



растворах ионов ванадия (IV). Показана возможность использования данного электрода для определения ионов ванадия (IV) в сухих остатках нефтей.

Список литературы

1. Астафьева Л. С. Экологическая химия. М., 2006. 224 с.
2. Рипан Р., Четяну И. Неорганическая химия : в 2 т. М., 1972. Т. 2. 871 с.
3. Лугинин В. А., Комова В. И., Грекович А. Л. Пленочный ионоселективный электрод // Журн. прикладной химии. 1987. Т. 60, № 1. С. 189.
4. Пилипенко А. Т., Рябушко О. П., Соколюк Г. И., Каретникова Е. А. Комплексное соединение ванадия с адамантил-1-гидроксамовой кислотой как электроодоактивное вещество твердофазного ионоселективного электрода // Укр. хим. журн. 1990. Т. 56, № 11. С. 1181.
5. Кимстач В. А. Исследования в области применения твердых металлических электродов для потенциометрического титрования галогенидов : автореф. дис. ... канд. хим. наук. Ростов н/Д, 1970. 252 с.
6. Бурхата В. А. Модифицированные электроды с полупроводниковыми мембранами в потенциометрии // Сенсор-2000. Сенсоры и микросистемы : тез. докл. Всерос. конф. с межд. участием. СПб., 2000. С. 317.
7. Кимстач В. А. Металлические электроды с модифицированной поверхностью в осадительном и комплексометрическом потенциометрическом титровании : дис. ... д-ра хим. наук. Ростов н/Д, 1986. С. 296.
8. Петерс Д., Хайес Дж., Хифтье Т. Химическое разделение и измерение : в 2 кн. М., 1978. Кн. 2. 677 с.
9. Рябов В. Д. Химия нефти и газа. М., 2004. 288 с.
10. ГОСТ 10364-90 Нефть и нефтепродукты. Метод определения ванадия.

УДК 543:544.42

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ ПРЕПАРАТОВ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ И ПАВ



Е. Г. Сумина, В. З. Угланова, О. Н. Сорокина¹, Д. О. Афонина

Саратовский государственный университет

E-mail: SuminaEG@yandex.ru E-mail: AtayanVZ@rambler.ru

¹Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова

E-mail: Sorokina-O-N@yandex.ru

Методом тонкослойной хроматографии изучены хроматографические свойства лекарственных препаратов кортикостероидных гормонов в водно-органических, циклодекстриновых и мицеллярных подвижных фазах при варьировании природы неподвижной фазы, природы и концентрации растворителя в подвижной фазе, природы и концентрации циклодекстринов и поверхностно-активных веществ. Найдены оптимальные хроматографические системы и условия их применения в ТСХ кортикостероидов. Полученные результаты подтверждены методом ВЭЖХ.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, кортикостероидные гормоны, циклодекстрины, поверхностно-активные вещества.

Definition of Degree of Cleanliness of Preparations of Corticosteroid Hormones by Method of Thin-Layer Chromatography in Mobile Phases on the Basis of Cyclodextrins and Surfactants

E. G. Sumina, V. Z. Uglanova, O. N. Sorokina, D. O. Afonina

Chromatographic properties of medical products of corticosteroid hormones in water-organic, cyclodextrins and micellar mobile phases at the variation of the nature of stationary phase, the nature and concentration of solvent in mobile phase, the nature and concentration of cyclodextrins and surfactants are studied by the method of thin-layer

chromatography. Optimum chromatographic systems and conditions of their application in the TLC of corticosteroids are founded. The received results are confirmed by the method of HPLC.

Key words: thin-layer chromatography, corticosteroid hormones, cyclodextrins, surfactants.

Введение

Кортикостероиды являются важнейшим классом стероидных гормонов, играющих первостепенную роль во многих физиологических и биохимических процессах в живых организмах. Для диагностики различных заболеваний, изучения путей синтеза и превращения кортикостероидов проводят их определение в биологических жидкостях, а для лечения ряда онкологических, эндокринных, гинекологических и других заболеваний используют лекарственные препараты на их основе, определение качества которых является важной задачей.

