

RETENCIJA I LIPOFILNOST DERIVATA ESTRADIOLA U NORMALNO- I REVERSNO-FAZNOJ TEČNOJ HROMATOGRAFIJI POD VISOKIM PRITISKOM

Marijana Ačanski¹, Đura Vujić¹, Zvonko Nježić²
marijanaachanski@gmail.com

¹Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 21000 Novi Sad, Srbija

²Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrambene tehnologije, 21000 Novi Sad, Srbija

Izvod

Ispitano je retenciono ponašanje i razdvajanje derivata estradiola primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom na komercijalnim kolonama silika gela i oktadecil silika gela. Kao pokretne faze korišćeni su: benzen-etilacetat, benzen-tetrahidrofuran, benzen-acetonitril, izopropanol-voda i tetrahidrofuran-voda u različitim odnosima. Rezultati su diskutovani sa aspekta prirode rastvorka, eluenta i nepokretne faze. Takođe, je ispitana korelacija između retencionih konstanti derivata estradiola dobijenih na koloni oktadecil silika gela i vrednosti $\log P$ računata primenom gotovog kompjuterskog programa ACD $\log P$.

Ključne reči: derivati estradiola, hromatografija, normalne faze, reversne faze, retencija, lipofilnost

UVOD

Steroidi su organska jedinjenja čija je opšta karakteristika da kao osnovni elemenat svoje strukture, sadrže rigidni skelet 1,2-ciklopentanoperhidrofenantrena za koji mogu biti vezane, u različitim položajima, različite funkcionalne grupe vrlo širokog raspona polarnosti. Jedinjenja steroidne strukture različite i velike biološke aktivnosti su npr.: vitamin D, hormoni kore nadbubrežne žlezde, srčani glikozidi, polni hormoni, itd. Kod steroidnih jedinjenja tečna hromatografija na normalnim i reversnim fazama našla je veliku primenu, upravo zbog njihove različite molekulske strukture.

S toga je veliki broj radova iz oblasti hromatografije koji su proučavali razdvajanje različitih steroidnih jedinjenja na različitim nosačima, primenom različitih eluenata, različitim hromatografskim tehnikama.

Na retenciju u tačnoj hromatografiji, na određenoj nepokretnoj fazi, utiču i ekstezivne (molekulska masa, broj atoma, itd.) i intenzivne (strukturne karakteristike) osobine molekula jedinjenja. Veliki broj ginekoloških kancera javlja se usled poremećaja u koncentraciji ili delovanju estrogenih hormona. U cilju lečenja tih vrsta kancera savremena bioorganska hemija bavi se sintezom različitih antihormona, koji bi na različitim nivoima mogli uticati na mehanizam delovanja estrogenih hormona. U Institutu za hemiju PMF-a u Novom Sadu, sintetizovana je serija steroidnih hormona derivata estradiola od kojih su neka u testovima *in vivo* pokazali potpuni gubitak aktivnosti, neki derivati su pokazali zapažen antiestrogen efekat, a neki su pojačavali dejstvo estradiola, tj. delovali su kao sinergisti [1–3]. Derivati estrona i estradiola su detaljno ispitivani tačnom hromatografijom na normalnim i reversnim fazama, pri čemu su dobijeni zapaženi rezultati [4–9].

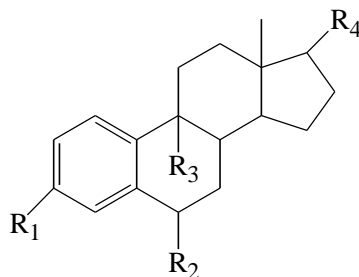
U ovom radu ispitano je retenciono ponašanje serije derivata estradiola, na njihovu retenciju u tačnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (HPLC), na normalnim i reversnim fazama. U hromatografiji na normalnim fazama kao nepokretna faza korišćena je kolona silika gela, a kao pokretna faza eluenti benzen-etila acetat (**A**), benzen – tetrahidrofuran (**B**) i benzen-acetonitril (**C**). U hromatografiji na reversnim fazama, kao nepokretna faza korišćena je kolona oktadecil silika gela, a kao pokretne faze eluenti izopropanol-voda (**D**) i tetrahidrofuran-voda (**E**). S druge strane, retencione konstante određene hromatografijom na reversnim fazama direktno su proporcionalne sa logaritmom podeonog koeficijenta $\log P$, tj. lipofilnošću molekula, preko koje se može tumačiti biološka aktivnost nekog jedinjenja [10–12]. U ranijim ispitivanjima sa derivatima estradiola je već potvrđeno da su korelacije između retencionih konstanti dobijenih na klasičnim (oktadecil i oktil funkcije), kao i polarno-vezanim hemijskim fazama u hromatografiji na reversnim-fazama i vrednosti $\log P$ računate na različite načine, veoma visoke [4–6, 9].

