chlorpheniramine, HPLC

## Хроматографічне розділення компонентів протизастудного засобу з використанням нерухомих фаз, що містять інкорпоровану полярну вставку

O.A. Сиротчук<sup>1</sup>, І.Р. Дідух<sup>1</sup>, С.Ф. Курас<sup>1</sup>, В.М. Зайцев<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> ДП «Центральна лабораторія аналізу якості лікарських засобів та медичної продукції» вул. Кудрявська, 10 Г, 04053 Київ, Україна;

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Володимирська, 64, Київ, Україна; \*e-mail: zaitsev@univ.kiev.ua

Надійшла: 05 червня 2015 р; Прийнята: 23 грудня 2015 р

*З метою покращення якості визначення полярних біологічно-активних сполук методом обернено-фазової ВЕРХ в мобільних фазах із високим вмістом води, досліджено умови розділення основних компонентів протизастудного засобу: парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну та хлорфеніраміну малеату на нерухомих фазах з іммобілізованими октадецильними групами (C18) та на фазах з інкорпорованими у C18 матрицю полярними фрагментами (EPG-C18). Показано, що в при використанні в якості рухомої фази 0.025 М водно-ацетонітрильного (90:10) розчину NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, розділити усі компоненти модельної суміші не вдається на жодній дослідженій C18 колонці в усьому вивченому інтервалі рН (2.5–7.0). Натомість, спостерігається повне розділення усіх компонентів на колонках EPG-C18. Показано, що на хроматографічних фазах типу EPG-C18 розділення аналітів може реалізуватися за дисперсійним механізмом (для малополярних молекул) та за змішаним механізмом, що включає хімічну взаємодію аналіту із полярною групою інкорпорованого іммобілізованого фрагменту.*

**Ключові слова:** парацетамол, кофеїн, фенілпропаноламін, хлорфенірамін, рідинна хроматографія

На сьогодні, метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) є одним з найбільш популярних для якісного та кількісного визначення речовин в галузі фармацевтики. Коректний вибір нерухомої фази для ВЕРХ є одним з найважливіших факторів, що визначає ефективність застосування

методу. Нерухома фаза на основі силікагелю з прищепленими октадецильними групами (C18) найчастіше використовується при ВЕРХ визначенні неполярних і, навіть, деяких полярних сполук. Проте, більшість біологічно-активних сполук мають іоногенні групи, що забезпечують їх

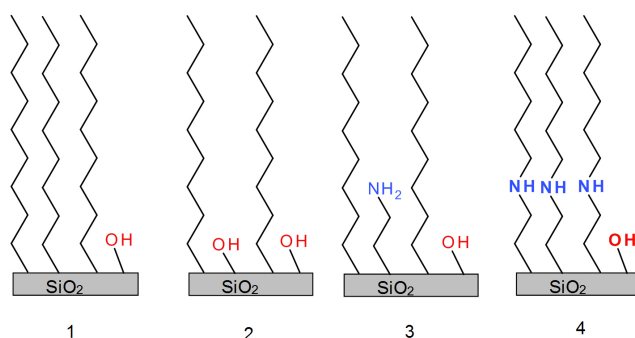
розчинність у воді. Тому час їх утримування на фазі C18 буде низьким, що негативно впливає на якість розділення таких компонентів. Для збільшення часу утримування і оптимізації розділення полярних сполук на C18 фазах запропоновано використання іон-парних реагентів [1]. Наприклад, відповідно до вимог фармакопеї США, ВЕРХ визначення парацетамолу у протизастудних засобах, що містять кофеїн, фенілпропаноламін та хлорфеніраміну мусить проводитися на фазі C18 у присутності іон-парного реагенту [2]. У розвиток такого підходу автори дослідження [3] використовують міцелярну хроматографію для розділення багатокомпонентної суміші. Проте, використання іон-парних реагентів в хроматографічному аналізі потребує значного часу для врівноваження хроматографічної системи, призводить до безповоротної зміни властивостей нерухомої фази, та скорочення життя хроматографічної колонки [1].

