

АНАЛІЗ ХІНОЛОНІВ МЕТОДОМ КАПІЛЯРНОГО ЗОНАЛЬНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ З НЕПРЯМИМ УФ-ДЕТЕКТУВАННЯМ

Розроблено методику визначення налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну методом капілярного зонального електрофорезу з непрямим УФ-детектуванням. Досліджено вплив концентрації та рН електролітного розчину, концентрації ПАР, прикладеної напруги і сили струму та часу введення проби на розділення налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну.

Антибіотики та синтетичні препарати, подібні за способом дії до антибіотиків, широко використовуються для отримання мембран з бактеріостатичними та бактерицидними властивостями. Антибіотики з групи хінолонів є ефективними лікарськими засобами нового покоління, які успішно застосовуються для профілактики і лікування мікробних інфекцій. Першими представниками цього класу антибіотиків у клінічну практику були впроваджені оксихінолін та налідиксова кислота (рис. 1). Оскільки будова таких антибіотиків дозволяє прищеплювати їх на мембрани, то оксихінолін та налідиксову кислоту використовують як модифікатори для отримання бактерицидних мембран. Важливим є контроль процесу модифікації та десорбції антибіотиків з мембран у процесі експлуатації. Для його успішного вирішення необхідно використання сучасних інструментальних методів аналізу. Оскільки капілярний електрофорез не потребує складного обладнання, автоматизований та дозволяє робити аналіз суміші за невеликий проміжок часу, він є перспективним для якісного та кількісного аналізу антибіотиків.

Матеріали і методи дослідження

Прилади. Дослідження проводили на капілярно-електрофоретичній установці «Капель 103 Р» фірми «ЛЮМЕКС» (Санкт-Петербург, Росія) з фотометричним детектором з фіксованою дов-

жиною хвилі 254 нм. Внутрішній діаметр кварцового капіляра 75 мкм, ефективна і загальна довжина капіляра 31,5 см і 40,5 см відповідно. Інформацію збирали на персональному комп'ютері програмою «Мультіхром-1,5» (Амперсент, Москва, Росія).

Матеріали та реактиви. Натрієві солі налідиксової кислоти (Sigma) та оксихіноліну (Sigma) отримували в лабораторних умовах.

Підготовка та виконання вимірювань. При підготовці нового капіляра до роботи його промивають протягом 30 хв 0,5 моль/дм³ розчином хлороводневої кислоти, бідистильованою водою протягом 30 хв і 40 хв електролітним розчином. При зміні електролітного розчину капіляр промивають аналогічно.

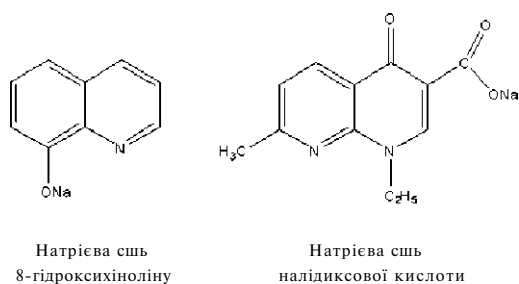
Перед початком вимірювань капіляр промивають упродовж 15 хв 0,5 моль/дм³ розчином хлороводневої кислоти, 15 хв бідистильованою водою і 30 хв електролітним розчином.

Між аналізами капіляр промивають протягом 3 хв 0,5 моль/дм³ розчином хлороводневої кислоти, 3 хв бідистильованою водою, 5 хв електролітним розчином.

Після закінчення роботи капіляр промивають таким чином: 10 хв 0,5 моль/дм³ розчином хлороводневої кислоти, 10 хв бідистильованою водою. Кінці капіляра залишають у віалах з бідистильованою водою.

Капілярний зональний електрофорез. Метод капілярного зонального електрофорезу (КЗЕ) бере свій початок з праць Х'єртена (Hjerten), який у 1967 р. розділив Вісмут та Купрум, використовуючи капіляр невеликого діаметра [1]. На сьогодні КЗЕ є найпоширенішим методом аналізу серед усіх капілярно-електрофоретичних методів. Принципова схема КЗЕ з оберненою полярністю представлена на рис. 2.

