

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРТИКАИНА В МОЧЕ КАПИЛЛЯРНЫМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ («КАПЕЛЬ -105»)

Фомин А. Н.², Хомов Ю. А.¹, Джурко Ю. А.²

¹ ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь
Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Полевая, 2) homov@pfa.ru

² ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль
Ярославль, Россия (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5)

Разработаны условия электрофоретического количественного определения артикаина на отечественном приборе для капиллярного электрофореза «Капель - 105». Рабочий электролит (РЭ) буферный раствор Бриттона – Робинсона pH 2,3; растворитель пробы – РЭ, разбавленный в 10 раз водой. Ввод пробы – давлением (30 м/бар × 15 сек). Положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение 20 кВ. Определение артикаина спектрофотометрически при длине волны 270 нм. Запись и обработка данных с помощью программного обеспечения «МультиХром для Windows». Для концентрирования пробы использовали приём «стекинга».

Пробоподготовка мочи осуществлялась прямой жидкостной экстракцией хлороформом при pH 9 с последующей рекстракцией артикаина в рабочий электролит, разбавленный в 10 раз водой, что устраняло мешающее влияние экстрактивных балластных веществ. Проведена валидационная оценка методики определения артикаина.

Ключевые слова: артикаин, моча, экстракция, прием «стекинга», капиллярный электрофорез, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF DETERMINATION OF ARTICAIN IN URINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS (“KAPEL-105”)

Phomin A. N.², Khomov Y. A.¹, Dzhurko Y. A.²

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, Perm,
Perm, Russia (614081, Perm, Polevaya st 2), homov@pfa.ru

² Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl
Yaroslavl, Russia (150000, Yaroslavl, Revolyutsionnaya st 5)

The conditions of quantitative determinations of articaïne by home industrial appliance for capillary electrophoresis “Kapel-105” are developed. We used Britton-Robinson’s buffer pH 2,3 as a performance electrolyte (PE). PE was diluted in 10 times by water and used as a solvent of the sample. Loading of the sample was under the pressure (30 m/bar × 15 sec). The positive electrode was on the side of the loading of PE, voltage was 20 kV. Detection of articaïne was performed at 270 nm. Recording and processing of the data were done with the help of software “MultiChrome for Windows”. The method of “stacking” was used for concentration of the samples.

Preparation of the urine for analysis was realized by direct liquid-liquid extraction with chloroform at pH 9 and subsequent re-extraction of articaïne to the performance electrolyte which was diluted in 10 times by water. These ways obviated the interference of ballast substances. The validation assessment of the method of determination of articaïne was performed.

Key words: articaïne, urine, extraction, method of “stacking”, capillary electrophoresis, validation.

Капиллярный электрофорез является относительно новым и развивающимся методом разделения сложных смесей, позволяющим анализировать ионогенные и нейтральные соединения различной природы, в том числе лекарственные средства, с высокой эффективностью и экспрессностью, программным обеспечением хода анализа и расчёта результатов [2, 3].

Целью исследования явились изучение возможности определения и валидационная оценка результатов анализа артикаина [4] в моче капиллярным электрофорезом на приборе «Капель-105».

Важными вопросами при количественном определении лекарственных веществ в биологических жидкостях и субстратах (в том числе и моче) методом капиллярного электрофореза являются вопросы пробоподготовки (изолирование из объектов и концентрирование исследуемых соединений). В биообъектах возможно присутствие различных эндогенных компонентов, на фоне которых затрудняется детектирование искомым соединений в микрограммовых количествах. Кроме того, фотометрическое детектирование разделённых компонентов происходит непосредственно в капилляре, вследствие этого чувствительность детекции ограничена малой длиной оптического пути, равного внутреннему диаметру капилляра.

