

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КАК ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Хомов Ю. А.¹, Фомин А. Н.²

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

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

Метод капиллярного электрофореза является одним из наиболее перспективных и находит все более широкое применение в зарубежной и отечественной аналитической практике, в том числе в анализе лекарственных веществ с целью идентификации и количественного определения нативного вещества и его метаболитов в биологических средах. В статье на основе литературных данных изложены принципы и терминология капиллярного электрофореза, дается оценка метода и область применения. Используются преимущественно кварцевые капилляры и спектрофотометрическое детектирование в УФ-области. Однако находит применение и электрохимическое детектирование: амперометрические и вольтамперометрические детекторы; масс-спектроскопия, лазерная флуоресценция. Капиллярный электрофорез применяется и для определения нелетучих примесей в лекарственных веществах и составляет конкуренцию методу ВЭЖХ, отличаясь очень высокой эффективностью и сводя к минимуму размытие пиков. Увеличение количества публикаций в отечественных научных журналах служит подтверждением значимости метода капиллярного электрофореза.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, принципы, оценка метода, область применения, детектирование.

CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS THE HIGH EFFECTIVE ANALYTICAL METHOD

Khomov Y. A.¹, Fomin A. N.²

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

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

Capillary electrophoresis is the one of the most perspective method of analysis. It is finding increasing use in foreign and domestic analytical practice including the analysis of the medicines on purpose of identification and quantitative determination of native substance and its metabolites in biological samples. The principles and terminology of capillary electrophoresis are presented in the article based on literary data. Estimation of the method and its scope are also given. The quartz capillaries and spectrophotometrical detection in UV area are preferentially use. However electrochemical detection (amperometric and voltamperometric detectors), mass spectrometry, laser fluorescence are finding use. Capillary electrophoresis is applied also for determination of nonvolatile admixtures in medicinal substances. It competes with the HPLC and differs very high efficiency with reducing impairment of quality of the peaks. Increase in quantity of publication in domestic scientific magazines serves as confirmation of significance of the method of capillary electrophoresis.

Key words: capillary electrophoresis, principles, method assessment, scope, detection.

Метод анализа – капиллярный электрофорез – на сегодняшний день является одним из наиболее перспективных и высокоэффективных методов разделения и анализа сложных смесей на составляющие компоненты и находит всё более широкое применение – особенно в зарубежной аналитической практике, в том числе и лекарственных средств [4, 10, 14, 24]. Метод характеризуется экспрессностью, микрообъемами анализируемого раствора, отсутствием колонки и твёрдого сорбента, проблем с его «старением» (в отличие от ВЭЖХ), физической и химической деструкции и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы, а также практически не требуется органических растворителей [5, 11].

Метод капиллярного электрофореза (КЭФ) основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля за счёт подачи высокого напряжения к концам капилляра.

Наиболее распространёнными вариантами метода КЭФ являются: капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ).

КЗЭ – метод разделения, реализуемый в капиллярах и основанный на различии в электрокинетических подвижностях заряженных частиц как в водных, так и в неводных электролитах.

МЭКХ – вариант капиллярного электрофореза, который позволяет проводить разделение соединений ионного и нейтрального характера при использовании поверхностно-активных веществ (ПАВ). Разделение электронейтральных соединений осуществляется благодаря введению в состав ведущего электролита поверхностно-активных веществ – мицеллообразователей. Чаще всего используют анионный ПАВ (например, додецилсульфат натрия – ДДСН) в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования, что приводит к формированию так называемой «псевдостационарной фазы», и аналиты распределяются между мицеллой и буферным электролитом согласно их гидрофобности.

Термины. Учитывая основной принцип разделения в КЭФ – электромиграционный, была сформирована собственная терминологическая база метода капиллярного электрофореза, которая с 2002 г. рекомендована к использованию ИЮПАК, а также – лежит в основе «Практического руководства по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» [6]. Основные из них:

-Время миграции (t_m) – время, необходимое компоненту для прохождения им эффективной длины капилляра ($L_{эфф}$) от зоны ввода пробы (начала капилляра) до зоны детектирования;

-Электроосмотический поток ЭОП – течение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля. Время, необходимое жидкости для преодоления эффективной длины капилляра вследствие возникающего ЭОП, называют временем ЭОП ($t_{эоп}$) и экспериментально определяют из электрофореграммы по времени миграции нейтрального компонента – маркера ЭОП.