Механізм розділення складається з двох процесів, які виникають при накладанні напруги: рух заряджених частинок до катоду або аноду (характеризується електрофоретичною рухли-



Натрієва сіль
8-гідроксихіноліну

Натрієва сіль
налідиксової кислоти

Рис. 1. Структурні формули натрієвих солей
8-гідроксихіноліну та налідиксової кислоти

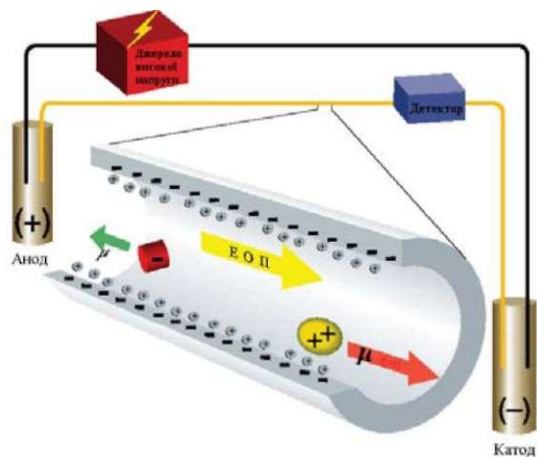


Рис. 2. Схема капілярно-електрофоретичної установки з оберненою полярністю

вістю) та рух електролітного розчину вздовж капіляра (характеризується електроосмотичним потоком (ЕОП)). Отже, поведінка речовини у капілярі зумовлюється електрофоретичною (μ_e) та електроосмотичною рухливістю ($\mu_{\text{ЕОП}}$), які разом складають ефективну електрофоретичну рухливість аналіту, μ_{ef} [1]:

$$\mu_{\text{ef}} = \mu_e + \mu_{\text{ЕОП}} \quad (2.1)$$

Електрофоретична рухливість залежить від в'язкості буферного розчину та від властивостей досліджуваної речовини – заряду та радіусу [2]:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta R}, \quad (2.2)$$

де q – заряд частинки; η – в'язкість електролітного розчину; R – стоківський радіус частинки.

ЕОП зумовлений взаємодією катіонів буфера з негативно зарядженими силанольними групами на внутрішній поверхні капіляра і залежить від таких параметрів [3]:

$$\mu_{\text{ЕОП}} = \frac{\varepsilon\xi}{4\pi r\eta}, \quad (2.3)$$

де ε – діелектрична проникність електролітного розчину; ξ – ξ -потенціал, виміряний на межі твердої і рідкої фаз; η – в'язкість електролітного розчину; r – радіус капіляра.

Результати та їх обговорення

Оптимізація методики аналізу налідиксової кислоти та оксихіноліну методом КЗЕ. Основними параметрами капілярно-електрофоретичної системи, які впливають на розділення речовин, є прикладена напруга, рН і концентрація компонентів електролітного розчину та умови введення проби.

Для встановлення оптимальних умов аналізу у процесі виконання роботи була досліджена залежність ефективної електрофоретичної рухливості досліджуваних антибіотиків від цих параметрів.

Вплив прикладеної напруги на розділення піків антибіотиків. Оскільки електрофоретична рухливість і швидкість ЕОП прямо пропорційно залежать від напруженості електричного поля, прикладена напруга є вагомим фактором у капілярно-електрофоретичній системі. Чим більше прикладена напруга, тим швидше відбувається аналіз. При цьому лімітуючим фактором є теплота Джоуля, яка підвищує силу струму в капілярі [2]. Оскільки верхню межу значення сили струму у приладі є 200 мА, а сила струму прямо пропорційно залежить від напруги, то найбільшою можливою напругою, яку можна прикласти, є 14 кВ. Але, оскільки при 14 кВ при зміні концентрації компонентів електролітного розчину у деяких випадках відбувається перевантаження системи і електричний струм у капілярі перевищує дозволений, було вирішено подальші дослідження проводити при напрузі 13 кВ. Залежність електрофоретичної рухливості від прикладеної напруги наведена на рис. 3.

