

ЭКСПРЕССНЫЙ ВАРИАНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЦИКЛИНА В МОЧЕ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Фомин А.Н.¹, Хомов Ю.А.²

¹ ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия», Ярославль, Россия (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5)

² ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Полевая, 2) homov@pfa.ru

Изучены условия электрофоретического исследования доксициклина на отечественном приборе для капиллярного электрофореза «Нанофор 01», с использованием кварцевого капилляра.

Рабочий электролит – боратный буферный раствор pH 10,2; растворитель пробы – боратный буферный раствор pH 8,0.

Условия электрофореза: ввод пробы под давлением 15 сек, катод со стороны детектора (нормальная полярность), напряжение 15 kV, электролит по обе стороны капилляра, время 20 мин.

Регистрация компонентов с помощью встроенного спектрометрического детектора. Запись и обработка данных с использованием программного обеспечения «МультиХром-КЭФ». Определение доксициклина в УФ-области спектра при длине волны 346 нм по методу внешнего стандарта. Для концентрирования проб использован приём стекинга. Пробоподготовка мочи осуществлялась последовательной фильтрацией проб через мембранные микрофильтры и с помощью самопроточной мини-колонки «Акрилекс Р-10», что устраняло мешающее влияние белковых компонентов.

Ключевые слова: доксициклин, моча, прием стекинга, капиллярный электрофорез, спектрометрический детектор.

EXPRESS VERSION OF DETERMINATION OF DOXYCYCLINE IN URINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Phomin A.N.¹, Khomov Y.A.²

¹ Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russia (150000, Yaroslavl, Revolyutsionnaya st 5)

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614081, Perm, Poleyaya st 2), homov@pfa.ru

The conditions of electrophoretical investigation of doxycycline by home industrial appliance for capillary electrophoresis “Nanophor 01” with the help of quartz capillary are studied.

We used boric buffer solution pH 10,2 as performance electrolyte and boric buffer solution pH 8,0 as solvent of the sample.

The conditions of electrophoresis was the following: loading of the sample under the pressure during 5 sec, cathode was on the side of the detector (normal polarity), voltage 15 V, electrolyte was on the both side of the capillary, time 20 min.

Registration of the components was carried out with the help of inbuilt spectrometric detector. Recording and processing of the data were done with the help of software “MultiChrome-KEP”. Determination of doxycycline was performed at UV range of the spectrum at 346 nm in accordance with the method of external standart. The method of “stacking” was used for concentration of the samples. Preparation of the urine for analysis was realized by sequential filtration of the samples through membrane filters and also with the help of the self-flowing minicolumn “Akrilex R-10”. These ways obviated the interference of protein substances.

Key words: doxycycline, urine, method of “stacking”, capillary electrophoresis, spectrometric detector.

Одним из современных и перспективных электромиграционных методов в аналитической практике лекарственных веществ является капиллярный электрофорез.

Метод основан на разделении заряженных частиц компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре (в растворе электролита) под действием электрического поля (за счёт подачи высокого напряжения к концам капилляра) [1].

Капиллярный электрофорез характеризуется экспрессностью, высокой эффективностью (более сотни тысяч теоретических тарелок), чувствительностью, что позволяет использовать малые объёмы проб (~2–10 нл). Кроме того, чувствительность метода капиллярного электрофореза с УФ-детектированием может быть существенно повышена за счёт концентрирования образца непосредственно в капилляре (приём стекинга). Концентрирование образца происходит, когда ионы аналитов пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора и высокой ведущего электролита. В случае более низкой проводимости пробы образца (за счёт разбавления водой или электролитом), чем у ведущего электролита, в зоне образца возникает относительно высокое электрическое поле. Аналиты внутри зоны образца движутся с более высокой скоростью и, замедляясь на границе с зоной ведущего электролита, концентрируются. Стекинг образца применяется только к заряженным анализам.