Cilj ovog rada bio je dvojak:

- da se na kolonama silika gela i oktadecil silika gela ispita retencija i promena retencije derivata estradiola, sa variranjem odnosa komponenata nevodenih i vodenih binarnih rastvarača,
- da se ispita zavisnost retencionih konstanti dobijenih primenom hromatografije na reversnim fazama, sa računatim vrednostima $\log P$. (Vrednosti $\log P$ su računate primenom komercijalnog softverskog programa ACD $\log P$.)

Strukturne formule i nazivi jedinjenja ispitivanih derivata estradiola prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Hemijske strukture i nazivi ispitivanih jedinjenja po IUPAC-u



Br.	Nazivi ispitivanih jedinjenja po IUPAC-u	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1.	3,17β-Dihidroksiestra-1,3,5(10)-trien (estradiol)	OH			OH
2.	3-Acetoksi-17β-hidroksiestra-1,3,5(10)-trien	^{a)} OAc			OH
3.	3,17β-Diacetoksiestra-1,3,5(10)-trien	OAc			OAc
4.	3-Benzoiloksi-17β-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien	^{b)} OBz			OAc
5.	3-Hidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10)trien	OH			^{c)} OPr
6.	3,17β-Dipropionoksiestra-1,3,5(10)-trien	OPr			OPr
7.	3-Propionoksi-17-acetoksiestra-1,3,5(10)-trien	OPr			OAc
8.	3-Hidroksiestra-17β-benzoiloksi-1,3,5(10) trien	OH			OBz
9.	3,17β-Dibenzoiloksiestra-1,3,5(10)-trien	OBz			OBz
10.	3,17β-Dihidroksiestra-1,3,5(10)-trien-6-on	OH	=O		OH
11.	3-Hidroksi-17β-propionoksiestra-1,3,5(10)-trien-6-on	OH	=O		OPr
12.	3,17β-Dipropionoksi-1,3,5(10)-trien-6-on	OPr	=O		OPr
13.	3,9α-Dihidroksi-17β-Propionoksiestra-1,3,5(10)-trien-6-on	OH	=O	α-OH	OPr

^{a)}OAc-OCOCH₃, ^{b)}OBz-OCOC₆H₅, ^{c)}OPr-OCOCH₂CH₃

EKSPERIMENTALNI DEO

Sva hromatografska ispitivanja su urađena na uređaju, HPLC Agilent 1100 Series (USA) koji se sastoji od Degazera G1379 A, binarne G1312 pumpe, ALS G1313A, COLCOM G1316A i detektora DAD G1315B. Korišćene su dve komercijalne kolone:

- ✓ Spherisorb SI 250 × 4 mm i.d. (E. Merck, Darmstadt, Germany) i
- ✓ Spherisorb ODS-2.5μm, 124 × 4 mm (Hewlett Packard, USA).

Derivati steroida (Tabela 1), rastvoreni su (0.05 mg mL⁻¹) u metanolu i profiltrirani kroz 0.2 μm Chromafil filter (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

Na silika gel koloni korišćeni su sledeći eluenti:

(A) Benzen-etil acetate (0.02-0.25, inkrementi 2% i 5%)

(B) Benzen-tetrahidrofuran (0.02-0.25, inkrementi 2% i 5%)

(C) Benzen-acetonitril (0.02-0.25, inkrementi 2% i 5%)

Na oktadecil silika gelu koloni korišćeni su eluenti:

(D) Izopropanol-voda (0.80-0.95, inkrement 5%)

(E) Tetrahidrofuran-voda (0.70-0.90, inkrement 5%)

Svi rastvarači su bili HPLC čistoće, a voda dva puta destilisana. Protok rastvarača je iznosio 1 mL min^{-1} , na sobnoj temperaturi.

Retencioni faktor, k , je računat $k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$, gde je t_r retenciono vreme rastvorka, a t_0 je

mrtvo retenciono vreme. Svako t_r je mereno tri puta, a zatim uprosečeno.

