



УДК 39.543.544

## Использование сверхсшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе лекарств в биологических объектах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)

Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Объедкова Е.В.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург*

Даванков В.А.

*ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва*

Поступила в редакцию 23.11.2009 г.

### Аннотация

Показана возможность одновременного определения гидрофобных и гидрофильных лекарственных препаратов, используемых при лечении различных дисфункций коры надпочечников, и на реальных объектах (моча и сыворотка крови) методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием с использованием off-line концентрирования на сорбенте сверхсшитом полистироле Purosep-270 и on-line на пластине. Проведена сравнительная количественная оценка жидкостной и твердофазной экстракций на С18, силикагеле и сверхсшитом полистироле PUROSEP-270. Увеличение селективности разделения было достигнуто с использованием различных модификаторов неподвижной фазы ( $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -ЦД) и поверхностно-активные вещества катионной и анионной природы).

**Ключевые слова:** ВЭТСХ, лекарственные препараты, твердофазная экстракция, сверхсшитый полистирол.

Possibility of simultaneous determination hydrophobic and hydrophilic drugs (medical products), used at treatment of various dysfunctions of adrenal glands, and on real objects (urine and serum) by method HPTLC with densitometry detection with use off-line concentration on sorbent hyperbranched polystyrene Purosep-270 and on-line on a plate was shown. The comparative quantitative estimation liquid and solid-phase extraction on C18, silicagel and hyperbranched polystyrene Purosep-270 have been done. The increase in selectivity of division has been developed with use of various modifiers of a stationary phase ( $\beta$ -cyclodecstrene ( $\beta$ -CD) and cationic and anionic surface-active substances).

**Key words:** HPTLC, analysis of drugs, steroids, solid-phase extraction, hyperbranched polystyrene.

### Введение

Важной задачей в клиническом анализе является контроль за содержанием следовых количеств биологически-активных веществ. Колебания их концентраций отражают целый ряд патологических состояний. Так, определение стероидных

гормонов эндо- и экзогенного происхождения позволяет судить о причине нарушений стероидогенеза при различных эндокринных заболеваниях. В настоящее время основными методами анализа гидрофобных лекарственных препаратов являются иммунологические и хроматографические. В последнем случае наряду с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) начинает активно использоваться метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) [1-3].

