

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 547.2/9:543.545

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.4.32>

А. А. Рыхлова, М. Л. Пивовар

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭЛЕКТРОМИГРАЦИЮ ПРОКАИНА ГИДРОХЛОРИДА В УСЛОВИЯХ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье рассмотрено влияние различных факторов на электромиграцию прокаина гидрохлорида в условиях электрофоретического разделения методом капиллярного электрофореза. Изучена скорость нарастания напряжения в системе капиллярного электрофореза, и разработано устройство, позволяющее измерить потенциал в системе независимо от программного обеспечения. Исследовано влияние разности гидростатического давления на входе и выходе кварцевого капилляра и разница в подходе к выполнению анализа при смене фонового электролита. Изучено влияние длины вводимой зоны образца на воспроизводимость результатов количественного определения прокаина гидрохлорида. С целью повышения эффективности разделения и воспроизводимости результатов количественного анализа рекомендуется заменять фоновый электролит после каждого анализа, а также вводить образец, избегая малых значений времени ввода и высокого давления. Рассчитаны значения кажущейся подвижности исследуемого вещества, которые могут быть использованы при разработке методик количественного определения прокаина гидрохлорида методом капиллярного электрофореза. Полученные результаты исследований могут быть применимы в химических и фармацевтических лабораториях, а также в научных исследованиях.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, воспроизводимость, эффективность, прокаина гидрохлорид.

ВВЕДЕНИЕ

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) – это физический метод, в основе которого лежат электрокинетические явления (электроосмос и электромиграция ионов или других заряженных частиц), позволяющие разделять сложные смеси на составляющие компоненты и анализировать их. При разработке новых методик на основе метода КЭ сравнительную характеристику обычно производят с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Это связано с тем, что в обоих методах разделение компонентов сложной смеси выполняется в ограниченном пространстве: в случае КЭ – в капилляре, а в случае ВЭЖХ – в колонке. Разделение происходит с участием движущейся жидкой фазы: буферного раствора в случае КЭ или подвижной фазы (элюента) в случае ВЭЖХ. Принципы детектирования в обоих методах также схожи. У метода КЭ имеется ряд преимуществ по сравнению

с ВЭЖХ: относительная простота пробоподготовки, малые объемы используемых буферных растворов и анализируемой пробы, высокая эффективность разделения, экспрессность анализа, низкая стоимость единичного анализа, относительно простое и, как следствие, не очень дорогое оборудование. При выполнении анализа методом КЭ практически не используются органические растворители [1–3].

К снижению эффективности и воспроизводимости результатов КЭ могут приводить такие факторы, как образование температурного градиента в объеме и на внутренней стенке кварцевого капилляра, увеличение зоны вводимой пробы, разность давлений в капилляре, адсорбция компонентов исследуемого образца и фонового электролита (ФЭ) на стенках капилляра [2, 4]. Устранение первого из перечисленных факторов осуществляется конструктивными особенностями используемых приборов (например, жидкостное охлаждение), остальные необходимо устранять методи-

чески при выполнении анализа. Вместе с тем методические подходы к устранению указанных факторов либо не описаны, либо используются *in-situ* без детального разъяснения их эффективности и применимости.

Целью данной работы являлось выявление факторов, влияющих на электромиграцию прокаина гидрохлорида в условиях капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: фармацевтическая субстанция прокаина гидрохлорида (производитель Fluka Analytical), трис (гидроксиэтил)аминометан (производитель Glentam Life Sciences), триэтиламин (производитель Sigma Aldrich), кислота фосфорная концентрированная, кислота хлористоводородная концентрированная, натрия гидроксид.

Оборудование: система капиллярного электрофореза «Капель-205», рН-метр HI 2211, аналитические весы Radwad 60/220/C/2.

Испытуемый раствор: водный раствор прокаина гидрохлорида, концентрация 10,00 мкг/мл.

