



УДК 543:544.42

Определение прогестерона в некоторых лекарственных препаратах методом жидкостной хроматографии в мицеллярных подвижных фазах

Сумина Е.Г., Угланова В.З., Белая Е.В.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Сорокина О.Н.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

Поступила в редакцию 19.04.2011 г.

Аннотация

Методами высокоэффективной и тонкослойной жидкостной хроматографии изучено хроматографическое поведение женского полового гормона – прогестерона в мицеллярных подвижных фазах на основе катионных, анионных и неионных поверхностно-активных веществ. Разработаны методики количественного определения прогестерона в некоторых лекарственных препаратах.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, катионные, анионные, неионные поверхностно-активные вещества, прогестерон.

Chromatographic behavior of a female sexual hormone – a progesterone in micellar mobile phases on the basis of cationic, anionic and not ionic surfactants by the methods of high-performance liquid and thin-layer chromatography is studied. Techniques of quantitative definition of progesterone in some medical products in micellar mobile phases on the basis dodecilsulfat sodium are developed.

Keywords: high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, cationic, anionic and not ionic surfactants, progesterone

Введение

Прогестерон – женский половой гормон, по химической природе относящийся к стероидам, в основе структуры которых лежит скелет циклопентанопергидрофенантрена (рис. 1). Определение прогестерона в лекарственных препаратах и биологических жидкостях играет важную роль в клинической диагностике и лечении многих эндокринных, гинекологических и онкологических заболеваний.

Анализ литературных данных [1, 2] показал, что для определения прогестерона, как и других половых гормонов, используются разнообразные электрохимические [3], электрофоретические [4], спектрофотометрические [5], иммунные [6-8] и хроматографические методы, более половины которых составляет

хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) [9-12], планарная [2, 13-15] и колоночная жидкостная (ЖХ) хроматография [16-18], ЖХ-масс-спектрометрия [19-22]. В составе подвижных фаз в ЖХ обычно используют органические растворители, обладающие резким запахом, токсичностью или канцерогенностью (уксусная кислота, метанол, бензол, четыреххлористый углерод и другие), что ограничивает применение разработанных методик.

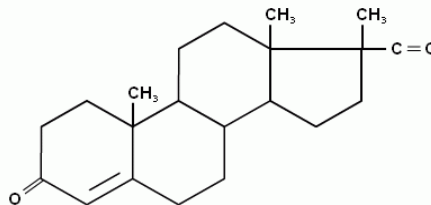


Рис. 1. Структура прогестерона

Однако известны немногочисленные работы, в которых вместо смесей органических растворителей используют водно-мицеллярные (МПФ) [23, 24] подвижные фазы, лишенные указанных недостатков. Для определения прогестерона такие подвижные фазы (ПФ) ранее не использовались. В связи с этим, цель данной работы состояла в применении мицеллярных ПФ для определения прогестерона методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии.

Эксперимент

Использовали $2.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл хлороформные растворы прогестерона (хроматографически чистый). В качестве катионных поверхностно-активных веществ (кПАВ) применяли бромид цетилтриметиламмония (ЦТА), анионных (аПАВ) – додецилсульфат натрия (ДДС), неионных (нПАВ) – оксиэтиллированный алкилфенол Тритон X-100 (ТХ-100). Все препараты ПАВ содержали не менее 96% основного вещества. Исходные водные растворы ПАВ имели концентрацию 0.005-0.06 М. Растворы ЦТА и ДДС готовили при нагревании до 40-50⁰ С. Рабочие растворы ПАВ получали разбавлением исходных непосредственно перед употреблением. Ионную силу раствора создавали 2М раствором хлорида калия. Для приготовления водно-органических ПФ использовали этанол, изопропанол, ацетонитрил квалификации “х.ч.”.