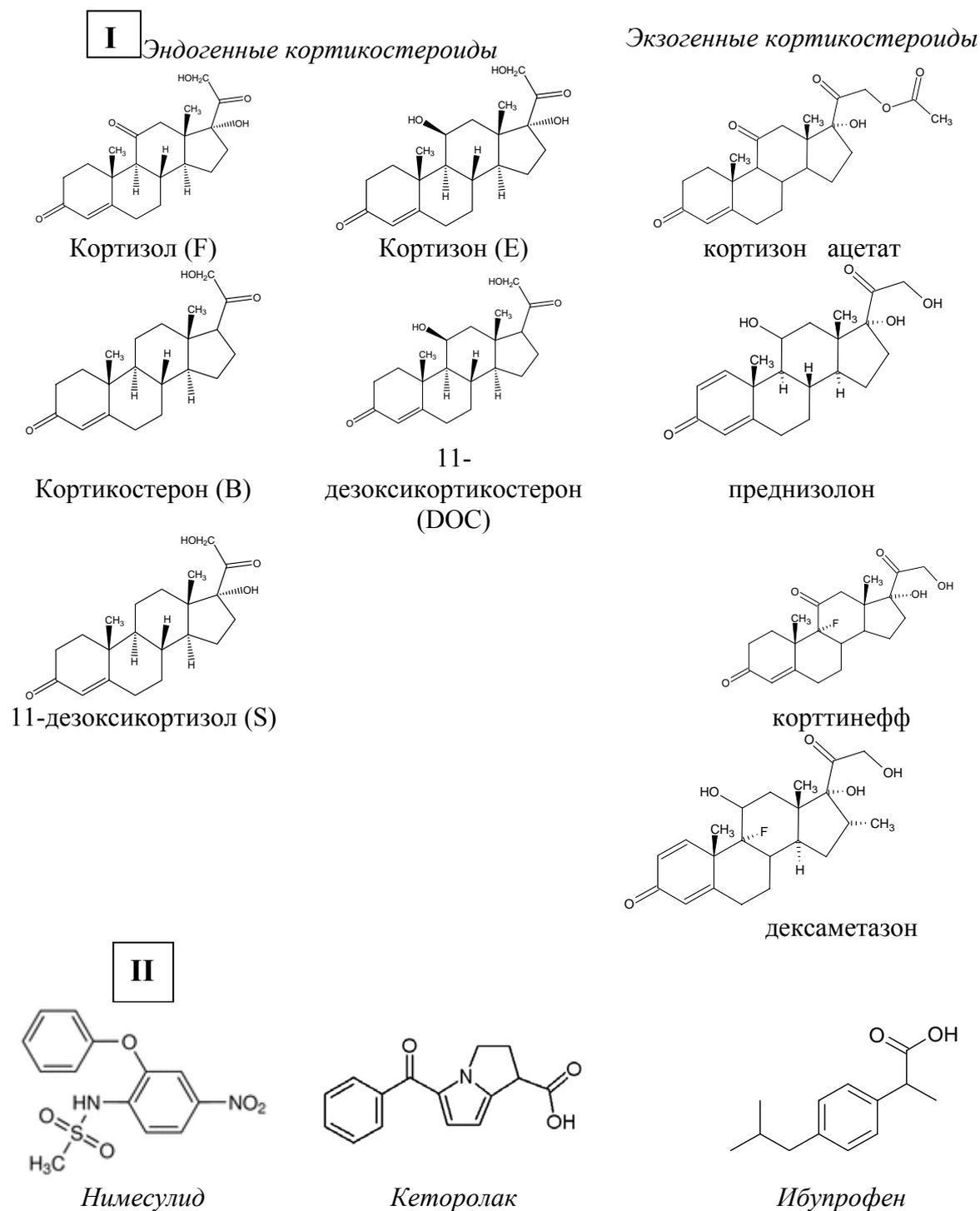


Рис. 1. Структурные формулы (I) природных и лекарственных кортикостероидов и (II) нестероидных противовоспалительных препаратов

ВЭТСХ с денситометрическим детектированием обладает рядом достоинств, среди которых экспрессность, возможность одновременного количественного определения различных образцов и стандартов. Однако в отличие от других методов разделения пределы обнаружения аналитов в методе ТСХ достаточно высоки, что затрудняет активное использование его в практике клинической медицины. Высокая концентрация белков и большое число эндогенных соединений, присутствующих в биологических жидкостях, очень осложняет определение лекарственных препаратов и их метаболитов в биологических жидкостях. Снизить пределы обнаружения возможно грамотной стратегией *off-line* концентрирования при подготовке пробы к анализу [4,5]. В современной лабораторной практике особое место занимает метод твердофазной экстракции (ТФЭ), в существенной степени вытеснивший жидкостную [6]. С другой стороны, при анализе реальных объектов необходимо увеличение селективности разделения, что достигается использованием различных модификаторов неподвижной фазы [7,8].

В качестве сорбентов для ТФЭ применяют силикагель, активированные угли и различные полимерные сорбенты. Особый интерес представляет сверхсшитый полистирол, разработанный группой сотрудников лаборатории ССП ИНЭОС под руководством проф. Даванкова В.А. и д.х.н. Цюрупы М.П. в начале 70-х гг [9-12], возможности которого в данной области изучены недостаточно.

В работе на модельных системах лекарственных препаратов гидрофильной и гидрофобной природы, используемых при лечении различных дисфункций коры надпочечников (рис. 1.) и на реальных объектах (моча и сыворотка крови) оптимизированы условия хроматографического анализа методом ВЭТСХ с денситометрическим детектированием и регламент ТФЭ с использованием сверхсшитого полистирола.