Іншим підходом до вдосконалення методів розділення полярних сполук методом обернено-фазової ВЕРХ є зміна властивостей нерухомої хроматографічної фази, шляхом зміни густини іммобілізованого шару та його складу, концентрації та характеру розподілу груп на поверхні [4-6]. Просте зменшення концентрації C18 груп на поверхні носія з метою збільшення інтегральної гідрофільності адсорбенту (Рис.1) виявилось не вдалим: при використанні таких фаз для розділення органічних основ хроматографічні піки мали несиметричний характер (через утворення водневих зв'язків амінів із кислотними залишковими силанольними групами поверхні кремнезему) [4].

Крім того, низька густина закріпленого C18 шару приводила до зміни його геометрії у розчинах із високим вмістом води, що негативно відбивалося на хроматографічних властивостях хроматографічної фази [7, 8]. Проте, ідея зміни густини закріпленого шару набула подальший розвиток і були отриманні мономодальні біфункціональні (тобто такі, що містять дві типи іммобілізованих груп однакової природи, наприклад C18 і C4) та бімодальні (іммобілізовані групи мають різну природу, наприклад C18 і  $-(CH_2)_3NH_2$ ) адсорбенти, Рис.1 [9]. Ідея застосування бімодальних адсорбентів у

обернено-фазовій ВЕРХ полягає у зменшенні ліпофільності іммобілізованої фази без зменшення її густини. Це сприяє стабільності іммобілізованої фази у середовищі з високим вмістом води та зменшує вплив залишкових силанольних груп на хроматографічні властивості фази, і, відповідно, покращує симетрію хроматографічних піків при розділенні полярних сполук основної природи [10]. Крім того, для таких фаз з'являється можливість тонкого регулювання властивостей колонки шляхом зміни співвідношення гідрофільних та гідрофобних груп у іммобілізованому шарі. Стратегія, яка уможливила бімодальних фаз була вперше висвітлена в роботі [11].

Проте, розробити доступну методику, що дозволяє контролювано інкорпоровати гідрофільні групи у масив ліпофільних поки що не вдалося. Натомість, реалізована інша ідея – розроблено метод отримання мономодальних фаз в яких фрагмент іммобілізованої молекули містить полярну групу [12-15]. Це може бути амідна, карбаматна або етерна група. Таких полярних груп в одній іммобілізованій молекулі може бути декілька [16]. Як і у бімодальних фазах, полярний фрагмент знаходиться біля поверхні носія та блокує утворення водневих зв'язків між аналітами основної природи та силанольними групами поверхні, Рис.1. Такі хроматографічні фази отримали назву обернених фаз з інкорпорованою полярною групою (embedded polar groups, EPG), чи EPG фази. Переваги EPG-C18 фаз у порівнянні з іншими відомими підходами до розділення полярних сполук методом обернено-фазової ВЕРХ продемонстрована в роботах [12,14]. Зокрема показано [13-15], що EPG-C18 фази, які містять карбаматні фрагменти  $(-OC(O)NH(CH_2)_nCH_3)$  мають альтернативну селективність до деяких груп аналітів за рахунок іонообмінних чи диполь-дипольних взаємодій з інкорпорованими групами [17]. Тому колонки такого типу здатні довше утримувати полярні сполуки, порівняно з C18 фазами [14, 18]. Відповідно до цього, альтернативну селективність бімодальних фаз можна використати для покращення умов хроматографічного розділення компонентів, що погано розділяються на класичних C18 колонках.



**Рис.1.** Схема будови іммобілізованого шару на поверхні фази C18: 1) високої густини, 2) низької густини, 3) бімодальної природи, 4) з інкорпорованою полярною групою.

В цій роботі ми спробували розібратися які позитиви та які обмеження мають EPG фази у порівнянні із сучасними фазами C18 високої густини при їх застосуванні для обернено-фазового ВЕРХ розділення полярних сполук із середовища з високим вмістом води. В якості об'єкта дослідження було обрано модельну суміш що містить водорозчинні сполуки різної полярності, які застосовуються як компоненти протизастудних засобів, а саме: парацетамол, кофеїн, фенілпропаноламін та хлорфенірамін малеат.

### Експериментальна частина

Для приготування модельних розчинів було використано парацетамол (PC), (стандартний зразок Європейської фармакопеї), кофеїн (CF), (чистота 99.9%, вторинний стандарт, Sigma-Aldrich), фенілпропаноламіну гідрохлорид (PPA), (чистота 100.0%, вторинний стандарт), хлорфеніраміну малеат (CFAM), (чистота 99.6%, вторинний стандарт, Sigma-Aldrich). Для приготування рухомої фази та розчинів для хроматографування було використано деіонізовану воду (Simplicity, Milli-Q, Millipore), ацетонітрил (HPLC grade, Sigma-Aldrich) та натрію дигідроген фосфат моногідрат (analytical grade, Merck), фосфорна кислота 85% (analytical

grade, Merck), натрію гідроксид (analytical grade, Merck).