Метод позволяет сочетать в автоматическом режиме процессы разделения исследуемой пробы на ингредиенты, их идентификацию и количественное определение при анализе одной и той же пробы с одновременным концентрированием соединения непосредственно в капилляре. Высокая селективность разделения в капиллярном электрофорезе обеспечивается за счёт рН ведущего электролита, изменения напряжения, температурного режима в системе, введения в состав буферного раствора маркеров [5–7].

Капиллярный электрофорез находит всё более широкое применение в анализе лекарственных средств, в том числе и в биологических средах [2–4].

Целью исследования явилось изучение возможности анализа доксициклина в моче капиллярным электрофорезом, с использованием отечественного прибора «Нанофор-01».

Электрофоретическое исследование доксициклина осуществляли на отечественном приборе «Нанофор-01», с использованием кварцевого капилляра (внутренний диаметр 30–80 мкм, общая длина до 1000 мм). Регистрацию компонентов проводили с помощью встроенного спектрофотометрического детектора с диапазоном длин волн 200–700 нм. Режим работы автоматический по заданной программе с непрерывным контролем текущих параметров. Запись и обработка данных производилась с использованием программного обеспечения «МультиХром-КЭФ».

Условия проведения капиллярного электрофореза доксициклина гидрохлорида

Рабочий электролит (РЭ) – боратный буферный раствор рН 10,2 имеет молярность по борной кислоте 0,15 М.

Растворитель пробы (РП) – боратный буферный раствор рН 8,0 имеет молярность по борной кислоте 0,03 М.

Рабочий стандарт (РС) – доксицилина гидрохлорид, отвечающий требованиям НД.

Подготовка капилляра – новый капилляр с внутренним диаметром 30 мкм последовательно промывали под давлением 1,5 бар: водой очищенной (3 мин), 1М-раствором хлористоводородной кислоты (3 мин), водой очищенной (3 мин), 1М-раствором натрия гидроксида (3 мин), водой очищенной (3 мин), рабочим электролитом (5 мин).

После этого проводили «холостой электрофорез» в рабочем электролите при условиях: катод со стороны детектора (нормальная полярность), напряжение 15 кV, электролит по обе стороны капилляра, время 15 мин.

При определении доксицилина в пробе с содержанием выше 0,1 мг/мл пробу растворяли в РЭ и вводили давлением в течение 15 сек, после чего проводили электрофорез при тех же условиях. Время анализа 20 мин. Полученные электрофореграммы при длинах волн 269 и 346 нм представлены на рисунках 1, 2.