Исследования методом восходящей ТСХ проводили на полярных (Сорбфил АО “Сорбполимер”, Россия), малополярных (Полиамид-6, “Fluka”, Германия) и неполярных (RP-18, “Merck”, Германия) сорбентах. Объем пробы, наносимой на пластину, составлял 0.5 – 1.0 мкл. Идентификацию хроматографических зон и количественное определение прогестерона проводили с помощью видеоденситометра “Сорбфил” (АО “Сорбполимер”, Россия). Исследования методом обращенно-фазовой ВЭЖХ выполняли на жидкостном хроматографе Стайер фирмы “Аквилон” со спектрофотометрическим детектором, используя колонки с неполярным сорбентом C18, 150*4.6 мм (“Phenomenex”, США).

Для оценки эффективности хроматографического процесса в водно-органических и мицеллярных ПФ использовали число теоретических тарелок (N) и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H).

Пробоподготовку лекарственных препаратов “Депо-провера” и “Дюфастон” для определения прогестерона проводили растворением лекарственных форм в

этаноле и последующим фильтрованием полученных растворов. Исходная концентрация препарата “Депо-провера” составляла $2.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл, “Дюфастон” - $1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл. Растворы хранили в замороженном состоянии не более семи дней.

Обсуждение результатов

Хроматографическое поведение прогестерона в водно-органических подвижных фазах

Обзор литературных данных [2] показал, что при использовании водно-органических ПФ наиболее эффективно применение неполярных неподвижных фаз. В связи с этим, изучено хроматографическое поведение прогестерона методом ТСХ на неподвижных фазах (НФ) RP-18 в водно-органических ПФ на основе протонных (этанол, изопропанол) и апротонных (ацетонитрил) растворителей. Зависимости подвижности (R_f) прогестерона от концентрации растворителя показаны на рис. 2.

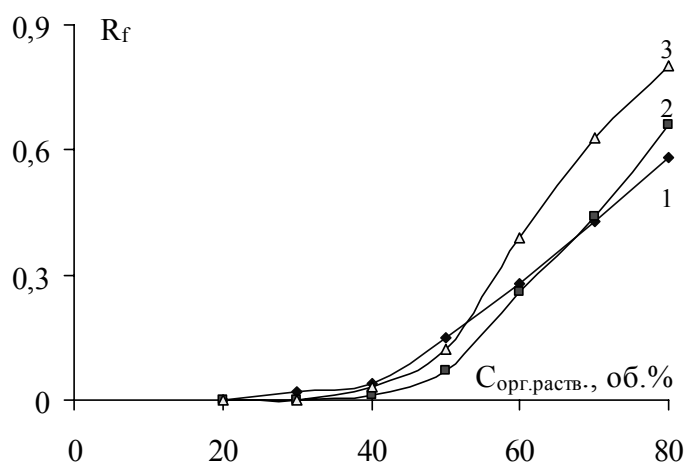


Рис. 2. Влияние природы и концентрации растворителя в ПФ на подвижность прогестерона. НФ: RP-18. $C_R = 2.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл. ПФ: 1 – ацетонитрил, 2 – этанол, 3 — изопропанол

Из данных рис. 2 следует, что независимо от природы органического растворителя при его содержании в ПФ до 40 об.% подвижность сорбата близка к нулю, что свидетельствует о сильном сродстве прогестерона к неполярной неподвижной фазе. Дальнейшее повышение концентрации органического растворителя увеличивает подвижность исследуемого сорбата. Такое поведение согласуется с теорией Хорвата и связано преимущественной адсорбцией растворителя на поверхности сорбента, что приводит к вытеснению сорбата и усилению его переноса ПФ [25].

Результаты выбора оптимальных условий хроматографирования методом ВЭЖХ представлены на рис. 3. Из приведенных данных видно, что в системе ацетонитрил – вода оптимальным является соотношение компонентов $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$, равное 60:40, что соответствует получению наиболее интенсивного хроматографического пика прогестерона.