С этой целью наиболее распространены высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [1–3] и ВЭЖХ-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) [4–8]. Значительно меньшее при-



менение получила тонкослойная хроматография (ТСХ) [9, 10], отличающаяся, как известно, простотой, доступностью проведения анализа, эффективностью разделения веществ и дешевизной.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение возможности применения метода ТСХ для оценки качества лекарственных препаратов, содержащих кортикостероидные гормоны. В качестве подвижных фаз (ПФ) апробированы водные мицеллярные подвижные фазы (МПФ), содержащие поверхностно-активные вещества (ПАВ) и циклодекстрины. В отличие от распространенных водно-органических элюентов они не обладают токсичностью, канцерогенностью, резким запахом и в большинстве случаев легко биоразлагаемы [11]. При хроматографическом определении кортикостероидов такие фазы практически не применялись, за исключением работ [12–14].

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выбраны следующие лекарственные препараты кортикостероидных гормонов: «Дексаметазон» – раствор для инъекций, 4 мг/мл; «Гидрокортизон» – суспензия для внутрисуставного и околосуставного введения, 25 мг/мл; «Преднизолон» – раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 30 мг/мл. Исходные растворы преднизолона и дексаметазона готовили растворением точной навески в дистиллированной воде. Гидрокортизон растворяли в ацетонитриле. Рабочие растворы кортикостероидных препаратов «х ч» содержали 2.5 мг/мл гидрокортизона, 4 мг/мл дексаметазона, 3 мг/мл преднизолона. До проведения анализа растворы кортикостероидов хранили в холодильнике.

Для приготовления водно-органических подвижных фаз использовали этанол ректифицированный, изопропанол «х ч», ацетонитрил «хроматографически чистый». В состав водных МПФ вводили катионное ПАВ – бромид цетилтриметиламмония (ЦТА), анионное ПАВ – додецилсульфат натрия (ДДС) и неионное ПАВ – оксиэтилированный алкилфенол Тритон X-100 (ТХ-100). Препараты ПАВ содержали не менее 96% основного вещества. Исходные растворы ЦТА, ДДС и ТХ-100 с концентрациями от $5 \cdot 10^{-2}$ М до $1 \cdot 10^{-1}$ М готовили по точным навескам растворением в дистиллированной воде при нагревании до 40–50 °С. Исходные растворы циклодекстринов с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М готовили растворением точной навески в дистиллированной воде (2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, 2-ГП- β -ЦД) и 8 М водном растворе мочевины (β -циклодекстрин, β -ЦД). Рабочие растворы всех веществ готовили разбавлением исходных перед употреблением. Ионную силу растворов создава-

ли 2.0 М раствором хлорида калия. Для сравнения эффективности и селективности разделения исследуемых соединений в циклодекстриновых, мицеллярных и водно-органических ПФ использовали: число теоретических тарелок (N), высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), и разрешение (R_s).

Исследования проводили методом восходящей ТСХ на коммерческих пластинах Сорбфил (Россия), Полиамид-6 (Германия), RP-18 (Германия), а также методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Luna C18(2) (150 x 4.6 мм). Зоны кортикостероидов идентифицировали на видеоденситометре Сорбфил с УФ-лампой (TUV PL-S PHILIPS, 254 нм) по собственной флуоресценции в УФ-свете. Зону основного вещества также выделяли, обрабатывая пластину бесцветным раствором тетразолиевого синего, который в результате реакции с кортикостероидами дает синее окрашивание [15].

Обсуждение результатов

Водно-органические подвижные фазы. Предварительно было изучено влияние природы неподвижной фазы (НФ) на число и компактность зон исследуемых веществ. Хроматограммы кортикостероидов на разных НФ представлены на рис. 1.