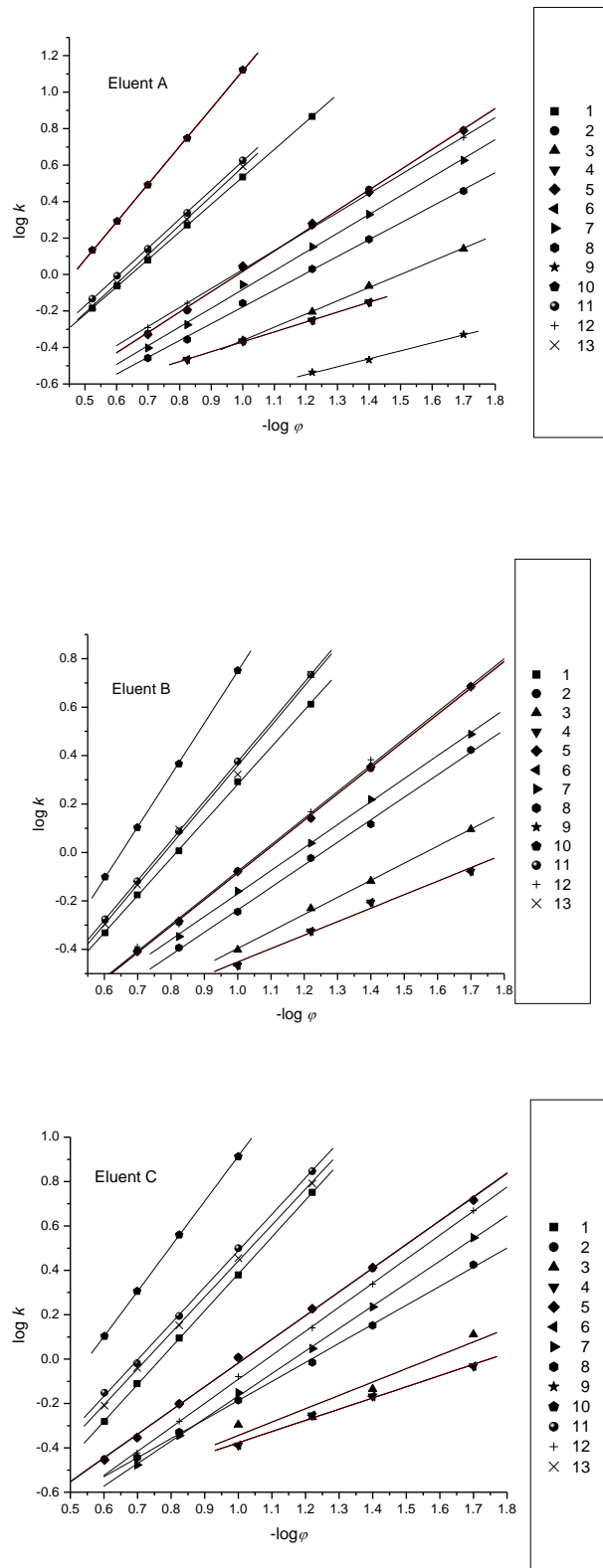
Korelacione analize su rađene primenom gotovog kompjuterskog programa Origin 6.1.

REZULTATI I DISKUSIJA

Retencija derivata estradiola na koloni silika gela

U normalno-faznoj tečnoj hromatografiji na silika gelu, kao pokretna faza korišćeni su eluenti benzen-etil acetat, benzen-tetrahidrofuran i benzen-acetonitril, pri čemu se zapreminski udeo diluenta kretao od 0.02 do 0.25 i povećavan je za 0.02 ili 0.05. Vrednosti $\log k$ ispitivanih derivata u zavisnosti od logaritamskog udela etilacetata, tetrahidrofurana i acetonitrila u pokretnoj fazi prikazani su na slici 1. Kao što se sa slike 1 vidi, zavisnost između $\log k$ ispitivanih derivata i $-\log \varphi$ (zapreminski udeo etil acetata, tetrahidrofurana i acetonitrila) je linearna, što je u skladu sa jednačinom (1), koja je opšte prihvaćena u teoriji adsorpcione hromatografije [4]. Konstante linearne zavisnosti, ispitivanih derivata estradiola iz tabele 1, prikazane su u tabeli 2. Koeficijenti korelacije linearne zavisnosti, kretali su se od 0.9652 do 1.