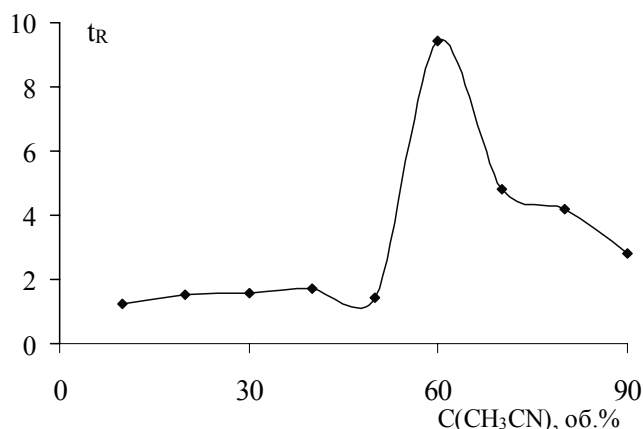


Рис. 3. Зависимость времени удерживания прогестерона от концентрации ацетонитрила. НФ: С18. ПФ: ацетонитрил – вода. $C_R=2.5 \cdot 10^{-6}$ г/мл

Хроматографическое поведение прогестерона в мицеллярных подвижных фазах

Анализ полученных результатов позволил выявить два основных фактора, влияющих на эффективность мицеллярных подвижных фаз в ТСХ и ВЭЖХ прогестерона:

- природа неподвижной фазы;
- природа и концентрация ПАВ.

Установлено, что хроматографические зоны прогестерона, полученные методом ТСХ в МПФ, на неполярных и слабополярных НФ либо сильно размыты, либо имеют значения подвижности, близкие к нулю. Поэтому эти фазы не были использованы для дальнейших исследований.

Изучение влияния ПАВ на пластинах Сорбфил показало, что катионные и неионные ПАВ не пригодны для определения прогестерона, т.к. в мицеллярных ПФ на их основе сорбат остается на линии старта. В присутствии в ПФ анионного ПАВ – додецилсульфата натрия, напротив, подвижность прогестерона возрастает (рис. 4), достигая максимального значения при концентрации ДДС, равной $4.3 \cdot 10^{-2}$ М, затем значения R_f стабилизируются.

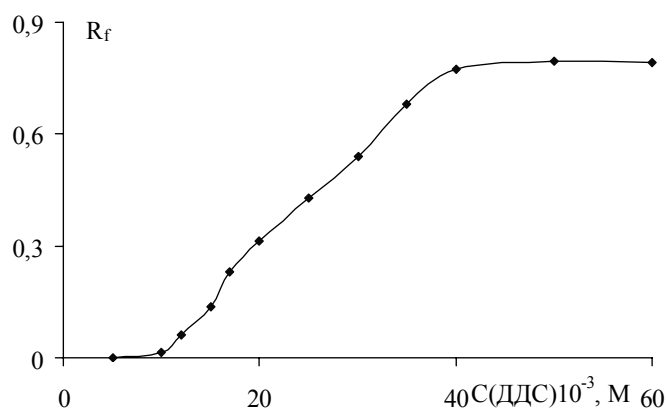


Рис. 4. Зависимость подвижности прогестерона от концентрации ДДС. НФ: Сорбфил. $C_R=2.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл

Этот факт согласуется с литературными данными [26] и может быть объяснен усилением связывания реагента (R) с МПФ вследствие смещения равновесия

солюбилизации вправо: $M + R \leftrightarrow M(R)$, где M – мицелла, $M(R)$ – система, состоящая из мицеллы и солюбилизированного в ней реагента. Оптимальной для определения исследуемого гормона является концентрация ДДС, равная $2.5 \cdot 10^{-2}$ М, вследствие наибольшей компактности и четкости образующейся хроматографической зоны. При дальнейшем увеличении концентрации ДДС в интервале $(3.0 - 6.0) \cdot 10^{-2}$ М наблюдается ухудшение разрешения и размывание зоны реагента (рис. 5).