## Эксперимент

**Реагенты и материалы.** Ацетонитрил (ч.д.а.) («Криохром»), этанол (ч.д.а.) («Sigma»), хлороформ (х.ч.) (ЗАО «ЭКОС-1»), дихлорметан (х.ч.) (ЗАО «ЭКОС-1»), метанол (ч.д.а.) («Sigma»), гидроксид натрия (ч.д.а.) («Химреактив»), этилацетат (х.ч.) («Вектон»), гексан (х.ч.) («Вектон»), толуол (ч.д.а.) («Вектон»), сульфат натрия (безв.) (ч.д.а.) («Реактив»), додецилсульфат натрия (ДДСН) («Sigma»),  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -ЦД) («Sigma»), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) («Sigma»), силикагель, С18, Puroser 270, диклофенак (мед. препарат, «Nemofarm», Сербия и Черногория), кеторалак (мед. препарат, «Dr. Reddys», Индия), дексаметазон (мед. препарат, «Эректон», Россия), преднизолон (мед. препарат, «Эректон», Россия), кортизон ацетат (98%) («Sigma»), кортинефф (98%) («Sigma»), кортизол (98%) («Sigma»), кортизон (98%) («Sigma»), кортикостерон (98%) («Sigma»), 11-дезоксикортикостерон (98%) («Sigma»), 11-дезоксикортизол (98%) («Sigma»). Сорбционные патроны С18 (60 мкм) («Separon»). Сорбенты: силикагель «КСК» (20-60  $\mu\text{m}$ ) («Ленхром»), сверхсшитый полистирол Puroser-270 (60-120  $\mu\text{m}$ ) («Purolite», UK). Анализируемые биологические объекты: сыворотка крови, моча.

**Оборудование.** Жидкостный хроматограф «HPP 4001» с ультрафиолетовым детектором ( $\lambda_{\text{макс}}=254$  нм) (Чехия), жидкостный хроматограф «Shimadzu» (LC-20AD) с детектором на диодной матрице (SPD-M20A), колонка Separon SGX C<sub>18</sub> (150 x 3 мм, 5 мкм). Видеоденситометр «Sorbfil-денситометр» (г. Краснодар), хроматографические пластинки "Sorbfil" ПТСХ-П-А-УФ (г. Краснодар).

**Жидкостная экстракция.** Жидкостная экстракция кортикостероидов из сыворотки крови (1 мл) проводилась пятикратным объемом дихлорметана; 1 мл мочи экстрагировали пятикратным объемом хлороформа. Затем органический экстракт промывали дважды 0,5 мл 0,1 н раствором гидроксида натрия (для удаления более полярных примесей и пигментов, присутствующих в образце) и 1 мл дистиллированной воды. Далее экстракт сушили над безводным сульфатом натрия и выпаривали током воздуха досуха. Для анализа методом ОФ ВЭЖХ выпаренный остаток растворяли в 60 мкл 10%-ного водного раствора ацетонитрила.

*Твердофазная экстракция*

а) на обращенно-фазовом сорбенте  $C_{18}$ .

Для ТФЭ использовали патроны Separon  $C_{18}$  (60 мкм). Процесс ТФЭ включает 4 стадии: кондиционирование патрона метанолом (7 мл) и дистиллированной водой (14 мл); пропускание через сорбент 2 (1) мл аналита; промывка патрона 12%-ным водным раствором метанола и 5 мл дистиллированной воды; элюирование сорбированных стероидов проводилось этанолом (2 мл).

б) на силикагеле

Твердофазную экстракцию проводили с использованием сорбционного патрона, заполненного 1 см<sup>3</sup> сорбента – силикагеля марки «КСК» (20-60μm). Сорбционный патрон кондиционировали дистиллированной водой, пропускали 0,5 мл реального образца (сыворотка крови). Затем патрон промывали водой для удаления белков плазмы, липидов и прочих мешающих соединений. Сорбировавшиеся стероиды селективно элюировали 5 мл смеси хлороформ – этанол (2:1), который затем высушивали, а остаток растворяли в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде.