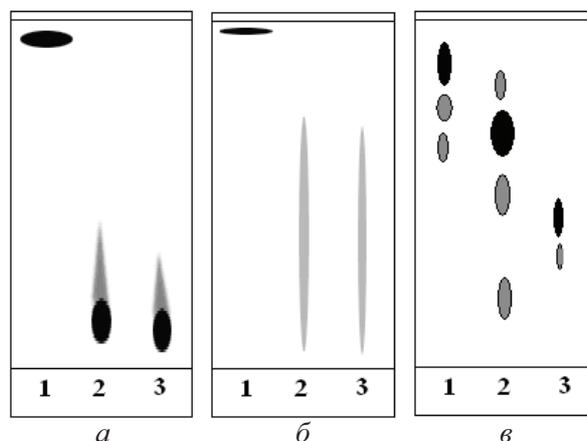


Рис. 1. Хроматограммы препаратов кортикостероидов. НФ: *a* – Полиамид-6, *б* – Сорбфил, *в* – RP-18. ПФ: ацетонитрил-вода (70 : 30). 1 – гидрокортизон (2.5 мг/мл); 2 – дексаметазон (4 мг/мл); 3 – преднизолон (3 мг/мл)

Видно, что на полярном (Сорбфил) и слабополярном (Полиамид-6) сорбенте зоны либо сильно размыты, либо движутся с фронтом элюента (рис. 1, *a*, *б*). Значительно лучшая хроматографическая картина наблюдается на неполярном сорбенте RP-18 (рис. 1, *в*), который был выбран для дальнейших исследований. Изучение хроматографического поведения гормонов на RP-18 в подвижных фазах, содержащих органические растворители разной природы (ацетонитрил, изопропанол,



бутанол-1, бутанол-2), проводили при варьировании концентрации органической составляющей от 20 до 80 об.%. Типичное изменение подвижностей (R_f) реагентов от концентрации растворителя показано на рис. 2.

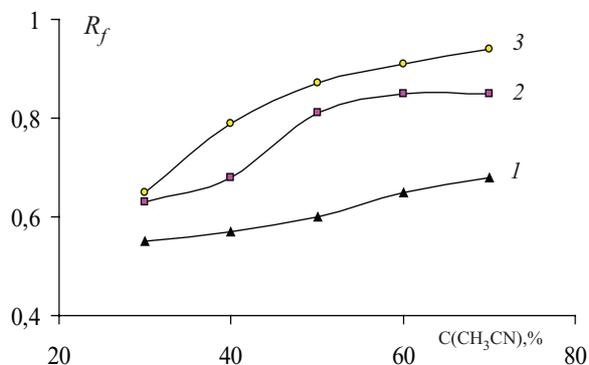


Рис. 2. Зависимость подвижности кортикостероидов (зоны основного вещества) от концентрации ацетонитрила. НФ: RP-18. ПФ: ацетонитрил-вода (70 : 30). 1 – преднизолон (3 мг/мл); 2 – дексаметазон (4 мг/мл); 3 – гидрокортизон (2.5 мг/мл)

Из данных рис. 2 следует, что с увеличением содержания экстрагента в ПФ значения R_f сорбатов увеличиваются, что подтверждает закономерности классической теории Хорвата [16] и обусловлено преимущественной сорбцией органического растворителя на НФ, способствующей переносу сорбатов ПФ.

Водно-циклодекстриновые подвижные фазы. Хроматографирование проводили, варьируя концентрацию β -ЦД и 2-ГП- β -ЦД в ПФ, а также концентрацию ацетонитрила и сильного электролита, используемых в качестве модификаторов циклодекстриновой ПФ. Установлено, что, независимо от концентрации β -ЦД, подвижность гидрокортизона практически равна нулю, а для дексаметазона и преднизолона значения R_f моно-

тонно возрастают (рис. 3, а, б, кривая 3). Наиболее четкие хроматографические зоны установлены при концентрации β -ЦД в ПФ, равной $6 \cdot 10^{-3}$ М. В случае 2-ГП- β -ЦД подвижность всех сорбатов значительно меньше 0.1, что, по-видимому, можно объяснить несоответствием размера полости 2-ГП- β -ЦД размеру молекул исследуемых гормонов [17]. Поэтому для дальнейших исследований использовали ПФ на основе β -ЦД.

