

УДК 543.054,543.544.5.068.7

## МИКРОЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ 17- $\beta$ -ЭСТРАДИОЛА ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ВЭЖХ-УФ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ

© 2022 г. З. Р. Якупова<sup>a, b, \*</sup>, С. А. Лебединец<sup>a</sup>, К. С. Вах<sup>a</sup>, С. Ю. Гармонов<sup>b</sup>, А. В. Булатов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
Университетский просп., 26, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504 Россия

<sup>b</sup>Казанский национальный исследовательский технологический университет  
ул. К. Маркса, 68, Казань, Республика Татарстан, 420015 Россия

\*e-mail: yakupovalab@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.06.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 21.06.2021 г.

Предложен способ хроматографического определения 17- $\beta$ -эстрадиола в лекарственных препаратах, включающий микроэкстракционное выделение аналита из раствора пробы. Процедура предполагает диспергирование экстрагента (1-додеканола) в водной фазе при вращении хлопкового диска, оснащенного вкладышем магнитной мешалки. Образование эмульсии экстрагента обеспечивает быстрый массоперенос целевого аналита. При вращении диска в водной фазе также происходит образование центрального вихря, в котором формируется капля экстракта при последующем разрушении эмульсии. Охлаждение экстракционной системы обеспечивает кристаллизацию экстракта, который отбирают для выполнения анализа методом ВЭЖХ-УФ. Достигнут предел обнаружения ( $3\sigma$ ) 0.03 мг/л. Аналитические возможности разработанного способа показаны на примере определения 17- $\beta$ -эстрадиола в трансдермальных гелях.

**Ключевые слова:** микроэкстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, 17- $\beta$ -эстрадиол, трансдермальный гель.

DOI: 10.31857/S0044450222010169

Эстрогены являются одними из наиболее распространенных и значимых гормонов в женском организме. Содержание эстрадиола и его производных на физиологическом уровне обеспечивает половое созревание, развитие вторичных половых признаков, усиливает рост и дифференцировку влагилищного эпителия и оказывает антисклеротическое действие. В свою очередь, снижение содержания эстрогенов в организме женщин может приводить к развитию остеопороза, сопровождается симптомами менопаузального периода, такими как расстройство сна, сосудодвигательная и терморегулирующая неустойчивость [1, 2]. В медицинской практике эстрогены назначают как противозачаточные лекарственные препараты, при лечении симптомов менопаузы, остеопороза, а также для профилактики эстрогензависимого рака груди [3].

В настоящее время существует большое количество лекарственных препаратов для заместительной гормональной терапии. К их числу относятся препараты синтетического эстрогена – 17- $\beta$ -эстрадиола, выпускаемые в форме трансдермальных гелей,

таблеток и пластырей. Контроль качества таких препаратов с целью подтверждения их подлинности, а также оценки содержания действующего вещества является важной задачей.

Для определения 17- $\beta$ -эстрадиола в лекарственных препаратах и биологических жидкостях широкое применение находят методы ВЭЖХ и газовой хроматографии с различными способами детектирования [4, 5], капиллярный электрофорез [6], хемилюминесценция [7] и электрохемилюминесценция [8]. Как правило, инструментальный анализ лекарственных препаратов, содержащих помимо лекарственных вспомогательные вещества, требует включения в общую схему анализа стадии пробоподготовки, которая, кроме растворения проб, может предполагать извлечение целевых аналитов из твердых проб или их экстракцию из приготовленных растворов.

В современной аналитической химии для выделения лекарственных веществ из различных матриц активно применяют методы жидкостной микроэкстракции, позволяющие упростить процедуры пробоподготовки, обеспечивая ее высо-

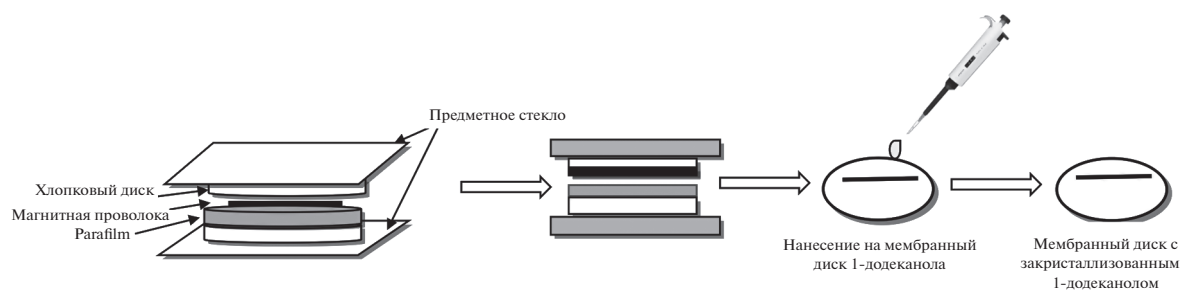


Рис. 1. Схема изготовления хлопкового диска.

