

УДК 543.544.5.068.7

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗДІЛЕННЯ КОМПОНЕНТІВ ЛІКАРСЬКОГО
ПРЕПАРАТУ, ЩО МІСТИТЬ ПАРАЦЕТАМОЛ, КОФЕЇН,
ФЕНІЛПРОПАНОЛАМІН ТА ХЛОРФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТ
НА КОЛОНКАХ З ІНКОРПОРОВАНОЮ ПОЛЯНОЮ ВСТАВКОЮ**

О. Сиротчук¹, І. Дідух¹, Р. Маркін¹, В. Зайцев²

*¹ДП “Центральна лабораторія аналізу якості лікарських
засобів та медичної продукції”,
вул. Кудрявська, 10 Г, 04053 Київ, Україна*

*²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01601 Київ, Україна*

Розглянуто можливість використання колонок з інкорпорованою поляною вставкою різної хімічної природи (амідної або карбаматної) для розділення парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну та хлорфеніраміну малеату. З'ясовано, що утримування органічних основ на колонках з інкорпорованою карбаматною вставкою (Symmetry Shield RP-8 та RP-18) менше залежить від рН рухомої фази порівняно з колонкою з інкорпорованою амідною вставкою (Supelcosil LC-ABZ). Також досліджено утримування органічних основ на колонках з інкорпорованою карбаматною вставкою, що прищеплена до гібридного силікагелю (Xterra RP-18). Утримування органічних основ на такій колонці найменше залежало від значення рН рухомої фази.

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

Одним із важливих завдань в фармацевтичному аналізі є розділення компонентів протизастудного засобу, у якому містяться компоненти проти різних симптомів застуди. Найчастіше компонентами таких засобів є парацетамол, кофеїн, фенілпропаноламіну гідрохлорид, хлорфеніраміну малеат та допоміжні компоненти.

Фармакопея США пропонує використовувати методики визначення протизастудних компонентів у готових лікарських засобах [1–6], однак немає однієї методики визначення для всіх чотирьох компонентів. Інші недоліки методик фармакопеї США – використання іон-парних реагентів, таких як додецилсульфат або 1-гексансульфонат натрію [1, 3, 5, 6], у складі рухомої фази, що зменшує термін застосування хроматографічної колонки [7]. З використанням міцелярної хроматографії вирішують проблему розділення компонентів у праці [8], та це також передбачає застосування іон-парних реагентів, а саме – натрію додецилсульфату. Один із варіантів розділення багатокомпонентних сумішей, що містять сполуки різної полярності, – це використання градієнтного елюювання. Автори [9] довели, що розділення компонентів протизастудного засобу можливе з використанням градієнтного елюювання. Проте градієнтний режим є менш робастним, ніж ізократичний, залежить від міксеру приладу, який застосовують та від мертвого об'єму хроматографічної системи.

Таблиця 1

Огляд методик кількісного визначення компонентів протизастудних лікарських засобів

Сполуки	Умови хроматографування	Л–ра
Хлорфеніраміну малеат, фенілпропаноламін	ВЕРХ Колонка: фенільна Рухома фаза: суміш метанолу і води (60:40, об./об.), що містить 0,34 г калію дигідрофосфату, 0,05 г триетиламіну, 0,025 г натрію додецилсульфату і 0,1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину	[1]
Хлорфеніраміну малеат	ВЕРХ Колонка: C18 Рухома фаза — 2,0 г натрію перхлорату в 350 мл води. Додають 650 мл метанолу	[2]
Фенілпропаноламін	ВЕРХ Колонка: C18 Рухома фаза: (1,9 г натрію 1-гексансульфонату в 700 мг води, 50 мл of 1 М натрію дигідрофосфату, 20 мл 0,25 Н триетиламонію фосфату до 1,0 л водою) – метанол = 100 – 82	[3]
Парацетамол, кофеїн, аспірин	ВЕРХ Колонка: C18 Рухома фаза : суміш води, метанолу і оцтової кислоти (69:28:3)	[4]
Парацетамол, хлорфеніраміну малеат, декстрометорфан	ВЕРХ Колонка: фенільна Рухома фаза: суміш метанолу і води (60:40), що містить 0,34 г калію дигідрофосфату, 0,3 г триетиламіну, 0,15 г натрію додецилсульфату і 0,1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину	[5]
Парацетамол, хлорфеніраміну малеат, декстрометорфан, фенілпропаноламін	ВЕРХ Хлорфеніраміну малеат, фенілпропаноламіну гідрохлорид: Колонка: фенільна суміш метанолу і води (60:40, об./об.), що містить 0,34 г калію дигідрофосфату, 0,15 г триетиламіну, 0,25 г натрію додецилсульфату і 0,1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину. Парацетамол Колонка: октадецильна Рухома фаза: метанол: вода: оцтова кислота (69:28:3, об./об.)	[6]
Парацетамол, фенілпропаноламін, фенілефрין, хлорфеніраміну малеат	ВЕРХ Колонка: Symmetry Shield RP-8 250-4.6 (5 мкм) Рухома фаза А: фосфатний буфер 40 мМ з рН 6,0 і рухома фаза Б: ацетонітрил. Від початку до 8 хв лінійний градієнт від 8 % рухомої фази Б до 25 %. З 8 хв 30 % рухомої фази Б на 5 хв, після 15 хв повернення до початкового співвідношення протягом 1 хв. До 20 хв урівноважується	[9]
Парацетамол, Кофеїн, Гуайфенезин і консерванти	Міцелярна ВЕРХ Колонка: Kromasil C18 Рухома фаза: 1-бутанол:вода(1:99, об./об.), що містить 0,04 М натрію додецилсульфат і 0,1 % трифтороцтову кислоту	[8]

