

Separazione e determinazione degli esteri del testosterone nelle soluzioni oleose (*)

VITO AMORMINO, GUIDO BELLOMONTE e ENRICO CINGOLANI

Laboratori di Biologia

Riassunto. — La separazione di alcuni esteri del testosterone allorché si trovano in miscela in soluzioni oleose, non è facile.

Dopo eliminazione della maggior parte dell'olio mediante ripartizione tra solventi, la cromatografia su strato sottile di gel di silice non separa tutti i componenti; migliori risultati si ottengono su strato sottile di allumina; anche in questo caso per composti molto simili, la separazione non è facile, anche se in alcuni casi la spettrofotometria I.R. permette l'identificazione di composti in miscele binarie.

La cromatografia gassosa a temperatura programmata, al contrario, senza l'ausilio d'una precedente separazione cromatografica su strato sottile, dà dei risultati migliori su queste miscele di esteri, permettendo una buona separazione e determinazione quantitativa dei composti.

Summary (*Separation and determination of testosterone esters in oily solutions*). — The separation of a mixture of different testosterone esters in oily pharmaceutical preparations is not easy.

Acceptable results have been obtained by means of thin layer chromatography plates coated with aluminium oxide GF₂₅₄. The oil had been previously removed by ripartition techniques. In some cases I.R. spectrophotometry has been used for the identification of non-separated binary mixtures. Temperature programmed gas-chromatography gives better results both from a qualitative and quantitative point of view.

INTRODUZIONE

Alcune preparazioni farmaceutiche ad azione androgena sono costituite da miscele di esteri del testosterone in soluzioni oleose per somministrazione parenterale. L'analisi di tali preparazioni, sia per il riconosci-

(*) Comunicazione presentata al XXVII Congresso Internazionale di Scienze Farmaceutiche - Montpellier, 4-9 settembre 1967.

mento dei singoli componenti che per la loro determinazione offre alcune difficoltà in quanto fra questi composti, che hanno un comportamento cromatografico simile, alcuni presentano un radicale acido appartenente alla stessa serie omologa.

Così la cromatografia su strato sottile, anche con un metodo a flusso continuo (CAVINA & MORETTI, 1966), non permette una separazione completa del propionato, fenilpropionato, ciclopentilpropionato, eptanoato, 4-metilpentanoato e decanoato di testosterone. La gas-cromatografia, invece, anche senza l'ausilio di una precedente separazione cromatografica, dà risultati migliori. Questa tecnica è sempre più largamente usata nell'analisi degli steroidi, soprattutto da quando è stato dimostrato che questi composti possono essere sottoposti a gas-cromatografia come tali senza che subiscano un'apparente degradazione termica. KROMAN *et al.* (1966), ad esempio, con una tecnica combinata di cromatografia su strato sottile e di gas-cromatografia separano microquantità di androgeni in miscela senza ricorrere alla formazione di derivati. Anche per gli estrogeni ed i progestativi la gas cromatografia può essere applicata sui composti come tali. UMBREIT & WISNIEWSKI (1954), l'applicano alla separazione di mestrenolo e noretindrone; SCHULZ (1965) alla determinazione rapida del mestranolo in presenza del noretindrone e del 6-cloro-6-deidro-17- α -acetossiprogesterone mentre FRANCE & KNOX (1966) la utilizzano nella determinazione dell'etinilestradiolo e del megestrolo nelle compresse, associandoli anche a progesterone e ad altri steroidi.

La combinazione della cromatografia su strato sottile e della gas-cromatografia, associate eventualmente alla spettrofotometria I.R., permette di risolvere alcuni dei problemi analitici presi in considerazione.

MATERIALI E METODI

Sono state esaminate due soluzioni oleose di esteri del testosterone prodotte per uso farmaceutico ed aventi la seguente composizione. A) Testosterone propionato mg 25, fenilpropionato mg 50, ciclopentilpropionato mg 75, eptanoato mg 100, in 1 ml di olio d'oliva. B) Testosterone propionato mg 30, fenilpropionato mg 60, 4-metilpentanoato mg 60, decanoato mg 100, in 1 ml di olio di arachidi.

