

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ НА ПРИМЕРЕ 4-ХЛОРДЕГИДРОМЕТИЛТЕСТОСТЕРОНА

(Богдан С.А., Моисеева Е.С., Шереметов А.М. ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии ФМБА России»)

Исследование фармацевтических препаратов физико-химическими методами анализа нашло широкое применение в фармакологии, токсикологии и судебной химии. Постоянная разработка новых физиологически активных веществ природного и синтетического происхождения является основой развития методов аналитической химии в этом направлении. В связи с этим важное значение в организации контроля за потреблением анаболических стероидов занимает качественный и количественный физико-химический анализ, который требует постоянной разработки новых, более чувствительных, экспрессных и селективных методов. Для анализа анаболических стероидов широко применяются хроматографические, спектральные методы и преимущественно хромато-масс-спектрометрия. При этом объектами исследования являются лекарственные средства.

4-хлордегидрометилтестостерон является оральным анаболическим стероидом, который был разработан в начале 60-х на фирме «Йенафарм» и входит в Запрещенный список Всемирного антидопингового кодекса. На сегодняшний день определению 4-хлордегидрометилтестостерона посвящен ряд научных работ, где основными методами определения этого стероида в биологических средах, пищевых добавках и продуктах питания, в диапазоне концентраций от 10^{-8} до 10^{-5} г/мл, являются газовая и жидкостная хроматография, преимущественно с масс-спектрометрическим детектированием. Аппаратурное решение задачи по количественному химическому определению стероидов данными методами требует существенных материальных вложений и нецелесообразно его использование в мобильных лабораториях. Как вариант экспрессного метода, с использованием мобильного оборудования, был предложен метод вольтамперометрии. Достоинством этого метода является сочетание универсальности, селективности и высокой чувствительности, простоты и портативности аппаратуры, а также присутствие на рынке электрохимических анализаторов достойных приборов отечественного производства.

Применение вольтамперометрии для определения 4-хлордегидрометилтестостерона в литературе не описано, однако, имеются данные по определению этим методом других анаболических стероидов. Нами проведены исследования электрохимического поведения 4-хлордегидрометилтестостерона на стеклоуглеродном электроде и разработана методика количественного химического анализа фармпрепаратов и биологических жидкостей.

В работе использовали аналитический вольтамперометрический комплекс СТА (ТУ 4215-001-20694097-98), состоящий из электронного блока и измерительного блока с тремя электрохимическими ячейками. В работе был использован вариант трехэлектродной электрохимической ячейки. Для исследований вольтамперометрического поведения в качестве индикаторного электрода был использован стеклоуглеродный электрод. В качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовали насыщенный хлоридсеребряный электрод.

В качестве фонового электролита был выбран раствор гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия. Стандартный раствор 4-хлордегидрометилтестостерона с концентрацией $2,4 \cdot 10^{-3}$ М был приготовлен путем растворения навески субстанции массой 0,020 г в водно-этанольной смеси (4:1) объемом 25 мл. Рабочие растворы получали последовательным разбавлением стандартного раствора бидистиллированной водой непосредственно перед экспериментом.

В ходе работы были изучены факторы, имеющие важное значение при определении органических веществ, зависимости величины тока 4-хлордегидрометилтестостерона от

потенциала электролиза, изменении времени электролиза, зависимости величины предельного тока от скорости изменения потенциала.

В ходе процедуры выбора рабочих условий вольтамперометрического определения 4-хлордегидрометилтестостерона были выбраны: потенциал электролиза (E_0) 0,4 В и скорости изменения потенциала развертки (w) 20 мВ/с. На рис.1 представлена вольтамперограмма 4-хлордегидрометилтестостерона, полученная в выбранных условиях. Аналитический сигнал определяемого вещества наблюдался при потенциале 1,12 В.

Нами получена зависимость величины тока пика 4-хлордегидрометилтестостерона от его концентрации в растворе (рис. 2). Установлено, что линейность градуировочного графика сохраняется в диапазоне концентраций $0,89 \cdot 10^{-7}$ - $0,71 \cdot 10^{-5}$ М с коэффициентом корреляции 0,992 и коэффициентом чувствительности 22,54.

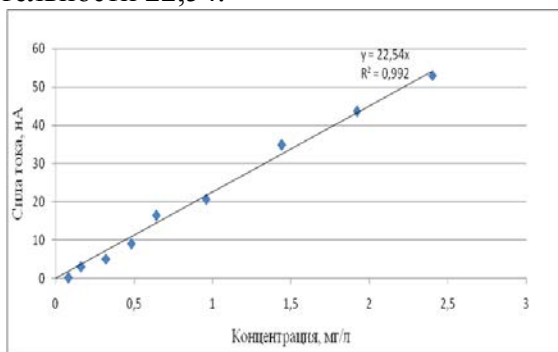
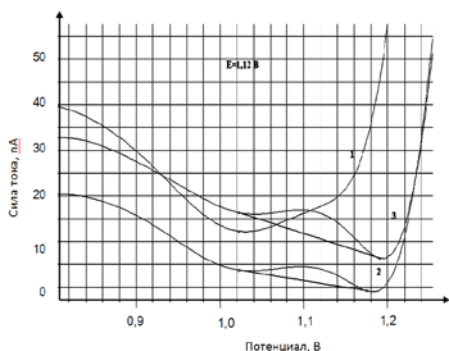


Рис. 1. Вольтамперограмма 4-хлордегидрометилтестостерона на стеклоуглеродном электроде при $\tau_0 = 15$ с; $w = 20$ мВ/с; $E_0 = 0,4$ В:
1 – фосфатный буфер при pH=5,3;
2 – $C_{4\text{-ХДМТ}} = 1,43 \cdot 10^{-6}$ М;
3 – $C_{4\text{-ХДМТ}} = 2,87 \cdot 10^{-6}$ М.

Рис. 2. Зависимость величины тока 4-хлордегидрометилтестостерона от концентрации на стеклоуглеродном электроде в фосфатном электролите ($\tau_0 = 15$ с; $w = 20$ мВ/с; $E_0 = 0,4$ В).

В результате изучения в рабочих условиях зависимости стандартного отклонения от определяемого содержания 4-хлордегидрометилтестостерона были вычислены предел определения (C_n), который составил 0,03 мг/л или $0,91 \cdot 10^{-7}$ М ($Sr = 0,33$), а также предел обнаружения (C_{min}), который составил $0,17 \cdot 10^{-7}$ М.

По результатам полученных рабочих условий нами был разработан алгоритм пробоподготовки и предложена методика количественного химического анализа фармпрепаратов для определения действующего вещества 4-хлордегидрометилтестостерон.

Проверку правильности методики проводили по методу добавок аттестованных смесей. Нами проведено сравнение разработанного экспресс-метода определения анаболических стероидов с другими инструментальными методами.

Метод анализа	Диапазон концентраций,	Время на проведение анализа	Стоимость оборудования, руб
Жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием	2-10 нг/мл	1,5-3,5 часа	от 8 млн.
Газовая хроматография с масс-селективным детектированием	0,2-8 нг/мл	1,5-4,5 часа	от 6 млн.
Капиллярный электрофорез	0,2-0,51 мкг/мл	1,0-2,0 часа	от 500 тыс.
Вольтамперометрия	0,1-30 нг/мл	от 40 мин	от 100 тыс.

Таким образом, полученная методика, позволяет количественно определять концентрации анаболических стероидов на уровне нг и может конкурировать с другими чувствительными методами количественного химического анализа, выигрывая, по затраченному времени на выполнение анализа, и ценам на аналитическое оборудование