

# Primena hromatografskih tehnika u optimizaciji procesa prečišćavanja amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina

Vladimir Dobričić\*, Sote Vladimirov, Olivera Čudina

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,  
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

\*Autor za prepisku, e-mail: [vladimir@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:vladimir@pharmacy.bg.ac.rs)

---

## Kratak sadžaj

*Soft* („*antedrug*“) glukokortikoidi su farmakološki aktivna jedinjenja koja se biotransformišu na predvidiv i kontrolisan način do neaktivnih i netoksičnih metabolita. Amidi kortijskih kiselina (17 $\beta$ -karboksamidni derivati glukokortikoida) su potencijalni *soft* lekovi sa manje neželjenih efekata u odnosu na konvencionalne glukokortikoide. Prečišćavanje 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata hidrokortizona je prikazano na primeru amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina i vrši se primenom hromatografije na koloni i preparativne tankoslojne hromatografije (TLC). Optimizacija procesa prečišćavanja je izvršena primenom analitičke TLC i reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP-HPLC). Mobilna faza koja omogućuje najbolje hromatografsko razdvajanje amida od nečistoća na TLC pločici (hloroform-metanol (95:5 V/V) je odabrana i izvršena je njena modifikacija (smanjenje polarnosti, odnosno dodatak glacijalne sirćetne kliseline) u cilju prečišćavanja hromatografijom na koloni, odnosno preparativnom TLC. Primenom RP-HPLC je potvrđeno da su navedeni postupci prečišćavanja omogućili dobijanje amida stepena čistoće 96,2 %.

**Ključne reči:** 17 $\beta$ -karboksamidni derivati hidrokortizona, analitička TLC, RP-HPLC, hromatografija na koloni, preparativna TLC.

---

## Uvod

Koncept *soft* lek se prvi put pominje 1980. godine kao deo retrometaboličkog pristupa u dizajniranju farmakološki aktivnih jedinjenja sa manje neželjenih efekata [1-5]. *Soft* („*antedrug*“) glukokortikoidi su estri kortijske kiseline (loteprednol etabonat i etiprednol dikloacetat), kao i estri i amidi kiseline dobijenih oksidacijom glukokortikoida na položajima C6, C17 i C21. Ova jedinjenja se biotransformišu na predvidiv i kontrolisan način do neaktivnih i netoksičnih metabolita [6, 7].

Do sada je sintetisano nekoliko grupa amida kortijskih kiseline (17 $\beta$ -karboksamidnih derivata glukokortikoida) i alkil, cijanoalkil, oksialkil, aminoalkil i aromatičnih amina [8-10]. Ova jedinjenja mogu biti agonisti, parcijalni agonisti ili antagonisti glukokortikoidnih receptora, što zavisi od prirode njihovog bočnog niza. Prisustvo grupa u bočnom nizu koje mogu da ostvaruju vodonične veze sa glukokortikoidnim receptorom je neophodno da bi ova jedinjenja delovala kao agonisti. Formstecher i saradnici su ispitivali afinitet za glukokortikoidni receptor i antiglukokortikoidnu aktivnost serije 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata deksametazona [10]. Najizraženiju antiglukokortikoidnu aktivnost poseduju derivati koji u bočnom nizu imaju alkil ili aril supstituente, bez prisustva grupa koje bi mogle da stvaraju vodonične veze sa receptorom. Zajedničko za derivate koji ispoljavaju glukokortikoidnu aktivnost i derivate koji ispoljavaju antiglukokortikoidnu aktivnost je da se povećanjem afiniteta za receptor povećava i biološka aktivnost jedinjenja. Toksičnost i metabolizam jedinjenja koja pokazuju glukokortikoidnu aktivnost nisu ispitani, tako da za sada nema potvrde da i ovi derivati glukokortikoida spadaju u *soft* lekove.