Вплив рН електролітного розчину на розділення налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну. рН електролітного розчину впливає на швидкість ЕОП, отже, може бути одним з основних факторів розділення піків речовин, що аналізуються. На електрофоретичну рухливість також може впливати зміна рН електролітного розчину, оскільки густина заряду частинок, що аналізуються, змінюється. Для негативно заряджених аналітів це може пояснюватися впливом рН на кислотно-основну рівновагу [4]. Вплив рН на

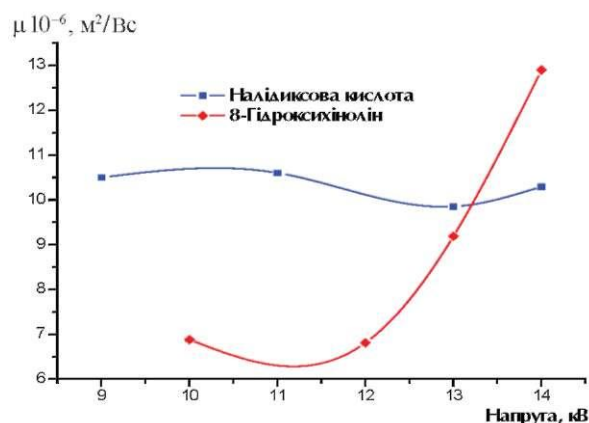


Рис. 3. Залежність електрофоретичної рухливості налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну від прикладеної напруги. Умови проведення вимірювань: електролітний розчин: K_2CrO_4 (5,5 ммоль/дм³), H_3VO_3 (2,5 ммоль/дм³), ЦТАБ (35 мкмоль/дм³), рН 7,6; введення проби: налідиксова кислота – 10х10 мбар х с, 8-гідроксихінолін – 8 х 10 мбар х с

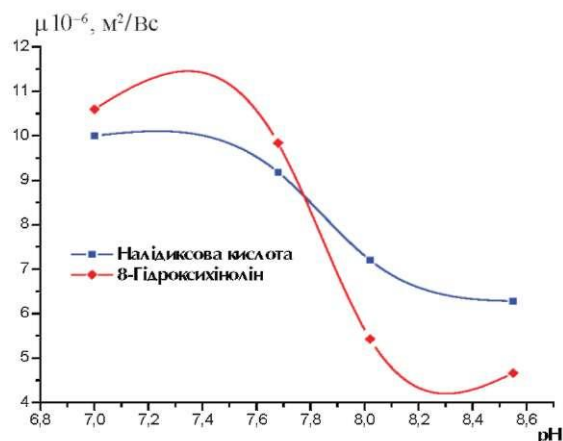


Рис. 4. Залежність електрофоретичної рухливості налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну від рН електролітного розчину. Інші умови: електролітний розчин: K_2CrO_4 (5,5 ммоль/дм³), H_3BO_3 (2,5 ммоль/дм³), ЦТАБ (35 мкмоль/дм³); прикладена напруга - 13 кВ; введення проби: налідиксова кислота - 10 х 10 мбар х с, 8-гідроксихінолін - 8 х 10 мбар х с

розділення піків антибіотиків було досліджено в інтервалі 7,0-8,5 (рис. 4).

Як видно на графіку, при збільшенні рН відбувається краще розділення піків, оскільки збільшується різниця значень μ . Але при цьому також збільшується час аналізу, що є неприйнятним при оптимізації методики. Для подальших досліджень було вирішено використовувати буфер з рН 7,6, тому що при цьому спостерігається розділення піків і рН цитоплазми клітин теж становить 7,6, що дозволить використовувати цю методику для біохімічних досліджень.