При разработке методики количественного определения артикаина в моче с использованием капиллярного электрофореза («Капель-105») эти осложняющие проблемы решали тем, что на этапе пробоподготовки для получения в достаточной степени очищенной и сконцентрированной пробы использовали жидкостно-жидкостную экстракцию хлороформом с последующим реэкстрагированием исследуемых компонентов в рабочий электролит, разбавленный водой в 10 раз. При этом перевод исследуемых компонентов в рабочий электролит, разбавленный водой в 10 раз, позволяет в процессе электрофореза в кварцевом капилляре дополнительно осуществить концентрирование пробы за счёт явления «стекинга». Данное явление происходит, когда ионы аналитов пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора образца и высокой – ведущего электролита. В случае, если матрица образца имеет значительно более низкую проводимость (обычно за счёт разбавления буфером или водой), чем ведущий электролит, в зоне образца возникает относительно высокое электрическое поле. Аналиты внутри зоны образца движутся с более высокой локальной скоростью, и, замедляясь на границе с зоной ведущего электролита, концентрируются.

При разработке методики количественного определения артикаина были использованы ранее изученные условия электрофореза с целью его идентификации на приборе «Капель-105» [6].

На основании проведённых исследований оптимальными условиями электрофореза являются:

1. Рабочий электролит (РЭ) – буферный раствор Бриттона – Робинсона, рН 2,3.
2. Растворитель пробы (РП) – РЭ, разбавленный в 10 раз водой.
3. Ввод пробы – давлением (30 мбар * 15 сек).

4. Положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: 20 кВ.

5. Детектирование – встроенный УФ-фотометрический детектор, 270 нм.

6. Последовательная промывка капилляра между анализами:

а) по полной схеме (между первым и четвёртым анализами): 0,5М раствором хлористоводородной кислоты – 10 мин, водой очищенной – 10 мин, 0,5М раствором натрия гидроксида – 10 мин, водой очищенной – 10 мин, РЭ – 10 мин. Проведение холостого электрофореза – 15 мин: положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: 20 кВ.;

б) по короткой схеме (между вторым и третьим анализами): РЭ – 10 мин. Проведение холостого электрофореза в тех же условиях, как и по полной схеме.

Запись и обработка данных анализа проводилась с помощью программного обеспечения «МультиХром для Windows».

При идентификации артикаина на ЭФГ нами рассчитаны наблюдаемое время миграции (t_m), исправленное время миграции (t_i) с использованием в качестве маркера ЭОП бензилового спирта, что позволило устранить колебания времени миграции. Значение t_i использовали для построения ЭФС, с помощью которого рассчитывали количественные характеристики: константу ионизации (pK_a) и внутренние коэффициенты подвижности P_i , дающие более полное представление об ионном состоянии вещества и увеличивающие надёжность идентификации методом капиллярного электрофореза [6].

При количественном определении для подтверждения фактора линейности строили график зависимости фотометрических сигналов (площади пиков) от концентрации артикаина на 5 уровнях концентраций его стандартных растворов [1, 5]. Готовили серию разведений стандартного раствора артикаина в буферном растворе Бриттона – Робинсона pH 2,3, разбавленном в 10 раз водой. Электрофоретические исследования полученных рабочих стандартных растворов проводили с использованием прибора «Капель-105» в избранных условиях. Запись и обработку полученных электрофореграмм производили с помощью программного обеспечения «МультиХром для Windows». Электрофореграмма артикаина с концентрацией 15 мкг/мл представлена на рисунке 1.