Буферные растворы: водный раствор 20 mM трис(гидроксиэтил)аминометана, 0,4% триэтиламина, кислота фосфорная концентрированная, кислота соляная концентрированная, натрия гидроксид до необходимого pH (ионная сила 0,1 M) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ввиду относительно большого разброса времени миграции в ходе эксперимента (свыше 5%), наблюдавшегося при выполнении анализа растворов прокаина гидрохлорида, необходимо было проверить стабильность приложенного к кассете напряжения, а, следовательно, потенциала, обеспечивающего формирование электроосмотического потока.

Авторами статьи было разработано устройство для измерения напряжения в режиме on-line независимо от программного обеспечения (рисунок 1).



Рисунок 1. – Блок-схема устройства для измерения высокого напряжения в системе капиллярного электрофореза «Капель-205»

В результате выполненных измерений установлено, что подача на кассету высокого напряжения с фиксированной величиной потенциала происходит не мгновенно, а наблюдается плавное, практически линейное нарастание напряжения. Длительность развития потенциала на

кассете зависит от заданного напряжения. Так, для достижения 20 кВ системе КЭ необходимо затратить около 10 секунд из всего времени анализа (рисунок 2).

Исходя из полученных данных, был сделан вывод о том, что для системы капиллярного электрофореза «Капель-205» неже-

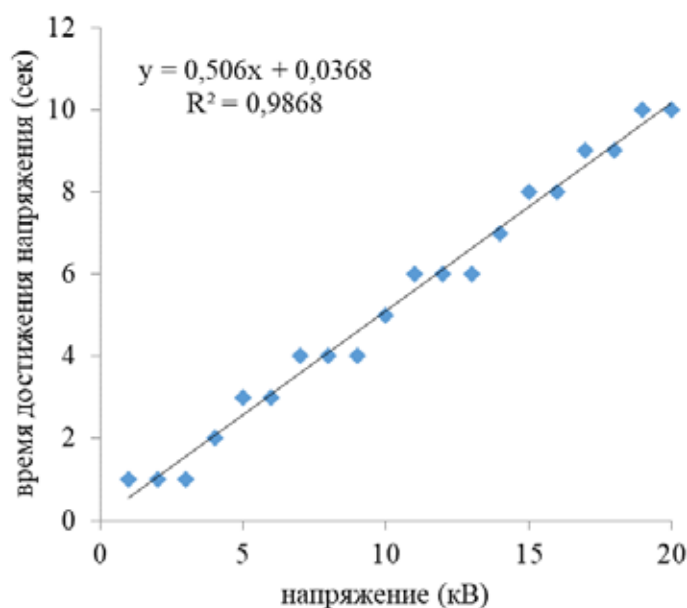


Рисунок 2. – Зависимость времени установления напряжения в системе капиллярного электрофореза «Капель-205» от заданного напряжения

лательно выполнение непродолжительных анализов с высоким потенциалом в системе, т.к. в данных условиях увеличивается доля времени развития потенциала по отношению к общему времени анализа. Указанный факт, наиболее вероятно, может приводить к значительному разбросу времени электромиграции вещества. Данное влияние можно нивелировать при использовании условий (низкое напряжение при анализе, состав фонового электролита, температурный режим), приводящих к более длительной электромиграции веществ. Стоит отметить, что данный подход, учитывая высокую эффективность метода капиллярного электрофореза, противоречит методологии, используемой в ВЭЖХ. Так, в методе КЭ, при наличии достаточной эффективности системы, не имеет смысла увеличивать время анализа, а зачастую его стремятся сократить.

Дополнительно, с целью оценки влияния на воспроизводимость времени электромиграции прокаина гидрохлорида, было изучено влияние разности гидростатического давления на свободных концах капилляра. Эффект разности гидростатического давления может быть вызван разным уровнем жидкости в сосудах с буферным раствором (БР). Теоретически сифонный эффект из выходного сосуда во входной (или наоборот) приводит к наложению гидравлически образуемого потока

жидкости на электроосмотический поток, создаваемый разностью потенциалов в капилляре. Это может приводить к ухудшению воспроизводимости результатов анализа и эффективности разделения [4].