в) на сверхсшитом полистироле Purosep-270

ТФЭ осуществлялась в 4 этапа: кондиционирование патрона этанолом (6 мл), введение 1 мл аналита или раствора стандарта (1 мкг/мл), промывание сорбента 4 мл дистиллированной воды, элюирование соответствующим растворителем. В качестве элюирующих систем были испытаны дихлорметан, хлороформ, метанол, метанол – дихлорметан (1:1), метанол – дихлорметан (1:2). Также варьировался объем сорбента: 1, 1,5 и 2 см<sup>3</sup>. Предварительно был осуществлен подбор объема элюента. Оптимальным оказался объем – 10 мл.

Контроль за эффективностью жидкостной и твердофазной экстракций гормонов проводили методом ОФ ВЭЖХ в изократическом режиме (28% раствор ацетонитрила в воде, по объему).

**Модификация пластин в ВЭТСХ.** Модификация пластин осуществляли в растворах ЦТАБ, ДДСН и β-ЦД соответствующей концентрации (0,5–10 мМ). Нужная молярность достигалась разбавлением растворов ДДСН (500 мМ), ЦТАБ (100 мМ) и β-ЦД (100 мМ) в дистиллированной воде. Пластины взвешивали, затем помещали горизонтально в ванночку с раствором на 10 мин., после чего извлекали, высушивали и снова взвешивали на аналитических весах. Время модификации, после которого не происходило дальнейшего прироста массы пластины, получено экспериментально. Масса осевшего модификатора составляла от 0,1 до 7%.

## Обсуждение результатов

Среди известных полимерных адсорбентов особое место занимает сверхсшитый полистирол. Интерес к таким материалам определяется широкими возможностями их практического применения в качестве высокоэффективных

сорбентов для выделения и разделения огромного числа органических и неорганических соединений.

Уникальная способность сверхсшитого полистирола практически одинаково набухать как в полярных, так и в неполярных органических растворителях и воде, и затем сохранять приобретенный объем, обусловлена жесткостью его ажурной полимерной сетки. Эти полимеры отличаются развитой нанопористой структурой, с аномальным свободным объемом ( $0,7 \text{ г/см}^3$ ), существенно большим, чем в жидкостях, и огромной внутренней удельной поверхностью ( $1000\text{-}1500 \text{ м}^2/\text{г}$ ) [11,12]. На рис. 2 представлен фрагмент структуры сверхсшитого полистирола.

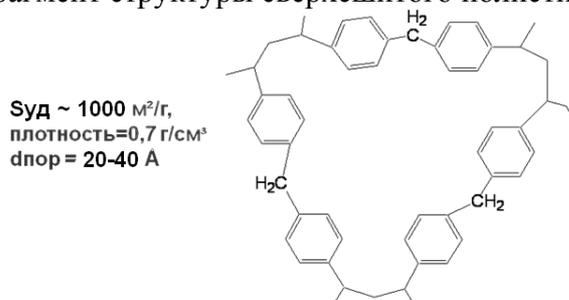


Рис. 2. Фрагмент структуры сверхсшитого полистирола.