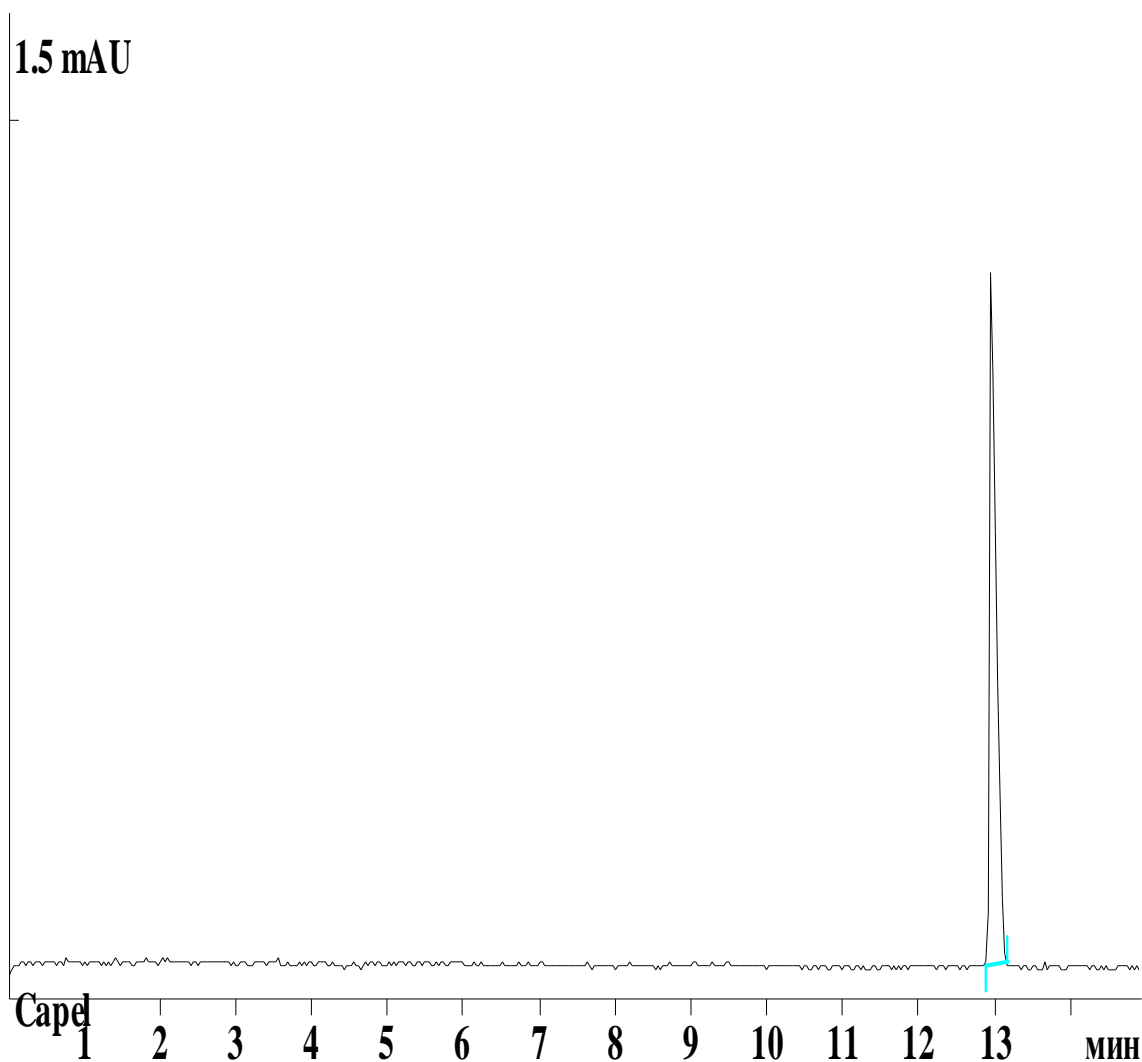


Рисунок 1. Электрофореграмма артикаина (15 мкг/мл). «Капель-105»

РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, рН 2,3.

Ввод пробы: давлением (30 мбар * 15 сек).

Рабочее напряжение: 20 кВ. Детектирование: 270 нм.

Линейная зависимость фотометрического сигнала от концентрации артикаина, наблюдаемая в интервале концентраций от 1 до 20 мкг/мл, была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов на ПК. Полученное уравнение имеет вид:

$$Y = 0,4798 X - 0,0368$$

Критерием приемлемости линейности является и коэффициент корреляции, который составил 0,9999. Его величина близка к 1 и совокупность данных можно описать прямой линией, что и видно из рисунка 2.