Ambedue le soluzioni contengono l'1% di alcool benzilico. Come prodotti di riferimento si sono usate preparazioni cromatograficamente pure degli esteri del testosterone presi in considerazione; le loro caratteristiche chimico-fisiche corrispondono a quelle per essi descritte in letteratura (GOULD *et al.*, 1957).

Preparazioni delle soluzioni dei campioni e di riferimento. — Dalle preparazioni (A) e (B), rispettivamente, si preleva 1 ml di soluzione oleosa e si effettua la ripartizione fra etere di petrolio (saturato con etanolo 80°) ed

etanolo 80° (saturato con etere di petrolio) (CAVINA, CINGOLANI & GIRALDEZ, 1962). Gli estratti alcoolici riuniti si evaporano a pressione ridotta a 60°C e il residuo si riprende con 50 ml di metanolo-cloruro di metilene (1:1).

Con i prodotti di riferimento si preparano soluzioni in metanolo-cloruro di metilene (1:1) dei singoli composti e delle miscele alle concentrazioni corrispondenti agli estratti ottenuti dalle preparazioni farmaceutiche in esame.

Cromatografia su strato sottile. — Le lastre di vetro 20 x 20 per la cromatografia su strato sottile sono ricoperte con uno strato dallo spessore di 500 μ , di Allumina GF₂₅₄ (Merck) precedentemente lavata in Soxhlet per 24 h con metanolo-cloruro di metilene (1:1) e successivamente attivata a 105°C per 45 min. Il solvente che dà i risultati migliori è costituito da: etere di petrolio (40°-70°) — acetato d'etile (90:10). La metodica impiegata è quella a flusso continuo descritta da CAVINA & MORETTI (1966), prolungando lo sviluppo per 3-4 h, a temperatura ambiente.

Mediante una microsiringa Hamilton si depongono 40 μ l delle soluzioni in metanolo-cloruro di metilene sopra descritte all'estremità di una lastra. I riferimenti singoli si depongono usualmente, mentre le miscele si depongono in modo uniforme lungo una linea di circa 7 cm. Al termine della cromatografia la rivelazione dei composti si effettua a luce U.V. di 254 nm.

Le aree marcate, e corrispondenti ai singoli composti, vengono cautamente raschiate e la polvere corrispondente trasferita in altrettante provette da centrifuga da 50 ml e munite di tappo. Ad ognuna di esse si aggiungono 10 ml del solvente metanolo-cloruro di metilene (1:1) agitando di tanto in tanto per 1 ora circa. Si centrifuga e si decanta il surnatante in recipienti tarati da 20 ml attraverso carta SS 5893 a fascia blu; l'estrazione viene ripetuta per altre due volte con successive porzioni di 3 ml del solvente. Si porta al volume di 20 ml e si agita. Porzioni di soluzione corrispondenti a 20-40 μ g di steroide si trasferiscono in provette graduate munite di tappo. Si evapora il solvente su b. m. in corrente d'azoto e si aggiungono 2 ml di metanolo. Su queste soluzioni si esegue la reazione colorimetrica con idrazide isonicotinica aggiungendovi 2 ml del reattivo all'1% (CAVINA, CINGOLANI & GIRALDEZ, 1962). Il calcolo delle quantità trovate si esegue analogamente a quanto descritto da CAVINA & MORETTI (1966), in riferimento ai valori delle soluzioni di confronto o all'E (1%, 1 cm) per ogni composto ottenuti nelle prove di ricupero dalle lastre.

Gas-cromatografia. — Il gas-cromatografo è un Perkin-Elmer 801, equipaggiato con colonna di vetro lunga 1,80 m, larga 2,5 mm, riempita con Chromosorb G silanizzato 80/100 mesh al 2% di GE-SE 30 (gomma al silicone) e precedentemente condizionata per 24 h a 280°C; blocco d'introduzione in vetro; rilevatore a ionizzazione a fiamma e registratore Hitachi-Perkin Elmer f. s. 2 mv regolato alla velocità di 5 mm/minuto. La temperatura del

blocco d'introduzione è a 280°C, quella della colonna è programmata da 200° a 265°C con incremento di 8°,33/minuto.

Il gas di trasporto è azoto purissimo (40 ml/minuto).

La separazione gas-cromatografica si effettua su 1,5 μ l di una soluzione in solfuro di carbonio ottenuta dalle soluzioni dei campioni e dei riferimenti descritte precedentemente; dopo evaporazione del solvente il residuo viene ripreso con una uguale quantità di solfuro di carbonio per avere le concentrazioni suddette.