Разные уровни БР (и разное гидростатическое давление на свободных концах капилляра соответственно) образуются при длительных серийных исследованиях за счет переноса жидкости электроосмотическим потоком и, как следствие, ухудшают результаты анализа. Для оценки влияния разных уровней БР на воспроизводимость результатов анализа нами изучены два варианта выполнения серийного анализа: с заменой фонового электролита (ФЭ) для каждого последующего анализа и с заменой ФЭ один раз после каждых 6 анализов (согласно рекомендациям производителя [6, 7]) (таблица 1).

Как видно из таблицы 1, выборочные дисперсии результатов анализа, полученных при замене ФЭ после каждого 6-ого анализа, достоверно отличаются от выборочных дисперсий результатов анализа, полученных при замене ФЭ после каждого анализа (для диаметра капилляра свыше 25 мкм). Причем с увеличением диаметра увеличивается дисперсия. Таким образом, при работе с диаметрами капилляра свыше 25 мкм необходимо рекомендовать замену ФЭ после каждого анализа.

Таблица 1. – Влияние частоты замены ФЭ на время миграции прокаина гидрохлорида

Диаметр капилляра	50 мкм		75 мкм		100 мкм	
	замена ФЭ после каждого анализа	замена ФЭ после 6-ого анализа	замена ФЭ после каждого анализа	замена ФЭ после 6-ого анализа	замена ФЭ после каждого анализа	замена ФЭ после 6-ого анализа
$t_{\text{мигр привед}}^*$ мин	9,756	9,897	9,795	9,933	9,845	9,850
	9,768	9,862	9,861	9,861	9,796	9,731
	9,874	9,811	9,901	9,753	9,789	9,623
	9,785	9,756	9,773	9,703	9,863	9,607
	9,874	9,743	9,802	9,698	9,913	9,521
	9,846	9,601	9,799	9,632	9,798	9,442
S^2	$2,897 \cdot 10^{-3}$	$1,107 \cdot 10^{-2}$	$1,272 \cdot 10^{-2}$	$1,730 \cdot 10^{-3}$	$2,394 \cdot 10^{-3}$	$2,128 \cdot 10^{-2}$
$F_{\text{экс}}$	3,82		5,38		8,89	
$F_{\text{кр}}$	5,05		5,05		5,05	
Результаты	$F_{\text{экс}} < F_{\text{кр}}$ (статистически достоверных различий нет)		$F_{\text{экс}} > F_{\text{кр}}$ (статистически достоверные различия есть)		$F_{\text{экс}} > F_{\text{кр}}$ (статистически достоверные различия есть)	

Примечание: $t_{\text{мигр привед}}^*$, мин – время миграции, пересчитанное на эффективную длину капилляра, равную 53 см; S^2 – выборочная дисперсия; $F_{\text{экс}}$ – экспериментальное значение критерия Фишера; $F_{\text{кр}}$ – критическое значение критерия Фишера.

Кроме перечисленных факторов, было изучено время ввода образца под давлением. Исходя из литературных данных [4], во время введения образца в капилляр рекомендуется следить за тем, чтобы длина вводимой зоны образца была минимальной. Если длина зоны будет больше того размытия, которое обуславливается диффузией, то уменьшается эффективность и разрешающая способность метода КЭ. Вклад воздействия длины вводимой зоны образца в общее размытие зоны определяется формулой [4]:

$$\sigma_{inj}^2 = (w_i^2) / 12, \quad (1)$$

где σ_{inj}^2 – вклад воздействия вводимой зоны образца,

w_i – длина вводимой зоны.

Исследование влияния времени ввода пробы на результаты анализа проводили с использованием кассеты для капиллярного электрофореза с диаметром капилляра 75 мкм [8].