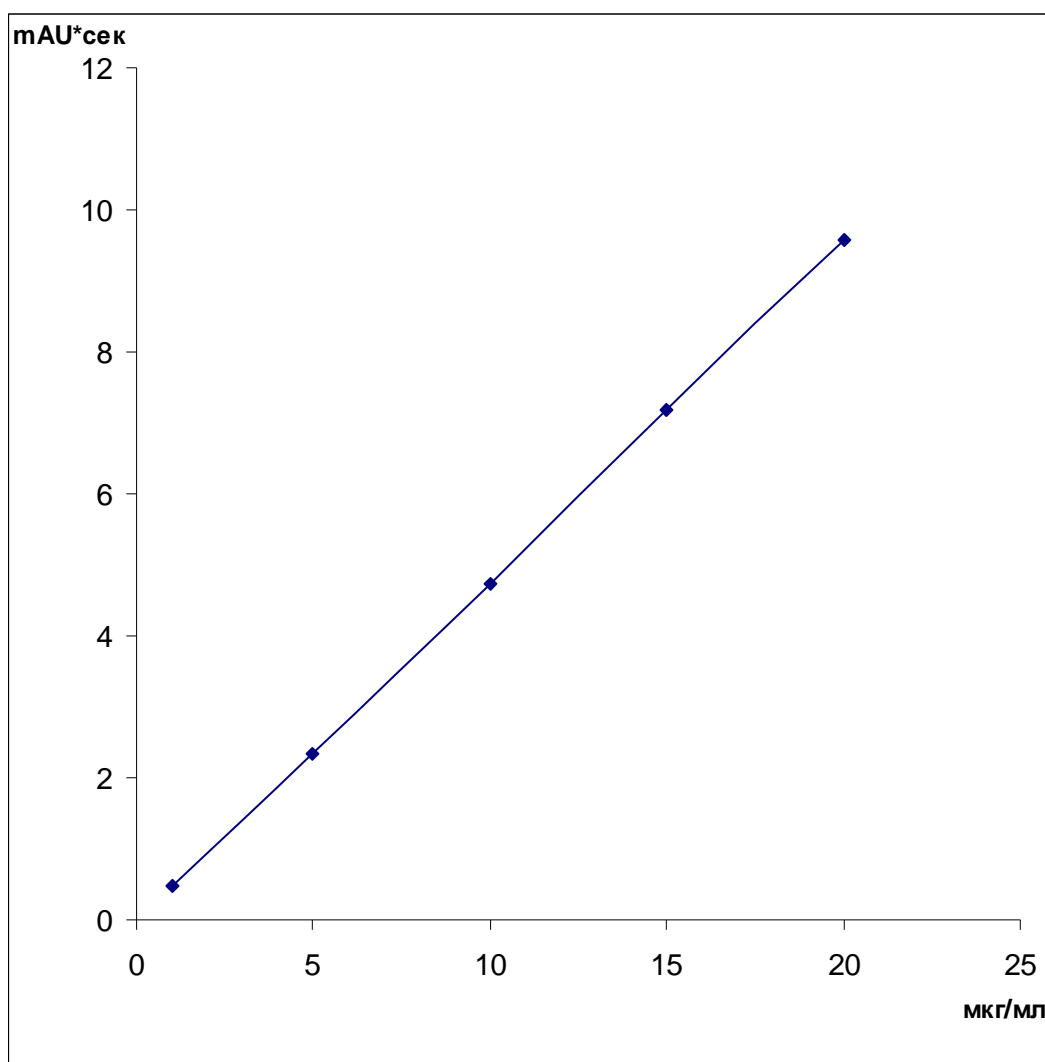


Рисунок 2. Калибровочный график для количественного определения артикаина методом капиллярного электрофореза ("Капель-105")

Таким образом, методика валидна по критерию линейности, и в данных интервалах концентраций обеспечивает определение с требуемой правильностью.

Для результатов анализа при исследовании биологических жидкостей важнейшее значение имеет способ пробоподготовки анализируемого вещества.

При изучении влияния рН среды, природы органического растворителя, кратности экстрагирования на степень экстракции артикаина из водных растворов было установлено, что максимальное количество артикаина экстрагируется хлороформом при рН 9 при однократной экстракции объёмом 5 мл и соотношении водной и органической фаз 1 : 1.