-Подвижность ЭОП ($\mu_{эоп}$) – представляет собой отношение скорости ЭОП к напряженности электрического поля. Скорость ЭОП положительна при направлении движения жидкости от входного участка капилляра к детектору и отрицательна при обратном направлении. В свою очередь, скорость ЭОП вычисляют по формуле:

$$v_{эоп} = L_{эфф} / t_{эоп}.$$

Напряженность электрического поля находят по отношению приложенной разности потенциалов (U) к общей длине капилляра ($L_{\text{общ}}$). Таким образом, подвижность ЭОП вычисляют из экспериментальных данных по формуле: $\mu_{\text{эоп}} = L_{\text{общ}} \times L_{\text{эфф}} / t_{\text{эоп}} \times U$.

При расчете подвижностей длину капилляра выражают в сантиметрах, время миграции в секундах, а разность потенциалов в вольтах. Время миграции как параметр качественного анализа принято выражать в минутах.

-Электрофоретическая подвижность частицы ($\mu_{\text{эф}}$) – по аналогии с предыдущей величиной представляет собой следующее отношение:

$$\mu_{\text{эф}} = L_{\text{общ}} \times L_{\text{эфф}} / t_{\text{м}} \times U.$$

В отличие от $\mu_{\text{эоп}}$ электрофоретическую подвижность частицы нельзя определить непосредственно из электрофореграммы, поэтому из результатов эксперимента находят общую подвижность, которая выражается (при положительной скорости ЭОП) в виде следующей формулы:

$$\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{эоп}} + \mu_{\text{эф}}$$

Определив из эксперимента $\mu_{\text{общ}}$ и $\mu_{\text{эоп}}$, находят $\mu_{\text{эф}}$.

Эффективность разделения. Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью (более сотни тысяч теоретических тарелок). Это объясняется прежде всего уникальным свойством ЭОП в кварцевом капилляре, который заключается в формировании плоского профиля потока (в отличие от параболического в ВЭЖХ), не вызывающий при движении зон компонентов практически их уширения. Очень высокая эффективность разделения позволяет широко применять метод для выявления не только близких по строению веществ (белков, пептидов, аминокислот, наркотиков, витаминов, красителей и др.), но и для контроля качества, технологического контроля, идентификации лекарственных препаратов, исследования фармакокинетики [3, 16, 19, 30].

Эффективность, выраженная числом теоретических тарелок, может быть определена непосредственно из электрофореграммы.

К снижению эффективности могут привести ряд факторов: увеличение зоны вводимой пробы (определяемая длительность ввода); образование температурного градиента (за счёт разницы температуры в центре капилляра и на внутренней стенке капилляра). Возникающий вследствие этого градиент вязкости приводит к тому, что вещество у стенки перемещается медленнее, чем в центре, что вызывает уширение полос и снижение эффективности; адсорбция на стенках капилляра, приводящая к искажению формы пиков (появление хвостов), и другие факторы. Все эти параметры управляются путём создания оптимальной схемы разделения.

Чувствительность метода. Основным способом детектирования в системах капиллярного электрофореза («Капель – 103 Р», «Капель – 104 Т», «Капель – 103 РТ», «Капель – 104 М», «Капель – 105», «Капель – 105 М») отечественного производителя – фирмы «Люмекс», является фотометрический [6].

Особенностью фотометрического детектирования разделённых аналитов в условиях кварцевого капилляра является малая толщина слоя (что обусловлено внутренним диаметром капилляра), а также – введением очень малых объёмов проб (~2-10 нл).

Чувствительность метода КЭФ с УФ-детектированием может быть существенно повышена за счёт концентрирования образца непосредственно в капилляре. Одним из наиболее общих подходов к увеличению концентрационной чувствительности в КЭФ является приём стекинга. Концентрирование образца происходит, когда ионы аналитов пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора и высокой – ведущего электролита. В случае если проба образца имеет значительно более низкую проводимость (за счёт разбавления водой или буфером), чем ведущий электролит, 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 аналитам.