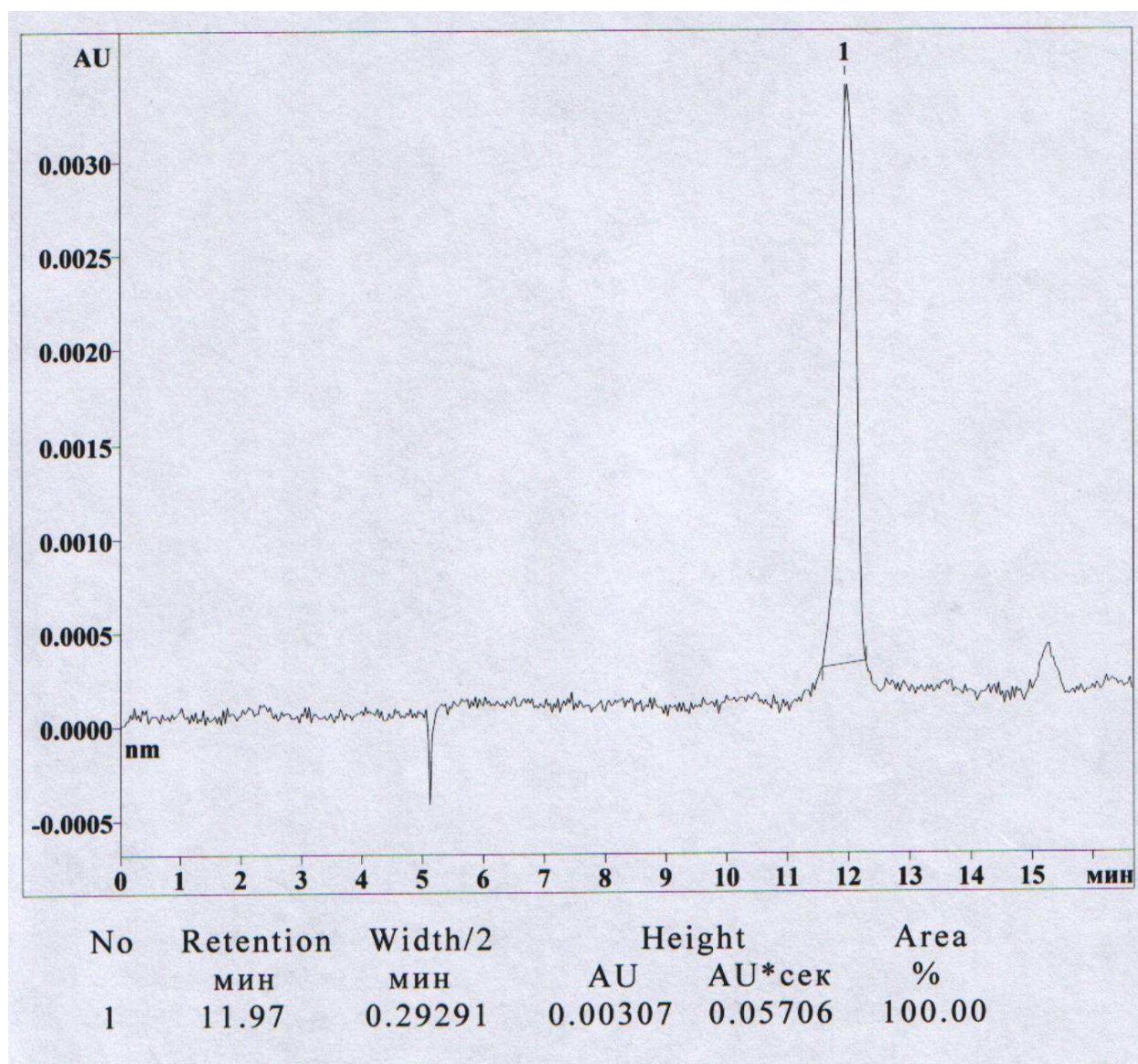


Рис. 1. Капиллярный электрофорез доксициклина (длина волны 269 нм). Доксициклин 0,1 мг/мл. Рабочий электролит – 0,15 М боратный буфер рН 10,2 по обе стороны капилляра, ввод давлением 15 сек, напряжение 15 кV, нормальная полярность, диаметр капилляра 30 мкм.

