



УДК 543.544.5.068.7

Обращено-фазовая ВЭЖХ флюмеквина и ципрофлоксацина в организованных средах

Смирнова Т.Д., Штыков С.Н., Неврюева Н.В.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Поступила в редакцию 22.11.2009 г.

Аннотация

Изучено влияние природы и концентрации ПАВ, а также циклодекстринов на разделение и чувствительность определения флюмеквина и ципрофлоксацина в смеси с другими антибиотиками методом ОФ ВЭЖХ с флуориметрическим детектором. Разработана методика определения ципрофлоксацина с γ -циклодекстрином в лекарственных препаратах различного производства.

Ключевые слова: фторхинолоны, определение, высокоэффективная жидкостная хроматография, организованные среды

The effect of the surfactant and cyclodextrin nature and concentration on the separation and limit of detection of flumequine and ciprofloxacin in the mixture with other antibiotics was studied by RP HPLC with fluorimetric detector. The procedure for ciprofloxacin determination based on the enhancement effect of γ -cyclodextrin in drugs produced by different manufactures was developed.

Key words: fluoroquinolones, determination, high performance liquid chromatography, organized media

Введение

Фторхинолоны (ФХ) являются производными 4-хинолон-3-карбоновой кислоты и широко используются в клинической практике. Введение фтора в положение 6 и пиперазина в положение 7 хинолонового цикла позволило получить соединения с очень широким спектром антибактериального действия, относительно малой токсичностью, низкой способностью вырабатывать лекарственную устойчивость у бактерий. Другая область их применения - добавки к кормам в животноводстве, птицеводстве, рыбном хозяйстве. Известно, что превышение определенного уровня содержания фторхинолонов в пищевой продукции может вызвать как привыкание к антибиотикам, так и аллергические реакции у потребителя. В этой связи для достижения положительного результата в лечебной практике и контроля качества продуктов питания необходимо контролировать содержание антибиотиков в фармацевтических препаратах, биологических жидкостях, тканях организма и пищевой продукции.

Для определения фторхинолонов наиболее часто используют хроматографические методы, преимуществом которых является возможность их

предварительного отделения от матрицы. Метод ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором при $\lambda=235$ нм [1] и $\lambda=279-295$ нм [2] предложен для определения четырех и более ФХ в диапазоне 4.0 – 24.0 мг/кг на колонках Phenomenex ODS C₁₈ [1,3] и LiChrospher RP-18 [2]. Понизить предел обнаружения и расширить диапазон определяемых концентраций можно при использовании флуориметрического детектора, поскольку многие ФХ обладают флуоресцентными свойствами.

Флуориметрическое детектирование с пределом обнаружения (ПрО) 5 мкг/мл применяли при определении ЦФ в плазме крови [4], свиных и лососевых мышцах [5] при $\lambda_{\text{возб}}=278-280$ нм. В качестве подвижной фазы (ПФ) используют смесь ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 3.0) [4, 5], ацетонитрил – метанол - ацетатный буфер (рН 3.6) [6]. Необходимо отметить, что во многих методиках в целях улучшения аналитических характеристик используют токсичные растворители, такие как ацетонитрил и метанол [6].

Дополнительный путь расширения возможностей ВЭЖХ состоит в использовании в хроматографических методах организованных систем, особенно прямых мицелл и циклодекстринов, позволяющих модифицировать как подвижные, так и неподвижные фазы [7]. Показано, что время удерживания и селективность разделения определяется концентрацией, природой ПАВ и циклодекстринов, величиной рН, ионной силой раствора.

Целью настоящей работы является изучение влияния природы и концентрации ПАВ, а также циклодекстринов на разделение и чувствительность определения ФЛ и ЦФ в смеси с другими антибиотиками методом ОФ ВЭЖХ с флуориметрическим детектором.