кую эффективность при минимальных расходах реагентов и проб [9]. Экспрессным методом является дисперсионная жидкостная микроэкстракция, которая предполагает диспергирование экстрагента в пробе с образованием тонкодисперсной эмульсии, в которой быстро устанавливается межфазное равновесие за счет большой площади контакта фаз [10–13]. Смесь неполярного экстрагента и растворителя-диспергатора, неограниченно смешивающегося с ним и с пробой, быстро вводят в анализируемый раствор, в результате чего фаза экстрагента равномерно распределяется в нем в виде тонкодисперсной эмульсии. Разделение фаз достигается центрифугированием, органическую фазу отбирают для проведения анализа. Для упрощения процедуры отделения фазы экстракта предложено использовать ее кристаллизацию при охлаждении экстракционной системы [14]. При этом применяют экстрагенты с температурой кристаллизации, близкой к комнатной, например такие длинноцепочечные спирты, как 1-ундеканол [15, 16] и 1-додеканол [17, 18]. Однако введение полярного растворителя (диспергатора) приводит к повышению растворимости аналита и экстрагента в водной фазе, результатом чего является снижение коэффициента распределения [19].

В данной работе для хроматографического определения 17- $\beta$ -эстрадиола в лекарственных препаратах реализован новый вариант дисперсионной жидкостной микроэкстракции, включающий диспергирование экстрагента в водном растворе пробы при вращении хлопкового диска, оснащенного вкладышем магнитной мешалки, с последующей кристаллизацией экстракта. С целью подтверждения эффективности предложенного варианта дисперсионной жидкостной микроэкстракции изучили возможность выделения 17- $\beta$ -эстрадиола из проб трансдермальных гелей для последующего определения методом ВЭЖХ-УФ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Раствор 17- $\beta$ -эстрадиола (10 г/л) готовили путем растворения точной навески вещества (Sigma-

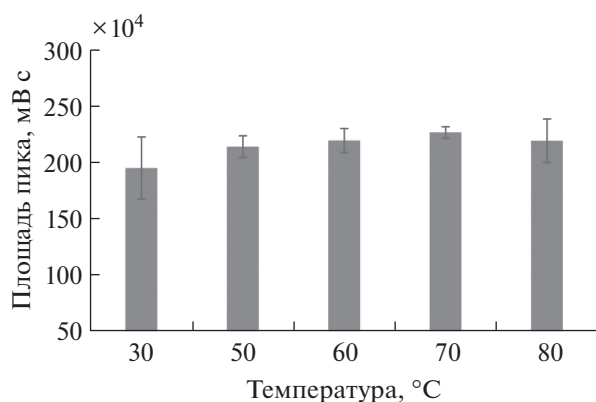
Aldrich, Германия) в метаноле. Приготовленный раствор хранили в темном месте при +4°C. Рабочие растворы гормона готовили непосредственно перед экспериментом путем последовательного разбавления исходного раствора деионизованной водой. В работе использовали 1-додеканол производства “Sigma-Aldrich” (Германия), ацетонитрил и метанол производства “J.T. Baker Chemical Company” (США).

Для приготовления хлопковых дисков использовали хлопковое полотно и лабораторную пленку Parafilm M (Bemis Company, Inc, США), из которых вырезали диски внутренним диаметром  $10 \pm 1$  мм (рис. 1). Затем каждый диск из хлопкового полотна аккуратно разделяли на два слоя. Пленку Parafilm M и вкладыш магнитной мешалки (металлическая проволока, длина 10 мм, внутренний диаметр 1 мм) помещали между двумя слоями хлопка. Систему накрывали двумя предметными стеклами и помещали в сушильный шкаф (100°C, 10 мин) для плавления пленки Parafilm M и склеивания дисков между собой. На диск помещали 50 мкл расплавленного 1-додеканола (30°C). При охлаждении 1-додеканол кристаллизовался на диске. Диски хранили в холодильнике в эксикаторе.