Sinteza 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata hidrokortizona se vrši primenom 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC), N-hidroksibenzotriazola (HOBt) i trietilamina (TEA) iz odgovarajuće kortijske kiseline i aminokiseline [11]. Čistoća reakcione smeše zavisi od više faktora: vremena trajanja reakcije, temperature, količine upotrebljenih reaktanata i katalizatora. Najveći problem prilikom prečišćavanja sintetisanih jedinjenja predstavljaju neizreagovali EDC, derivat uree koji nastaje iz EDC po završetku reakcije, kao i sporedni proizvodi slične strukture i fizičko-hemijskih osobina kao 17 $\beta$ -karboksamidni derivati hidrokortizona. Stoga, neophodno je pronalaženje optimalnih hromatografskih uslova kako bi se izvršilo prečišćavanje reakcione smeše hromatografijom na koloni i preparativnom tankoslojnom hromatografijom (*Thin Layer Liquid Chromatography* - TLC).

Cilj ovog rada je da se prikaže primena hromatografskih tehnika u optimizaciji procesa prečišćavanja 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata hidrokortizona na primeru amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina (HEG). Optimizacija uslova prečišćavanja hromatografijom na koloni i preparativnom TLC je izvršena primenom analitičke TLC i reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom

(Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC). Ispitivanje stepena čistoće sintetisanog amida izvršeno je primenom RP-HPLC.

## **Eksperimentalni deo**

### ***Materijali***

U cilju optimizacije uslova prečišćavanja amida primenom analitičke TLC korišćen je TLC silikagel 60 F254 na aluminijumskim pločama (Merck, Darmstadt, Nemačka). Za prečišćavanje sintetisanog amida korišćeni su silikagel za hromatografiju na koloni (veličina čestica: 0,063-0,200 mm; Merck, Darmstadt, Nemačka), silikagel F254 za preparativnu TLC (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka), hloroform (JT Baker, Loughborough, Velika Britanija), metanol (JT Baker, Loughborough, Velika Britanija) i glacijalna sirćetna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka). Za ispitivanje stepena čistoće amida primenom RP-HPLC korišćeni su acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka) i dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka).

### ***Prečišćavanje reakcione smeše primenom hromatografije na koloni***

17 $\beta$ -karboksamidni derivati hidrokortizona su sintetisani primenom EDC, HOBt i TEA prema postupku opisanom u literaturi [11].

U prvoj fazi prečišćavanja primenjena je hromatografija na koloni. Odmereno je 7 g silikagela za hromatografiju na koloni i suspendovano u odgovarajućoj mobilnoj fazi. Ovako pripremljena suspenzija kvantitativno je prenetu u vertikalno postavljenu staklenu kolonu dužine 54 cm. Uparena reakciona smeša (oko 80 mg) se rastvori u mobilnoj fazi i kvantitativno prenese u kolonu na površinu suspenzije silikagela. Prečišćavanje se vrši kontinuiranim dodavanjem mobilne faze u kolonu i prikupljanjem eluata u obliku većeg broja frakcija male zapremine (2-4 mL). Frakcije koje sadrže amid se spajaju, uparavaju do suva, nakon čega se vrši prečišćavanje primenom preparativne TLC.

### ***Prečišćavanje reakcione smeše primenom preparativne TLC***

U drugoj fazi prečišćavanja korišćena je preparativna TLC. Odmereno je 20 g silikagela za preparativnu TLC (sa fluorescentnim indikatorom F254) i suspendovano u 55 mL destilovane vode. Dobijena suspenzija je razlivena na staklenu ploču dimenzije 20 X 20 cm i ostavljena jedan dan da se osuši na sobnoj temperaturi. Pre upotrebe, ovako pripremljena ploča se aktivira sušenjem na 105 °C u toku 2 h. Uzorak (oko 30 mg) se rastvori u metanolu i nanese u obliku tanke horizontalne linije na oko 2 cm od donje ivice staklene ploče. Razvijanje se vrši uzlaznom tehnikom primenom

odgovarajuće mobilne faze. Iz odgovarajuće zone na ploči ekstrahuje se amid smešom hloroform-metanol (70:30 V/V), nakon čega se dobijeni ekstrakt upari do suva.