Вплив концентрації компонентів електролітного розчину на розділення піків антибіотиків. Було досліджено електролітні розчини з різною концентрацією компонентів: боратної кислоти та хромату калію. У цих дослідженнях значення рН електролітного розчину залишалось незмінним - 7,6. Результати представлено на рис. 5. Як можна побачити, рухливість антибіотиків спочатку збільшується, а потім зменшується при подальшому збільшенні концентрації. Така поведінка, ймовірно, пов'язана з конкуруючим впливом у результаті змін йонної сили електрофоретичного середовища. За досить низьких концентрацій електролітного розчину рухливість також низька внаслідок зменшення ζ -потенціалу, що впливає з теорії подвійного електричного шару. На противагу цьому, коли використовується буферний розчин з більшою йонною силою, спостерігається надлишкове виділення Джоулевого тепла, що, ймовірно, веде до збільшення рухливостей у результаті впливу температури на в'язкість електролітного розчину. При подальшому підвищенні концентрації вплив в'язкості середовища переважає над впливом йонної сили, тому електрофоретична рухливість зменшується [4].

З графіка видно, що найкраще розділення піків спостерігається при концентрації боратної кислоти 2,5 ммоль/дм³ і хромату калію 5,0 ммоль/дм³.

Встановлення оптимальних умов введення проби налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну. Відтворюваність введення проби є досить складною проблемою у КЕ. Для того, щоб не викликати збільшення ширини смуг, зона проби повинна

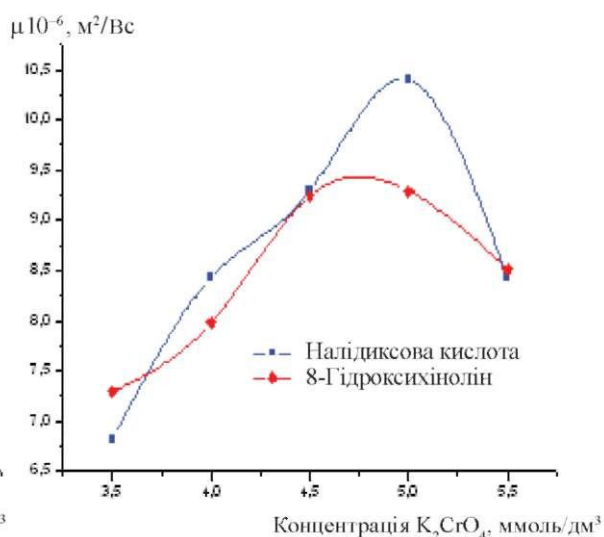
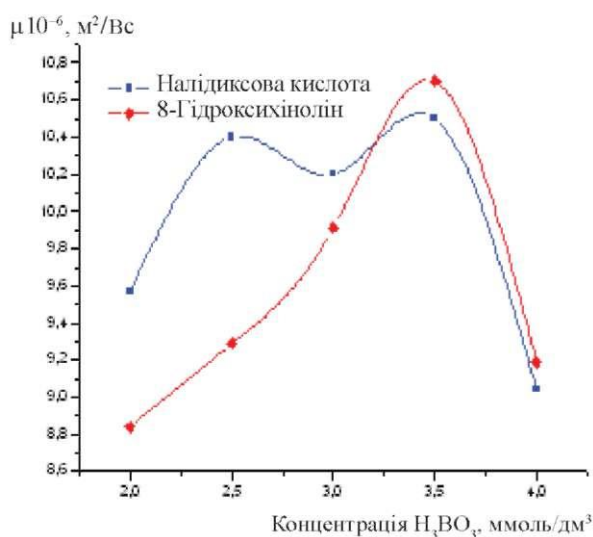


Рис. 5. Залежність електрофоретичної рухливості налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну від концентрації компонентів електролітного розчину. Умови проведення вимірювань: електролітний розчин: ЦТАБ (35 мкмоль/дм³), рН 7,6; прикладена напруга - 13 кВ; введення проби: налідиксова кислота - 10 х 10 мбар х с, 8-гідроксихінолін - 8 х 10 мбар х с