Для определения 17- $\beta$ -эстрадиола использовали систему ВЭЖХ LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором. Хроматографическое разделение выполняли на колонке Luna C18 (250  $\times$  4.6 мм, 5 мкм). Элюирование осуществляли в изократическом режиме. Подвижную фазу, состоящую из деионизованной воды и ацетонитрила (в соотношении 2 : 3), подавали со скоростью 1.0 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. Детектирование выполняли при длине волны 280 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных в качестве экстрагента для извлечения 17- $\beta$ -эстрадиола выбрали 1-додеканол, который имеет ограниченную растворимость в водной фазе (0.004 г/л [21]), низкую летучесть и температуру кристаллизации, близкую к комнатной (температура плавления 24°C [22]).

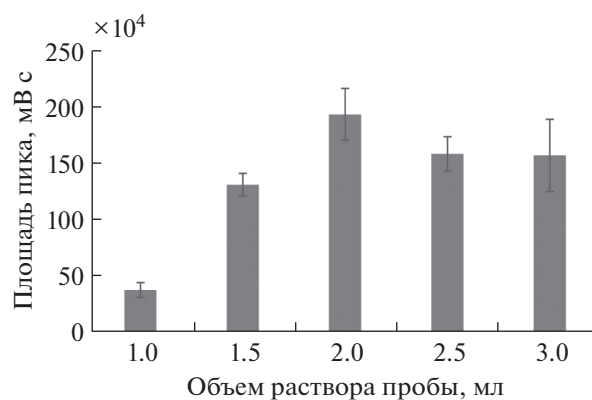


**Рис. 2.** Влияние температуры на эффективность микроэкстракции 17- $\beta$ -эстрадиола. Концентрация аналита 10 мг/л, объем водной фазы 3 мл, объем органической фазы 60 мкл, время перемешивания 15 мин, 700 об/мин.

Перечисленные свойства этого длинноцепочечного спирта позволили применить его в дисперсионной жидкостной микроэкстракции с кристаллизацией экстракта.

Для исключения применения полярных растворителей в процессе диспергирования экстрагента в водной фазе реализовали способ, предполагающий переход твердой фазы 1-додеканола в жидкую и ее диспергирование в водной фазе при вращении хлопкового диска при нагревании. Для нагрева экстракционной системы использовали лабораторную магнитную мешалку с контролируемой температурой. Температура играет ключевую роль для фазового перехода и диспергирования экстрагента. С целью оптимизации условий микроэкстракции варьировали температуру от 30 до 80°C. Предварительно на диск помещали 60 мкл расплавленного экстрагента, затем выполняли микроэкстракцию из 3 мл раствора 17- $\beta$ -эстрадиола (10 мг/л) при вращении диска (700 об/мин) в течение 15 мин. Установили, что при 30°C 1-додеканол не полностью переходит с поверхности диска в водную фазу и как следствие воспроизводимость результатов определения аналита в экстрактах оказывается неудовлетворительной (рис. 2). При охлаждении экстракционной системы на поверхности диска оставались частицы твердой фазы 1-додеканола. Удовлетворительное извлечение гормона и минимальное значение относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) (5%) достигаются при 70°C. В этом случае после охлаждения остатки твердой фазы 1-додеканола на поверхности диска не наблюдали.

Трансдермальные гели 17- $\beta$ -эстрадиола являются высоковязкими пробами, в состав которых входят полярные вспомогательные органические вещества (карбомеры, многоатомные спирты), снижающие эффективность извлечения гормона в



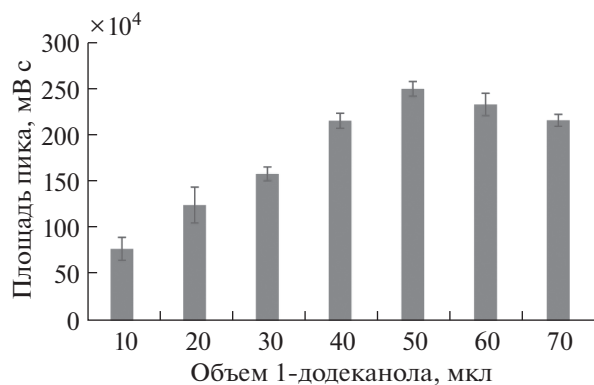
**Рис. 3.** Влияние объема раствора пробы на эффективность микроэкстракции 17- $\beta$ -эстрадиола. Концентрация аналита 10 мг/л, объем органической фазы 60 мкл, время перемешивания 15 мин, 700 об/мин.