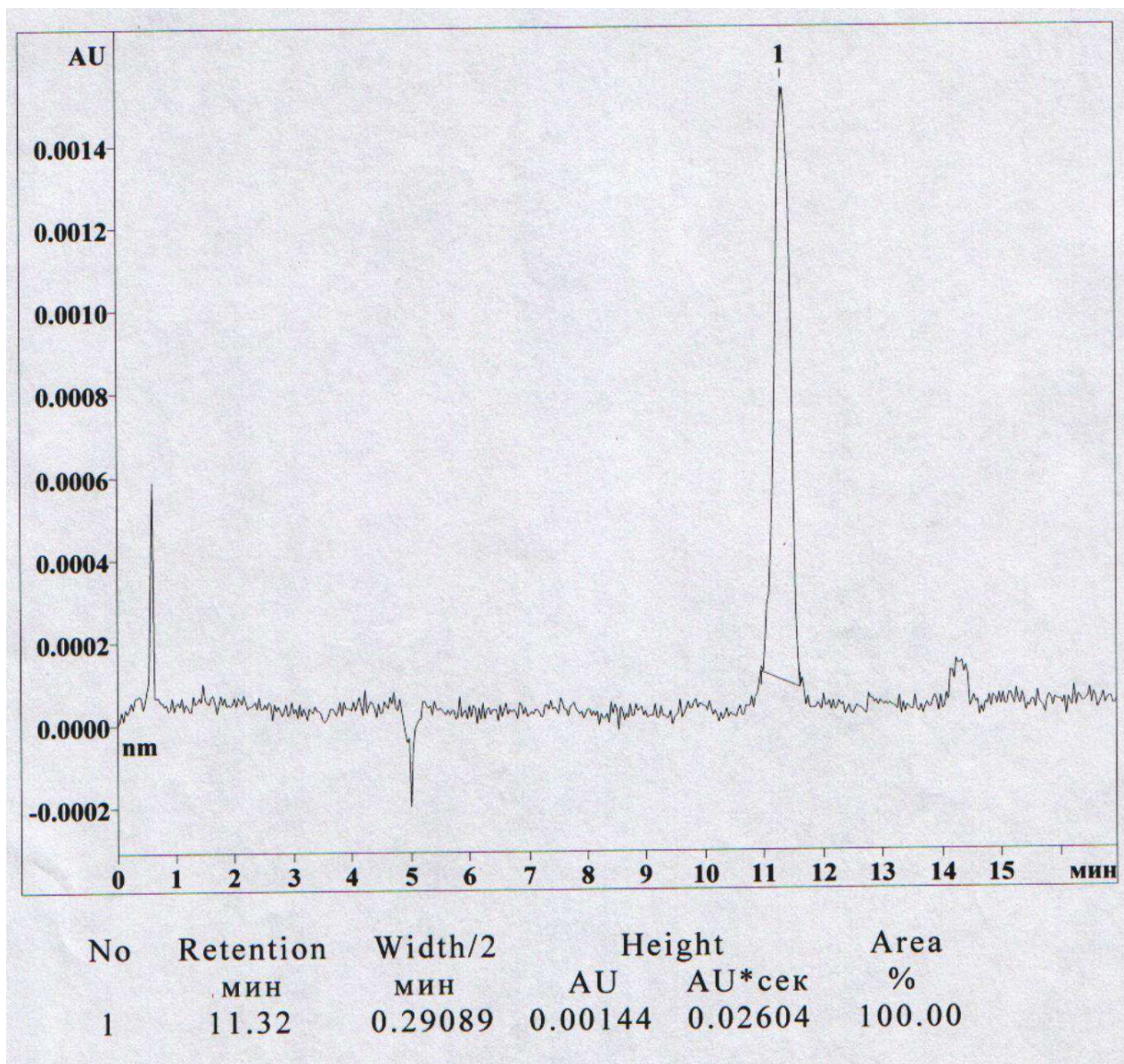


Рис. 2. Капиллярный электрофорез доксициклина (длина волны 346 нм). Доксициклин 0,1 мг/мл. Рабочий электролит – 0,15 М боратный буфер рН 10,2 по обе стороны капилляра, ввод давлением 15 сек, напряжение 15 кV, нормальная полярность, диаметр капилляра 30 мкм.

Как видно из рисунков 1, 2, уровень чувствительности обнаружения доксициклина при длине волны 346 нм значительно выше, чем при 269 нм, поэтому 346 нм избраны в качестве аналитической длины волны.

При определении доксициклина в пробе с содержанием менее 0,01 мг/мл проводили концентрирование пробы непосредственно на приборе на начальной стадии электрофоретического анализа, используя метод стекинга. Метод основан на том, что проба вводится в капилляр в буферном растворе, имеющем электропроводность в десять раз меньше, чем в РЭ (за счёт понижения ионной силы). В таком растворителе как электрофоретическая, так и электроосмотическая подвижность увеличиваются, и зона анализируемого вещества сужается. Для усиления этого эффекта нами использовано понижение значения рН буферного раствора – РП до рН 8,0 при значении рН РЭ – 10,2.