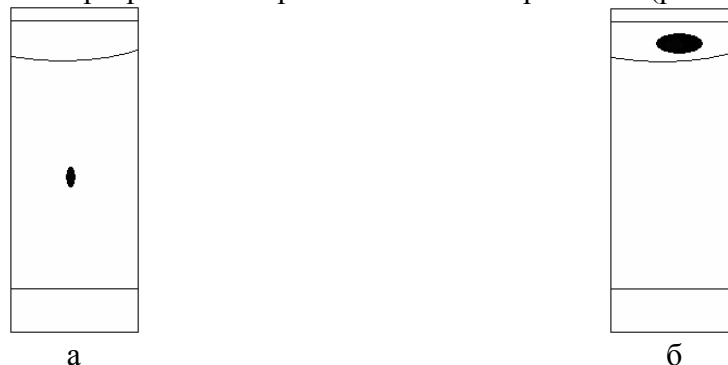


Рис. 5. Влияние концентрации ДДС на подвижность прогестерона и компактность зоны. НФ: Сорбфил. $C_R = 2.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл.
ПФ: а – $C_{\text{ДДС}} = 2.5 \cdot 10^{-2}$ М, б – $C_{\text{ДДС}} = 6.0 \cdot 10^{-2}$ М.

Установлено, что добавление в подвижную фазу ацетонитрила (3-5 об.%) практически не меняет подвижности реагента, а в присутствии электролита (KCl) зона прогестерона остается на линии старта. Сравнение параметров эффективности хроматографического процесса – величин \bar{N} и \bar{H} в водно-органических и мицеллярных элюентах свидетельствует о преимуществе последних (табл. 1).

Таблица 1. Параметры эффективности, рассчитанные для различных хроматографических систем ($n=3$, $P=0.95$)

$C(R) \cdot 10^{-3}$, г/мл	$\bar{N} \cdot 10^{-3}$		\bar{H} , мм	
	НФ: RP-18 ПФ: CH_3CN – вода (60:40)	НФ: Сорбфил ПФ: $2.5 \cdot 10^{-2}$ М ДДС	НФ: RP-18 ПФ: CH_3CN – вода (60:40)	НФ: Сорбфил ПФ: $2.5 \cdot 10^{-2}$ М ДДС
2.5	0.26	0.29	0.035	0.030
1.0	0.35	0.48	0.023	0.017
0.50	0.43	2.1	0.019	0.004
0.10	0.62	3.3	0.013	0.002

Так, например, при изменении концентрации прогестерона в интервале $(0.1 - 0.50) \cdot 10^{-3}$ г/мл значения \bar{N} в мицеллярной ПФ возрастают в 5-6 раз по сравнению с хроматографированием в водно-органических ПФ. Соответственно происходит уменьшение величины \bar{H} .

Оптимальные условия хроматографирования, выбранные в ТСХ, были подтверждены в условиях ВЭЖХ. Исследования показали, что в МПФ увеличение времени удерживания прогестерона наблюдается в два раза, т.е. сродство к неполярной неподвижной фазе увеличивается. Хроматографический пик также несколько меняется: он становится более узким и симметричным (рис. 6). Так, коэффициент асимметрии в водно-ацетонитрильной ПФ имел значение $F_{\text{ass}} = 3.68$, в мицеллярной ПФ – 2.04. Также, почти в четыре раза увеличилось значение числа теоретических тарелок – параметра \bar{N} , т.е. улучшилась эффективность

хроматографического процесса. Результаты проведенных исследований использованы для определения прогестерона в лекарственных препаратах.