*Розчини для хроматографування готували розчиненням 20 мг стандартного зразку аналіту у 100 мл води. Таким чином були отримані розчини парацетамолу, фенілпропаноламіну гідрохлориду, кофеїну та хлорфеніраміну малеату. Змішаний модельний розчин було отримано розчиненням 10 мг кожної з цих речовин у 100 мл води.*

*Приготування рухомої фази.* Водні буферні розчини з pH=2.5, 4.5 та 7.0 готували змішуванням водних розчинів  $H_3PO_4$  та NaOH у кількостях, необхідних для приготування 0.025M буферного розчину. Рухому фазу готували змішуванням водних буферних розчинів із ацетонітрилом у співвідношенні (об./об.) 90:10 та 70:30.

Дослідження проводили на хроматографі HP 1100 (Agilent Technologies), обладнаному діодно-матричним детектором, чотирьох каналним насосом, дегазатором, термостатованим автоматичним пробовідбірником і термостатом колонок. Кислотність рухомої фази контролювали за допомогою pH-метра Merthrom 713.

В роботі було використано шість хроматографічних колонок: три з яких містять C18 і три EPG-C18 нерухомі фазами, Табл.1.

**Таблиця 1.** Основні характеристики хроматографічних колонок.

Назва колонки	Виробник	Тип фази	d*, Å	S**, м²/г	Вміст карбону ω, %	C***, μmol/m²
Symmetry C18		C18	100	335	19	2.36
Symmetry Shield RP8	Waters	EPG-C18	100	335	15	2.67
Symmetry Shield RP18		EPG-C18	100	335	17	1.76
Perfectbond ODS-HD	Analysentechik	C18	150	320	18.5	2.41
Zorbax eclipse XDB18	Agilent	C18	80	180	10	2.31
Supelcosil ABZ	Supelco	EPG-C18	120	170	12	2.45

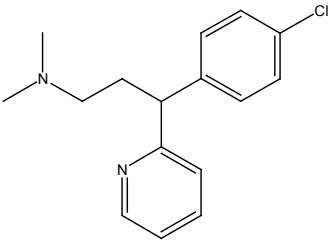
\* - діаметр пор; \*\* - питома площа поверхні; \*\*\* - середня густина закріпленого шару була розрахована за формулою:  $C(\mu\text{mol}/\text{m}^2) = (10^4 \cdot \omega) / (S \cdot 12 \cdot n(C))$ , де  $n(C)$  – кількість атомів карбону у іммобілізованому фрагменті.

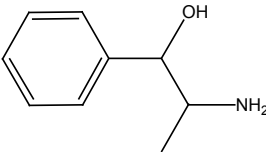
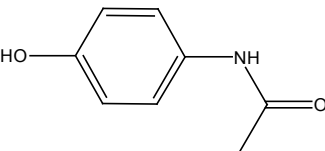
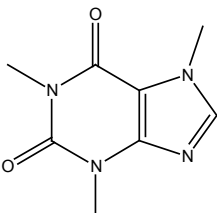
### Результати і обговорення

Біологічно-активні сполуки, що входять до складу сучасних комбінованих протизастудних засобів – це полярні азот-вмісні сполуки, Табл.2. Деякі з яких

(наприклад, хлорфенірамін та фенілпропаноламін) містять фрагменти алкіламінів, що, як відомо, погано відбивається на симетрії хроматографічних піків [4].

**Таблиця 2.** Структурні формули досліджених компонентів протизастудного засобу та розраховані\* значення log P і pKa (для атомів нітрогену).