Это свойство открывает широкие возможности для его использования в качестве адсорбента в режиме ТФЭ. При адсорбции на сверхсшитом полистироле реализуются два основных механизма удерживания определяемых соединений – «обращенно-фазовый» и механизм, включающий  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия между ароматическими структурами адсорбента и ненасыщенной системой адсорбата. Purosep-270 является микропористым сорбентом с максимумом распределения пор по размерам в области 20-40 Å [13]. Эти поры оказываются недоступными для форменных элементов крови, белковых молекул, гликопротеинов и даже большинства пептидов. При пониженном сродстве поверхности сверхсшитого полистирола к белкам (по сравнению с макропористыми полистирольными сорбентами) эти свойства открывают возможность использовать Purosep-270 для избирательной сорбции малых молекул непосредственно из цельной крови, плазмы крови и других физиологических жидкостей. Этот путь может не только ускорить анализ, устраняя стадию депротенизации образца, но и уменьшить потери целевых аналитов за счет соосаждения с белками. С другой стороны, малый размер пор данного сорбента может снизить его сорбционную способность по отношению к таким крупным молекулам, какими являются стероидные гормоны, и несколько замедлить их десорбцию. Выяснение данных моментов было одной из задач данной работы.

Стероидные гормоны в биологических объектах (сыворотка крови, моча) содержатся на уровне мкг/мл, поэтому их анализ требует предварительного концентрирования и освобождения от большинства иных компонентов сложной матрицы. Стадия пробоподготовки предполагает выделение возможно более чистой фракции свободных стероидных гормонов. В данной работе оптимизированы условия и проведена сравнительная количественная оценка жидкостной и твердофазной экстракций на C18, силикагеле и сверхсшитом полистироле Purosep-270 стероидных гормонов с последующим ВЭЖХ-контролем с УФ-детектированием.

От жидкостной экстракции в результате сравнения этих методов концентрирования аналитов мы отказались, поскольку при проведении жидкостной

экстракции наблюдалось образование эмульсий, что приводит к потерям; при этом время проведения жидкостной экстракции составило 40 мин.

При работе со сверхсшитым полистиролом варьировали его объем и природу элюента. При увеличении полярности растворителя значения степеней извлечения улучшались, однако, недостаточно. Увеличение объема сорбента в концентрирующем патроне (от 1,5 до 2,0 см<sup>3</sup>) привело к росту коэффициентов извлечения аналитов до 80-90%; при этом были опробованы три элюирующих системы. Лучшие результаты получены для системы метанол:дихлорметан (1:1, объемн.) и метанол:дихлорметан (1:2, объемн.). При этом использование последнего требует меньшего времени. Эта система (метанол:дихлорметан (1:2, объемн.)) и была выбрана нами далее для анализа реальных образцов.

В таблицах приведены результаты по степеням извлечения стероидных лекарств и эндогенных гормонов, которые присутствуют в реальных объектах (табл. 1-3). Степени извлечения рассчитывались по формуле:

$$\text{степень извлечения} = (S_x - S) / S_0 * 100\%,$$

где  $S_x$  – площадь хроматографического пика аналита после экстракции объекта со стандартной добавкой;  $S$  – площадь хроматографического пика аналита после экстракции биологического объекта;  $S_0$  – площадь хроматографического пика аналита водного раствора стандарта без экстракции

Таблица 1. Оценка степени извлечения лекарственных стероидных препаратов из сыворотки крови и мочи методом жидкостной экстракции, (n=5, P=0,95)

Стероидный гормон	Степень извлечения (%)		
	Сыворотка крови		Моча
	Хлороформ	Дихлорметан	Хлороформ
Преднизолон	72,3±2,3	80,3±1,5	85,3±2,6
Кортизон ацетат	65,4±2,1	79,5±2,5	93,2±1,8
Дексаметазон	55,6±1,4	64±4	79,6±2,7
Кортинефф	54,3±1,2	62±3	80,2±2,5
Кортизол	81,0±4,3	82,3±2,5	102±3
Кортизон	78,6±2,6	80,6±1,8	93,7±2,5
Кортикостерон	54,0±1,5	72,6±2,5	70,0±3,0
11-дезоксикортикостерон	50,0±2,3	65,8±1,5	71,0±3,0
11-дезоксикортизол	47,0±4,0	64,4±1,9	65,5±1,9

Таблица 2. Оценка степени извлечения лекарственных стероидных препаратов из сыворотки крови и мочи методом твердофазной экстракции на сорбенте C18, (n=5, P=0,95)