Исходя из полученных данных (таблица 2) можно сделать вывод о том, что слишком малое время ввода образца (1–3 секунды) приводит к получению маловоспроизводимых результатов количественного анализа. Данное явление, очевидно, связано с тем, что система ввода образца в системе капиллярного электрофореза «Капель-205» пневматическая, и давление при

вводе не создается мгновенно, а прогрессивно возрастает на первом участке временного промежутка, используемого для ввода пробы. Как следствие, при большом давлении и очень малом времени ввода образца может наблюдаться ситуация, когда давление в течение ввода пробы нельзя считать постоянным. В данной ситуации будет наблюдаться отчетливый градиент давления, который будет вносить значительные искажения в объем вводимого образца. При более длительном времени ввода пробы данный эффект нивелируется за счет изменения соотношения времени набора давления к общему времени ввода пробы.

В имеющихся руководствах по работе с системой КЭ (СКЭ) [4] имеются рекомендации по максимальной заполняемости капилляра исследуемым образцом. Практический предел длины вводимой зоны образца составляет до 3% от полной длины капилляра [4]. Однако, исходя из полученных данных (таблица 2), при использовании длительного времени ввода пробы не наблюдается ухудшения эффективности и разрешающей способности СКЭ. Таким образом, при работе с образцами с низким содержанием исследуемого вещества допустимо рассматривать увеличение времени ввода пробы сверх рекомендуемых значений с целью увеличения площади пика и повышения чувствительности.

Таблица 2. – Заполнение капилляра образцом в зависимости от времени введения и приложенного давления (длина капилляра (эффективная/общая) – 53/60 см, диаметр капилляра – 75 мкм)

Время введения образца, сек	Заполнение капилляра образцом, мм	Заполнение капилляра образцом, %	Отклонение площади пика от линии тренда, %
1	1,18	0,20	-17,56
2	2,36	0,39	-7,64
3	3,54	0,59	-3,85
4	4,72	0,79	-0,05
5	5,90	0,98	-1,78
6	7,08	1,18	-0,86
7	8,26	1,38	-2,73
8	9,44	1,57	0,54
9	10,62	1,77	-2,53
10	11,80	1,97	-2,78
11	12,98	2,16	-1,67
12	14,16	2,36	-0,44
13	15,34	2,56	2,42
14	16,52	2,45	1,16
15	17,70	2,95	1,83
16	18,88	3,15	2,58
17	20,06	3,34	2,97
18	21,24	3,54	1,71
19	22,42	3,74	1,23
20	23,60	3,93	1,23
21	24,78	4,13	4,35
22	25,96	4,33	4,15
23	27,14	4,52	-0,57
24	28,32	4,72	-2,37
25	29,50	4,92	-0,99
26	30,68	5,11	-1,17
27	31,86	5,31	-0,93
28	33,04	5,51	-2,95
29	34,22	5,70	1,49
30	35,40	5,90	-2,36

В результате выполненного исследования определена степень влияния различных факторов на воспроизводимость и эффективность анализа прокаина гидрохлорида и рассчитаны значения кажущейся подвижности (μ_a) прокаина гидрохлорида. Для расчета использовали формулу [4]:

$$\mu_a = l \cdot L / (t_a \cdot V), \quad (2)$$

где l – эффективная длина капилляра,
 L – полная длина капилляра,
 t_a – время миграции прокаина гидрохлорида,
 V – приложенное напряжение.