La gas-cromatografia della miscela contenente il ciclopentilpropionato e l'eptanoato di testosterone è stata effettuata anche dopo separazione degli altri componenti la miscela (A) per cromatografia su strato sottile. A tale scopo, effettuata la cromatografia su strato sottile col metodo quantitativo descritto sopra, la porzione di strato di allumina contenenti i due esteri si eluisce come già detto col solvente metanolo-cloruro di metilene (1:1). Si evapora il solvente e si riprende con 1 ml di solfuro di carbonio e si iniettano 10 μ l di tale soluzione corrispondenti a 0,6 e 0,8 μ g rispettivamente di testosterone ciclopentilpropionato ed eptanoato.

Spettrofotometria I. R. — Su una piastra per cromatografia su strato sottile, preparata come già detto, si depongono uniformemente, lungo una linea di circa 10 cm, 90 μ l della soluzione diluita (miscela A) contenente 135 μ g e 180 μ g rispettivamente di testosterone ciclopentilpropionato ed eptanoato.

Si effettua la cromatografia e si eluisce la porzione di strato contenente i due esteri con complessivi 20 ml di solvente metanolo-cloruro di metilene (1:1). La soluzione si trasferisce a piccole porzioni, che vengono evaporate su b.m. in corrente d'azoto, in provette da centrifuga a fondo conico da 5-10 ml. Appena il solvente è tutto evaporato, si aggiungono 35-40 μ l di tetracloruro di carbonio puro per spettrofotometria e si registrano gli spettri I. R. limitatamente alla regione 2000-800 cm^{-1} , utilizzando una espansione della scala di 6X.

Nel raggio di riferimento si inseriscono alternativamente soluzioni in tetracloruro di carbonio di testosterone ciclopentilpropionato ed eptanoato ambedue alla stessa concentrazione di quella della soluzione in esame. Lo spettrofotometro I. R. è un Perkin-Elmer 237, la microcella in NaCl impiegata è dello spessore di 0,5 cm e del volume totale di 37 μ l; l'accessorio per l'espansione della scala delle ordinate è modello Perkin-Elmer accoppiato ad un registratore Bristol.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Mediante la cromatografia su strato sottile si ottengono risultati migliori con lo strato di allumina, anzichè con quello di gel di silice. Con quest'ultimo infatti, e solo con alcuni solventi, si riesce, nel migliore dei casi ad avere, per la composizione (A), una separazione due a due, migrando con

la stessa velocità il propionato e il fenilpropionato ed ancora il ciclopentilpropionato e l'eptanoato (Fig. 1). Operando invece su gel di allumina si ottiene nel caso della composizione (A) la separazione del propionato dal fe-

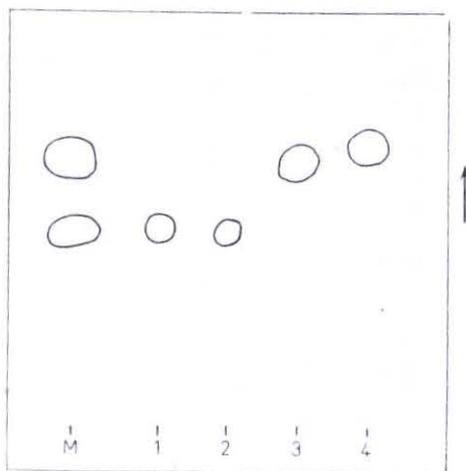


Fig. 1. — Separazione cromatografica su strato sottile di gel di silice GF (etere di petrolio 65° p. 50, etere etilico privo di perossidi p. 50, acido acetico p. 1) del testosterone propionato (1), fenilpropionato (2), ciclopentilpropionato (3), eptanoato (4).

nilpropionato e dal ciclopentilpropionato o dall'eptanoato, i quali due ultimi migrano all'incirca con la stessa velocità (Fig. 2); nel caso invece della mi-

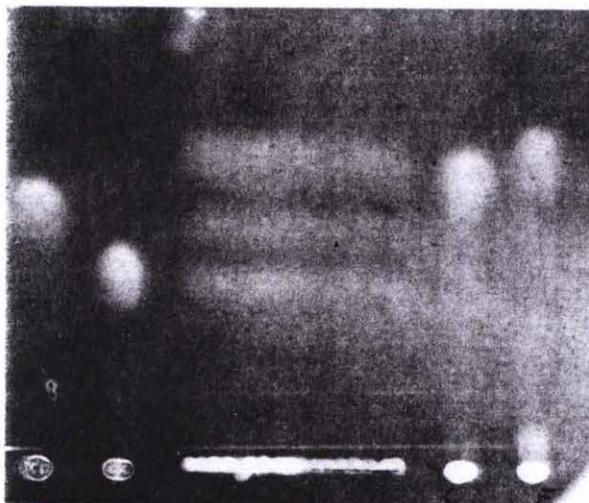


Fig. 2. — Separazione cromatografica su strato sottile di allumina GF₂₅₄ del testosterone propionato (P), fenilpropionato (FP), ciclopentilpropionato (C), eptanoato (E), (solvente: etere di petrolio-acetato di etile 90:10).

scela (B) la separazione è netta fra tutti e quattro i componenti (Fig. 3). La miscela dei sei esteri si comporta come è riportato nella Fig. 4: sono cioè il ciclopentilpropionato, l'eptanoato e il 4-metilpentanoato che migrano



Fig. 3. — Separazione cromatografica su strato sottile di allumina GF₂₅₄ del testosterone propionato (P), fenilpropionato (FP), 4-metilpentanoato (IC), decanoato (D), (solvente: etere di petrolio-acetato di etile 90:10).

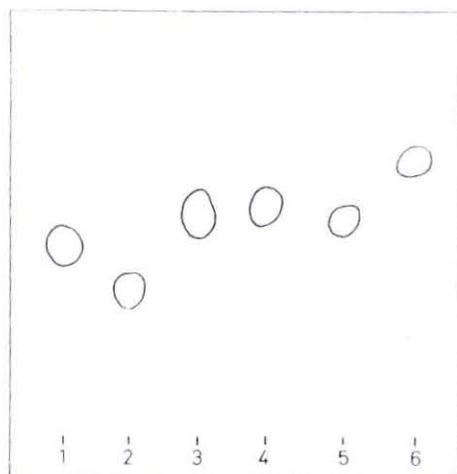


Fig. 4. — Separazione cromatografica su strato sottile di allumina GF₂₅₄ del testosterone propionato (1), fenilpropionato (2), ciclopentilpropionato (3), eptanoato (4), 4-metilpentanoato (5), decanoato (6), (solvente: etere di petrolio-acetato di etile 90:10).

quasi con la stessa velocità. Tentativi di separazione col metodo bidimensionale, con diversi solventi, non hanno fornito risultati migliori.

Considerato che lo scorrimento è in ogni caso lento e le differenze di R_f sono modeste, si è utilizzato, come è stato già detto, il metodo a flusso continuo (CAVINA & MORETTI, 1966) per un tempo di 3-4 ore circa. Si è preferito però non deporre le miscele oleose diluite in esano sulla piastra, ma far precedere alla deposizione un'estrazione dal solvente oleoso per ripartizione fra solventi (CAVINA, CINGOLANI & GIRALDEZ, 1962) allo scopo di eliminarne la maggior parte. I risultati che si ottengono a partire da queste soluzioni oleose così trattate, sono perfettamente comparabili con quelli che si hanno con le miscele di confronto allestite in laboratorio con soluzioni alcoliche di prodotti puri. Le eventuali tracce di olio residuo migrano con il fronte e vengono trattenute dalle strisce di carta da filtro. Il metodo è quantitativo e dopo rivelazione delle macchie a luce U.V. ed eluizione della parte di strato corrispondente, i singoli esteri del testosterone possono essere determinati sugli eluati mediante la reazione con idrazide isonicotinica (CAVINA *et al.*, 1962).