Чувствительность метода КЭФ с УФ-детектированием может быть также повышена за счет увеличения длины оптического пути при использовании капилляров с расширенным световым путем. Существует несколько способов: зону детектирования выполняют в форме пузырька, возрастание чувствительности в 3–5 раз; используют капилляры Z-формы, увеличение чувствительности в 20–40 раз.

Важной задачей любого сепарационного метода является селективность разделения компонентов пробы. Повышение селективности разделения в КЭФ может быть обеспечено за счёт изменения рН ведущего электролита, изменения напряжения, температурного режима в системе, введения в состав буферного раствора макроциклов, органических растворителей и др.

Применение метода капиллярного электрофореза при аналитических исследованиях.

Капиллярный электрофорез как новый и быстро развивающийся метод широко применяется в аналитической практике лекарственных средств, в том числе и в биологических средах с целью идентификации и количественного анализа [15, 17, 18, 31]. Используются преимущественно кварцевые капилляры и УФ-детекторы [9]. Однако находят применение в зарубежной практике и электрохимическое детектирование [23, 29], амперометрические детекторы типа «отражающая стенка» с электродами из углеродного волокна, меди [20, 22,

26], вольтамперометрические детекторы [12], а также масс-спектрометрия [25, 28], лазерная флуоресценция [27].

Капиллярный электрофорез применяется и при определении нелетучих примесей [1, 21, 28] в лекарственных веществах и составляет конкуренцию методу ВЭЖХ, отличаясь очень высокой эффективностью и сводя к минимуму размытие пиков. Как правило, метод используется для анализа водных растворов (буферные растворы), с добавлением ПАВ, либо не содержащих ПАВ [11]. В отдельных работах показаны возможности использования неводного капиллярного электрофореза [13].

Ряд сведений об использовании капиллярного электрофореза отмечен в отечественной литературе. Работы такого типа в существенной степени инициированы созданием отечественных систем капиллярного электрофореза «Капель».

Использование сепарационного метода анализа позволяет эффективно решать вопросы стандартизации лекарственных препаратов сложного состава. Была изучена возможность применения капиллярного электрофореза для качественного обнаружения и количественного определения бутконазола нитрата в лекарственном препарате и биологических жидкостях. Проведена сравнительная оценка фармакокинетических параметров, противогрибковой активности и мукоадгезивных свойств бутконазола нитрата. Методика использована для изучения накопления бутконазола в сыворотке крови [7].

Проведено изучение возможности анализа доксициклина в моче капиллярным электрофорезом с использованием отечественного прибора «Нанофор-1». Методика характеризуется высокой воспроизводимостью и достаточной чувствительностью (граница обнаружения – 5 мкг/мл мочи) [9].

Фоминым А. Н. с соавторами показана возможность идентификации ряда азотсодержащих соединений основного характера в присутствии соэкстрактивных веществ мочи и крови методом капиллярного электрофореза «Капель-105» по электрофоретическим спектрам. Установлено, что на количественные характеристики исследуемых соединений не оказывают существенного влияния компоненты мочи и крови [2, 8].

Возрастание количества публикаций в отечественной литературе отражает актуальность и значимость метода КЭФ в аналитической практике.

Список литературы

1. Глазков И. Н. Определение органических примесей в фармацевтических препаратах / И. Н.Глазков, Н. Л.Бочкарёва, И. А.Ревельский // Журн. аналит. химии. – 2005. – №2. – С. 124-136.