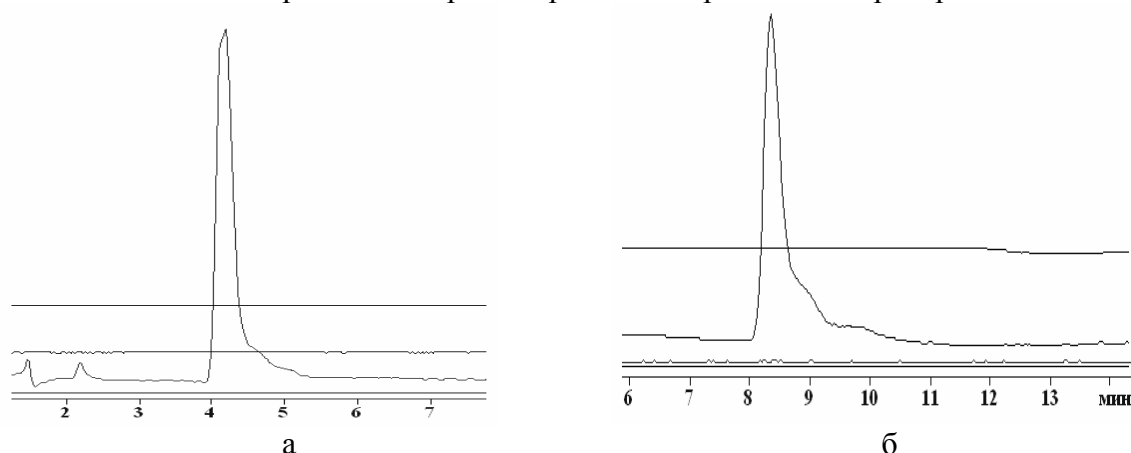


Рис. 6. Хроматограммы прогестерона. НФ: С18. $C_R=2.5 \cdot 10^{-6}$ г/мл.
а – ПФ: ацетонитрил – вода (60:40), $t_{уд}=4.19$ мин, $N=1481$, $F_{асс}=3.68$; б – ПФ: ДДС – ацетонитрил (95:5), $t_{уд}= 8.36$ мин, $N=4056$, $F_{асс}=2.04$.

Практическое применение мицеллярной ТСХ и ВЭЖХ для определения прогестерона

Полученные данные при идентификации прогестерона в исследуемых лекарственных препаратах представлены в табл. 2.

Таблица 2. Значения R_f и t_R прогестерона в стандартных растворах и исследуемых объектах ($n=3$, $P=0.95$)

Объекты исследования	ТСХ (R_f)	ВЭЖХ ($t_{уд}$, мин)
Стандартный раствор прогестерона	0.51 ± 0.01	8.5 ± 0.01
«Депо-провера»	0.49 ± 0.01	8.4 ± 0.01
«Дюфастон»	0.48 ± 0.02	8.6 ± 0.01

Совпадение значений подвижности прогестерона в стандартном и анализируемых растворах (метод ТСХ), а также соответствующих значений времен удерживания (метод ВЭЖХ) свидетельствует о надежной его идентификации.

В выбранных оптимальных условиях проведено количественное определение прогестерона в лекарственных препаратах и сравнение полученных результатов с хроматографированием в водно-органических элюентах (рис. 7). Видно, что использование мицеллярных ПФ повышает чувствительность методов, т.к. наклоны градуировочных графиков увеличиваются. Коэффициенты корреляции также несколько возрастают. Для контроля правильности определения использован метод «введено-найдено» (табл. 3).

Таблица 3. Результаты определения прогестерона методом «введено-найдено» в мицеллярных ПФ ($n=3$, $P=0.95$)

ТСХ				ВЭЖХ			
Введено, 10^{-3} г/мл	Найдено, 10^{-3} г/мл	S_r	$\Delta x/x$, %	Введено, 10^{-6} г/мл	Найдено, 10^{-6} г/мл	S_r	$\Delta x/x$, %
0.30	0.25 ± 0.02	0.026	6	0.10	0.10 ± 0.01	0.061	15
1.5	1.5 ± 0.2	0.062	13	0.50	0.43 ± 0.06	0.055	14
2.0	1.9 ± 0.3	0.055	15	2.0	1.9 ± 0.2	0.044	10

Результаты количественного определения прогестерона методами ТСХ и ВЭЖХ приведены в табл. 4. Обработка результатов по F- и t-критериям показала отсутствие систематической ошибки.