Стероидный гормон	Степень извлечения (%)	
	Сыворотка крови	Моча
Преднизолон	75,2±1,5	81,5±2,6
Кортизон ацетат	85,3±2,5	79,6±1,8
Дексаметазон	76,4±1,9	82±3
Кортинефф	79,4±1,8	78,0±1,5
Кортизол	92,0±2,3	91±3
Кортизон	93±4	90±4
Кортикостерон	89,5±2,8	81,0±2,7
11-дезоксикортикостерон	87,3±1,5	79,0±2,3
11-дезоксикортизол	85±3	75,5±1,8

Таблица 3. Оценка степени извлечения стероидных гормонов из раствора стандартов методом ТФЭ на сорбенте Purosep-270 ( $V = 2 \text{ см}^3$ ,  $n=3$ ,  $p=0,95$ )

Стероидный гормон	Степень извлечения (%)		
	Метанол – дихлорметан (1:1)	Метанол – дихлорметан (4:1)	Метанол – дихлорметан (1:2)
Преднизолон	-	-	78,3±8,2
Дексаметазон	-	-	74,6±5,8
Кортизол	94,3±1,4	95,0±3,5	92,7±4,7
Кортизон	93,9±1,4	76,1±6,2	95,9±3,3
Кортикостерон	101,3±18,6	62,3±1,8	79,4 ±3,2
11-дезоксикортикостерон	90,1±5,2	68,5±17,0	96,4±2,7
11-дезоксикортизол	76,3±15,8	35,1±18,2	87,9±4,7

Поскольку Purosep-270 обладает существенно большей сорбционной емкостью [6, 7], чем остальные опробованные материалы, и степени извлечения изученных стероидных гормонов (табл. 3) превышают значения, полученные для полярного силикагеля (табл. 1) и гидрофобного неполярного материала С18 (табл. 2), можно заключить, что в качестве сорбента для ТФЭ стероидных гормонов эффективнее использовать сверхсшитый полистирол.

Оптимизация условий разделения эндогенных гормонов и гидрофобных лекарств в режиме ВЭТСХ проводилась с использованием различных модификаторов: были взяты  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -ЦД) и поверхностно-активные вещества катионной (ЦТАБ) и анионной природы (ДДСН), что позволило изменить сорбционные характеристики неподвижной фазы. Осуществлялось двукратное проявление (подвижная фаза толуол – этанол (9:1)).

Выявлены возможности следующих режимов ВЭТСХ:

- модификация пластин;
- модификация подвижной фазы;
- модификация пластин с добавкой модификаторов в элюент.

Концентрации модификаторов силикагеля варьировались в диапазоне от 0,5 до 10 ммоль/л.

Получены графические зависимости параметров удерживания ( $R_f$ ) стероидных гормонов, синтетических стероидных и нестероидных лекарств от концентраций различных модификаторов в процессе модификации пластины хроматографической системы (рис. 3, 4).

Из рис. 3(А) видно, что до достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ), т.е. 0,9 мМ, ЦТАБ «блокирует» активные центры (в первую очередь, силоксановые атомы кислорода) неподвижной фазы, что приводит к снижению удерживания. Выше этого значения в модифицирующем растворе образуются мицеллы ЦТАБ, и сродство к неподвижной фазе растет за счет проникновения гидрофобных аналитов в полости адсорбированных мицелл. Дальнейшее снижение удерживания может быть вызвано переходом адсорбированного модификатора в подвижную фазу в условиях хроматографического анализа.