Для устранения фонового влияния сопутствующих балластных веществ мочи использовали приём реэкстракции исследуемых компонентов из хлороформного извлечения в рабочий электролит, разбавленный водой в 10 раз.

При количественном определении артикаина в условиях модельного эксперимента к 1 мл мочи с известным содержанием исследуемого вещества добавляли 4 мл буферного

раствора Бриттона – Робинсона pH 9 и проводили экстракцию 5 мл хлороформа (шейкер, 10 мин). Эмульсии разрушали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). Хлороформный экстракт отделяли, добавляли к нему 1,0 мл РП (буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,3, разбавленного в 10 раз водой) и проводили реэкстракцию (шейкер, 10 мин). Реэкстракт отделяли, центрифугировали в пробирках для образца типа «эппендорф» в мини-центрифуге («MiniSpin plus», 10000 об/мин, 5 мин) и использовали для количественного определения артикаина по разработанной электрофоретической методике. Результаты определения артикаина в моче представлены в таблице 1.

Таблица 1

Количественное определение артикаина в моче методом капелльного электрофореза
(Капель-105)

Концентрация артикаина в модельной смеси, мкг/мл	Найдено артикаина после изолирования		Метрологические характеристики
	мкг/мл	%	
20	14,65	73,25	$S = 0,48$
	14,76	73,80	$S_{\bar{x}} = 0,28$
	14,57	72,85	$\Delta \bar{x} = 1,20$
	$\bar{x}_{\text{ср.}} 14,66$	73,30	$\bar{\epsilon} = 1,64$
1	0,718	71,80	$S = 0,77$
	0,713	71,30	$S_{\bar{x}} = 0,45$
	0,727	72,70	$\Delta \bar{x} = 1,94$
	$\bar{x}_{\text{ср.}} 0,719$	71,93	$\bar{\epsilon} = 2,70$
0,5	0,358	71,60	$S = 2,80$
	0,338	67,60	$S_{\bar{x}} = 1,62$
	0,331	66,20	$\Delta \bar{x} = 6,97$
	$\bar{x}_{\text{ср.}} 0,342$	68,47	$\bar{\epsilon} = 10,18$

Как видно из таблицы, при статистической обработке данных, полученных в ходе количественного определения артикаина в модельных пробах мочи на трёх уровнях концентраций отражается вполне удовлетворительная сходимость результатов в пределах рекомендуемой аналитической области. Рассчитанное стандартное отклонение среднего результата находится в пределах критерия приемлемости. Методика не отягощена грубой и систематической ошибкой, является правильной и позволяет получать воспроизводимые результаты.

Таким образом, разработанная методика применима для количественного определения артикаина в моче и может быть рекомендована для использования при химико-токсикологических анализах.

Выводы

1. Разработана методика определения артикаина в моче на основе прямой экстракции хлороформом с последующей рекстракцией анализируемого вещества в рабочий электролит, разбавленный водой, и электрофоретического исследования на приборе «Капель - 105».
2. Показано, что по разработанной методике пробоподготовки балластные вещества мочи не мешают фотометрическому определению артикаина.
3. Проведена валидационная оценка методики определения артикаина. При статистической обработке полученные результаты находятся в пределах критериев приемлемости.

Список литературы

1. Аладышева, Ж. И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж. И. Аладышева, В. В. Беляев, В. В. Береговых // Фармация. – 2008. – №7. – С. 9 – 14.
2. Идентификация ряда азотсодержащих соединений основного характера в присутствии созкстрактивных 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 бутконазола нитрата / С. П. Сенченко, К. С. Чеченева, М.В. Гаврилин [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2009. – №11. – С.7-10.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства: 16-е изд. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
5. Фомин А. Н. Валидационная оценка методики определения доксицилина 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).
6. Фомин А. Н. Идентификация артикаина и бупивакаина методом капиллярного электрофореза / А. Н. Фомин, А. В. Шпак, А. В. Смирнова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – М., 2010. – №7. – С. 68 – 72.

Рецензенты:

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

Гейн В. Л., д. хим. н., профессор, зав. кафедрой физической и коллоидной химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.