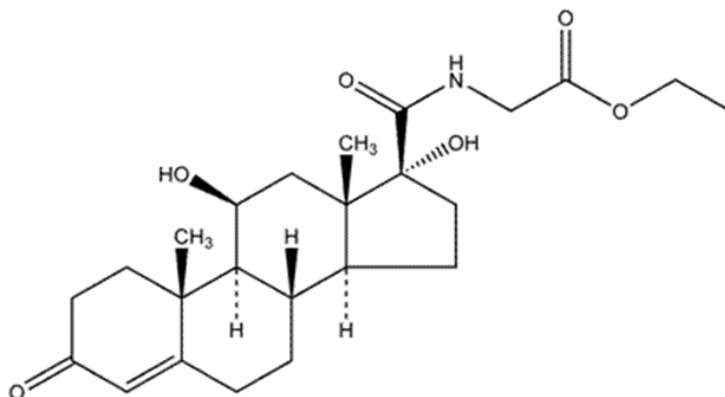
### ***Ispitivanje stepena čistoće sintetisanog amida***

Stepen čistoće sintetisanog amida je ispitan primenom RP-HPLC. Primenjena je modifikacija hromatografske metode iz Ph. Eur. 7. koja se koristi za ispitivanje stepena čistoće hidrokortizona [12]. RP-HPLC analiza je izvršena na Agilent 1200 tečnom hromatografu, opremljenom binarnom pumpom, Rheodyne injektorom (injekciona zapremina je 20  $\mu$ L) i DAD detektorom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m veličina čestica), mobilna faza se sastoji od acetonitrila i vode (40:60 V/V) sa protokom 1 mL/min, a temperatura kolone je podešena na 30  $^{\circ}$ C. Stepen čistoće amida određivan je na talasnoj dužini od 254 nm.

## **Rezultati i diskusija**

### ***Optimizacija hromatografskih uslova za prečišćavanje amida hromatografijom na koloni i preparativnom TLC***

Upotreba hromatografskih tehnika u optimizaciji prečišćavanja, prečišćavanju i ispitivanju stepena čistoće 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata hidrokortizona je prikazana na primeru amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina (HEG, Slika 1).



**Slika 1. Struktura amida HEG**

**Figure 1. The structure of amide HEG**

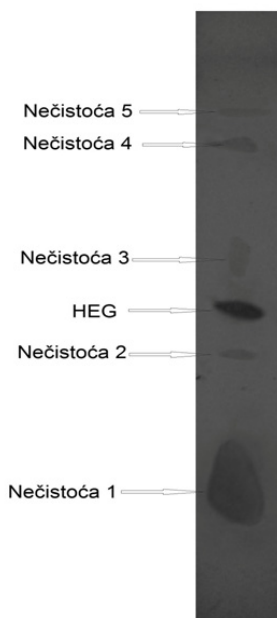
Prečišćavanje amida je izvršeno u dve faze. U prvoj fazi primenjena je hromatografija na koloni, a u drugoj preparativna TLC.

Kao polazna tačka u optimizaciji hromatografskih uslova prečišćavanja amida HEG hromatografijom na koloni i preparativnom TLC poslužila je mobilna faza upotrebljena za ispitivanje stepena čistoće serije 17 $\beta$ -karboksamidnih derivata deksametazona sa različitim alkil i aminoalkil aminima primenom analitičke TLC: hloroform-metanol (90:10 V/V) [9].

Hromatografsko razdvajanje amida HEG od nečistoća iz reakcione smeše ispitano je primenom nekoliko mobilnih faza sa različitim zapreminskim odnosima hloroforma i metanola:

- hloroform-metanol (70:30 V/V) (A)
- hloroform-metanol (80:20 V/V) (B)
- hloroform-metanol (90:10 V/V) (C)
- hloroform-metanol (95:5 V/V) (D)