Эксперимент

Реагенты. Растворы всех основных и вспомогательных химических реактивов готовили на бидистиллированной воде. Антибиотики фторхинолонового ряда - ципрофлоксацин (ЦФ), налидиксовая кислота (НК), флюмеквин (ФЛ) («Sigma»), а также тетрациклин (ТТ) и окситетрациклин (ОТТ) («Merck»), содержали не менее 98% основного вещества. Рабочие растворы концентрации 0.25 мг/мл готовили растворением точной навески антибиотиков. Использовали водные растворы катионных (бромид цетилтриметиламмония и хлорид цетилпиридиния, фирмы «Merck»), анионных (додецилсульфат натрия, «AppliChem») и неионогенных ПАВ (Тритон X -100, Тритон X-305, Бридж 35, Твин 80 фирмы «Sigma»). Содержание основного вещества во всех препаратах ПАВ не менее 99%. α -, β -, γ - циклодекстрины (ЦД) фирмы «Fluka», содержание основного вещества не менее 98%. Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил хроматографической чистоты, фирмы «Panteas», 99,9 % основного вещества. Ацетатно-аммиачные буферные растворы готовили из 2М CH₃COOH и NH₃ (квалификация х.ч.).

Аппаратура. Хроматограммы регистрировали на жидкостном хроматографе «Стайер» фирмы «Аквилон» с флуориметрическим детектором. Антибиотики разделяли на ОФ колонке Phenomenex Luna 5u C₁₈ (150×4.60 мм, 5мкм), снабженной предколонкой с защитным картриджем Phenomenex C₁₈, 5мкм при температуре 20⁰С в изократическом режиме. Для записи и обработки хроматограмм использовали программу «Мультихром-2.4». Детектирующее устройство: источник возбуждения – кварцевая галогеновая лампа с дихроическим рефлектором, фотоэлектронный умножитель, диапазон длин волн 200-600 нм.

Обсуждение результатов

Оптимальные условия разделения антибиотиков. Для разделения фторхинолонов апробированы две подвижные фазы: ацетонитрил - ацетатно-аммиачный буферный раствор (рН 3.0-8.0) и ацетонитрил – $2.7 \cdot 10^{-3}$ М щавелевая кислота (рН 2.5). Установлено, что площадь хроматографического пика ФХ зависит от состава, соотношения компонентов ПФ и максимальна в смеси ацетонитрил - ацетатно-аммиачный буферный раствор 43:57, об./об. для ЦФ и 34:66, об./об. для ФЛ. Влияние кислотности среды изучены в диапазоне рН 3.0 – 8.0. Максимальная площадь пиков хроматограмм наблюдается для ФЛ и ЦФ при рН 3.0 и 4.3 и временах удерживания 9.2 и 2.0 мин, соответственно. Установлено, что в диапазоне рН 5.0-7.0 ухудшается селективность разделения и уменьшается площадь хроматографического пика. Кроме того, при увеличении рН время удерживания ФЛ сокращается с 9.2 до 5.5 мин. Оба ФХ в кислой среде (рН 3.0 – 4.0) находятся в протонированном состоянии, что обеспечивает однородность ионного состава и способствует уменьшению размывания хроматографической зоны исследуемых антибиотиков. При скорости потока ПФ 0.5 мл/мин время удерживания ФЛ возросло до 20 мин, а при скорости потока ПФ более 1 мл/мин время удерживания уменьшалось до 2 мин, но возросло давление в хроматографической системе. В качестве оптимальной выбрана скорость 1 мл/мин.

Влияние ПАВ. Известно, что ПАВ могут изменять химическую форму сорбатов и состояние поверхности сорбента. В связи с этим нами дополнительно изучено влияние кислотности среды, которую создавали ацетатно-аммиачным буферным раствором в диапазоне рН 3.0 – 9.0, природы ПАВ и его концентрации на площадь хроматографического пика. Результаты на примере ФЛ при рН 3.0, 5.0, и 7.0 в присутствии различных ПАВ представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, максимальная площадь хроматографического пика ФЛ наблюдается при рН 3.0 в присутствии неионных ПАВ Тритон Х-100, Бридж-35, Тритон Х-305. При концентрации указанных ПАВ, равной $5.0 \cdot 10^{-5}$ М, т.е. значительно меньше критической концентрации мицеллообразования, площадь хроматограммы ФЛ увеличилась по сравнению с исходной ПФ в 1.9, 1.5, 1.8 раз соответственно. Увеличение аналитического сигнала, по-видимому, можно объяснить модификацией молекулами ПАВ поверхности ОФ хроматографической колонки.

Влияние циклодекстринов. Для модификации свойств ПФ, кроме ПАВ, широко используют и молекулы-рецепторы, среди которых чаще всего используют природные циклические олигосахариды – циклодекстрины и их синтетические производные. Три наиболее важных представителя этого ряда соединений – это α -, β -, γ - ЦД, содержащие шесть, семь и восемь глюкопиранозидных единиц и образующие в пространстве жесткие трехмерные полости. По мере увеличения жесткости молекулярной полости и ее размеров, способность ЦД образовывать комплексы включения с органическими молекулами возрастает. В ряде случаев, включая процессы дезактивации и переноса энергии в возбужденном состоянии, гидрофобная полость внутри циклодекстринов является микропсевдофазой с присущими ей локальными свойствами среды [7]. Интенсивность флуоресценции ФХ при образовании комплекса включения состава 1:1 возрастает благодаря удалению молекул воды из микроокружения антибиотика и защитному эффекту полости от влияния посторонних тушителей. Два этих фактора являются определяющими в уменьшении доли безызлучательной потери энергии флуорофора [7]. Результаты влияния циклодекстринов для ФЛ и ЦФ представлены отдельно.

Таблица 1. Влияние ПАВ и pH на площадь хроматографического пика ФЛ. $S_{ФЛ}=65$ мкг/мл, ($S_0=365$ в отсутствии ПАВ)

ПАВ	$C_{ПАВ}, M$	Площадь пика		
		pH 3.0	pH 5.0	pH 7.0
ЦПХ	$1.0 \cdot 10^{-3}$	341	306	135
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	403	276	172
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	383	312	111
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	341	294	78
ЦТАБ	$1.0 \cdot 10^{-3}$	304	217	65
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	381	293	104
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	364	258	155
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	341	222	138
ДДС	$1.0 \cdot 10^{-3}$	341	244	117
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	447	280	118
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	328	254	116
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	292	240	70
Тритон X-100	$1.0 \cdot 10^{-3}$	380	261	125
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	431	273	97
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	693	274	64
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	516	204	-
Бридж 35	$1.0 \cdot 10^{-3}$	409	208	62
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	372	240	100
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	536	258	90
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	404	239	-
Тритон X-305	$1.0 \cdot 10^{-3}$	579	279	128
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	558	269	123
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	645	311	140
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	508	245	112
Твин 80	$1.0 \cdot 10^{-3}$	242	111	-
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	304	139	65
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	348	159	75
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	325	149	-
ОП-10	$1.0 \cdot 10^{-3}$	373	207	123
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	402	223	133
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	318	177	120
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	343	190	113
Проксанол- 305	$1.0 \cdot 10^{-3}$	353	196	116
	$5.0 \cdot 10^{-4}$	323	179	107
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	419	233	138
	$5.0 \cdot 10^{-6}$	348	193	115

Определение флюмеквина. Изучена зависимость площади хроматографического пика ФЛ от концентрации и природы ЦД. Установлено, что хроматографические характеристики ФЛ в присутствии α - и β -ЦД не изменяются поскольку размер молекулы фторхинолона превышает размер полости указанных циклодекстринов. В присутствии γ -ЦД при его концентрации в подвижной фазе $1.0 \cdot 10^{-3}$ M и pH 3.0 площадь хроматографического пика увеличивается в 2.3 раза. Как

и в исходной ПФ при меньшей кислотности (рН 5.0 - 7.0) селективность разделения уменьшается и время удерживания ФЛ сокращается с 9.2 до 5.5 минут.

Для построения градуировочного графика на ФЛ в каждую из десяти пробирок вносили 1 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора (рН 3.0), затем добавляли 0.5 мл $1.0 \cdot 10^{-2}$ М γ -ЦД, и различные аликвоты стандартных растворов ФЛ в интервале концентраций 0.10 – 300 мкг/мл, затем разбавляли буферным раствором до общего объема 5 мл. Из каждого раствора отбирали аликвоту 30 мкл и вводили в хроматограф. Время удерживания ФЛ в присутствии γ -ЦД не изменилось (9.2 мин). Некоторые метрологические характеристики методики определения ФЛ представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, предел обнаружения (ПрО) ФЛ в присутствии γ -ЦД уменьшился в 4.2 раза.

Таблица 2. Метрологические характеристики определения ФЛ и ЦФ при использовании ПФ вода-ацетонитрил и вода-ацетонитрил- γ -ЦД

Фторхинолон	Модификатор	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	ПрО, мкг/мл	Уравнение градуировочного графика	r^2
ФЛ	-	2.5 - 650.0	1.35	$y = 3.90x + 61.4$	0.997
	γ -ЦД	0.65 – 250.0	0.32	$y = 3.54x + 201$	0.999
ЦФ	-	2.5-100	1.7	$y = 17.6x + 80,6$	0.998
	γ -ЦД	0.25-75	0.2	$y = 28.5x + 64,5$	0.997
ЦФ на фоне антибиотиков	-	2.5-100	1.4	$y = 15.4x + 220$	0.996
	γ -ЦД	0.25-75	0.2	$y = 26.6x + 64.5$	0.997

Определение ЦФ. Установлено, что как и для ФЛ, увеличение хроматографического пика ЦФ в 1.5 раза происходило только в присутствии в ПФ γ -ЦД; время удерживания при этом не изменялось и было равно 2 мин. Как видно из рис.1 максимальный рост площади хроматографического сигнала наблюдался при концентрации γ -ЦД равной $5 \cdot 10^{-5}$ М. Оптимальная кислотность при добавлении γ -ЦД не изменялась (рН=4.5) (рис.2).

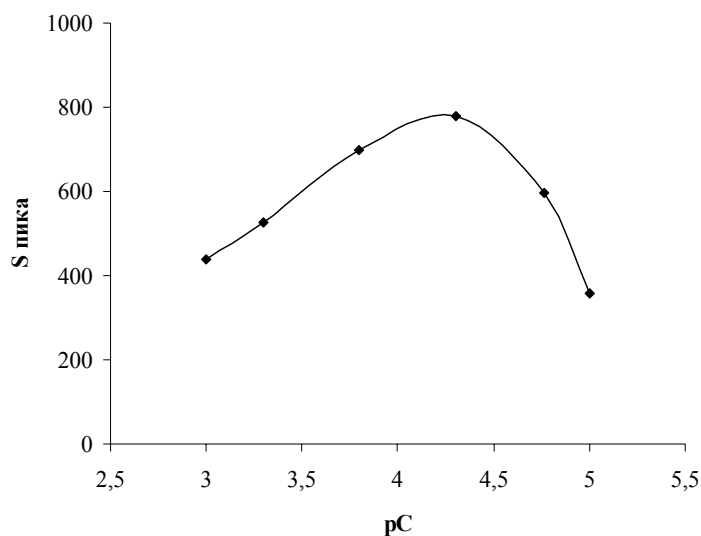


Рис.1. Зависимость высоты хроматографического пика в системе ЦФ - γ -ЦД от концентрации γ -ЦД, $S_{ЦФ} = 25$ мкг/мл, ПФ: ацетонитрил: ацетатно-аммиачный буфер(43:57 об./об., рН=4.5), время удерживания – 2 мин

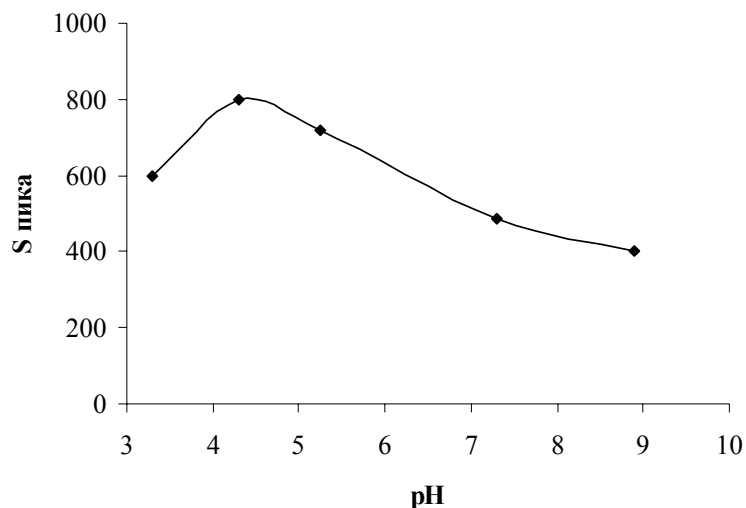


Рис.2. Зависимость высоты хроматографического пика ЦФ от pH, ПФ: ацетонитрил / ацетатно-аммиачный буфер, $C_{\gamma\text{-ЦД}}=5 \cdot 10^{-5}$ М

Для построения градуировочного графика в каждую из десяти пробирок вносили 1 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора pH 4.5, затем последовательно добавляли 0.25 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М γ -ЦД, затем ЦФ в диапазоне концентраций от 0.10 - 300 мкг/мл, разбавляли буферным раствором до общего объема 5 мл и тщательно перемешивали. Из каждой пробирки отбирали аликвоту 50 мкл, которую вводили в хроматограф. В таблице 2 представлены некоторые метрологические характеристики определения ЦФ. Как видно из таблицы, ПрО в присутствии ЦД понижается в 9 раз по сравнению с ПФ, не содержащей γ -ЦД.

Определение ЦФ в смеси с антибиотиками. Исследована также возможность определения ЦФ в присутствии других антибиотиков. Основой для этого, как видно из таблицы 3, является значительно отличающееся время удерживания ЦФ по отношению к остальным антибиотикам фторхинолонового, хинолонового и тетрациклинового классов. Из этой таблицы также видно, что хроматографический пик ЦФ в оптимальных для его определения условиях имеет наибольшую площадь и ему соответствует наибольшее число теоретических тарелок. Метрологические характеристики определения ЦФ на фоне указанных антибиотиков в ПФ как без модификатора, так и в присутствии γ -ЦД приведены в таблице 2. Диапазоны определяемых концентраций ЦФ на фоне смеси антибиотиков не отличаются от таковых для растворов индивидуального препарата ЦФ, однако углы наклона градуировочных графиков немного уменьшаются.

Для построения градуировочного графика определения ЦФ в присутствии ФЛ, ОТТ, ТТ, НК в каждую из десяти пробирок вносили 1 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора с pH 4.5, последовательно добавляли 0.25 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М γ -ЦД, ЦФ в диапазоне концентраций от 0.10 - 300 мкг/мл, антибиотики в концентрации 50 мкг/мл и разбавляли буферным раствором до общего объема 5 мл. Из каждого раствора отбирали аликвоту 50 мкл и вводили ее в хроматограф. Характеристики хроматографического разделения антибиотиков представлены в таблице 3. Как видно из таблицы, ПрО ЦФ на фоне других антибиотиков в присутствии γ -ЦД понижается в 6.8 раз.

Определение ЦФ в лекарственных препаратах. Разработанная методика апробирована на дозированных лекарственных препаратах, содержащих ЦФ - глазных каплях различного производства: «Ципролет» фирмы Dr.Reddy's laboratories

(Индия), «Ципрофлоксацин» – АКОС Синтез (г.Курган), «Ципромед» Promed Exports (Индия).

Таблица 3. Количественные хроматографические характеристики антибиотиков в присутствии γ -ЦД

Антибиотик	Время удерживания, мин.	Площадь пика	F _{ass}	R _S	α	K'	N
ФТОРХИНОЛОНЫ							
ЦФ	2.0	810.0	0.87	2.4	1.7	1.0	$6.30 \cdot 10^3$
ФЛ	12.8	47.25	0.84	11.9	11.6	5.3	$1.22 \cdot 10^3$
ТЕТРАЦИКЛИНЫ							
ТТ	2.7	67.90	0.84	2.4	1.7	1.7	$1.13 \cdot 10^3$
ОТТ	6.2	642.7	0.80	5.2	5.3	2.8	$2.96 \cdot 10^3$
ХИНОЛОНЫ							
НК	3.8	534.3	0.75	4.8	2.8	12	$1.54 \cdot 10^3$

