

На правах рукописи

Лебедева Маргарита Владимировна

**МАКРОЦИКЛИЧЕСКИЕ АНТИБИОТИКИ КАК НОВЫЕ
ХИРАЛЬНЫЕ СЕЛЕКТОРЫ В НЕВОДНОМ КАПИЛЛЯРНОМ
ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: чл.-корр. РАН, доктор химических наук, профессор
Шпигун Олег Алексеевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Даванков Вадим Александрович
Учреждение Российской академии наук Институт
элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

кандидат химических наук
Назимов Игорь Владимирович
Учреждение Российской академии наук Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова

Ведущая организация: **Центр «Биоинженерия» Российская Академия Наук**

Защита состоится 19 марта 2014 г. в 15 ч. 00 мин. в ауд. 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат диссертации размещен на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (www.chem.msu.ru) и на сайте ВАК (<http://vak.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан 14 февраля 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Разделение оптических изомеров является важной задачей аналитической химии. С ужесточением требований контроля качества продукции фармацевтической промышленности большое значение приобретают описание фармакологических свойств отдельных изомеров и оценка энантиомерной чистоты лекарственных препаратов. В последнее время наблюдается увеличение количества препаратов, активным веществом которых является только один индивидуальный оптический изомер. Использование таких лекарственных средств позволяет снизить необходимую дозировку и избежать неблагоприятных побочных эффектов. Разработка методик разделения оптических изомеров и определения хирального состава лекарственных препаратов является актуальной задачей, с которой наряду с ВЭЖХ успешно справляется метод капиллярного электрофореза (КЭ), который является высокоэффективным и экспрессным методом. В основном в качестве фонового электролита (ФЭ) используют водные растворы, однако замена воды на органические растворители расширяет область применения капиллярного электрофореза, так появляется возможность использования растворимых в органических растворителях хиральных селекторов (ХС), обладающих нужной энантиоселективностью, анализа нерастворимых и/или неустойчивых в воде соединений. Низкая степень диссоциации многих электролитов в органических растворителях приводит к уменьшению электропроводности фонового электролита, что позволяет разделять вещества при высоком напряжении без существенного разогревания капилляра, при этом уменьшается время анализа и повышается эффективность. Так же применение органических растворителей уменьшает адсорбцию компонентов фонового электролита, селектора и пробы на стенках капилляра, что улучшает параметры разделения.

Макроциклические антибиотики (МА) являются одним из основных классов соединений, используемых в качестве хиральных селекторов в КЭ. В водном варианте метода использование некоторых антибиотиков ограничено их растворимостью, поэтому применение органических растворителей в качестве фоновых электролитов позволит значительно расширить круг исследуемых селекторов. Макроциклические антибиотики в неводном капиллярном электрофорезе (НКЭ) практически не исследованы. Механизм энантиоразделения еще до конца не ясен и, следовательно, не существует однозначного ответа на вопрос о возможности применения того или иного хирального селектора для решения конкретной задачи. Поэтому поиск новых антибиотиков и систематическое изучение влияния состава фонового электролита на энантиоразделение позволит выявить некоторые закономерности процесса и дать рекомендации по выбору условий разделения.

Цель работы заключалась в использовании макроциклических антибиотиков как новых хиральных селекторов (эремомидина, азитромицина, кларитромицина и эритромицина) для разделения энантиомеров профенов, аминов и аминокислот в неводном капиллярном электрофорезе. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- изучение свойств исследуемых антибиотиков (растворимость в водно-органических и неводных системах, оптическое поглощение, стабильность растворов, адсорбция на стенках кварцевого капилляра);
- оценка влияния метанола на разделение энантиомеров профенов в немодифицированном кварцевом капилляре при использовании эремомицина;
- исследование влияния состава фонового электролита (содержания и природы кислот и оснований, природы органического растворителя) на энантиоразделяющую способность азитромицина, кларитромицина и эритромицина, и выявление наиболее значимых факторов, влияющих на разделение энантиомеров аминов и аминок спиртов;
- сравнение закономерностей энантиоразделения в неводном капиллярном электрофорезе при использовании азитромицина, кларитромицина и эритромицина.

Научная новизна. Показана возможность использования эремомицина как хирального селектора в водно-органических фоновых электролитах для успешного разделения энантиомеров профенов. Установлены преимущества данных фоновых электролитов по сравнению с водными: уменьшение адсорбции хирального селектора на стенках немодифицированного кварцевого капилляра, высокая эффективность и воспроизводимость.

В работе впервые изучены эритромицин и кларитромицин в форме оснований в качестве хиральных селекторов в неводных фоновых электролитах. Систематическое исследование влияния состава фонового электролита (природы органического растворителя, содержания и природы кислот и оснований), концентрации хирального селектора на миграцию и энантиоразделение позволило установить основные закономерности и выбрать условия разделения энантиомеров ряда органических аминов и аминок спиртов.

Показана принципиальная роль борной кислоты в составе неводных фоновых электролитов для достижения энантиоразделения с использованием азитромицина, кларитромицина и эритромицина в качестве хиральных селекторов. Доказано образование комплекса макролид * борная кислота, который принимает участие в энантиоразделении.

Практическая значимость. Установлено, что применение водно-органических фоновых электролитов является альтернативой использования модифицированных капилляров для разделения энантиомеров профенов с эремомицином в качестве хирального селектора. Получено разделение энантиомеров флурбипрофена, индопрофена, кетопрофена и фенопрофена с высоким разрешением менее чем за 17 мин.