$$\log k = \log k_0 - n \log \varphi \quad (1)$$



Slika 1. Linaerna zavisnost vrednosti $\log k$ ispitivanih derivata estradiola iz tabele 1 i $-\log \varphi$, za eluente (A), (B) i (C)

Tabela 2. Vrednosti konstanti ispitivanih derivata estradiola iz tabele 1 za eluente (A), (B) i (C)

Jedinjenje	Eluent A		Eluent B		Eluent C	
	$\log k_0$	n	$\log k_0$	n	$\log k_0$	n
1	-0.937	1.508	-1.248	1.530	-1.277	1.661
2	-1.102	1.119	-1.177	1.091	-1.084	1.067
3	-1.084	0.723	-1.100	0.704	-0.946	0.602
4	-0.911	0.542	-1.009	0.557	-0.882	0.505
5	-1.095	1.113	-1.179	1.094	-1.088	1.071
6	-0.911	0.542	-1.009	0.557	-0.882	0.506
7	-1.108	1.027	-1.119	0.949	-1.181	1.014
8	-1.097	0.920	-1.166	0.930	-1.045	0.858
9	-1.073	0.436	-	-	-	-
10	-0.955	2.072	-1.392	2.140	-1.117	2.032
11	-0.964	1.587	-1.260	1.635	-1.150	1.639
12	-1.013	1.040	-1.176	1.097	-1.174	1.082
13	-1.010	1.600	-1.280	1.638	-1.178	1.621

Retencija ispitivanih derivata na koloni silika gela primenom eluena A-C opada u sledećem redosledu:

$$10 >> 11 > 13 > 1 > 5 = 2 \geq 12 > 8 > 7 > 3 > 4 = 6 >> 9$$

Najjaču retenciju pokazuje derivat **10**. U sva tri eluenta derivat **10** je jasno odvojen od ostalih jedinjenja. Derivat **10** u molekulu sadrži samo polarne grupe, u položajima *3* i *17* hidroksilne grupe, a u položaju *6* keto grupu. Zatim slede derivati **11**, **13** i **1**. Najslabiju retenciju pokazuje derivat **9**, koji u položajima *3* i *17* sadrži nepolarne benziloksi funkcionalne grupe. Derivat **9** u eluentima **B** i **C** se praktično ni ne zadržava, pa nisu dobijeni retencioni podaci. Jedinjenja **5** i **2**, kao i **4** i **6** se u sva tri eluenta praktično, međusobno ne razdvajaju.

Interesantno je uporediti vrednosti nagiba n ispitivanih jedinjenja, za eluente **A**, **B** i **C**, tabela 2. Za ista jedinjenja, a različite diluente (etil-acetat, tetrahidrofuran i acetonitril) u pokretnoj fazi vrednosti konstante n su slične, iako su retencija tj., vrednosti $\log k$ različite. To je u saglasnosti sa ranijim ispitivanjima [4], gde je pokazano da nagib n , različitih steroidnih jedinjenja zavisi od tipa i broja supstituenata u molekulu i od strukture skeleta molekula. Naime, vrednost konstante n predstavlja sumu različitih Δn vrednosti.

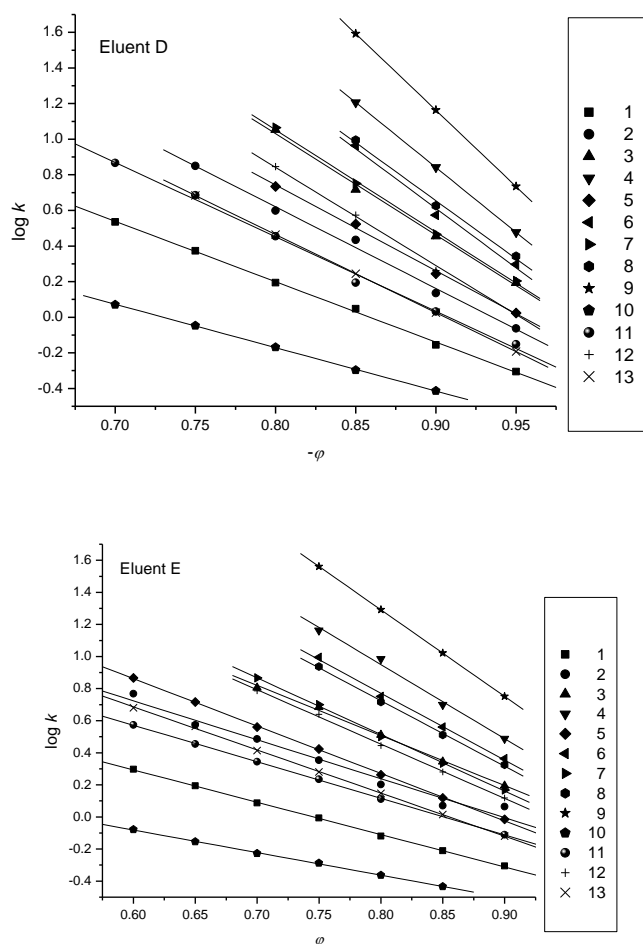
Retencija derivata estradiola na koloni oktadecil silika gela