С целью улучшения хроматографических характеристик сорбатов в циклодекстриновых ПФ нами было исследовано влияние добавок органического растворителя и сильного электролита. Установлено, что как для дексаметазона, так и для преднизолона введение ацетонитрила в хроматографическую систему уменьшает значения R_f сорбатов (рис. 3, а, б, кривая 1). Установленные закономерности могут быть объяснены конкурирующим включением молекул ацетонитрила в полость ЦД, препятствующим образованию комплекса «гость – хозяин» с молекулой сорбата [18]. Изменения хроматографических характеристик сопровождаются улучшением компактности и четкости хроматографических зон основного вещества и примесей, содержащихся в исследуемых лекарственных препаратах. Так, например, в препарате дексаметазона в присутствии β -ЦД образовалось четыре четкие зоны, тогда как в водно-ацетонитрильной ПФ их было всего три. Однако преднизолон по-прежнему не разделился на отдельные компоненты, при этом его хроматограмма стала более размытой. Подвижность гидрокортизона несколько увеличилась, однако не превысила значения R_f , равного 0.1.

Установлено, что увеличение ионной силы раствора, так же как и введение в ПФ органического растворителя, уменьшает подвижность дексаметазона и преднизолона в циклодекстриновых ПФ, однако не столь резко (рис. 3, а, б, кривая 2).

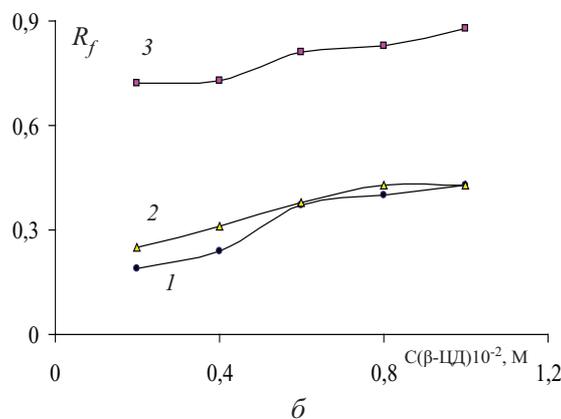
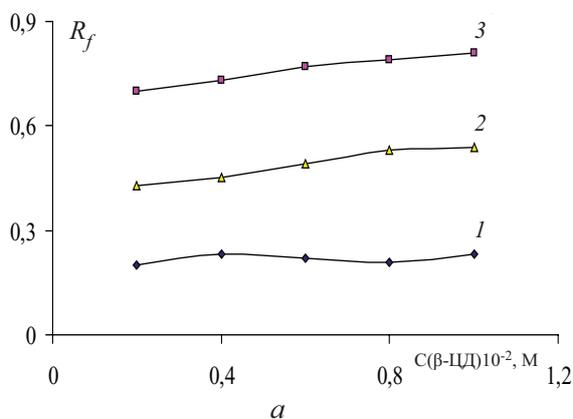


Рис. 3. Зависимость подвижности дексаметазона (а) и преднизолона (б) (зона основного вещества) от концентрации β -ЦД. НФ: RP-18. $C_{\text{дексаметазона}} = 4 \text{ мг/мл}$, $C_{\text{преднизолона}} = 3 \text{ мг/мл}$. ПФ: 1 – вода – β -ЦД – ацетонитрил; 2 – вода – β -ЦД – KCl; 3 – вода – β -ЦД



Возможно, как и в присутствии ацетонитрила, протекает конкурирующая реакция комплексообразования между ЦД и электролитом, концентрация ионов которого на несколько порядков больше концентрации сорбатов. Основным положительным результатом введения электролита в циклодекстриновую ПФ является возможность

разделения на отдельные зоны уже двух сорбатов – преднизолона, в котором обнаружены две зоны, и дексаметазона, в котором по-прежнему обнаружено четыре зоны, форма которых несколько улучшилась. Этот вывод подтвержден расчетом параметров эффективности и разрешения (таблица).