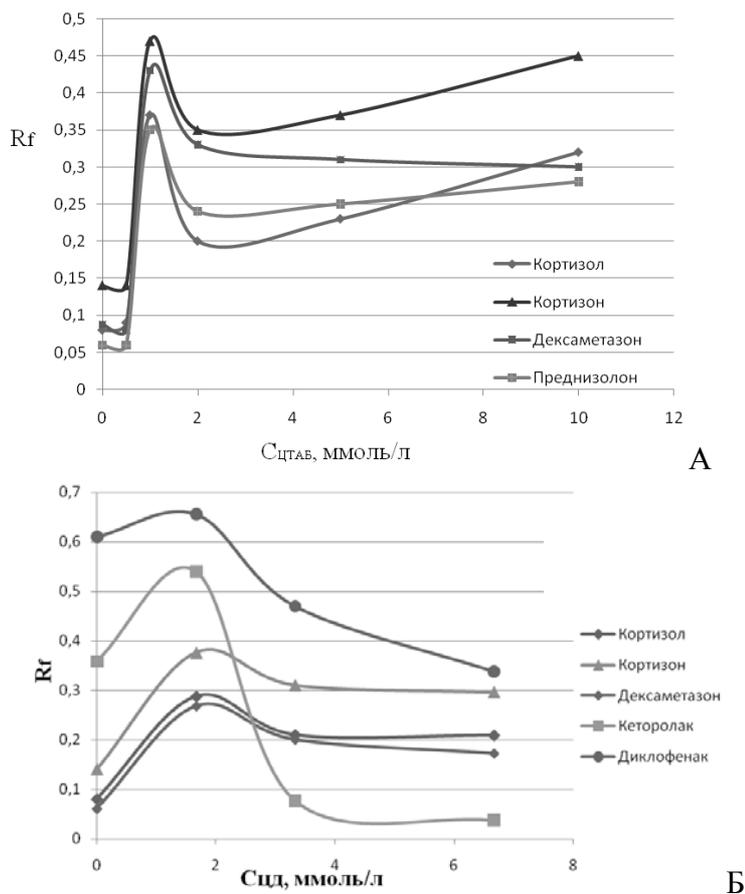


Рис. 3. Зависимость параметров удерживания преднизолона, дексаметазона, кортизола и кортизона от концентраций ЦТАБ (А) и  $\beta$ -ЦД (Б), сорбированного на ТСХ-пластине

При модификации циклодекстрином (рис. 3(Б)) при низких концентрациях для всех соединений наблюдается снижение сродства к неподвижной фазе, что обусловлено ослаблением взаимодействий между аналитами и активными центрами сорбента. Дальнейшее увеличение концентрации  $\beta$ -ЦД приводит к возрастанию удерживания определяемых компонентов, что можно объяснить сродством аналитов к  $\beta$ -ЦД с участием специфических и неспецифических взаимодействий. Полное разделение достигается при концентрации модификатора 6,7 мМ в модифицирующем растворе.

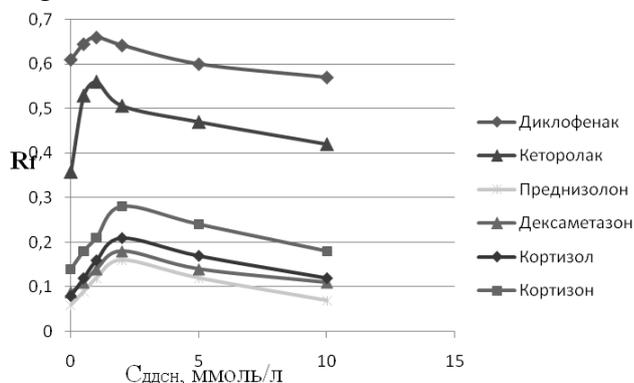


Рис. 4. Зависимость параметров удерживания стероидов и лекарственных препаратов от концентраций ДДСН в подвижной фазе

Лучшие результаты (по эффективности и селективности разделения) отмечены при использовании условий: введение добавки модификатора – 5 мМ ДДСН – в состав подвижной фазы (рис. 4).

В оптимизированных условиях были определены пределы обнаружения природных и синтетических стероидных гормонов на модифицированных и немодифицированных пластинах. Количественную оценку проводили с использованием метода видеоденситометрии. Пределы детектирования составили:

1. Без концентрирования – 60-200 нг. Модификация пластин, вопреки ожиданиям, практически не повлияла на значения пределов обнаружения.