Полученные значения кажущейся подвижности прокаина гидрохлорида представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Кажущаяся подвижность прокаина гидрохлорида при различных значениях pH (длина капилляра (эффективная/общая) – 53/60 см, диаметр капилляра – 75 мкм, напряжение – 20 кВ)

Значения pH	μ_a , см ² /(В·с)
2	$1,01 \cdot 10^{-4}$
3	$2,89 \cdot 10^{-4}$
4	$5,31 \cdot 10^{-4}$
5	$6,99 \cdot 10^{-4}$
6	$6,84 \cdot 10^{-4}$
7	$6,70 \cdot 10^{-4}$
8	$6,65 \cdot 10^{-4}$
9	$7,20 \cdot 10^{-4}$
10	$8,07 \cdot 10^{-4}$
11	$9,40 \cdot 10^{-4}$

Эти значения объясняют скорость электроосмотического потока при использовании разных значений pH фонового электролита. Значения кажущейся подвижности могут быть использованы для выбора оптимальных условий электрофоретического разделения (время электромиграции, оптимальный диапазон pH, напряжение во время анализа) при разработке методик количественного определения прокаина гидрохлорида методом капиллярного электрофореза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что на процесс электромиграции прокаина гидрохлорида влияет частота замены фонового электролита, pH фонового электролита, время ввода образца.

Выработаны рекомендации, связанные с повышением воспроизводимости результатов анализа и эффективности разделения. В частности, при работе в режиме ввода пробы под давлением необходимо производить замену фонового электролита после каждого анализа (в случае использования давления при вводе пробы свыше 25 мбар). Ввод образца следует осуществлять в течение более чем трех секунд.

Рекомендации выработаны с учётом результатов изучения влияния разности гидростатического давления на концах капилляров, нарастания напряжения в системе капиллярного электрофореза, времени ввода пробы и pH на миграционные характеристики прокаина гидрохлорида.

Разработано и использовано устройство для измерения высокого напряжения в режиме on-line в системе капиллярного электрофореза «Капель-205».

SUMMARY

A. A. Rykhlova, M. L. Pivovarov
FACTORS EFFECTING
PROCAINE HYDROCHLORIDE
ELECTROMIGRATION UNDER
CONDITIONS OF CAPILLARY
ELECTROPHORESIS

The article discusses the influence of various factors on procaine hydrochloride electromigration under conditions of electrophoretic separation by capillary electrophoresis. The rate of voltage rise in the capillary electrophoresis system has been studied and a device making it possible to measure the potential in the system independent of the program

software has been developed. The influence of the difference in hydrostatic pressure at the inlet and outlet of the quartz capillary and the difference in the approach to the analysis when changing the base electrolyte are investigated. The influence of the sample injected zone length on reproducibility of assay results of procaine hydrochloride has been studied. In order to improve separation efficiency and reproducibility of quantitative analysis results it is recommended to replace the base electrolyte after each analysis, as well as to inject the sample avoiding short injection values and high pressure. The values of apparent mobility of the test substance which can be used in the development of methods for procaine hydrochloride assay by capillary electrophoresis are calculated. The research results obtained can be applied in chemical and pharmaceutical laboratories as well as in scientific research.

Keywords: capillary electrophoresis, reproducibility, efficiency, procaine hydrochloride.

ЛИТЕРАТУРА

1. Езерская, А. А. Капиллярный электрофорез: основные принципы, применение в фармацевтическом анализе / А. А. Езерская, М. Л. Пивовар // Вестн. фармации. – 2019. – № 1. – С. 35–44.
2. Capillary electrophoresis / R. K. Harstad [et al.] // Analytical chemistry. – 2016. – Vol. 88, iss. 1. – P. 299–319.
3. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review / M. Ramos-Payán [et al.] // Electrophoresis. – 2018. – Vol. 39, N 1. – P. 111–125.
4. Лауэр, Х. Х. Высокоэффективный капиллярный электрофорез / Х. Х. Лауэр; ред. Г. П. Розинг. – Санкт-Петербург: Профессия, 2019. – 240 с.
5. Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE-DAD) / J. L. Costa [et al.] // J. of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. – 2014. – Vol. 945–946. – P. 84–91.
6. Езерская, А. А. Оценка влияния различных факторов на воспроизводимость результатов анализа прокаина гидрохлорида методом капиллярного электрофореза [Электронный ресурс] / А. А. Езерская, М. Л. Пивовар // Студенческая медицинская наука XXI века. V Форум молодых научных обществ : материалы XX междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых и V Форума молодежи. науч. обществ, Витебск, 28–29 окт. 2020 г. / редкол.: А. Т. Щастный [и др.]. – Витебск, 2020. – С. 714–716. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

7. Комарова, Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – Санкт-Петербург: ВЕДА, 2006. – 212 с.