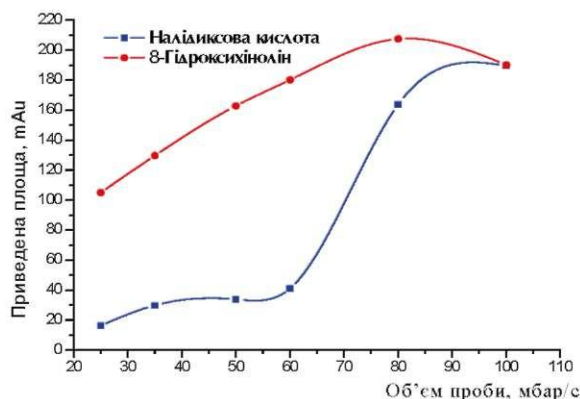


Рис. 6. Залежність площі піків налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну від параметрів введення проби. Інші умови: електролітний розчин: K_2CrO_4 ($5,5 \text{ ммоль/дм}^3$), H_3BO_3 ($2,5 \text{ ммоль/дм}^3$), ЦТАБ (35 мкмоль/дм^3), рН 7,6; прикладена напруга - 13 кВ.

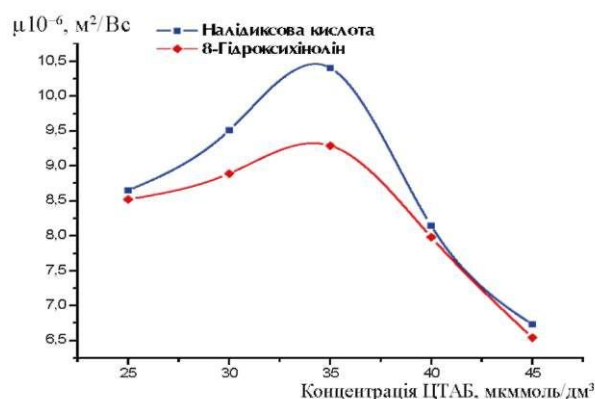


Рис. 7. Залежність електрофоретичної рухливості налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну від концентрації ЦТАБ в електролітному розчині. Інші умови: електролітний розчин: K_2CrO_4 ($5,0 \text{ ммоль/дм}^3$), H_3BO_3 ($2,5 \text{ ммоль/дм}^3$), рН 7,6; прикладена напруга - 13 кВ; введення проби: налідиксова кислота - $10 \times 10 \text{ мбар} \times \text{с}$, 8-гідроксихінолін - $8 \times 10 \text{ мбар} \times \text{с}$

бути досить малою (5-50 нл). Великий об'єм проби часто призводить до асиметрії піків внаслідок перевантаження за об'ємом і погіршення розділення. Цю проблему можна розв'язати за рахунок використання негомогенних електролітних розчинів, що призводить до концентрування проби в капілярі і зменшення дифузії. При цьому проба вводиться з водного розчину, електропровідність якого більша, ніж електролітного. Під впливом електричного поля проба спочатку рухається з великою швидкістю, а при вході у зону електролітного розчину сповільнюється і концентрується на межі двох зон [5]. Цей метод концентрування і було використано при розробці методики, оскільки електролітний розчин складається з трьох компонентів: борної кислоти, хромату калію і ЦТАБ. Зважаючи на те, що об'єм проби також впливає на межу чутливості детектування, було досліджено залежність площі піків від об'єму проби (рис. 6).

Оптимальними параметрами введення проби налідиксової кислоти є $10 \times 10 \text{ мбар} \times \text{с}$, а 8-гідроксихіноліну - $8 \times 10 \text{ мбар} \times \text{с}$, оскільки при цьому спостерігається найбільша площа піків.