Далее обессоленная проба вводится под давлением 0,5 атм в течение 200 сек, при этом объём введённой пробы во много раз превышает предельно допустимый объём инъекции (1% от рабочей длины капилляра) при капиллярном электрофорезе. В наших условиях первоначальная проба занимает 24% от длины капилляра до окна детектора. Затем в течение 30 сек проводится электрокинетическое удаление буфера РП при обратной полярности рабочих электродов, с одновременным образованием суженной зоны на входе капилляра. Окончание процесса концентрирования фиксируется по току: в этот момент прекращается возрастание тока, и он выходит на плато. После этого полярность электродов меняется на стандартную, т.е. катод на стороне «окна» детектора, и начинается процесс электрофореза при напряжении 15 kV с детектированием элюата исследуемого вещества по поглощению при длине волны 346 нм. Электрофореграмма представлена на рисунке 3.

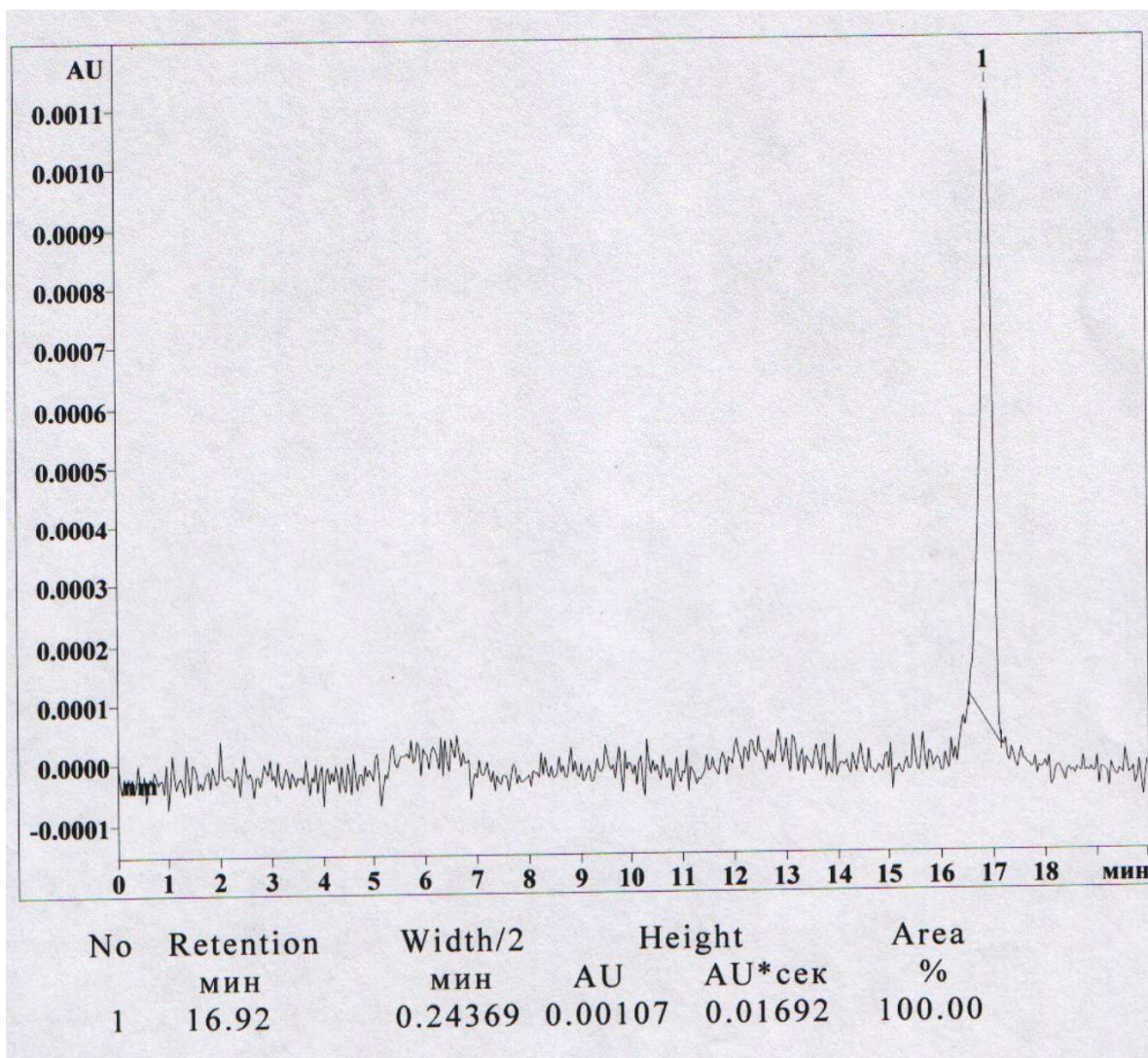


Рис. 3. Капиллярный электрофорез доксициклина (длина волны 346 нм) с использованием стеклинга. Доксициклин 5 мкг/мл. РЭ – 0,15 М боратный буфер рН 10,2, буфер-РП – 0,03 М борная кислота рН 8,0, ввод давлением 200 сек, напряжение 15 кV, нормальная полярность, диаметр капилляра 30 мкм. Отгонка буфера-растворителя 30 сек при обратной полярности.

Для построения градуировочного графика количественного определения доксициклина была выбрана также длина волны детекции 346 нм как наиболее селективная и удовлетворяющая по уровню чувствительности. Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций 10–500 мкг/мл. Градуировочный график строго линеен. Расчёт концентрации доксициклина проводили методом сравнения со стандартом по формуле:

$$C_x = \frac{AU_{сек_x} \cdot C_{см}}{AU_{сек_{см}}},$$

где:

C_x – исследуемая концентрация;

$C_{ст}$ – концентрация стандарта;

$AU_{сек_x}$ – оптическая плотность исследуемой пробы;

$AU_{сек_{ст}}$ – оптическая плотность стандарта.

Для оценки погрешности определения доксициклина капиллярным электрофорезом проводили пять параллельных исследований с концентрацией 100 мкг/мл в описанных выше условиях. Результаты определений представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Статистическая обработка результатов количественного определения доксициклина капиллярным электрофорезом

№ п/п	Доксициклин, мкг/мл	AU·сек	Определено, мкг/мл	Метрологические характеристики
1	100,0	0,02625	101,44	$\bar{x}=99,95$ $S=1,36$ $S_x=0,61$ $\Delta \bar{x}=1,70$ $\bar{\varepsilon}=1,70\%$