Ispitano je i retenciono ponašanje, kao i promena retencije derivata estradiola sa promenom zapreminskog udela organskog rastvarača u pokretnoj fazi.

U tu svrhu je kao nepokretna faza korišćena komercijalna kolona oktadecilsilika gela, a kao pokretna faza smeše rastvarača: **D**-izopropanol -voda i **E**-tetrahidrofuran -voda u različitim odnosima, pri čemu je udeo organskog rastvarača povećavan za 5%. U svim slučajevima je dobijena linearna zavisnost između retencione konstante $\log k$ i zapreminskog udela organskog rastvarača φ , u skladu sa opšte prihvaćenom jednačinom (2) u podeonoj hromatografiji [4]:

$$\log k = \log k_0 - s\varphi \quad (2)$$

Linearna zavisnost ispitivanih derivata estradiola u oba eluenta je prikazana na slici 2. Koeficijenti pravca s i odsecci na ordinati $\log k_0$ ispitivanih derivata za sisteme **D** i **E**, prikazani su u tabeli 3. Koeficijenti korelacije linearne zavisnosti kretali su se od 0.9979 do 0.9999.



Slika 2. Zavisnost između vrednosti $\log k$ i φ , ispitivanih derivata estradiola u eluentima D i E

Tabela 3. Vrednosti konstanti $\log k_0$ i s , derivata estradiola, prema jednačini (2), na oktadecilsilika gel koloni za eluente D i E; U poslednjoj koloni su vrednosti $\log P$

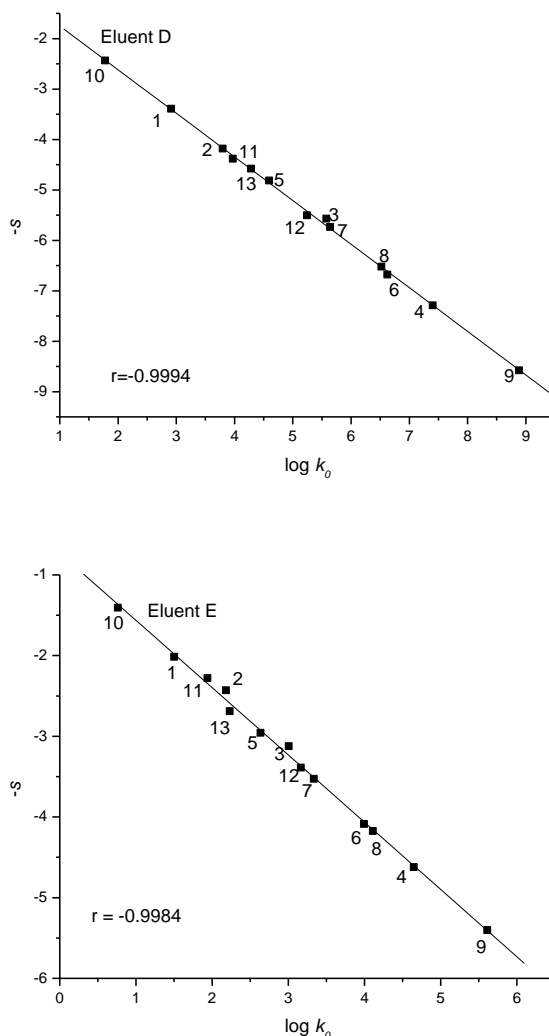
Jedinjenje	Eluent D		Eluent E		$\log P$
	$\log k_0$	$-s$	$\log k_0$	$-s$	
1	2.913	-3.392	1.503	-2.016	4.13
2	4.284	-4.580	2.181	-2.429	4.20
3	5.576	-5.568	3.007	-3.124	5.10
4	7.403	-7.290	4.647	-4.622	7.33
5	4.596	-4.816	2.636	-2.956	5.56
6	6.623	-6.680	4.111	-4.174	5.16
7	5.641	-5.736	3.335	-3.526	7.05
8	6.523	-6.520	3.995	-4.088	6.24
9	8.885	-8.580	5.613	-5.402	9.15
10	1.778	-2.436	0.763	-1.407	3.30
11	3.795	-4.180	1.939	-2.279	4.73
12	5.246	-5.506	3.164	-3.388	5.12
13	3.972	-4.384	2.230	-2.689	3.53