Вплив концентрації ЦТАБ на розділення піків аналітів. ПАР часто використовуються при приготуванні електролітного розчину у КЗЕ для впливу й оптимізації ЕОП та процесу розділення. Ці ефекти, однак, завжди багатосторонні і кінцевий результат є комплексним, а процес розділення може бути порушеним. Додавання ПАР до електролітного розчину спричинює такі ефекти [6]:

- ПАР взаємодіє зі стінками капіляра і таким чином впливає на полярність ЕОП;
- ПАР, концентрація якого нижча за ККМ, селективно взаємодіє з аналітами та ком-

понентами електролітного розчину, що змінює їх заряди і відповідно змінює селективність розділення;

- ПАР, концентрація якого вища за ККМ, утворює псевдонерухомі фази, що використовуються для розділення нейтральних сполук у МЕКХ.

У роботі ПАР цетилтриметиламоній бромід було використано для зміни полярності ЕОП. Відомо, що навіть при невеликих концентраціях ЦТАБ ($2-4 \times 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$), катодна рухливість ЕОП падає до нуля, а потім досягаються негативні значення ЕОП. Навіть невеликі зміни концентрації ЦТАБ спричинюють значні зміни анодного ЕОП. Використання ЦТАБ для обертання потоку при додаванні хроматного буфера обґрунтоване тим, що ЦТА+ утворює сильні асоціати з двозарядними аніонами і при цьому не взаємодіє з аналітами [6]. ККМ ЦТАБ у воді $0,92 \times 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$, а у хроматному буфері явище міцелоутворення спостерігається ще при нижчих концентраціях, тому для уникнення створення псевдостационарної фази недоцільно збільшувати концентрацію ЦТАБ у електролітному розчині понад 40 мкмоль/дм^3 . Вплив концентрації ЦТАБ на час виходу піків налідиксової кислоти та 8-гідроксихіноліну показано на рис. 7.

Як видно з дослідів, оптимальною концентрацією ЦТАБ для розділення піків антибіотиків і зменшення часу міграції є 35 мкмоль/дм^3 .

Висновки

Розроблено методику аналізу антибіотиків класу хінолонів методом капілярного зонального електрофорезу з непрямым УФ-детектуванням.

Оптимальними умовами розділення є: концентрація електролітного розчину K_2CrO_4 - 5,0 ммоль/дм³, H_3BO_3 - 2,5 ммоль/дм³; концентрація ЦТАБ - 35 мкмоль/дм³; рН електролітного розчину - 7,6; прикладена напруга - 13 кВ;

введення проби: налідиксова кислота - 10×10 мбар $\times$ с, 8-гідроксихінолін - 8×10 мбар $\times$ с. Електрофоретична рухливість за оптимальних умов аналізу: налідиксової кислоти - $1,04 \cdot 10^{-5}$ м²/В $\cdot$ с; 8-гідроксихіноліну - $9,29 \cdot 10^{-6}$ м²/В $\cdot$ с.

1. Liu B.-F., Liu L.-B., Cheng J.-K. Analysis of inorganic cations as their complexes by capillary electrophoresis // Journal of Chromatography A. - 1999. - Vol. 834. - P. 277-308.
2. Landers J. P. Handbook of Capillary Electrophoresis. - CRC Press. - 1997. - 894 p.
3. Liu Y.-M., Cheng J. Elemental speciation analysis in capillary electrophoresis // Electrophoresis. - 2003. - Vol. 24. - P. 1993-2012.
4. Timerbaev A. R., Semenova O. P. Theoretical estimation of capillary zone electrophoresis behavior of metal complexes using multivariate regression analysis // Journal of Chromatography A. - 1995. - Vol. 690. - P. 141-148.
5. Руководство по капиллярному электрофорезу / Под ред. А. М. Волощук. - М., 1996. - 192 с.
6. Beckers J. L., Bocek P. Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant // Electrophoresis. - 2002. - Vol. 23. - P. 1947-1952.

I. Davidovich, N. Antoniuk

ANALYSIS OF QUINOLONES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS WITH INDIRECT UV DETECTION

The method of separation of nalidixic acid and 8-oxyquinolone by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection was developed. The influence of pH value, concentration of electrolyte buffer, surfactant concentration, applied potential and injected volume on the resolution of nalidixic acid and 8-oxyquinolone has been studied.