Параметры эффективности и разрешения, рассчитанные для различных хроматографических систем

Подвижная фаза	Препарат	R_f	$N \cdot 10^{-2}$	H	R_S
$\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (70 : 30)	Преднизолон	0.30 0.40	1.4	0.551	43
	Дексаметазон	0.20 0.46 0.66 0.83	1.4	0.588	43 52 60
	Гидрокортизон	0.60 0.73 0.86	6.8	0.118	19 20
β -ЦД – КСI – H_2O (30 : 5 : 65)	Преднизолон	0.24 0.44	1.8	0.450	83
	Дексаметазон	0.12 0.32 0.52 0.76	1.7	0.473	50 67 81
	Гидрокортизон	-	-	-	-
ДДС – КСI – H_2O (40 : 10 : 50)	Преднизолон	0.29 0.55	2.3	0.372	96
	Дексаметазон	0.16 0.37 0.63 0.83	9.0	0.089	107 103 90
	Гидрокортизон	0.26 0.47 0.64	14	0.055	43 52

Примечание. Жирным шрифтом выделены зоны основного вещества, по отношению к которым рассчитаны значения R_S примесей.

Водно-мицеллярные подвижные фазы. При проведении эксперимента использовали пластины Сорбфил с нормальной фазой, выбранной согласно [14]. Как и в случае с циклодекстринами, предвари-

тельно варьировали концентрацию ПАВ в мицеллярных ПФ. Результаты предварительного исследования показали, что с ростом концентрации всех типов ПАВ подвижность гормонов растет (рис. 4).

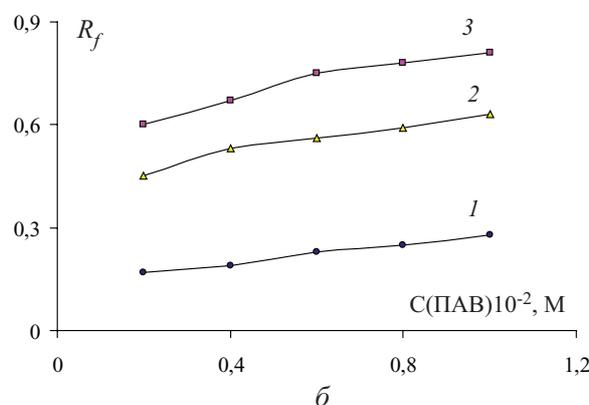
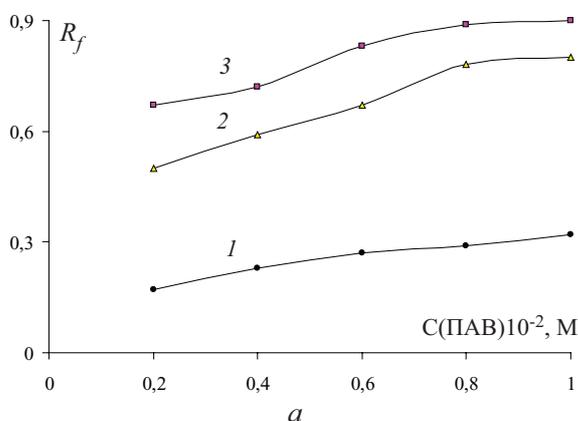


Рис. 4. Зависимость подвижности гидрокортизона (а) и преднизолона (б) (зона основного вещества) от концентрации ПАВ. НФ: Сорбфил. $C_{\text{гидрокортизона}} = 2.5 \text{ мг/мл}$, $C_{\text{преднизолона}} = 3 \text{ мг/мл}$. ПФ: 1 – вода – ТХ-100; 2 – вода – ЦТА; 3 – вода – ДДС



Наиболее существенное изменение R_f наблюдается для ДДС и ЦТА. Для ТХ-100 возрастание подвижности незначительно и носит монотонный характер. Как и в случае с ПФ на основе β -ЦД, рост подвижности сорбатов в МПФ вызван смещением равновесия солубилизации в мицеллы ПАВ вправо: $R + Mц \rightarrow R(Mц)$ [17].

Результаты анализа хроматограмм лекарственных препаратов в МПФ показывают, что использование ДДС приводит к разделению дексаметазона на три пятна; преднизолон на два; гидрокортизон образует две или три зоны в зависимости от концентрации ДДС в МПФ (в водно-органических и циклодекстриновых ПФ разделения гидрокортизона не происходило). В присутствии ЦТА дексаметазон также разделяется на три зоны, преднизолон на две, а у гидрокортизона все возможные зоны сливаются друг с другом, практически не разделяясь. Мицеллярные ПФ на основе ТХ-100 характеризуются также сильным размыванием всех выделенных зон исследуемых веществ и уменьшением их числа.