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 бутконазола нитрата / С. П. Сенченко [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2009. – №11. – С.7-10.
4. Каменцев Я. С. Основы метода капиллярного электрофореза. Аппаратурное оформление в области применения / Я. С. Каменцев, Н. В. Комарова // Журн. «Аналитика и контроль». – 2002. Т.6. – №1. – С. 13-18.
5. Каменцев Я. С. Возможности метода капиллярного электрофореза для контроля качества питьевых, поверхностных, сточных и технологических вод / Я. С. Каменцев, Н. В. Комарова, А. А. Корашенников // ЭКВАТЭК-2002: тезисы докл. 5-го Международного конгресса (Москва, 4-7 июня 2002 г.). – Москва, 2002. – С. 608-610.
6. Комарова Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». – Санкт-Петербург: ООО «Веда», 2006. – 212 с.
7. Ларская К. С. Разработка способов анализа бутконазола нитрата в лекарственном препарате и биологических жидкостях: Автореф. дис... канд. фарм. наук. – Пятигорск, 2012. – 23 с.
8. 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.
9. Фомин А. Н. Экспрессный вариант определения доксицилина в моче методом капиллярного электрофореза / А. Н. Фомин, Ю. А. Хомов// Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4; URL: www.science-education.ru/104-6464 (дата обращения: 10.07.2012).
10. Черноглазов В. Н. Развитие капиллярного электрофореза и его аппаратного оформления / В. Н. Черноглазов, П. Н. Нестеренко // Рос. хим. журн. – 1996. – №1. – С. 100-110.
11. Юрьев А. В. Применение метода капиллярного электрофореза при анализе фармпрепаратов// Актуальные проблемы аналитической химии: тезисы. докл. Всерос. конф. (Москва, 11-15 марта 2002 г.). – М., 2002. – С. 107-108.
12. Adsorbtion-voltammetric determination of guanine, guanosine, adenine and adenosine with capillary zone electrophoresis separation / J. Wenrui [et al] // Anal. chim. acta. – 1997. – №3. – P. 269-274.
13. Aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis of pharmaceutical amines / G. Annabel [et al. // Pharm. and Pharmacol. Commun. – 1998. – №4. – P. 189-192.
14. Capillary electrophoresis: A powerful microanalytical technique for biologically active

molecules /J.P.Landers [et al.] // *Biotechniques*. – 1993. – Vol. 14, 1. – P. 98-111.

15. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs./A. J. Arranz [et al.] // *Chromatogr A*. – 2000. – Vol. 25, №871(1-2). – P.399-402.

16. 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.

17. Credo, A. L. Optimization of the separate of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis/ A. L. Credo, M. L. Marina, J. L. Lavandera.// *J. of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 917, № 1-2. – P. 337-345.

18. Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis./ F. Wienen [et al.] // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2003. – Vol. 30, № 6. – P. 1879-1887.

19. Determination of fenticonazole and its impurities by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography / M. Giovanna Quaglia [et al.]// *J. of High Resolution Chromatography*. – 2001. –Vol. 24, № 5. – P. 392-396.

20. Determination of allopurinol and its active metabolite oxypurinol by capillary electrophoresis with end-column amperometric detection / X. Sun [et al.] // *Anal. chim. acta*. – 2001. – №1. – P. 121-128.

21. 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.

22. End-column amperometric detection of 5-fluorouracil by capillary zone electrophoresis with a carbon fiber microelectrode / Y.Tanyan [et al.] // *Anal. lett.* – 1999. – №6. – P. 1109-1119.

23. End-column electrochemical detection for aromatic amines with high performance capillary electrophoresis / X.Huang [et al.] // *Electroanalysis*. – 1999. – №13. – P. 969-972.

24. Fan B. Determination of lamivudine (didanosine)saquinavir in human serum using capillary zone electrophoresis // *J. Liq. Chromatogr. andRelat. Technol.* – 2002. – №2. – P. 241-249.

25. JianilCai. Elucidation of LSD in vitro metabolism by liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* – 1996. – Vol. 20, 1. – P. 27-37.

26. Jin W. Determination of adenine and guanine by capillary electrophoresis with end-column amperometric detection at a carbon fiber microdisk array electrode /W. Jin, H. Wie, X. Zhao// *Electroanalysis*. – 1997. – № 10. – P. 770-774.

27. Hempel, G. Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / G. Hempel, G. Blaschke // *J. of Chromatography*. – 1996. – Vol. 675. – P. 131-137.

28. Identification and quantitation of cis-ketoconazole impurity by capillary zone electrophoresis mass spectrometry / M. Castro-Puyana [et al.] // J. of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1114, № 1. – P. 170-177.
29. Li J. Simultaneous determination of ethamsylate, tramadol and lidocaine in human urine by capillary electrophoresis with electrocheminescence detection / J.Li, H.Ju // Electrophoresis. – 2006. – №27. – P. 3467-3474.
30. 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// SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – Vol. 72, №4. – P. 789-795.
31. Validation and application of capillary electrophoresis for the analysis of lidocaine in a skin tape stripping study /Z.Chik [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2007. – №21. – P. 775-779.

Рецензенты:

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

Михайловский А. Г., д. фарм. н., доцент, зав. кафедрой неорганической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.