фазу 1-додеканола. Для снижения вязкости гелей и устранения мешающего влияния вспомогательных веществ использовали растворение проб в деионизованной воде. Установили, что при 80-кратном разбавлении проб трансдермальных гелей мешающее влияние вспомогательных веществ устраняется.

Объем раствора пробы влияет на эффективность концентрирования и достигаемую чувствительность определения целевого аналита. Изучили влияние объема раствора пробы в диапазоне от 1 до 3 мл на эффективность микроэкстракции путем сравнения площадей пиков на хроматограммах. При увеличении объема раствора пробы до 2 мл аналитический сигнал возрастает (рис. 3). Следует также отметить, что при экстракции из 2.5 и 3.0 мл раствора пробы получали невоспроизводимые результаты, что можно объяснить неравномерным диспергированием 1-додеканола в большом объеме водной фазы. Таким образом, для дальнейших исследований выбрали объем пробы 2 мл.

Объем экстрагента существенно влияет на степень извлечения аналита. Для оптимизации этого параметра проводили процедуру микроэкстракции с различными объемами 1-додеканола (от 10 до 70 мкл), который предварительно наносили на диск. Установили, что объем экстрагента 50 мкл обеспечивает самые высокие значения площадей хроматографических пиков (рис. 4) при перемешивании фаз в течение 10 мин. При уменьшении времени перемешивания фаз возрастало значение  $s_r$ .

На основе полученных результатов разработали способ определения 17- $\beta$ -эстрадиола в трансдермальных гелях (рис. 5): 0.025  $\pm$  0.005 г пробы помещают в стеклянный флакон, добавляют 2 мл деионизованной воды и интенсивно встряхивают



**Рис. 4.** Влияние объема экстрагента на эффективность микроэкстракции 17-β-эстрадиола. Концентрация аналита 10 мг/л, объем водной фазы 50 мкл, время перемешивания 10 мин, 700 об/мин.

смесь в течение 2 мин. Хлопковый диск с 1-додеканолом (50 мкл) помещают во флакон с раствором пробы и перемешивают со скоростью 700 об/мин в течение 10 мин при 70°C. Плотность экстракта меньше плотности водной фазы, поэтому органическую фазу выделяют в форме капли в центральном вихре в водной фазе. Для кристаллизации экстракта стеклянный флакон помещают в криостат (-5°C, 5 мин). После этого твердую фазу экстракта (в форме капли) аккуратно переносят в другой сосуд с помощью шпателя, растворяют в 100 мкл метанола при комнатной температуре и вводят приготовленный раствор в хроматографическую систему.

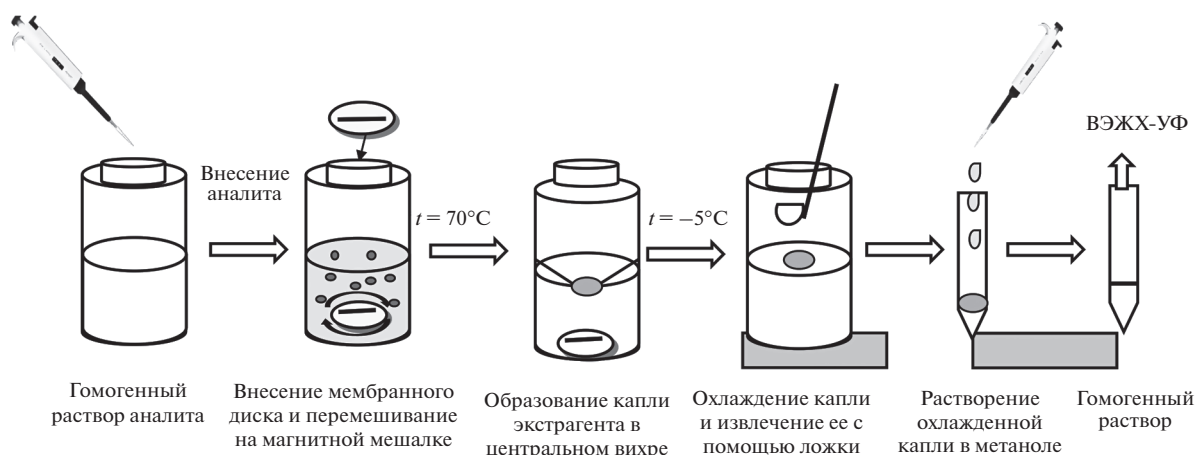
Для построения градуировочного графика использовали водные растворы 17-β-эстрадиола. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций от 0.1 до 15.0 мг/л ( $y = 64.363x$ ). Достигнут предел обнаружения ( $3\sigma$ ) 0.03 мг/л. Значение  $s_r$