В целом хроматографическая картина разделения препаратов гормонов в МПФ отличается размыванием и нечеткостью зон, а также их незначительной разрешенностью. Поэтому такие фазы малопригодны для анализа. С целью улучшения этих характеристик проводилось модифицирование указанных подвижных фаз путем введения добавок органического растворителя и сильного электролита. Установлено, что введение ацетонитрила до 5 об.% оказалось нецелесообразным, так как вызвало дополнительное размывание пятен всех веществ независимо от природы ПАВ. В отличие от растворителя влияние хлорида калия в интервале $\mu = 0.01 - 1$ явилось позитивным, так

как улучшило четкость и компактность хроматографических зон, их разрешение. Аналогичные положительные изменения в присутствии хлорида калия, хотя и в меньшей степени, наблюдаются и для МПФ на основе ЦТА и ТХ-100.

Сравнение параметров эффективности и разрешения в оптимальных подвижных фазах, содержащих органические растворители, циклодекстрины и ПАВ, представлено в таблице. Анализ таблицы показывает, что наилучшие хроматографические характеристики наблюдаются для системы ДДС – H_2O в присутствии KCl. Так, например, в этой ПФ значения ΔR_f между зоной основного вещества и примеси в преднизолоне возрастают почти в два раза по сравнению с водно-органической ПФ и превышают на 50% эту характеристику в циклодекстриновой ПФ. Значения ΔR_f между хроматографическими зонами гидрокортизона увеличиваются в 2–3 раза (по сравнению с водно-ацетонитрильным элюентом), а в циклодекстриновых ПФ гидрокортизон не разделяется вовсе. Важные положительные изменения в МПФ в присутствии KCl наблюдаются и для дексаметазона. Улучшение селективности разделения в МПФ сопровождается более эффективным разделением кортикостероидов, как это видно из расчета значений N и H (см. таблицу).

Для подтверждения результатов, полученных методом ТСХ, было проведено экспериментальное исследование этих систем методом ВЭЖХ (рис. 5). Из данных, представленных на рис. 5, видно, что количество хроматографических зон в препаратах кортикостероидов и порядок их элюирования соответствуют ТСХ. Это свидетельствует о надежности проведенного экспериментального исследования.

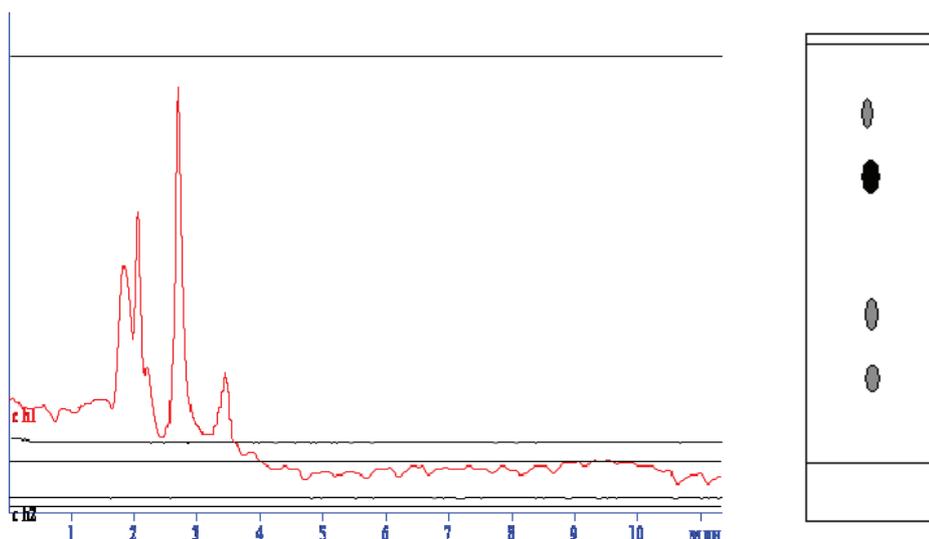


Рис. 5. Хроматограмма дексаметазона (4 мг/мл), полученная методом ВЭЖХ (НФ: С18) и ТСХ (Сорбфил) соответственно. ПФ: ДДС – H_2O – KCl (40 : 50 : 10)