La separazione gas-cromatografica delle miscele descritte ha dato i risultati riportati nelle Fig. 5 e 6. Gli stessi risultati si ottengono sia con la

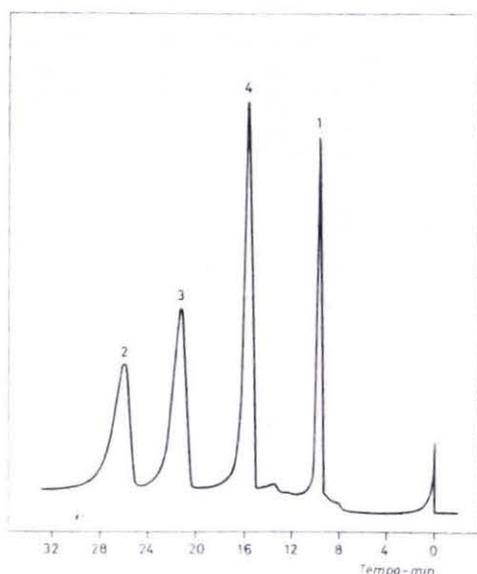


Fig. 5. — Separazione gas-cromatografica del testosterone propionato (1), eptanoato (4), ciclopentilpropionato (3), fenilpropionato (2), in miscela.

soluzione in solfuro di carbonio dei composti puri, sia con quella ottenuta dalle soluzioni oleose previa ripartizione fra solventi.

La separazione è ben netta e l'assenza di picchi estranei indica la stabilità termica degli esteri del testosterone nelle condizioni descritte.

Il metodo è quantitativo e riproducibile e la determinazione può essere facilmente effettuata moltiplicando il valore dell'altezza del picco per la base calcolata a mezza altezza e confrontando le aree così ottenute con quelle che si ottengono con quantità note di composti di riferimento (AMORMINO *et al.*, 1968). Per la miscela (A) si ha una netta separazione fra tutti e quattro i composti (Fig. 5) e ciò permette di differenziare e successivamente dosare anche il ciclopentilpropionato e l'eptanoato non separabili, come già detto, con la cromatografia su strato sottile. Per la miscela (B) la separazione è egualmente realizzabile fra il propionato, il 4-metilpentanoato e il fenilpropionato o il decanoato (Fig. 6). Questi due ultimi hanno tempi di ritenzione simili e quindi si sovrappongono formando un unico picco.

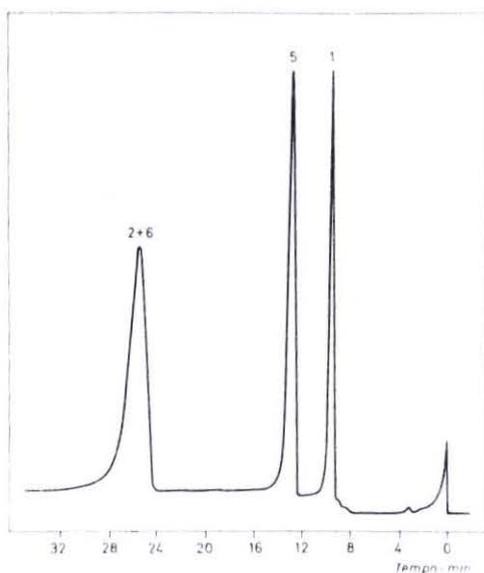


Fig. 6. — Separazione gas-cromatografica del testosterone propionato (1), 4-metilpentanoato (5), fenilpropionato e decanoato (2 + 6) in miscela.

Abbiamo cioè due esempi in cui ambedue le tecniche si completano: nel primo caso la gas-cromatografia permette di separare composti non separabili mediante la cromatografia su strato sottile, nel secondo caso, invece, è la cromatografia su strato sottile che separa composti non separabili per gas-cromatografia con la tecnica descritta: è probabile che variando opportunamente le condizioni sperimentali si possa, in quest'ultimo caso, ottenere una separazione soddisfacente.

La gas-cromatografia può anche essere agevolmente eseguita sugli eluati dalle piastre cromatografiche. Facendo precedere alla gas-cromatografia una cromatografia su strato sottile si ha il vantaggio di eliminare eventuali sostanze estranee ed interferenti. Purtroppo è nostra opinione

che la gas-cromatografia da sola possa risolvere molte separazioni simili a quelle descritte.

Nel caso della miscela (A), dopo la cromatografia su strato sottile può sottoporsi a gas-cromatografia l'eluato della macchia corrispondente al ciclo-pentilpropionato e all'eptanoato, ottenendosi la separazione, identificazione e determinazione dei due composti.