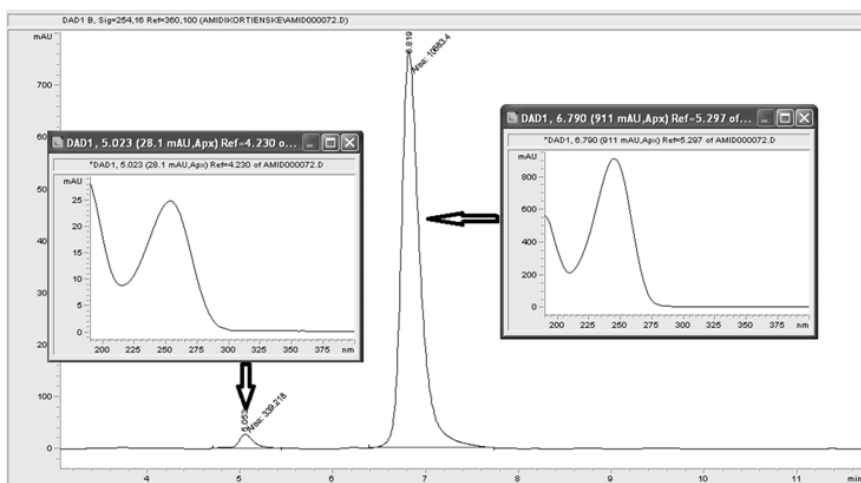
Najbolje razdvajanje amida od nečistoća iz reakcione smeše je postignuto primenom mobilne faze D (hloroform-metanol (95:5 V/V)).  $R_f$  vrednosti HEG i nečistoća koje su vidljive na 254 nm u ovom hromatografskom su: 0,10 (nečistoća 1); 0,36 (nečistoća 2); 0,44 (HEG); 0,56 (nečistoća 3); 0,80 (nečistoća 4); 0,89 (nečistoća 5). TLC hromatogram amida HEG i nečistoća 1-5 je prikazan na Slici 2.



**Slika 2. TLC hromatogram amida HEG i nečistoća 1-5 (mobilna faza D)**

**Figure 2. TLC chromatogram of amide HEG and impurities 1-5 (mobile phase D)**

Direktna primena mobilne faze optimizovane primenom analitičke TLC u prečišćavanju hromatografijom na koloni često nije moguća, tako da se obično vrši blago smanjenje njene polarnosti. Polarnost izabrane mobilne faze (mobilna faza D) je smanjena promenom odnosa hloroforma i metanola, tako da je sastav mobilne faze upotrebljene za prečišćavanje HEG hromatografijom na koloni hloroform-metanol (98,5:1,5 V/V). Prikupljene frakcije koje sadrže HEG su spojene i uparene do suva. Stepenn čistoće HEG prečišćenog hromatografijom na koloni je ispitan primenom RP-HPLC metode, a odgovarajući hromatogram je prikazan na Slici 3.



**Slika 3. HPLC hromatogram amida HEG nakon prečišćavanja hromatografijom na koloni**

**Figure 3. The HPLC chromatogram of amide HEG after the purification by use of column chromatography**

Na prikazanom hromatogramu se pored amida HEG ( $R_t = 6,82$  min) uočava i nečistoća koju nije moguće uočiti u hromatografskom sistemu D (nečistoća 6,  $R_t = 5,05$  min;  $RR_t = 0,74$ ). Na slici su prikazani i UV spektri amida i nečistoće 6, pored odgovarajućih hromatografskih pikova. Na osnovu sličnih UV spektara i izgleda hromatografskih pikova može se zaključiti da nečistoća 6 ima sličnu hemijsku strukturu kao HEG. Sadržaj ove nečistoće je oko 3 % u odnosu na sadržaj HEG. Čistoća amida HEG iznosi 93,2 %.