Одним із перспективних напрямів розділення багатокомпонентних лікарських засобів є використання колонок, що містять полярні фрагменти в іммобілізованому гідрофобному ланцюзі. У праці [10] досліджено поведінку парацетамолу, фенілпропаноламіну, кофеїну та хлорфеніраміну на колонках C18 та колонках з полярною вставкою. Виявлено ліпшу селективність колонок з полярною вставкою щодо розділення парацетамолу та фенілпропаноламіну. На підставі цих даних розроблено методику визначення зазначених сполук на колонці Supelcosil ABZ. Наголошено, що сполуки основної природи, а саме – фенілпропаноламін та хлорфенірамін, є дуже чутливими до зміни рН рухомої фази, що може призводити до проблем, пов'язаних з відтворенням за недостатньо точного визначення рН рухомої фази, а отже, зниження робастності таких методик.

Тому для підвищення робастності методик кількісного визначення компонентів проти застудного засобу на хроматографічних колонках з полярною вставкою вирішено дослідити колонки нового покоління з карбаматною полярною вставкою на силікагелі (Symmetry Shield RP-8 та RP-18) та колонки з полярною вставкою на гібридному матеріалі (Xterra RP-18).

Експериментальна частина

Стандартні речовини та реактиви. Для експерименту використано парацетамол (100,0 %, Європейська фармакопея), кофеїн (99,9 %, Sigma-Aldrich), фенілпропаноламін гідрохлорид (100,0 %, Sigma-Aldrich), хлорфеніраміну maleat (99,6 %, Sigma-Aldrich), воду (Simplicity, Milli-Q, Millipore), ацетонітрил (HPLC grade, Sigma-Aldrich), натрію дигідроген фосфат (analytical grade, Merck), фосфорну кислоту 85 % (analytical grade, Merck), натрію гідроксид (analytical grade, Merck).

Обладнання. Дослідження проведено на хроматографі HP 1100 (Agilent Technologies, Germany), обладнаному діодно-матричним детектором, чотириканальною помпою, дегазатором і термостатом колонок. Значення рН рухомої фази довели за допомогою рН-метра Merthrom 713.

У роботі використано чотири комерційно доступні хроматографічні колонки, характеристики нерухомих фаз яких наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Характеристики хроматографічних колонок

Комерційна назва колонки	Тип вставки	Розмір пор, А	Питома площа поверхні, м ² /г	Вміст С, %
Supelcosil ABZ	Амідна	120	170	12
Symmetry Shield RP-8	Карбаматна	100	335	15
Symmetry Shield RP-18	Карбаматна	100	335	17
Xterra RP-18	Карбаматна	125	175	15

Приготування розчинів для хроматографування. Розчини досліджуваних сполук: окремі розчини парацетамолу, фенілпропаноламіну гідрохлориду, кофеїну, хлорфеніраміну maleату з концентрацією 0,2 мг/мл у воді.

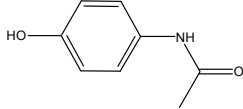
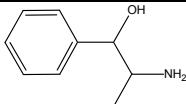
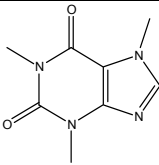
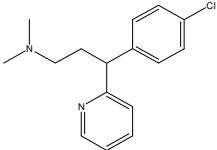
Приготування рухомої фази. Як сольовий компонент для рухомої фази використано 0,025 М розчин натрію дигідрофосфату зі значеннями рН = 2,5; 4,5; 7,0 з точністю $\pm 0,05$. Для хроматографування розчинів парацетамолу, фенілпропаноламіну гідрохлориду, кофеїну розчини сольових компонентів змішували з ацетонітрилом у співвідношенні 90:10 (об./об.), а для хлорфеніраміну – 70:30 (об./об.).

Результати й обговорення

Наша мета – дослідити хроматографічну поведінку компонентів протизастудного засобу, що містить парацетамол, кофеїн, фенілпропаноламін та хлорфеніраміну малеат, на колонках нового покоління з інкорпорованою карбаматною вставкою. Зазначені сполуки містять хімічні групи різної кислотно-основної природи. Основні властивості, згідно з теорією Бренстеда–Лоурі, виявляють ті сполуки, що містять атом нітрогену з неподіленою електронною парою, яка здатна приймати протон, наприклад аміни. Чим вище значення рKa, тим сильнішою є органічна основа. Якщо електронна пара задіяна у внутрішньомолекулярній взаємодії, то нітрогеновісна сполука не матиме основних властивостей. Наприклад, для парацетамолу рKa протонізації атома нітрогену становить -0,14, а для кофеїну – 1,39 (табл. 3), а це свідчить про те, що ці сполуки є дуже слабкими органічними основами. Фенілпропаноламін і хлорфенірамін містять первинну та третинну аміногрупу зі значеннями рKa = 8,47 та 9,33, відповідно. Парацетамол і фенілпропаноламін виявляють дуже слабкі кислотні властивості, значення рKa = 9,86 та рKa = 12,07.

Таблиця 3

Структурні формули та рKa компонентів протизастудного засобу

Сполука	Структурна формула	рKa ACD labs
Парацетамол (PC)		15,32 \pm 0,70 (NH) 9,86 \pm 0,13 (OH) -0,14 \pm 0,50 (NH ₂ ⁺)
Фенілпропаноламін (PPA)		12,07 \pm 0,45 (OH) 8,47 \pm 0,10 (NH ₃ ⁺)
Кофеїн (CF)		1,39 \pm 0,70 (NH ⁺) -2,37 \pm 0,40 (NH ⁺) -6,44 \pm 0,60 (NH ⁺)
Хлорфенірамін (CFAM)		9,33 \pm 0,28 (NH ⁺) 3,77 \pm 0,19 (NH ⁺ піридин)

У праці [10] валідовано методику кількісного визначення наведених вище речовин з використанням колонки Supelcosil LC-ABZ. Ця колонка містить амідну вставку -NH-CO-, що з'єднана пропільним спейсером з поверхнею силікагелю, а довжина алкільного хвоста становить 14 ланок. У праці [11] описано здатність такої фази екранувати взаємодію органічних молекул основної природи з залишковими силанольними групами поверхні, а також переваги над традиційними колонками C18. Для цієї хроматографічної фази виявлено значну рН залежність основних сполук. Сучаснішим різновидом такої фази є фаза на основі силікагелю з карбаматною вставкою -O-CO-NH-, наприклад Symmetry Shield RP-18, та фаза на основі гібридного матеріалу, у якому значна частина Si-OH замінена на Si-CH₃, наприклад Xterra RP-18. Переваги колонок з карбаматною вставкою описано в праці [12].

У разі зміни значення рН властивості колонок змінюватимуться. Значення рКа групи Si-OH становить близько 4,5, а це означає, що в умовах експерименту ступінь іонізації змінюватиметься від 0 до 100 %. В іонізованій формі силанол здатний до іонного обміну з органічними основами.

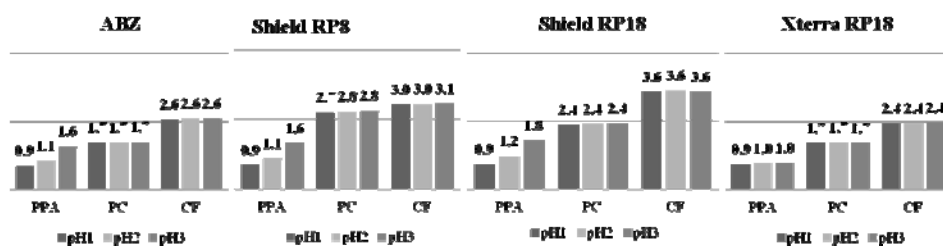


Рис. 1 Фактори утримування ($k=(t-t_0)/t_0$, де t – час утримування, а t_0 – час виходу неутриманого компоненту) фенілпропаноламіну, парацетамолу та кофеїну на колонках з інкорпорованою полярною вставкою за різних значень рН рухомої фази ($pH_1=2,5$; $pH_4=4,5$; $pH_3=7,0$).

З рис. 1 бачимо, що утримування парацетамолу та кофеїну не залежить від рН, це пояснюють відсутністю груп, що можуть вступати у взаємодію з силанолами.

Утримування фенілпропаноламіну як органічної основи залежить від значення рН рухомої фази для всіх колонок на основі силікагелю внаслідок посилення іонного обміну завдяки дисоціації силанольних груп. Для колонки Supelcosil ABZ при $pH=7,0$ фенілпропаноламін та парацетамол перестають розділятися. Зміна фактора утримання приблизно однакова для всіх колонок на основі силікагелю. Фактор утримування фенілпропаноламіну практично не залежить від значення рН рухомої фази для колонки Xterra RP-18, це пояснюють тим, що на поверхні гібридного матеріалу міститься менше силанольних груп, ніж на поверхні силікагелю.

На рис. 2 відображено, що утримування хлорфеніраміну залежить від рН для всіх колонок. Хлорфенірамін, згідно з розрахованими значеннями рКа, є сильнішою основою, ніж фенілпропаноламін (див. табл. 2). За значення $pH=2,5$ хлорфенірамін є протонуваним третинним аміном, що зменшує його гідрофобність і здатність утримуватися за дисперсійним механізмом, тому фактор утримування є низьким. У разі переходу до вищих значень рН змінюється ступінь іонізації молекули і збільшується гідрофобність, поверхня силікагелю набуває здатності до іонного обміну. Це зумовлює значне зростання фактору утримування, що найяскравіше виражене для колонки Supelcosil ABZ.

Це свідчить про низьку інертність цієї колонки. Менше фактор утримування хлорфеніраміну залежить від рН на колонках з карбаматною вставкою. Найменше фактор утримування змінюється (менше ніж утричі) на колонці Xterra RP-18.

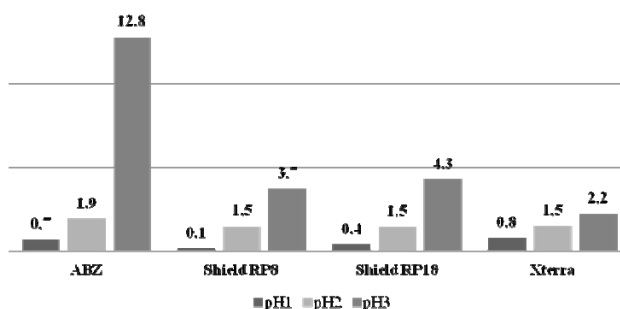


Рис. 2 Фактори утримування хлорфеніраміну на колонках з інкорпорованою полярною вставкою за різних значень рН рухомої фази ($pH_1=2,5$; $pH_2=4,5$; $pH_3=7,0$).

Отже, враховуючи результати дослідження поведінки парацетамолу, фенілпропаноламіну, кофеїну та хлорфеніраміну на колонках з інкорпорованою вставкою залежно від рН водно-солевого компонента рухомої фази, можна дійти висновку, що колонки з інкорпорованою вставкою мають різні властивості стосовно органічних основ. Виявлено, що колонки з карбаматною вставкою є більш інертними. Найменше фактор утримування змінювався на колонці на гібридному силікагелі, у якому частина гідроксильних груп замінена на метильні.

З'ясовано, що утримування органічних основ на колонках з полярною вставкою на основі силікагелю є рН залежним. У разі використання колонки на основі гібридного матеріалу з меншою кількістю залишкових силанолів на поверхні виявлено менший вплив рН на утримування органічних основ. Утримування фенілпропаноламіну практично перестало залежати від рН на цій колонці, а зміна фактора утримування хлорфеніраміну малеату відбувалася втричі, а не в 11–37 разів як для колонок на основі силікагелю.