не превышало 10% ( $n = 5$ ). Степень извлечения составила 90%, коэффициент концентрирования 36.

Разработанный способ использовали для определения содержания 17-β-эстрадиола в трансдермальных гелях “Дивигель” и “Эстрогель”. Правильность результатов подтверждали методом введено—найдено. Найденные результаты определения содержания эстрадиола в лекарственных препаратах представлены в табл. 1.

\*\*\*

Разработан эффективный вариант дисперсионной жидкостной микроэкстракции, включающий диспергирование экстрагента в водном растворе пробы при вращении хлопкового диска, оснащенного вкладышем магнитной мешалки, с последующей кристаллизацией экстракта. Описан способ изготовления хлопкового диска для реализации дисперсионной жидкостной микроэкстракции. Показана возможность применения 1-додеканола в качестве экстрагента для микроэкстракционного выделения 17-β-эстрадиола. Разработанный способ микроэкстракции исключает необходимость применения полярных растворителей для диспергирования экстрагентов. Предложенный способ ВЭЖХ-УФ-определения 17-β-эстрадиола в лекарственных препаратах по сравнению с аналогами [4–8] позволил упростить процедуру пробоподготовки и сократить расход экстрагентов (на одно определение требуется 50 мкл экстрагента). Разработанный способ микроэкстракции может в дальнейшем найти применение в практике персонализированной медицины для определения гормонов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС.



**Рис. 5.** Схема проведения дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующей кристаллизацией экстракта.

**Таблица 1.** Результаты (мг/л) определения 17- $\beta$ -эстрадиола в лекарственных препаратах ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Лекарственный препарат	Введено	Найдено	Степень извлечения, %
Дивигель (1.0 мг/г)	0	1.11 $\pm$ 0.16	–
	0.80	1.68 $\pm$ 0.65	71.3
	1.60	2.52 $\pm$ 0.93	88.1
Эстрожель (0.6 мг/г)	0	0.57 $\pm$ 0.28	–
	1.60	1.98 $\pm$ 0.59	88.8