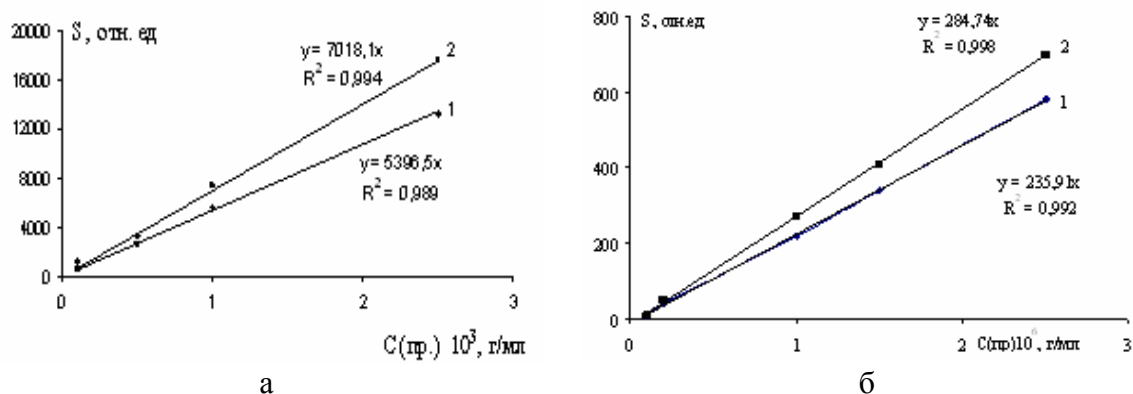


Рис. 7. Зависимость площади зон (ТСХ) (а) и площади пиков (ВЭЖХ) (б) от концентрации прогестерона. НФ: а) Сорбфил; б) С18. ПФ: 1 – ацетонитрил–вода (60:40), 2 – $2.5 \cdot 10^{-3}$ М ДДС.

Таблица 4. Результаты определения прогестерона в лекарственных препаратах (n=3, P=0.95)

Объект исследования	Содержание основного вещества по паспорту	Найдено методом МТСХ*; (S_T)	Найдено методом МВЭЖХ**; (S_T)	$F_{\text{эксп}}$	$F_{\text{табл}}$	$t_{\text{эксп}}$	$t_{\text{табл}}$
“Депро-провера”	150 мг/мл	148±9 (0.024)	149±5 (0.013)	3.29	19.0	0.38	2.78
“Дюфастон”	10 мг/ табл.	9.3±0.8 (0.035)	9.7±0.7 (0.030)	1.26		1.58	

* – мицеллярная ТСХ (МТСХ); ** – мицеллярная ВЭЖХ (МВЭЖХ).

Заключение

В настоящей работе впервые методами колоночной и планарной жидкостной хроматографии в мицеллярных подвижных фазах проведено определение женского полового гормона – прогестерона. Установлено, что во всех исследуемых системах оптимальными подвижными фазами являются мицеллярные растворы додецилсульфата натрия, характеризующиеся наибольшей хроматографической эффективностью по сравнению с водно-органическими элюентами. Разработаны ТСХ- и ВЭЖХ-методики определения прогестерона в некоторых лекарственных препаратах.

Список литературы

1. Резников А. Г. Методы определения гормонов. К.: Наук. думка, 1980. 536с.
2. Герег Ш. Количественный анализ стероидов. М: Мир, 1985. 504с.