1. *USP 37*. Chlorpheniramine Maleate and Phenylpropanolamine Hydrochloride Extended-Release Capsules.
2. *USP 37*. Chlorpheniramine Maleate Extended-Release Capsules.
3. *USP 37*. Phenylpropanolamine hydrochloride Extended-Release Capsules.
4. *USP 37*. Acetaminophen, Aspirin, and Caffeine Tablets.
5. *USP 37*. Acetaminophen, Chlorpheniramine Maleate, and Dextromethorphan Hydrobromide Tablets .
6. *USP 37*. Oral Solution Containing at Least Three of the Following—Acetaminophen and Salts of Chlorpheniramine, Dextromethorphan, and Phenylpropanolamine.
7. *Dolan J. W.* Ion Pairing - Blessing or Curse? // *LCGC North Am.* 2008. Vol. 26. N 2. P. 170–174.

8. *Kulikov A. U., Verushkin A. G.* Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, Guaifenesin and Preservatives in Syrups by Micellar LC // *Chromatographia*. 2008. Vol. 67. P. 347–355.
9. *Marrin A., Garcia E., Garcia A., Barbas C.* Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets // *J. Pharm. Biomed Anal.* 2002. Vol. 29. P. 701–714
10. *Сиротчук О. А., Дідух І. Р., Маркін Р. О., Зайцев В. М.* Визначення парацетамолу, фенілпропаноламіну гідрохлориду, кофеїну, хлорфеніраміну малеату в лікарському засобі із застосуванням алкільної нерухокої фази з інкорпорованою вставкою на силікагелі// *Журн. хроматографію т-ва*. 2014. Т. 14. № 1–4. С.5–18.
11. *Ascah T. L., Feibush B.* Novel, highly deactivated reversed-phase for basic compounds // *J. of Chromatography A*. 1990. Vol. 506. N 11. P. 357–369.
12. *O’Gara J. E., Walsh D. P., Phoebe C. H. Jr., et al.* Embedded-Polar-Group Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography // *LCGC*. 2001. Vol. 19. N 6. P. 632–642.

SEPARATION OF THE COMPLEX MEDICAL PREPARATIONS USING EMBEDDED POLAR COLUMNS

O. Syrotchuk¹, I. Didukh¹, R. Markin¹, V. Zaitsev²

¹*Central laboratory for quality control
of medicines and medical products,
Kudryavska Str., 10-G, 04053 Kyiv, Ukraine*

²*Kyiv National Taras Shevchenko University,
Volodymyrska Str., 64, 01601 Kyiv, Ukraine*

Active ingredient assay for the anticold remedy containing paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine hydrochloride and chlorpheniramine maleate is important problem in pharmaceutical analysis.

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is one of the most frequently used technique for determination of paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine and chlorpheniramine maleate in against cold remedy. C18 stationary phase is the most widely used column for this. But silica based C18 columns often offers different selectivity due to silica activity. Frequently methods are not robust if column is changed to another manufacturer C18 column. Other problem is separation of polar compounds. In order to retain polar compound, ion-pair reagent is added to mobile phase. Ion-pair reagent usage can change properties of the column irrevocably and shorten column life time.

Other way to obtain separation between this compounds is to use embedded polar group column. These embedded polar groups (amide, carbamate, urea or ether) are generally incorporated into the alkyl ligand close to the silica surface. Polar groups provide alternative selectivity to C18 and deactivate interaction of organic bases with silanols. Different columns were used in this investigation – Supelcosil ABZ (amide), Symmetry Shield RP-18 (carbamate), Symmetry Shield RP-8 (carbamate), Xterra RP-18 (carbamate). It has been shown that elution order and reasonable separation is not affected by type of polar group and alkyl chain length. Mobile phases with different pH is used. Retention of phenylpropanolamine and chlorpheniramine (organic bases) is pH-dependent due to changes in ionization degree of the molecules. Organic bases retention strongly depends on the mobile phase pH for the column with amide group (Supelcosil ABZ). Symmetry Shield columns showed better deactivation of organic base-silanol interaction. And the most inert column was Xterra RP-18.

It has been shown that method developed using embedded polar group column is robust if column is changed. Inertness of the columns increases from Supelcosil ABZ to Xterra RP-18. Hence, it is showed that the best choice for separation of against cold components is Xterra RP-18.

Key words: paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine, chlorpheniramine, HPLC.

Стаття надійшла до редколегії 24.05.2015

Прийнята до друку 12.01.2016