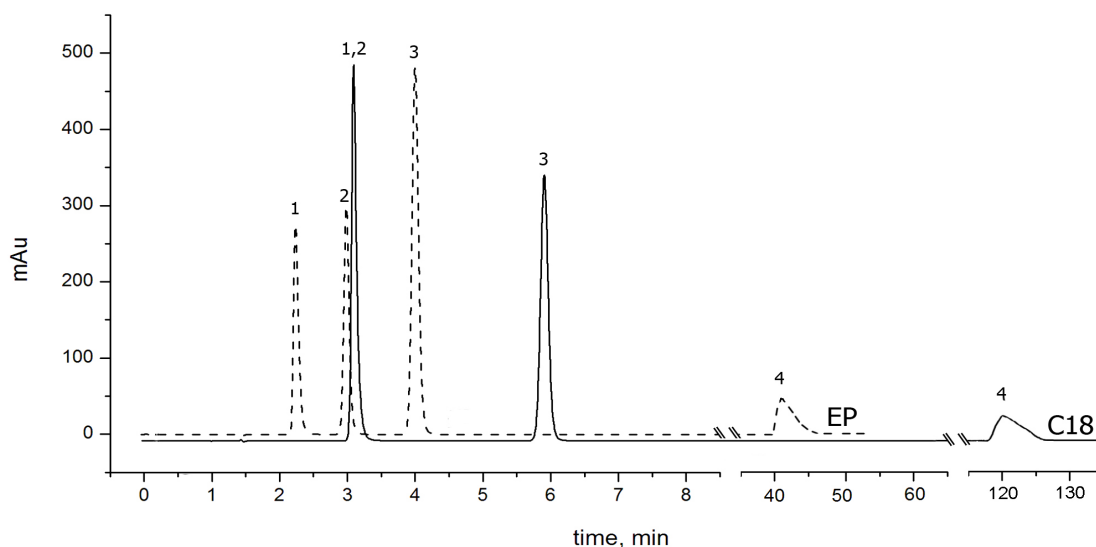
Сполука	Структурна формула	pKa	LogP**
Хлорфенірамін (CFAM)		9.33 (NH <sup>+</sup> ) 3.77 (NH <sup>+</sup> піридин)	-0.92; 0.22; 1.13

Сполука	Структурна формула	pKa	LogP**
Фенілпропаноламін (PPA)		8.47 (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	-2.29; -2.24; -0.67
Парацетамол (PC)		< 0 (NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	0.34; 0.34; 0.34
Кофеїн (CF)		1.39 (NH <sup>+</sup> )	-0.11; -0.08; -0.08

\* розрахунок проводився в програмі ACD labs; \*\* - значення наведено для pH= 2.5, 4.5 та 7.0, відповідно.

Дійсно, нам не вдалося досягти високої симетрії піків елювання фенілпропаноламіну і хлорфеніраміну на колонці Symmetry C18 (Рис.2) та на інших колонках типу C18 з високою густиною

закріпленого шару. Окрім того, на Symmetry C18 нам не вдалося розділити фенілпропаноламін та парацетамол, Рис.2.



**Рис.2.** Хроматограма модельної суміші, що містить 1 – фенілпропаноламін, 2 – парацетамол, 3 – кофеїн, 4 – хлорфенірамін на колонках C18 (Symmetry C18) та EP (Supelcosil ABZ). Рухома фаза вода : ацетонітрил = 90:10 (об./об.), pH=4.5.

Тому, була вивчена можливість розділення компонентів лікарського засобу на інших колонках типу C18 в діапазоні pH 2.5–7.0. Як свідчать результати, що наведено на Рис.3, на жодній з досліджених C18 колонці розділити усі компоненти лікарського засобу не вдається. Як і слід було очікувати виходячи з дисперсійного механізму адсорбції на C18 колонках, кислотність середовища практично не впливає на фактори утримання аналітів. Так само фактори утримання

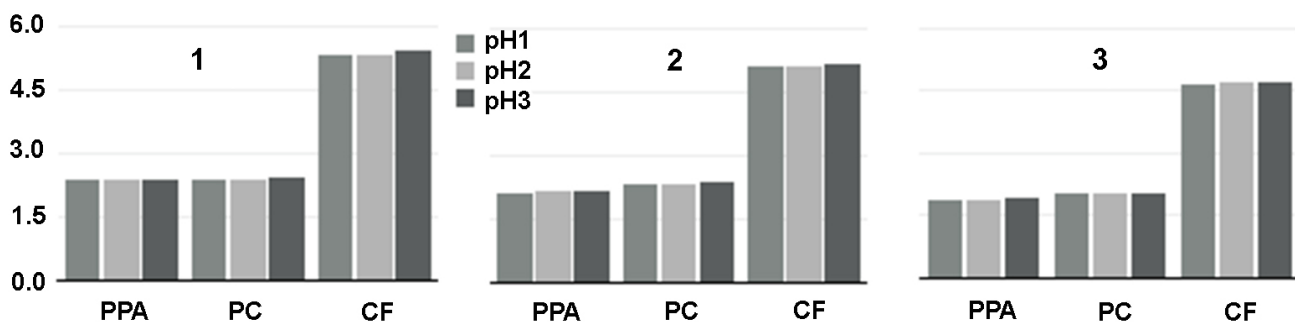
сполук мало залежать від виробника колонки, що є безумовним позитивом колонок цього типу. Можна прослідкувати слабку тенденцію покращення розділення PPA та PC на C18 фазі з меншою густиною закріплених груп, Рис.3.

На відміну від C18 фаз, фази типу EPG-C18 повністю розділяють усі компоненти модельної суміші. Як видно з Рис.2, у слабкокислому середовищі в якості прикладу наведено розділення трьох компонентів. Спостерігається також висока

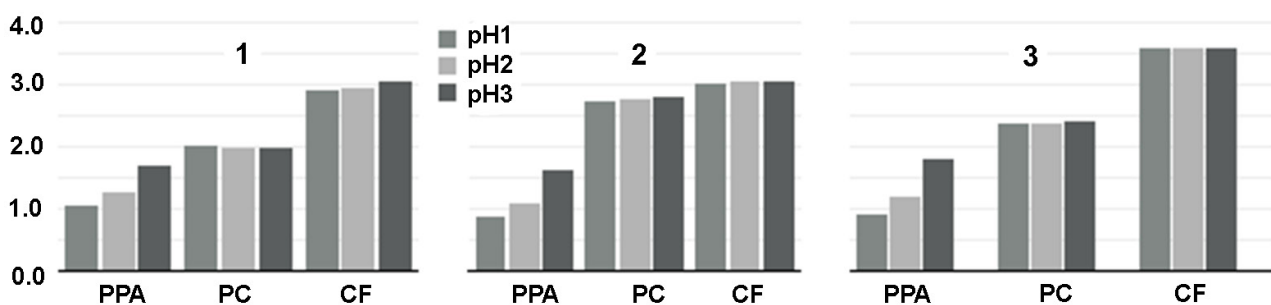
симетрія усіх хроматографічних піків, включаючи піки PPA і CFAM. Ще однією особливістю фаз типу EPG-C18 є суттєва зміна факторів утримання сполук в залежності від виробника та густини закріпленого шару, Рис.4.

Така поведінка адсорбенту передбачувана тому, що розділення сполук на зазначених фазах може відбуватися за комбінованим механізмом, що включає дисперсійні та інші (наприклад диполь-дипольні) взаємодії. Ми дослідили умови розділення компонентів модельної суміші в

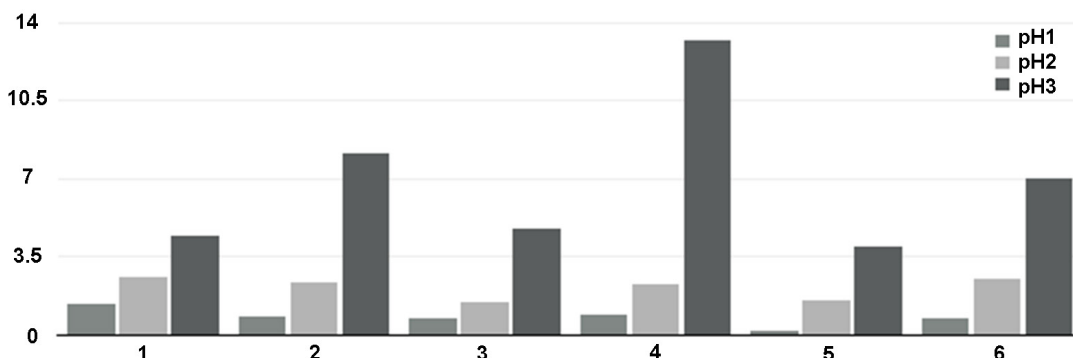
залежності від кислотності розчину. Результати, що наведено на Рис.4, та Рис.5 повністю підтверджують припущення про комбінований механізм розділення сполук на EPG-C18 колонках. Дійсно, на EPG-C18 фазах фактори утримання слабо-основних сполук - парацетамолу та кофеїну так само як і на C18 фазах майже не залежать від кислотності розчину, Рис.4. Натомість, фактори утримання органічних основ - фенілпропаноламіну та хлорфеніраміну на EPG-C18 фазах помітно знижується із зменшенням pH розчину, Рис. 4-5.



**Рис.3.** Фактори утримування (вісь ординат) PPA, PC та CF на C18 колонках: Symmetry C18 (діаграма 1), Perfectbond ODS-HD (діаграма 2) та Zorbax eclipse XDB-18 (діаграма 3) при різних значеннях pH рухомої фази: pH1=2.5; pH2=4.5; pH3=7.0.



**Рис.4.** Фактори утримування (вісь ординат) PPA, PC та CF на EPG-C18 колонках: Supelcosil ABZ (діаграма 1), SymmetryShield RP-8 (діаграма 2) та SymmetryShield RP-18 (діаграма 3) при різних значеннях pH рухомої фази: pH1=2.5; pH2=4.5; pH3=7.0.



**Рис.5.** Фактор утримування хлорфеніраміну на C18 фазах: 1) Symmetry C18, 2) Perfectbond ODS-HD, 3) Zorbax eclipse XDB-18; та на EPG-C18 фазах: 4) SupelcosilABZ, 5) SymmetryShield RP-8, 6) SymmetryShield RP-18 при значеннях pH1=2.5, pH2=4.5 та pH3=7.0.



Така хроматографічна поведінка аналітів на EPG-C18 фазах вказує на суттєвий вплив хімічної взаємодії (кислотно-основної, диполь-дипольної) на механізм адсорбції. Виходячи з того, що із зростанням кислотності розчину фактори утримання амінів зменшуються, можна припустити наступну модель їх адсорбції на EPG-C18 фазах. У нейтральному розчині групи, аміногрупи, що входять до складу іммобілізованих на поверхні EPG-C18 шару, не протоновані. Тому, за цих умов, розділення аналітів на фазах EPG-C18 як і на C18 фазах відбувається за дисперсійним механізмом. Із зростанням кислотності розчину відбувається протонізація аміногруп карбаматних фрагментів іммобілізованого шару на EPG-C18. Це спричиняє виникненню позитивного заряду на цих фрагментах і сприяє відштовхуванню між однойменно зарядженими групами поверхні та протонованими аналітами, що врешті зменшує коефіцієнт розподілу амінів між кислим розчином та EPG-C18 фазою.

Запропонована модель адсорбції дозволяє пояснити особливості змін факторів утримання найбільш основної і, в той же час, найбільш гідрофобної сполуки - хлорфеніраміну на C18 та EPG-C18 фазах, Рис.5. Фактор утримання хлорфеніраміну при pH=2.5 є найменшим для всіх колонок. Це пояснюється тим, що хлорфенірамін за умов його елювання ( $H_2O/CH_3CN=70/30$ , pH=2.5) повністю протонований, а отже погано утримується на неполярних фазах. У повній відповідності до запропонованої моделі фактори утримання CFAM на EPG-C18 менші, ніж на C18 фазах, Рис.5. При pH=7.0 хлорфенірамін знаходиться у молекулярній формі, тому утримуються на обох типах колонок за дисперсійним механізмом. За цих умов, наявність інкорпорованих фрагментів в іммобілізованому шарі мало впливає на час утримання аналіту, проте значно покращує симетрію піку елювання. Фактори утримання CFAM при pH=7.0 більшою

мірою визначаються рівнем ліпофільності адсорбенту. Це призводить до того, що фази високої густини (Supelcosil ABZ та Perfectbond ODS-HD) утримують CFAM краще, ніж низької (SymmetryShield RP-18). Фаза, і іммобілізованими C8 групами (Symmetry Shield RP8) утримує CFAM гірше, ніж фази з C18 шаром, Рис.5.

Занадто високі значення факторів утримання CFAM при pH=7.0 на сучасних C18 фазах високої густини та на EPG-C18 фазах робить неефективним їх застосування у зазначених умовах, натомість у слабкокислому середовищі (pH=4.5) час утримання CFAM є оптимальним для проведення хроматографічного аналізу. Тому значення pH=4.5 було обрано для розробки методики визначення хлорфеніраміну у лікарському засобі.