Заключение

На основании сравнительного изучения хроматографического поведения лекарственных препаратов гидрокортизона, дексаметазона и преднизолона в водно-органических, циклодекстриновых и мицеллярных подвижных фазах выбраны оптимальные системы и выявлены их аналитические возможности. Показано преимущество использования мицеллярных подвижных фаз, модифицированных сильным электролитом.

Список литературы

1. Gupta G. A., Myrdal P. B. On-line high-performance liquid chromatography method for analyte quantitation from pressurized metered dose inhalers // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1033, № 1. P. 101–106.
2. Yasueda S. I., Kimura M., Ohtori A., Kakehi K. Analysis of an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, in aqueous humor by combination of semi-micro HPLC and column switching method // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2003. Vol. 30, № 6. P. 1735–1742.
3. Карцова А. А., Великанова Л. И. Изучение особенностей стероидогенеза больных с различными заболеваниями коры надпочечников методами ОФ ВЭЖХ // *Журн. аналит. химии*. 2004. Т. 59, № 10. С. 1081–1087.
4. Ronquist-Nii Y., Edlund P. O. Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography - tandem mass spectrometry // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2005. Vol. 37, № 2. P. 341–350.
5. Vulliet E., Baugros J.-B., Flament-Waton M.-M., Grenier-Loustalot M.-F. Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater // *Anal. and Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 387, № 6. P. 2143–2151.
6. Reddy Sharanya, Iden Charles R., Brownawell Bruce J. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2005. Vol. 77, № 21. P. 7032–7038.
7. Budzinski H., Devier M. H., Labadie P., Togola A. Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS // *Anal. and Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 386, № 5. P. 1429–1439.
8. Hou S., Hindle M., Byron P. R. Chromatographic and mass spectral characterization of budesonide and a series of structurally related corticosteroids using LC-MS // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2005. Vol. 39, № 1–2. P. 196–205.
9. Lekic M., Korac F., Sober M., Marjanovic A. Planar chromatography of steroid hormones and anabolics // *Acta chim. sloven.* 2007. Vol. 54, № 1. P. 88–91.
10. Бусыгина И. А. Оценка качества преднизолона различных фирм-производителей по показателю «Посторонние стероиды» // *Сорбц. и хроматогр. процессы*. 2007. Т. 7, № 1. С. 166–170.
11. Штыков С. Н., Сумина Е. Г., Паришина Е. В., Лопухова С. С. Применение мицеллярных подвижных фаз для разделения производных флуоресцеина методом ТСХ // *Журн. аналит. химии*. 1995. Т. 50, № 7. С. 747–751.
12. Карцова Л. А., Бессонова Е. А., Великанова Л. И., Павлова Е. Г. Влияние β -циклодекстрина на факторы удерживания стероидных гормонов в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Вестн. С.-Петербург. ун-та. Сер. 4*. 2005. № 1. С. 75–81.
13. Pena-Garcia-Brioles D., Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R., Santos-Montes A. Method development for betamethasone and dexamethasone by micellar liquid chromatography using cetyl trimethyl ammonium bromide and validation in tablets application to cocktails // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2004. Vol. 36, № 1. P. 65–71.
14. 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.
15. Гёрёг Ш. Количественный анализ стероидов. М., 1961. 504 с.
16. Шатц В. Д., Сахартова О. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988. 160 с.
17. Сумина Е. Г., Штыков С. Н., Атаян В. З. Циклодекстрины как модификаторы подвижных и неподвижных фаз в жидкостной хроматографии // *Сорбц. и хроматогр. процессы*. 2005. Т. 5, вып. 5. С. 719–735.
18. Сумина Е. Г. Организованные наносистемы в тонкослойной хроматографии // *Сорбц. и хроматогр. процессы*. 2010. Т. 10, вып. 1. С. 150–160.