8. Езерская, А. А. Оценка влияния времени ввода на воспроизводимость результатов анализа методом капиллярного электрофореза [Электронный ресурс] / А. А. Езерская, М. Л. Пивовар // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 76-ой науч. сес. ВГМУ, Витебск, 28–29 янв. 2021 г. / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск, 2021. – С. 235–236. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

REFERENCES

1. Ezerskaia AA, Pivovarov ML. Capillary electrophoresis: basic principles, application in pharmaceutical analysis. *Vestn farmatsii*. 2019;(1):35–44. (In Russ.)

2. Harstad RK, Johnson AC, Weisenberger MM, Bowser MT. Capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 2016;88(1):299–319. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04125

3. Ramos-Payán M, Ocaña-Gonzalez JA, Fernández-Torres RM, Llobera A, Bello-López MÁ. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review. *Electrophoresis*. 2018;39(1):111–25. doi: 10.1002/elps.201700269

4. Lauer KhKh. Highly efficient capillary electrophoresis. *Rozing GP, redactor. Sankt-Peterburg, RF: Professii*; 2019. 240 s. (In Russ.)

5. Costa JL, Morrone AR, Resende RR, Chasin AA, Tavares MF. Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE–DAD). *J Chromatogr B Analyt*

Technol Biomed Life Sci. 2014;945-946:84–91. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.014

6. Ezerskaia AA, Pivovarov ML. Evaluation of the influence of various factors on the reproducibility of the results of analysis of procaine hydrochloride by capillary electrophoresis [Elektronnyi resurs]. V: Shchastnyi AT, Gorodetskaia IV, Lud NG, Sushkov SA, Khishova OM, Cherniavskii IuP, redkollegiia. *Studencheskaia meditsinskaia nauka KhKhI veka. V Forum molodezhnykh nauchnykh obshchestv* [CD-ROM]. Materialy XX mezhdunar nauch-prakt konf studentov i molodykh uchenykh i V Forum molodezh nauch obshchestv; 2020 Okt 28-29; Vitebsk, Belarus'. Vitebsk, RB; 2020. s. 714–6. (In Russ.)

7. Komarova NV, Kamentsev IaS. Practical guide to the use of capillary electrophoresis systems "DROP". Sankt-Peterburg, RF: VEDA; 2006. 212 s. (In Russ.)

8. Ezerskaia AA, Pivovarov ML. Evaluation of the effect of injection time on the reproducibility of analysis results by capillary electrophoresis [Elektronnyi resurs]. V: Shchastnyi AT, redactor. *Dostizheniia fundamental'noi, klinicheskoi meditsiny i farmatsii* [CD-ROM]. Materialy 76-oi nauch ses VGMU; 2021 Ianv 28-29; Vitebsk, Belarus'. Vitebsk, RB; 2021. s. 235–6. (In Russ.)

Адрес для корреспонденции:

210009, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена Дружбы
народов медицинский университет»,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. раб.: 8 (029) 812 16 00,
e-mail: anastasiya96ezerskaya@gmail.com,
Рыхлова А. А.

Поступила 05.10.2021 г.

УДК 615.282.535.243

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.4.38>

О. И. Лазовская¹, В. В. Сенчук², В. Н. Леонтьев¹

О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИЛИРУБИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

¹Белорусский государственный технологический университет,

г. Минск, Республика Беларусь,

²СП ООО «Фармлэнд», г. Минск, Республика Беларусь

При получении лекарственных препаратов альбумина человека с высокой связывающей способностью для применения в детоксикационной терапии актуальной задачей