2	100,0	0,02620	101,26	
3	100,0	0,02553	98,67	
4	100,0	0,02552	98,63	
5	100,0	0,02581	99,74	

Как видно из таблицы 1, при статистической обработке данных, полученных в ходе количественного определения доксициклина, отражается вполне удовлетворительная сходимость результатов. Рассчитанное стандартное отклонение среднего результата (критерий воспроизводимости результатов измерений) находится в пределах критерия приемлемости (менее 2% по валидационной оценке). Таким образом, капиллярный электрофорез («Нанофор – 01») может быть использован для анализа доксициклина.

Изучение возможности определения доксициклина в моче капиллярным электрофорезом («Нанофор – 01»)

Инъекция пробы мочи непосредственно в капилляр не позволяет выделить пик доксициклина на фоне пиков многочисленных эндогенных компонентов. Кроме того, чувствительность фотометрического детектирования в капиллярном электрофорезе («Нанофор – 01») ограничена малой длиной оптического пути – она равна внутреннему диаметру капилляра. Поэтому, без предварительного концентрирования пробы, в спектральной области селективного поглощения доксициклина (346 нм) удаётся уверенно фиксировать только концентрации порядка 100 мкг/мл и более.

Предложена экспрессная методика пробоподготовки мочи (без экстракционного концентрирования). Для чего проба последовательно фильтруется через бумажный фильтр

(или через стекловолоконный микрофильтр с диаметром пор 1–2 мкм), затем через мембранный (инертный к белкам) микрофильтр с диаметром пор 0,2 мкм, после чего обессоливается и депигментируется с помощью самопроточной мини-колонки с бисерным полиакриламидным гелем «Акрилекс Р-10». В мини-колонку с объёмом слоя геля 9 мл вносят 2 мл мочи, затем она промывается буфером-РП для капиллярного электрофореза (0,03 М раствор натрия бората, рН 8,0). Первые 5 мл элюата сливают, а следующие 2,5 мл собирают и используют для отбора пробы на анализ. Весь процесс пробоподготовки занимает 10 мин, причём несколько проб мочи может обрабатываться одновременно на нескольких идентичных мини-колонках. При этом белковая фракция мочи элюируется в первых 5 мл и не используется в анализе, а большинство низкомолекулярных компонентов элюируются из мини-колонки с гелем в объёме, большем 7,5 мл. Такая пробоподготовка в сочетании с избирательным детектированием при длине волны 346 нм обеспечивает отсутствие фоновых пиков при анализе доксициклина.