Retencioni redosled derivata estradiola dobijen u reversno-faznoj hromatografiji je u skladu sa hidrofobnošću ispitivanih jedinjenja, manje polarni derivati imaju veću retenciju i obrnuto. Retencioni redosled je isti u oba eluenta i opada u sledećem redosledu:

$$9 > 4 > 6 > 8 > 7 > 3 > 12 > 5 > 13 > 11 > 2 > 1 > 10$$

Praktično, derivati koji nisu razdvojeni normalno-faznom hromatografijom, razdvojeni su reversno-faznom hromatografijom, što još jedanput pokazuje da se ove dve hromatografske tehnike međusobno ne isključuju već naprotiv, dopunjuju.

Kao što se iz tabele 3 vidi, koeficijent pravca s i odsečak na ordinati $\log k_0$ rastu kako raste retencija, odnosno hidrofobnost jedinjenja, pa je zato između ove dve konstante linearna zavisnost veoma visoka, slika 3.

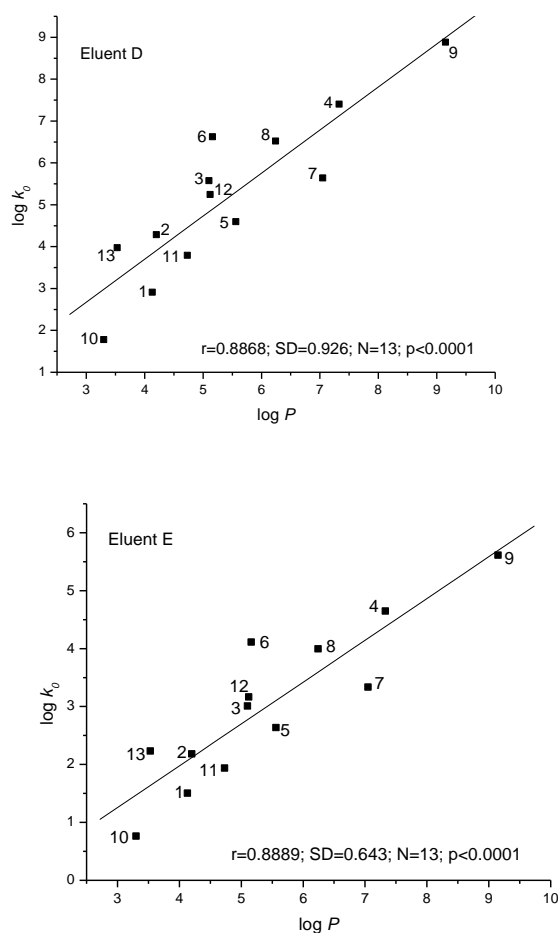


Slika 3. Zavisnost između vrednosti $\log k_0$ i s ispitivanih derivata estradiola u eluentima D i E

3.3. Korelacija između aproksimirane konstante $\log k_0$ derivata estradiola i vrednosti $\log P$

Odsečak $\log k_0$ derivata estradiola je aproksimirana vrednost i u hromatografiji na reversnim fazama predstavlja retenciju rastvorka u čistoj vodi. U hromatografiji ne reversnim fazama se koristi kao parametar hidrofobnosti [4, 10, 14].

Korelacija između aproksimirane konstante $\log k_0$ dobijene u hromatografiji na reversnim fazama derivata estradiola i vrednosti $\log P$ (vrednosti $\log P$ su date u poslednjoj koloni tabele 3) su zadovoljavajuće, slika 4, ali slabije u pređenju sa korelacijama kada su za ista jedinjenja korišćeni eluenti metanl-voda i acetonitril-voda [4].