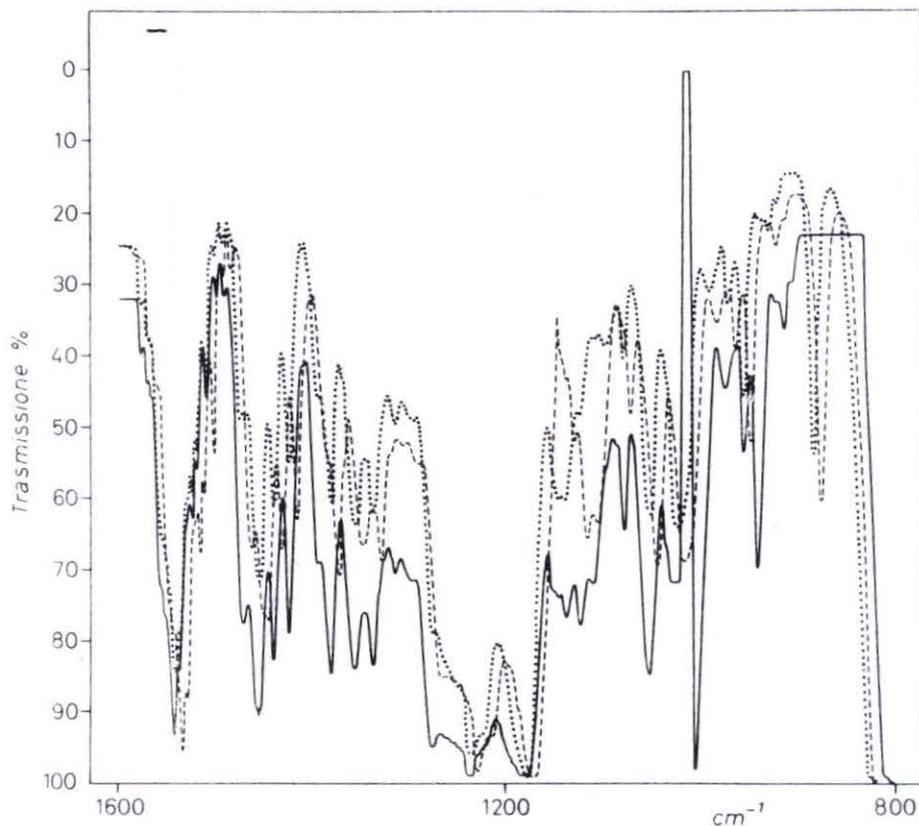


Fig. 7. — Spettri I.R. del testosterone ciclo-pentilpropionato (.....), eptanoato (-----), e di miscela (—), in microcella e espansione 6X.

L'identificazione di questi due composti, può anche essere agevolmente effettuata per spettrofotometria I.R. differenziale in tetracloruro di carbonio della miscela dei due esteri eluiti dalle piastre. Ciò è possibile in quanto l'assorbimento della banda C-O estere si trova a 1110 cm^{-1} per l'eptanoato e a 1140 cm^{-1} per il ciclo-pentilpropionato (Fig. 7).

18 novembre 1967.

BIBLIOGRAFIA

- AMORMINO, V., G. BELLOMONTE, G. CARELLI & E. CINGOLANI, 1968. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 108.
- CAVINA, G., E. CINGOLANI, V. AMORMINO & A. GIRALDEZ, 1962. *Farmaco Ed. Prat.*, **17**, 323.
- CAVINA, G., E. CINGOLANI & A. GIRALDEZ, 1962. *Farmaco Ed. Prat.*, **17**, 149.
- CAVINA, G. & G. MORETTI, 1966. *J. Chromatog.*, **22**, 41.
- FRANCE, J. T., & B. S. KNOX, 1966. *J. Gas Chromatog.*, **4**, 173.
- GOULD, D., L. FINCKENOR, E. B. HERSHBERG, J. CASSIDY & P. L. PERLMAN, 1957. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4472.
- KROMAN, H. S., M. L. MOSKOVITZ, S. R. BENDER & A. N. BREST, 1966. *J. Gas Chromatog.*, **4**, 147.
- SCHULZ, E. P., 1965. *J. Pharm. Sci.*, **54**, 147.
- UMBREIT, A. R. & J. V. WISNIEWSKI, 1954. *Facts and Meth.*, **5**, 9.