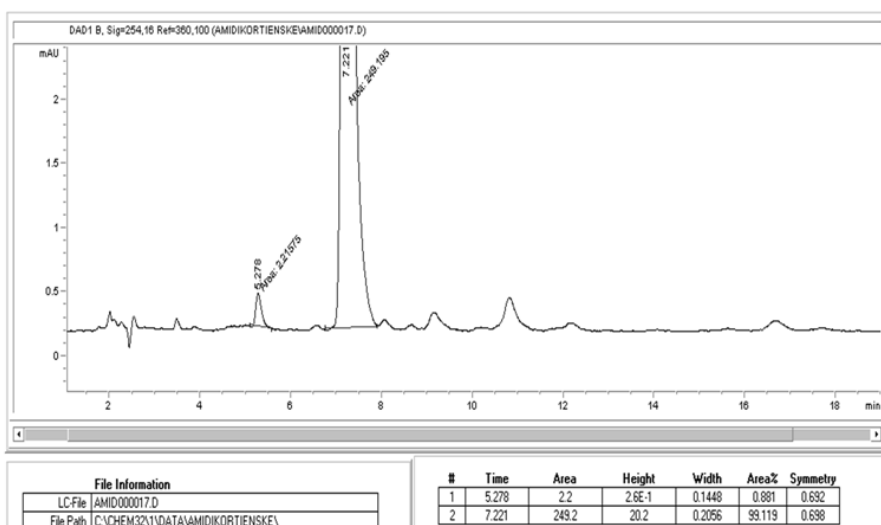
Kako bi se postiglo razdvajanje HEG od nečistoće 6, izvršena je modifikacija sastava mobilne faze D dodatkom glacijalne sirćetne kiseline. Modifikovana mobilna

faza je sledećeg sastava: hloroform-metanol-glacijalna sirćetna kiselina (95:5:1 V/V/V) (E).

Primena mobilne faze E (dodatak glacijalne sirćetne kiseline) omogućuje razdvajanje amida HEG ( $R_f = 0,44$ ) od nečistoće 6 ( $R_f = 0,42$ ). Na osnovu pretpostavljene sličnosti hemijskih struktura HEG i ove nečistoće, može se očekivati da dodatak glacijalne sirćetne kiseline ne dovodi do jonizacije ova dva jedinjenja već do suzbijanja jonizacije silanolnih grupa, čime se povećava efikasnost silikagela i poboljšava razdvajanje supstanci koje se prečišćavaju ovom tehnikom. Na osnovu ovih rezultata, mobilna faza E je odabrana za finalno prečišćavanje amida HEG preparativnom TLC.

### ***Prečišćavanje amida HEG preparativnom TLC***

Prečišćavanje amida HEG (iz uzorka prečišćenog hromatografijom na koloni) je izvršeno primenom preparativne TLC i mobilne faze E. Iz odgovarajuće zone na TLC ploči ekstrahovan je amid smešom hloroform-metanol (70:30 V/V). Čistoća ovako izolovanog amida je ispitana RP-HPLC metodom. Dobijeni hromatogram je prikazan na Slici 4.



**Slika 4. HPLC hromatogram amida HEG nakon prečišćavanja preparativnom TLC (mobilna faza E)**

**Figure 4. The HPLC chromatogram of amide HEG after the purification by use of preparative TLC (mobile phase E)**

Sadržaj nečistoće 6 u uzorku je oko 0,9 % u odnosu na sadržaj amida, što je značajno manje u odnosu na uzorak koji je prečišćen samo hromatografijom na koloni. Hromatografijom na koloni i preparativnom TLC (uz primenu mobilne faze E) dobijen je amid HEG čistoće 96,2 %. Ovako prečišćen amid može biti upotrebljen za dalja *in vitro* (fizičko-hemijska karakterizacija i određivanje osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih parametara) i *in vivo* (procena biološke aktivnosti) ispitivanja.

## Zaključak

U cilju prečišćavanja HEG (amid kortizonske kiseline iz hidrokortizona i etil estra L-glicina) primenjene su dve hromatografske tehnike: hromatografija na koloni i preparativna TLC. Mobilnu fazu koja je korišćena za prečišćavanje hromatografijom na koloni čine hloroform i metanol (hloroform-metanol (98,5:1,5 V/V)), a mobilnu fazu korišćenu za prečišćavanje preparativnom TLC čine hloroform, metanol i glacijalna sirćetna kiselina (hloroform-metanol-glacijalna sirćetna kiselina (95:5:1 V/V/V)). Sastav mobilnih faza korišćenih za prečišćavanje HEG ovim hromatografskim tehnikama je prethodno optimizovan primenom analitičke TLC. Kombinacija hromatografije na koloni i preparativne TLC omogućuje dobijanje amida stepena čistoće 96,2 %, koji može biti upotrebljen za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

## Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta OI172041, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## Literatura

1. Bodor N, Kaminski J, Selk S. Soft drugs. 1. Labile quaternary ammonium salts as soft antimicrobials. J Med Chem. 1980; 23(5):469-74.
2. Bodor N, Kaminski J. Soft drugs. 2. Soft alkylating compounds as potential antitumor agents. J Med Chem. 1980; 23(5):566-9.
3. Bodor N, Woods R, Raper C, Kearney P, Kaminski J. Soft drugs. 3. A new class of anticholinergic agents. J Med Chem. 1980; 23(5):474-80.



4. . Bodor N, Buchwald P. Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. *Curr Pharm Design*. 2006; 12(25):3241-60.
5. Chandegara N, Chorawala M. Soft and dissociative steroids: a new approach for the treatment of inflammatory airway an eye diseases. *Int J Pharm Sci Res*. 2012; 3(2): 311-9.
6. Bodor N. Drug targeting and retrometabolic drug design approaches introduction. *Adv Drug Deliver Rev*. 1994; 14(2-3):157-66.
7. Omar M, Khan F, Lee HJ. Synthesis and pharmacology of anti-inflammatory steroidal antedugs. *Chem Rev*. 2008; 108(12):5131-45.
8. Manz B, Grill HJ, Kreienberg R, Rehder M, Pollow K. Methyl 17 $\beta$ -carboxyester derivatives of natural and synthetic glucocorticoids: correlation between receptor binding and inhibition of in vitro phytohaemagglutinin-induced lymphocyte blastogenesis. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 21(2):69-75.
9. Manz B, Rehder M, Heubner A, Kreienberg R, Grill HJ, Pollow K. 17 $\beta$ -carboxamide steroids: highly effective inhibitors of the phytohaemagglutinin mediated blastogenesis of normal human peripheral lymphocytes. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1984; 22(3):209-14.
10. Formstecher PA, Lefebvre Ph, Burollaud T. Hormones and antihormones. The steroidal model. *J Pharm Belg*. 1991; 46(1):37-48.
11. Dobričić V, Marković B, Nikolic K, Savić V, Vladimirov S, Čudina O. 17 $\beta$ -carboxamide steroids - in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur J Pharm Sci*. 2014; 52:95-108.
12. European Pharmacopoeia seventh Edition, Strasbourg: Council of Europe, 2010:2196-98.

# The application of chromatography techniques for the purification process optimization of amide of hydrocortisone-derived cortienic acid and ethyl ester of L-glycine

Vladimir Dobričić\*, Sote Vladimirov, Olivera Čudina

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

\*Corresponding author, e-mail: [vladimir@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:vladimir@pharmacy.bg.ac.rs)

---

## Summary

Soft (“antedrug”) glucocorticoids are pharmacologically active compounds which are biotransformed in a predictable and controllable way to inactive and non-toxic metabolites. Amides of cortienic acids (17 $\beta$ -carboxamide derivatives of glucocorticoids) are potential soft drugs with fewer side effects than traditional glucocorticoids. The purification of 17 $\beta$ -carboxamide derivatives of hydrocortisone was explained using the amide of hydrocortisone-derived cortienic acid and ethyl ester of L-glycine as an example and performed by use of column chromatography and preparative thin-layer chromatography (TLC). The optimization of purification process was performed employing analytical TLC and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The mobile phase that enables best chromatographic separation of the amide from impurities on TLC plate (chloroform-methanol (95:5 V/V)) was selected and modified (reduction of polarity and addition of glacial acetic acid) to be used for the column chromatography and preparative TLC purification. It was confirmed by use of RP-HPLC that purification procedures applied in this study resulted in pure (96.2 %) amide.

**Keywords:** 17 $\beta$ -carboxamide derivatives of hydrocortisone, analytical TLC, RP-HPLC, column chromatography, preparative TLC.

---