Slika 4. Zavisnost između vrednosti $\log k_0$ i $\log P$ ispitivanih derivata estradiola u eluentima D i E

ZAKLJUČAK

Derivati estradiola prikazani u tabeli 1, ispitivani su hromatografijom na normalnim fazama – na koloni silika gela primenom eluena benzen-etil acetat, benzen-tetrahidrofuran i benzen-acetonitril i hromatografijom na reversnim fazama – na koloni oktadecil silika gela, primenom eluena izopropanol-voda i tetrahidrofura-voda. Na silika gelu, retenciona sekvenca steroidnih jedinjenja u osnovi je posledica polarosti jedinjenja. Polarniji rastvorci imaju jaču retenciju. Na oktadecil silika gelu, retenciona sekvenca steroidnih jedinjenja u osnovi je posledica hidrofobnosti jedinjenja. Hidrofobniji derivati imaju jaču retenciju. Derivati koji nisu razdvojeni hromatografijom na normalnim fazama, razdvojeni su hromatografijom na reversnim fazama. Dobijeni rezultati još jednom potvrđuju da je za uspešno razdvajanje strukturno sličnih jedinjenja potrebno koristiti obe hromatografske tehnike: i na normalnim i na reversnim fazama. Aproksimirana konstanta $\log k_0$, dobro korelira sa $\log P$ vrednostima ispitivanih derivata.

ZAHVALNICA

Za finansijsku pomoć neophodnu za realizaciju ovog rada autori se najsrdačnije zahvaljuju Ministarstvu Republike Srbije (Projekti III 46005 i TR 31066) i Pokrajinskom Sekretarijatu za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine (Projekat No. 114-451-2373/2011).

LITERATURA

- [1] J. A. Petrović, V. M. Pejanović, D. A. Miljković, J. T. Hranisavljević, *Steroids* 55(1990) 276-281.
- [2] V. M. Pejanović, Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1991.
- [3] S. Jovanović-Šanta, S. Andrić, R. Kovačević, V. Pejanović, *Collect. Czech. Chem.* 65(2000) 77-82.
- [4] M. M. Ačanski, *Tečna hromatografija derivata estradiola i estrona-Monografija*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2007. i reference citirane u monografiji
- [5] M. M. Ačanski, J. P. Dobrijević, A. S. Redžepović Đ. N. Vujić, S. S. Jovanović-Šanta, *Chromatographia*, 70(2009) 1679-1683.
- [6] M. M. Ačanski, J. P. Dobrijević, A. S. Redžepović, Đ. N. Vujić, S. N. Sakač, S. S. Jovanovic Šanta, *Chromatographia*, 71(2010) 913-916.
- [7] M. M. Ačanski, Z. B. Nježić, S. M. Radak, *International Journal of Managment and Technology*, 1 (1)(2011) 155-165.
- [8] M. M. Ačanski, Đ. N. Vujić, *International Journal of Current Research*, 3(6) (2011) 155-153.
- [9] M. M. Ačanski, Đ. N. Vujić, S. Jovanović-Šanta, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 17(4)(2011) 535-545.
- [10] B. Testa, S. D. Kramer H. Wunderli-Allenspach, GerdFolkers, *Pharmaco Profiling in Drug Research*, Wiley VCH, 2006. pp 126-154.
- [11] B. Testa, H. V. de Waterbeemd, G. Folkers, , R. Guy, *Pharmacocinetic Optimization in Drug Research, Biological, Physicochemical and Computational Strategies*, Wiley VCH, 2001. pp 141-181.
- [12] V. Pliška, B. Testa, H. V. de Waterbeemd, *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, Wiley VCH 1996. pp 73-85.

**RETENTION AND LIPOPHILICITY OF ESTRADIOL DERIVATIVES IN
NORMAL- AND REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

Marijana Ačanski¹, Đura Vujić¹, Zvonko Nježić²
marijanaachanski@gmail.com

¹University of Novi Sad, Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Serbia,

²University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 21000 Novi Sad, Serbia

Abstract

The retention behaviour and separation ability of some estradiol derivatives were studied by HPLC on silica and C-18 commercially available columns. The mobile phases used were: benzene-ethyl acetate, benzene-tetrahydrofuran, benzene-acetonitrile, isopropanol-water and tetrahydrofuran-water in various proportions. The results are discussed in terms of nature of the solute, eluent and stationary phase.

Correlation between the retention constants of estradiol derivatives obtained on C-18 column and log P calculated by program ACD log P was examined too.

Key words: *estradiol derivatives, chromatography, normal phases, reversed phases, retention, lipophilicity*