3. Kreuzer M.P., McCarthy R., Pravda M., Guilbault G.G. Development of electrochemical immunosensor for progesterone analysis in milk // *Anal. Lett.* 2004. V.37, № 5. P. 943-956.
4. Srivastava M.L., Tiwari A.K., Mishra M.K. Electrophoresis of progesterone particles dispersed in carbohydrate and nonelectrolyte solutions // *J. Colloid and Interface Sci.* 2002. V.249, №2. P.322-326.
5. Shiwei Xu. Спектрофотометрическое определение 1,4-3-кетостероидов // *Anal. Chem.* 1987. V.15, №5. P.385-389.
6. Гончаров Н.П., Кацяя Г.В., Колесникова Г.С., Нижник А.Н. и др. Сравнительный анализ определения тестостерона в сыворотке крови различными методами // *Журн. пробл. эндокринологии.* 2005. Т.51, №6. С.31-37.
7. Lovgren U., Kronkvist K., Johansson G., Edholm L.-E. Enzym amplified immunoassay for steroids in biosamples at low picomolar concentrations // *Anal. Chim. Acta.* 1994. V.288, №3. P.227-235.
8. Zherdev A.V., Byzova N.A., Izumrudov V.A. Rapid polyelectrolyte-based immunofiltration technique for testosterone detection in serum samples // *Analyst.* 2003. V.128, №10. P.1275-1280.
9. Jungju S., Hye-Young K., Chul C.B., Jungju Seo H.J. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2005. V.1067, №1-2. P.303-309.
10. Marcos V., Perogordo E., Espinosa P., Martin de Pozuelo M., Hooghuis H. Multiresidue analysis of anabolic compounds in bovine hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. chim. acta.* 2004. V.507, №2. P. 219-227.
11. Adessi G.L., Eichenberger D., Quang Nhuan Tran, Jayle N.F. Gas chromatography profile of estrogens: Application to pregnancy urine // *Steroids.* 1975. V.25, №4. P.553-564.
12. Balizs G., Jainz A., Horvatovich P. Investigation of the feeding effect on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2005. V.1067, №1-2. P.323-330.
13. Tinschert K., Träger L. Separation of androsterone from epiandrosterone, and dehydroepiandrosterone from its 3-hydroxy epimer by thin-layer chromatography // *J. Chromat.* 1978. V.152, №2. P.447-452.
14. Lekic M., Korac F., Sober M., Marjanovic A. Planar chromatography of steroid hormones and anabolics // *Acta chim. sloven.* 2007. V.54, №1. P.88-91.
15. Zarzycki P.K., Zarzycka M.B. Application of temperature-controlled micro planar chromatography for separation and quantification of testosterone and its derivatives // *J. Anal. and Bioanal. Chemistry.* 2008. V.391, №6. P.2219-2225.
16. Carfagnini G., Corcia A.Di, Marchetti M., Samperi R. Assay for urinary estriol during the menstrual cycle based on extraction by a graphitized carbon black cartridge followed by high-performance liquid chromatography // *Chromatog.* 1987. V.23, №11. P. 835-838.
17. Batra S.K., Saumande J. High Performance Liquid Chromatographic Separation of Estradiol-17 and -17 β in Biological Fluids; Application to Plasma, Milk and Urine of Cows // *J. Liquid Chromatogr. & Relat. Technol.* 1984. V.7, №12. P.2431-2446.
18. Zhao Shan, Wu Danan, Wang Peng. Simultaneous determination of seven sexual hormones in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography // *Chin. J. Chromatogr.* 2004. V.22, №3. P.267-269.

19. Reddy S., Iden C.R., Brownawell B.J. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2005. V.77, №21. P. 7032-7038.
20. Ingrand V., Herry G., Beausse J., de Roubin M. R. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2003. V.1020, №1. P.95-100.
21. Koh Y.K.K., Chiu T.Y., Boobis A., Cartmell E., Lester J.N. and Scrimshaw M.D. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V.1173, №1-2. P.81-87.
22. Petrovic M., Tavazzi S., Barcelo D. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment // *J. Chromatogr. A.* 2002. V.971, №1-2. P.37-45.
23. Карцова Л.А., Стрельникова Е.Г. Разделение экзо- и эндогенных стероидных гормонов мицеллярной высокоэффективной тонкослойной хроматографией // *Журн. аналит. химии.* 2007. Т.62, №9. С.965-968.
24. Garcia Diez L., H.-J. Bart Micellar chromatography for enantiomer separations // 27 International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, Frankfurt am Main. 19-24 May, 2003. P.74.
25. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988. 160с.
26. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Поверхностно-активные вещества в тонкослойной хроматографии. // *Журн. аналит. химии.* 2003. Т.58, №8. С.808-818.

Сорокина Ольга Николаевна - ассистент кафедры химии, Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

Сумина Елена Германовна - д.х.н., профессор кафедры аналитической химии и химической экологии, Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Угланова Варсения Загидовна - к.х.н., доцент кафедры физики катастроф и чрезвычайных ситуаций, Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Белая Елена Владимировна - студентка, Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Sorokina Olga N. – assistant of Chemistry Department, N. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

Sumina Elena G. – Doctor of Chemical Sciences (Dr. Sc., Highest Degree), Professor, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov, SuminaEG@yandex.ru

Uglanova Varseniya Z. – Ph.d., lecturer, Division of Physics of catastrophs and extreme situations, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov

Belaya Elena V. – student, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov