

УДК 543.545.2

## ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ЭНАНТИОРАЗДЕЛЕНИЕ ПРОФЕНОВ В ВОДНО-МЕТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭРЕМОМИЦИНА В КАЧЕСТВЕ ХИРАЛЬНОГО СЕЛЕКТОРА

М.В. Лебедева, А.Ф. Прохорова, Е. Н. Шаповалова, О.А. Шпигун

*(кафедра аналитической химии: email: margoL87@mail.ru)*

Продемонстрирована возможность электрофоретического разделения энантиомеров профенов в присутствии макроциклического гликопептидного антибиотика эремомицина в качестве хирального селектора с использованием водно-метанольных фоновых электролитов. Изучено влияние содержания метанола, pH фосфатного буферного раствора и концентрации антибиотика на параметры разделения энантиомеров. Показано, что использование водно-метанольного фонового электролита обеспечивает лучшую воспроизводимость времени миграции соединений и стабильность базовой линии по сравнению с водными буферными растворами. Время анализа в неводных условиях не превышает 15 мин.

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, энантиоразделение, макроциклические антибиотики, эремомицин, профены.

Разделение энантиомеров биологически активных соединений – важная аналитическая задача, поскольку установлено, что существуют различия в фармакодинамике и фармакокинетике индивидуальных изомеров. Метод капиллярного электрофореза (КЭ) эффективен и удобен при разделении и определении хиральных соединений. Широко используемыми универсальными и селективными хиральными селекторами (ХС) являются макроциклические антибиотики (МА) [1].

Эремомицин – антибиотик, предложенный российскими исследователями, он не уступает по эффективности ванкомицину и селективен по отношению к органическим кислотам [2]. Эремомицин, как и другие МА, адсорбируется на стенках кварцевого капилляра, что приводит к снижению эффективности и существенным искажениям результатов определения аналитов [3]. Уменьшить взаимодействие между МА и поверхностью кварцевого капилляра, а следовательно, понизить адсорбцию хирального селектора позволяет модифицирование поверхности капилляра разными соединениями [4] или использование неводных фоновых электролитов.

Цель данной работы – изучение разделения энантиомеров индопрофена, флурбипрофена, кетопрофена и фенпрофена в присутствии эремомицина в кварцевом капилляре с водно-метанольным фоновым электролитом.

### Экспериментальная часть

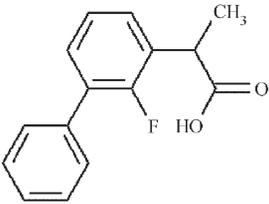
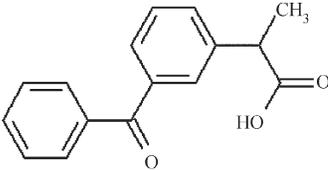
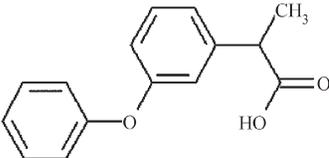
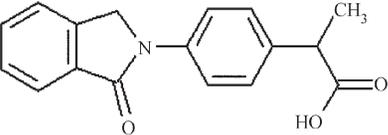
#### Реагенты и аппаратура

В работе использовали  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCl}$  и  $\text{KOH}$  («Germed», Германия),  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  («Лаб-тех», Россия),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  («Рехим», Россия), метанол. В качестве хирального селектора использовали сульфат эремомицина, предоставленный С.М. Староверовым (ЗАО «БиоХимМак С&Т», Россия). Стандартные (0,1 мг/мл) растворы индопрофена, флурбипрофена, кетопрофена и фенпрофена (табл. 1) («Sigma-Aldrich», США) готовили растворением точных навесок в метаноле. В качестве фонового электролита (ФЭ) использовали смеси метанола и фосфатного буферного раствора (50 мМ, pH 4,8; 5,8; 7,3) с разными добавками эремомицина. Для приготовления растворов использовали очищенную воду («MilliQ»). Подготовку растворов проводили в УЗИ-бане «Сапфир» (НПФ «Сапфир», Россия); pH водных растворов контролировали на иономере «ЭВ-74».

Использовали систему «Капель-103Р» (НПФ АП «Люмэкс», Россия) со спектрофотометрическим детектором при 254 нм и кварцевый капилляр 44/35 см (внутренний и внешний диаметры 50 и 363 мкм, «Polymicro Technologies», США). Образцы вводили под давлением (25 мбар, 15 с). Приложенное напряжение составляло –20 кВ. Данные получены и

Т а б л и ц а 1

## Структурные формулы профенов

Флурбипрофен	
Кетопрофен	
Фенопрофен	
Индопрофен	

обработаны с помощью программного обеспечения Мультихром 1.52r (ЗАО «Амперсэнд», Россия).

Начиная работу с новым кварцевым капилляром, его последовательно промывали водой (30 мин), 1 М раствором КОН (30 мин), водой (30 мин), 1 М HCl (30 мин) и водой (30 мин). Ежедневно перед началом работы капилляр последовательно промывали смесью метанола и воды (1:1) и ФЭ в течение 10 и 15 мин соответственно. Между анализами капилляр промывали смесью метанола и воды (3 мин) и ФЭ (5 мин). По окончании работы капилляр промывали водно-метанольной смесью (10 мин), водой (10 мин) и оставляли концы капилляра в воде.

#### Результаты и их обсуждение

Макроциклический антибиотик эремомицин плохо растворим в органических растворителях (спирты,

ацетонитрил) и хорошо растворим в воде, поэтому в качестве ФЭ возможно использование смеси метанола и водного буферного раствора (содержание метанола до 60–70 об.%). Эремомицин имеет аминогруппы, способные к протонированию при  $\text{pH} < 7,65$ , что приводит к взаимодействию с силанольными группами поверхности кварца. Для оценки адсорбции предложено использовать зависимость общей подвижности адсорбата от введенной в капилляр концентрации [5]. В настоящей работе исследована адсорбция антибиотика эремомицина в диапазоне концентраций от 0,01 до 8,25 мМ в ФЭ, состоящем из метанола и 50 мМ фосфатного буферного раствора (ФБ) в соотношении 60/40 об.% ( $\text{pH} 5,8$ ). Изучение адсорбции при более высоких концентрациях ХС не представляется возможным из-за ограниченной растворимости эремомицина в смеси ФБ–метанол. При увеличении

концентрации эремомицина во вводимой пробе скорость электроосмотического потока ( $\mu$ ) падает, что связано с уменьшением суммарного отрицательного заряда стенок капилляра вследствие адсорбции положительно заряженных молекул селектора. Общая подвижность эремомицина с ростом его концентрации во вводимой пробе увеличивается, а затем выходит на плато (табл. 2).

Начальный (1,03–4,12 мМ) участок полученной изотермы является линейным ( $y = 0,06x + 0,096$ ;  $r^2 = 0,990$ ), его можно рассматривать как изотерму Генри. Тангенс угла наклона линейного участка изотермы адсорбции равен константе  $A$ , которая пропорциональна степени заполнения поверхности стенки капилляра молекулами эремомицина и характеризует скорость изменения общей подвижности в зависимости от концентрации ХС. Константа  $A$  аналогична константе Генри и в исследованных условиях составляет  $6 \times 10^{-3} \text{ см}^2/\text{кВ} \times \text{мМ} \times \text{с}$ . В работах, выполненных ранее, вычислены константы  $A$  при использовании водного (рН 5,5) электролита в немодифицированном и модифицированном капиллярах. Установлено, что при использовании немодифицированного капилляра константа  $A$  составляет  $1,1 \times 10^{-1} \text{ см}^2/\text{кВ} \times \text{мМ} \times \text{с}$ , для капилляра, модифицированного эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан, она равна  $8,8 \times 10^{-2} \text{ см}^2/\text{кВ} \times \text{мМ} \times \text{с}$ . Таким образом, использование водно-органического фонового электролита значительно уменьшает адсорбцию эремомицина на внутренних стенках капилляра.

Основным параметром, определяющим подвижность аналита в ФЭ, является отношение  $\epsilon/\eta$  ( $\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость ФЭ,  $\eta$  – вязкость ФЭ). Молекулы карбоновых кислот в ФЭ заряжены отрицательно (значения  $pK_a$  в воде больше 4,1), следовательно, они должны двигаться в сторону анода в направлении, противоположном ЭОП. Полярность, при которой следует детектировать профены, определяется, главным образом, соотношением собственной электрофоретической подвижности соединения и подвижности ЭОП. В водно-метанольных ФЭ собственная электрофоретическая подвижность органических кислот оказывается больше подвижности ЭОП, поэтому необходимо использовать отри-

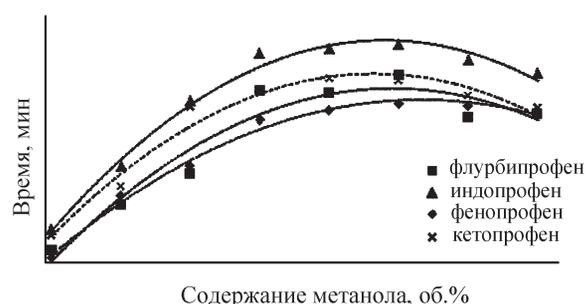


Рис. 1. Зависимость времени миграции профенов от содержания метанола в ФЭ

цательную полярность. В качестве ФЭ использовали смесь метанола и 50 мМ ФБ (рН 5,8) с 2 мМ добавкой эремомицина. Содержание метанола в ФЭ изменяли в диапазоне 0–70 об.%, поскольку при дальнейшем увеличении доли метанола растворимость антибиотика резко уменьшается. Зависимость времени миграции индопрофена, кетопрофена, фенопрофена и флурбипрофена от содержания метанола в ФЭ представлена на рис. 1. Как видно из графика, время миграции профенов монотонно возрастает при увеличении содержания метанола от 0 до 30 об.%, при дальнейшем увеличении содержания метанола до 60 об.% они практически не изменяются, а затем несколько уменьшаются. Так как направление собственной миграции профенов и ЭОП противоположно, а добавка метанола влияет на оба этих параметра, то зависимость времени миграции профенов от доли метанола в ФЭ не должна носить линейный характер, а должна предположительно иметь максимум или выходить на плато, что соответствует полученному графику. При увеличении содержания метанола в ФЭ наблюдается увеличение времени миграции профенов, а также некоторое уменьшение коэффициентов селективности и разрешения пиков энантиомеров профенов. Это связано с тем, что при увеличении доли метанола в ФЭ заряд молекулы эремомицина уменьшается, и электростатические взаимодействия между селектором и профенами ослабляются. Но даже при содержании метанола 60 об.% в ФЭ разрешение между пиками энантиомеров достигается до базовой линии благодаря высокой эффективности. Преимуществом добавки метанола является меньший генерируемый

Т а б л и ц а 2

Концентрация эремомицина, мМ	1,03	2,05	3,09	4,12	6,16	8,25
$\mu$ , $\text{см}^2/\text{кВ} \times \text{с}$	0,101	0,109	0,115	0,120	0,122	0,121

ток и, как следствие, меньшее количество Джоулева тепла, что повышает устойчивость ХС и улучшает воспроизводимость значений времени миграции и площади пиков, а также стабильность базовой линии.

Изучено влияние pH фосфатного буферного раствора на параметры разделения при содержании метанола 60 об.% в ФЭ. При изменении pH от 4,8 до 7,3 время миграции профенов увеличивается примерно в полтора раза, а энантиоселективность ухудшается, лучший результат наблюдается при pH 5,8. Разрешение пиков энантиомеров зависит от концентрации селектора, которую изменяли в интервале 0,5–2,0 мМ. В табл. 3 отражено влияние концентрации эремомицина на разделение энантиомеров. Время миграции профенов с ростом концентрации селектора изменяется незначительно. Разрешение пиков энантиомеров увеличивается, что свидетельствует об образовании диастереомерных комплексов. Лучшее разделение

энантиомеров достигается для флурбипрофена и индопрофена, хуже всего разделяются энантиомеры фенопрофена. Следует отметить, что даже при концентрации эремомицина 0,5 мМ достигается разделение энантиомеров флурбипрофена и индопрофена практически до базовой линии. На рис. 2 показаны электрофореграммы рацемических смесей флурбипрофена и индопрофена.

Применимость разработанного подхода для аналитических целей показана на примере определения кетопрофена в геле «Быструмгель» с использованием немодифицированного капилляра в водно-метанольном ФЭ (60 об.% метанол и 40 об.% ФБ, pH 5,8; 2,0 мМ эремомицина). При построении градуировочной зависимости по оси ординат откладывали площадь, нормированную на время миграции ( $S/t$ ). Показано, что данный препарат содержит рацемическую смесь кетопрофена, доля энантиомера, мигрирующего первым (12,7 мин),

Т а б л и ц а 3

Влияние концентрации эремомицина (мМ) на разделение энантиомеровпрофенов\*

Соединение	Концентрация эремомицина, мМ								
	2,0			1,0			0,5		
	$t_1$ , мин	$R_s$	$A$	$t_1$ , мин	$R_s$	$A$	$t_1$ , мин	$R_s$	$A$
Флурбипрофен	12,7	5,92	1,09	12,9	3,71	1,06	13,4	1,66	1,03
Кетопрофен	13,2	3,80	1,04	13,4	1,32	1,02	14,8	0,60	1,01
Фенопрофен	12,7	2,01	1,03	12,8	0,82	1,01	14,0	0	1,00
Индопрофен	14,7	4,65	1,08	14,9	3,16	1,03	16,2	1,30	1,02

\*Условия: метанол (60 об.%), 50 мМ фосфатный буферный раствор, pH 5,8 (40 об.%),  $U = -20$  кВ.

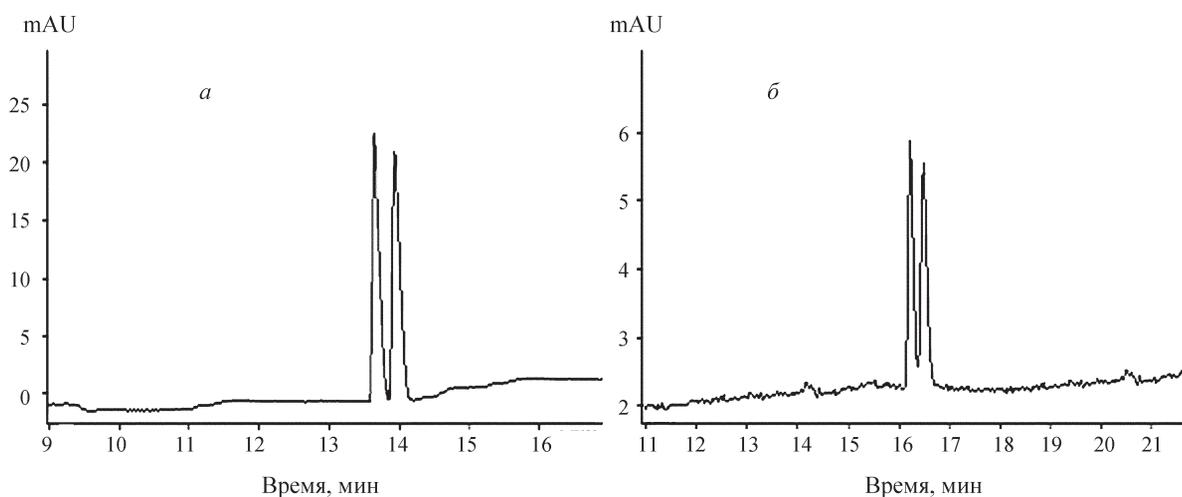


Рис. 2. Электрофореграмма флурбипрофена (а) и индопрофена (б). Условия: метанол / ФБ, pH 5,8 (60/40 об.%), 0,5 мМ эремомицин,  $U = -20$  кВ

составляет (50,7±2,2)%, доля энантиомера, мигрирующего вторым (13,3 мин) составляет (49,3±2,2)%. Наибольшее содержание кетопрофена (2,4±0,1)% совпадает с заявленным производителем (2,5 %).

Из данных, полученных нами ранее [6] следует, что в водном КЭ модифицированные капилляры обладают заметными преимуществами перед немодифицированными – уменьшение адсорбции ХС на стенках капилляра и времени анализа и, главное, снижение необходимой концентрации ХС для разделения энантиомеров. Так, в капилляре, модифицированном эремомицином через эпоксисилан, частичное разделение энантиомеров флурбипрофена

( $R_s = 0,52$ ) и кеторпрофена ( $R_s = 0,35$ ) получено при концентрации 0,1 мМ ХС в ФЭ, что намного меньше значений концентрации, представленных в литературе ранее (от 1 до 5 мМ) [2]. Однако получение модифицированных капилляров требует достаточно много времени и сил. Кроме того, их использование накладывает определенные ограничения на значения рН фонового электролита и приложенного напряжения, поэтому в качестве альтернативы можно предложить использование водно-метанольного ФЭ в немодифицированном капилляре. В данном случае в оптимальных условиях время анализа не превышает 15 мин.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №12-03-31255).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpigun O.A. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. **53**. P. 1170.
2. Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpak A.V., Staroverov, S. M., Shpigun, O. A. // J. Chromatogr. A. 2009. **1216**. P. 3674.
3. Weinberger R. Practical Capillary Electrophoresis. 2nd ed. 2000. N.Y.
4. Horvath J., Dolnik V. // Electrophoresis. 2001. **22**. P. 644.
5. Fang N., Zhang H., Li H.-W., Yeung E.S. // Anal. Chem. 2007. **79**. P. 6047.
6. Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Староверов С.М., Кузнецов М.А. // Сорб. и хром. процессы. 2011. **11**. С. 589.

Поступила в редакцию 25.03.13

### ELECTROPHORETIC ENANTIOSEPARATION OF PROFENS IN WATER-METHANOL SOLUTIONS USING EREMOMYCIN AS A CHIRAL SELECTOR

M.V. Lebedeva, A.F. Prokhorova, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun

**The possibility of electrophoretic enantioseparation of profens in water-methanol solution of eremomycin was demonstrated. Effect of methanol content, phosphate buffer pH, and chiral selector concentration on enantioresolution was studied. Water-methanol run buffer was shown to provide better reproducibility of migration times, baseline stability compared to aqueous buffers. Analysis time in non-aqueous conditions is less than 15 min.**

**Key words:** capillary electrophoresis, enantioseparation, macrocyclic antibiotics, eremomycin, profens.

**Сведения об авторах:** Лебедева Маргарита Владимировна – аспирант химического факультета МГУ (margoL87@mail.ru); Прохорова Александра Федоровна – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (alexapro@gmail.com); Шаповалова Елена Николаевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (shapovalova@analyt.chem.msu.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, чл.-кор. РАН (shpigun@analyt.chem.msu.ru).