### Висновки

Таким чином, було показано, що застосування колонок типу EPG-C18 дає можливість впливати на час хроматографічного утримання сполук, шляхом зміни кислотності мобільної фази і, таким чином, оптимізувати умови розділення сумішей полярних сполук навіть у мобільних фазах із високим вмістом води (до 90%). Збільшення кислотності мобільної фази суттєво зменшує час утримання досліджених сполук. З урахуванням високої симетрії піків аналітів на EPG-C18 фазах це дає можливість інтенсифікувати хроматографічний аналіз компонентів протизастудного засобу. З метою реалізації переваг EPG-C18 фаз перед класичними C18 фазами, розділення компонентів необхідно проводити за умов, коли реалізується змішаний дисперсійно-диполь-дипольний механізм утримання аналітів, що у випадку вибраних у статті об'єктів дослідження спостерігається при  $pH \leq 4.5$ . Збільшення вмісту органічного модифікатора в мобільній фазі може нівелювати ефект інкорпорованих полярних фрагментів для аналітів із високим часом утримання.

### Література

1. T. Cecchi. Ion-Pair Chromatography and Related Techniques. CRC Press, 2009, 215 p.
2. <http://www.usp.org>. USP37
3. A.U. Kulikov, A.G. Verushkin. Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, Guaifenesin and Preservatives in Syrups by Micellar LC. Chromatographia 2008, 67, 347–355.
4. S. Ahuja and S. Scypinski (Eds.) Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Elsevier, 2011, 582 p.
5. T.V. Koval'chuk, U. Lewin, V.N. Zaitsev, W. Engewald, Chromatographic properties of high-density octadecyl phases immobilized on the high-purity silica gel. J. Anal. Chem., 1999, 54(2), 115-121.
6. L.C. Sander, M. Pursch, S.A. Wise. Anal. Chem., 1999, 71, 4821–4830.
7. C. Wang, C. Jiang, D.W. Armstrong. J. Sep.

Sci., 2008, 31, 1980–1990.

8. D.V. McCalley. J. Chromatogr., 1993, 636, 213–220.
9. M.R. Euerby, P. Petersson. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis. J. of Chromatography A, 2005, 1088, 1–15.
10. N.S. Wilsona, J. Gilroya, J.W. Dolana, L.R. Snyder. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI. Columns with embedded or end-capping polar groups. Journal of Chromatography A, 2004, 1026, 91–100.
11. V.N. Zaitsev, V.V. Skopenko, Yu.V. Kholin, N.D. Donskaya, S.A. Merny. Amino silica with lattice type distribution of bonded groups. Zhurn. Obschei

Khimii, 1995, 65, 529-537.

12. T.L. Ascah, B. Feibush. Novel, highly deactivated reversed-phase for basic compounds. J. of Chromatography A, 1990, 506(11), 357–369.

13. J. E. O'Gara, D. P. Walsh, C. H. Phoebe Jr., B. A. Alden, E.S.P. Bouvier, P. C. Iraneta, M. Capparella, T. H. Walter. Embedded-Polar-Group Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography. LCGC, 2001, 19(6).

14. J. Layne. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases. J. of Chromatography A, 2002, 957, 149–164.

15. U.D. Neue, Y.F. Cheng Z. Lu, B.A. Alden, R.C. Iraneta, C.H. Phoebe, K. Van Tran. Properties of

Reversed Phase Packings with an Embedded Polar Group Chromatographia 2001, 54, 169-177

16. A.K. Mallik, H. Qiu, T. Oishi, Y. Kuwahara, M. Takafuji, H. Ihara. Design of C18 Organic Phases with Multiple Embedded Polar Groups for Ultraversatile Applications with Ultrahigh Selectivity. Analytical chemistry, 2015, 87(13), 6614-6621.

17. G.P. O'Sullivan, N. M. Scully, J. D. Glennon. Polar-embedded and polar-endcapped stationary phases for LC. Analytical Letters, 2010, 43(10-11), 1609-1629.

18. Z. Xiang, X. Sun, P. Liu, X. Li, R. Jiang. Selectivity Differences Between ODS and Polar Modified Stationary Phases in RP-LC. Chromatographia, 2010, 72(1-2), 23-32.