Для определения чувствительности метода при анализе доксициклина в моче капиллярным электрофорезом («Нанофор-01») проводили концентрирование пробы в капилляре прибора методом стекинга и последующее электрофоретическое исследование доксициклина в приведённых выше условиях. Электрофореграмма мочи с содержанием доксициклина 5 мкг/мл представлена на рисунке 4.

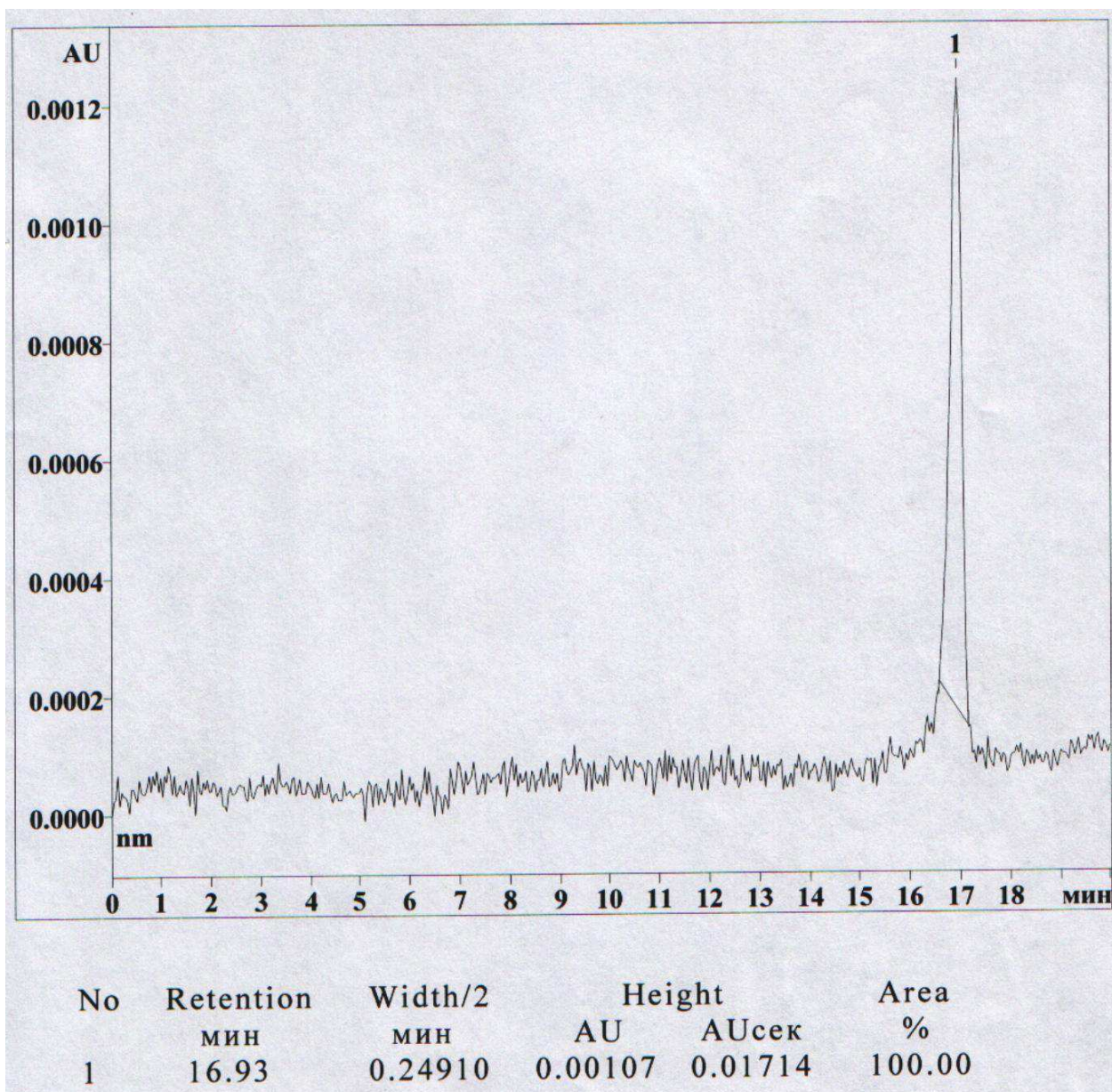


Рис. 4. Анализ доксициклина в моче капиллярным электрофорезом (длина волны 346 нм). Доксициклин 5 мкг/мл (моча). Рабочий электролит – 0,15 М боратный буфер рН 10,2, буфер-растворитель – 0,03 М борная кислота рН 8,0, ввод давлением 200 сек, напряжение 15 кV, нормальная полярность, диаметр капилляра 30 мкм. Отгонка буфера-растворителя 30 сек при обратной полярности.

Таким образом, за счёт пробоподготовки и селективного детектирования удаётся полностью устранить наложение мешающих определению доксициклина низкомолекулярных компонентов мочи, а за счёт обогащения пробы стекингом удаётся обеспечить такую концентрационную чувствительность, при которой доксициклин надёжно определяется при концентрациях меньше 5 мкг/мл, что значительно ниже терапевтического уровня.

Выводы

1. Процедура пробоподготовки мочи для анализа на доксициклин заключается в

последовательном фильтровании пробы через бумажный или стекловолоконный микрофильтр, затем через мембранный (инертный к белкам) микрофильтр с диаметром пор 0,2 мкм. После чего проба депигментируется через самопроточную мини-колонку «Акрилекс Р-10».

2. Безэкстракционная пробоподготовка в сочетании с избирательным УФ-детектированием при длине волны 346 нм позволяет полностью устранить наложение пиков, мешающих определению доксициклина, низкомолекулярных компонентов мочи.

3. За счет использования приема обогащения пробы стекингом удается обеспечить такую концентрационную чувствительность, при которой доксициклин надежно определяется при концентрации менее 5 мкг/мл (ниже терапевтического уровня).