2. С использованием off-line концентрирования на Purosep-270 – 30- 100 нг

Дополнительное концентрирование на ТСХ-пластине позволяет снизить эту величину до 15-50 нг.

### Заключение

Показана возможность одновременного определения гидрофобных и гидрофильных лекарственных препаратов методом ВЭТСХ с использованием off-line концентрирования на сорбенте Purosep-270 и on-line на пластине.

### Список литературы

1. Ларионов О.Г. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Москва. 1994. 311 С.
2. Akula K.K., Kaur M., Kulkarni S.K. Estimation of adenosine and its major metabolites in brain tissues of rats using high-performance thin-layer chromatography–densitometry. // J. Chromatography A. V. 1209. P. 230-237.
3. Красиков В.Д. Современная планарная хроматография // Журнал аналитической химии. 2003. Т. 58. №8. С. 792 – 807.
4. Osbourn D.M., Weiss D.J., Lunte G.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis.// Electrophoresis. 2000. V. 21. № 14. P. 2768.
5. Shihabi Z.K. Stacking in capillary zone electrophoresis. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 902. № 1. P. 107.
6. Hennion M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography // J. Chrom. 1999. V. 856. P. 3-54.
7. Flood K.G., Reynolds E.R., Snow N.H. Characterization of inclusion complexes of betamethasone – related steroids with cyclodextrins using high – performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2000. V. 903. P. 49 – 65.
8. Карцова Л. А., Бессонова Е. А., Великанова Л. И., Павлова Е. Г. «Влияние β-циклодекстрина на факторы удерживания стероидных гормонов ОФ ВЭЖХ» // Вестник СПбГУ. Сер. 4. 2005. Вып. 1. С. 78 – 84.
9. Цюрупа М.П., Даванков В.А. ССП новый тип сорбентов./ Итоги науки и техники. Хроматография. 1984. С. 32 – 63.
10. Цюрупа М.П., Панкратов Е.А., Цванкин Д.Я., Жуков В.П., Даванков В.А. Морфология макросетчатых изопоρισтых полимеров стирола типа «Стиросорб»// Высокомолекулярные соединения. 1985. Т. XXVII. №2. С. 339 – 345.
11. Davankov V.A., Tsyurupa M.P. Structure and properties of hypercross-linked polystyrene the first representative of a new class of polymer networks React. Polymer. 1990. V. 13. P. 27-42.

12. Pastukhov A.V., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Hypercrosslinked Polystyrene: A Polymer in a Non-Classical Physical State. // J. Polymer Science: Part B: Polymer Physics. 1999. V. 37. P. 2324 – 2333.

13. Davankov V.A., Sychov C.S., Ilyin M.M., Sochilina K.O. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material. Mechanisms of retention // J. Chromatography A. 2003. V. 987. P. 67-75.

---

**Карцова Людмила Алексеевна** – д.х.н., проф. кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Даванков Вадим Александрович** – д.х.н., проф., зав. лабораторией Института элементоорганических соединений РАН, тел. (499) 135-64-71

**Бессонова Елена Андреевна** – доцент кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Объедкова Екатерина Валерьевна** – магистрант кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Kartsova Ludmila A.** – Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [kartsova@gmail.com](mailto:kartsova@gmail.com)

**Davankov Vadim A.** – Dr.Sc.Chem., Prof., Head of Department Institute of Organo-Element Compounds, Russ. Acad. Sci., [davank@ineos.ac.ru](mailto:davank@ineos.ac.ru)

**Bessonova Elena A.** – docent of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [Lena\\_pol@inbox.ru](mailto:Lena_pol@inbox.ru)

**Obyedkova Ekaterina** – master of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [Katunchik88@yandex.ru](mailto:Katunchik88@yandex.ru)