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruggiero RJ, Likis FE.* Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy // *J. Midwifery Womens Health.* 2002. V. 47. № 3. P. 130. [https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(02)00233-7)
2. *Ricanyova J., Gadzala-Kopciuch R., Reiffova K., Bazal Y., Buszewski B.* Molecularly imprinted adsorbents for pre-concentration and isolation of progesterone and testosterone by solid phase extraction combined with HPLC // *Adsorption.* 2010. V. 16. P. 473. <https://doi.org/10.1007/s10450-010-9265-7>
3. *Середа Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М.* Ферменты метаболизма эстрогенов и рецепторы как факторы риска развития и прогноза при раке молочной железы // *Сибирский онкологический журн.* 2004. № 1(9). С. 35. (*Sereda E.E., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M.* Enzymes of estrogen metabolism and receptors as risk factors for the development and prognosis in breast cancer // *Siberian J. Oncol.* 2004. V. 1. № 9. P. 35.)
4. *Saini Shivender Singh.* A novel hybrid micro extraction for the sensitive determination of 17 $\beta$ -estradiol in water samples // *Anal. Methods.* 2020. V. 12. P. 2614. <https://doi.org/10.1039/D0AY00581A>
5. *Robles J., Marcos J., Renau N., Garrosta L., Segura J., Ventura R., Barceló B., Barceló A., Pozo O.J.* Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas-chromatography tandem mass spectrometry // *Talanta.* 2017. V. 169. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.032>
6. *DeMaleki Z, Lai EPC, Dabek-Zlotorzynska E.* Capillary electrophoresis characterization of molecularly imprinted polymer particles in fast binding with 17 $\alpha$ -estradiol // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 2796. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000257>
7. *Zhao L., Lin J.M., Li Z., Ying X.* Development of a highly sensitive, second antibody format chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of 17 $\beta$ -estradiol in wastewater // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 558. P. 290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.034>
8. *Kim Y.S., Jung H.S., Matsuura T., Lee H.Y., Kawai T., Gu M.B.* Electrochemical detection of 17 $\beta$ -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. P. 2525. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.10.004>
9. *Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О.* Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // *Журн. аналит. химии.* 2011. Т. 6. № 4. С. 341. (*Krylov V.A., Krylov A.V., Mosyagin P.V., Matkivskaya Yu.O.* Liquid-phase micro-extraction concentration of impurities // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 6. № 4. P. 341.) <https://doi.org/10.31857/S0044450220100059>
10. *Дмитриенко С.Г., Аняри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В.* Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 10. С. 867. (*Dmitrienko S.G., Anyari V.V., Tolmacheva V.V., Gorbunova M.V.* Dispersion liquid-liquid microextraction of organic compounds. Review of Reviews // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 10. P. 867.) <https://doi.org/10.31857/S0044450220100059>
11. *Olatz Zuloaga, Maitane Olivares, Patricia Navarro, Asier Vallejo, Ailette Prieto.* Dispersive liquid-liquid microextraction: Trends in the analysis of biological samples // *Bioanalysis.* 2015. V. 7. № 17. P. 2211. <https://doi.org/10.4155/bio.15.141>
12. *Mansour F.R., Khairy M.A.* Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017. V. 1061–1062. P. 382. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.055>
13. *Andruch Vasil, Ioseph S. Balogh, Livia Kocúrová, Jana Šandrejová.* Five years of dispersive liquid-liquid microextraction // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2013. V. 48. № 3. P. 161. <https://doi.org/10.1080/05704928.2012.697087>
14. *Mansour F.R., Danielson N.D.* Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool // *Talanta.* 2017. V. 170. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.084>
15. *Jafarnejad M., Ezoddin M., Lamei N., Abdi K., Babhadi-Ashar N., Pirooznia N., Akhgari M.* Effervescent tablet-assisted demulsified dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for determination of methadone in water and biological samples prior to GC-flame ionization and GC-MS // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 16. P. 3266. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000078>
16. *Wang, X., Wang Y., Zou X., Cao Y.* Improved dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet method with a binary

- mixed solvent applied for determination of nicotine and cotinine in urine // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. № 7. P. 2384.  
<https://doi.org/10.1039/C3AY42308E>
17. *Farahmand Farnaz, Bahar Ghasemzadeh, Abdolhossein Naseri*. Air-assisted liquid–liquid microextraction using floating organic droplet solidification for simultaneous extraction and spectrophotometric determination of some drugs in biological samples through chemometrics methods // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. № 188. P. 72.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.069>
18. *Pelit F.O., Yengin T.* Application of solidified floating organic drop microextraction method for biomonitoring of chlorpyrifos and its oxon metabolite in urine samples // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014. V. 949. P. 109.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.004>
19. *Regueiro J., Llompарт M., Garcia-Jares C., Garcia-Montegudo J.C., Cela R.* Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1190. P. 27.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.091>
20. *Shishov A., Chromá R., Vakh C., Kuchár J., Simon A., Andruch V., Bulatov A.* In situ decomposition of deep eutectic solvent as a novel approach in liquid-liquid microextraction // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1065. P. 49.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.038>
21. *Perez Avila A.D., Rodriguez-Barona S., Fontalvo-Alzate J.* Molecular toxicity of potential liquid membranes for lactic acid removal from fermentation broths using lactobacillus Casei ATCC 393 // *DYNA*. 2018. V. 85. P. 360.  
<https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.72374>
22. *Maryadele J. O'Neil.* The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013. P. 6.