Методика определения. Исследуемый раствор глазных капель разбавляют в 25 раз. Из полученного раствора отбирают в пробирку аликвоту 0.2 мл, добавляют 0.25мл $1 \cdot 10^{-3}$ М γ -ЦД и разбавляют до общего объема 5 мл ацетатно- аммиачным буферным раствором рН 4.5. Аликвоту полученного раствора 50 мкл вводят в хроматограф, измеряют площадь хроматографического пика ЦФ и по градуировочному графику определяют содержание ЦФ в лекарственных препаратах. Результаты определения ЦФ представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты определения ЦФ в лекарственных препаратах глазных капель* (n = 3, P=0.95)

Препарат	Найдено, мг/мл	S _r
«Ципролет», Индия	2.62±0.07	0.03
«Ципрофлоксацин», Курган	2.49±0.15	0.06
«Ципромед», Индия	2.29±0.05	0.02

* - указанное производителем содержание ЦФ - 3 мг/мл

Контроль правильности определения осуществляли методом добавок. Установлено, что в лекарственных препаратах различного производства содержание ЦФ занижено.

Заключение

Показано, что среди 9 исследованных ПАВ различных классов наилучшее разделение и определение флюмеквина и ципрофлоксацина достигается в подвижной фазе, содержащей неионогенный ПАВ Тритон X-100, который способствует увеличению площади хроматографического пика фторхинолонов в 1.9 раз. Образование комплексов включения фторхинолонов с γ -циклодекстрином увеличивает площадь хроматографического пика флюмеквина и ципрофлоксацина в 2.3 и 1.5 раза, а пределы обнаружения уменьшает в 4.2 и 9 раз, соответственно.

Разработана методика определения указанных антибиотиков методом ОФ ВЭЖХ, которая апробирована на лекарственных препаратах, содержащих ципрофлоксацин.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 08-03-00725а

Список литературы

1. Shervington L. A., Abba M., Hussain B. and Donnelly J. The simultaneous separation and determination of five quinolone antibiotics using isocratic reversed-phase HPLC: Application to stability studies on an ofloxacin tablet formulation // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. V. 39. № 3-4. P.769-775.
2. Inês M., Santoro R.M., Kassab N. M., Singh A.I K., Kedor-Hackmam E. M. Quantitative determination of gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin and pefloxacin fluoroquinolonic antibiotics in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 40. №1. P.179-184.
3. Mancean S., Giequel M., Lanrentie M. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biomedical fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1999. V.726. №1-2. P.175-178.
4. Imre S., Dogaru M.T., Vari C.E., Muntean T., Kelemen L. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. V. 33. №1. P.125-130.
5. Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. B. 2003. V. 789. №2. P.373-381.
6. Zotou A., Miltiadou N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. V. 28. №3-4. P.559-568.
7. Штыков С.Н. Химический анализ в нанореакторах. Основные понятия и применение // Журн. аналит. химии. 2002. Т.57. №10. С.1018-1028.
8. El-Kemary M., Dauhal A. Photochemistry and photophysics of cyclodextrin caged drugs: relevance to their stability and efficiency // Cyclodextrin materials in photochemistry, photophysics and photobiology. Ed. by Douhal A. - Elsevier. 2006. V.1. P.79-105.

Смирнова Татьяна Дмитриевна - к.х.н., доцент кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского, Саратов

Штыков Сергей Николаевич - д.х.н., профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского, г. Саратов

Неврюева Наталия Владимировна - аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского

Smirnova Tatyana D. - Ph.D. in chemical science, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov. E-mail: Smirnova@sgu.ru

Shtykov Sergei N. – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov, E-mail: ShtykovSN@mail.ru

Nevrueva Nataliy B. - Research student, Division of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N.G. Chernyshevskii Saratov State University, Saratov. E-mail: natasha.k.83@mail.ru