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – Вып. 1. – М. : Медицина, 1987. – 336 с.
2. Идентификация ряда азотсодержащих соединений основного характера в присутствии соэкстрактивных веществ мочи и крови методом капиллярного электрофореза / А.Н. Фомин [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2010. – № 9. – С. 46-48.
3. Использование метода капиллярного электрофореза для изучения фармакокинетики бутаконазола нитрата / С.П. Сенченко, К.С. Чеченева, М.В. Гаврилин [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2009. – № 11. – С. 7-10.
4. Фомин А.Н. Валидационная оценка методики определения доксициклина в моче спектрофотометрическим методом после электрофоретического выделения / А.Н. Фомин, Ю.А. Хомов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – [URL:www.science-education.ru/103-6159](http://www.science-education.ru/103-6159) (дата обращения: 18.05.2012).
5. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations / I. Velikinac [et al.] // Farmaco. – 2004. – Vol. 59. – № 5. – P. 419-424.
6. Development and validation of a method for quantitative determination of econazole nitrate in cream formulation by capillary zone electrophoresis / A.A. Gaona-Galdos [et al.] // J. of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1192. – № 2. – P. 301-305.
7. Pandeewaran M. Electronic, Raman and FT-IR spectral investigations of the charge transfer interactions between ketoconazole and povidone drugs with iodine / M. Pandeewaran, K.P. Elango // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – Vol. 72. – № 4. – P. 789-795.

Рецензенты

Михалев А.И., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздравсоцразвития, г. Пермь.

Ярыгина Т.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии очного факультета, ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздравсоцразвития, г. Пермь.