Выбраны оптимальные условия разделения энантиомеров 4 профенов и 20 аминов и аминок спиртов с применением исследуемых антибиотиков.

Доказано образование комплекса макролида и борной кислоты, который участвует в энантиоразделении. Использование метанольного раствора комплекса в качестве фонового электролита позволяет успешно разделять энантиомеры оптически активных веществ без введения дополнительных добавок борной кислоты.

Показана возможность одновременного разделения энантиомеров нескольких соединений основного характера в присутствии макролидов. Применимость разработанных подходов показана на примере определения энантиомерного состава различных лекарственных препаратов и содержания в них основных компонентов. Определен энантиомерный состав и содержание тетрагидрозолина в глазных каплях, пропранолола в таблетках и кетопрофена в геле.

Автор выносит на защиту:

- Результаты исследования растворимости и адсорбции антибиотиков в водно-органических и неводных системах.
- Данные по исследованию влияния добавки метанола в фоновом электролите на электрофоретическое поведение и энантиоразделение профенов в присутствии эремомицина.
- Условия разделения энантиомеров ряда аминов и аминок спиртов в неводных системах с применением азитромицина, кларитромицина и эритромицина в качестве хиральных селекторов.
- Результаты исследования роли борной кислоты в энантиоразделении аналитов с использованием макролидов в качестве хиральных селекторов в неводных системах.
- Условия количественного определения энантиомерного состава некоторых лекарственных препаратов с использованием различных хиральных селекторов.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на 11 международных и всероссийских конференциях, включающих 17th International Symposium on Capillary Electrophoresis Techniques (Балтимор, США, 2010), II Всероссийскую конференцию «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2010), Nordic Separation Science Society 6th Conference (Рига, Латвия, 2011), III Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, Россия, 2011), Advances in Chromatography and Electrophoresis & ChirAnal 2012 (Оломоуц, Чешская Республика, 2012), 29th International Symposium on Chromatography ISC 2012 (Торунь, Польша, 2012), 3-ю научную конференцию с международным участием «Химия – 2013. Физическая химия. Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика, преподавание» (Москва, Россия, 2013), 29th International Symposium on Microscale Bioseparations (Шарлоттсвилль, США, 2013), XX Международную научную конференцию студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, 2013), 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2013 (Амстердам, Нидерланды, 2013), 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Шиофок, Венгрия, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи, 13 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 1 главы обзора литературы, 1 главы экспериментальной части, 4 глав обсуждения результатов, выводов, 4 приложений, списка литературы, включающего 124

источника. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков и 23 таблицы.

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость.

Обзор литературы состоит из одной главы (1), в которой изложены основы метода капиллярного электрофореза, особенности его неводного варианта и систематизированы хиральные селекторы, используемые в методе неводного капиллярного электрофореза.

Экспериментальная часть работы содержит одну главу (2), в которой перечислены исходные вещества и их характеристики, использованное оборудование, а также приведены методики приготовления растворов, проведения реакций и обработки результатов измерений.

Обсуждение результатов представлено четырьмя главами (3-6). Третья глава посвящена изучению свойств исследуемых в качестве хиральных селекторов антибиотиков. В четвертой и пятой главах описано энантиоразделение веществ с использованием антибиотиков в водно-органических и неводных системах. Шестая глава посвящена применению разработанных подходов для определения оптически активных компонентов в лекарственных препаратах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Описаны основы теории хирального капиллярного электрофореза, в частности его неводного варианта, а также влияние растворителя на механизм энантиоразделения. Критически рассмотрены особенности метода неводного КЭ. Проведен анализ и систематизированы литературные данные об использовании циклодекстринов, антибиотиков и других хиральных селекторов для энантиоразделения в неводных условиях методом капиллярного электрофореза.

Экспериментальная часть

Стандартные растворы (1 мг/мл) индопрофена, кетопрофена, фенпрофена и флурбипрофена, альпренолола, атенолола, изопротеренола, кленбутерола, лабеталола, метопролола, пиндолола, пропранолола, сальметерола, сальбутамола, соталола, фенотерола, 2,2'-диамино-1,1'-бинафталина, амфетамина, гидроксизина, доксиламина, меклозида -метилбензиламина, метоксифенамина, норэфедрина, норметанефрина, октопамина, окспренолола, основания Трегера, *n*-гидроксиминдальной кислоты, *n*-гидроксиэфедрина, прометамина, селегилина, синефрина, тетрагидрозолина, тербуталина, триптофанола, хлорфенирамина, хлорпсевдоэфедрина, *n*-хлорамфетамина, эпинефрина, эфедрина готовили растворением точных навесок в метаноле, DL-триптофана, DL-*n*-хлорфенилаланина – в воде. Рабочие растворы (0,1 мг/мл) готовили разбавлением стандартных растворов метанолом. В качестве хиральных селекторов использовали азитромицин, кларитромицин, кларитромицин цитрат, эритромицин, эремомицин сульфат.

Комплекс эритромицина и борной кислоты синтезировали по методике, описанной в литературе: к раствору эритромицина в этаноле добавляли раствор борной кислоты в том же растворителе, перемешивали, затем растворитель удаляли

в потоке воздуха, остаток перекристаллизовывали из смеси хлороформа и петролейного эфира. Идентификацию полученного комплекса проводили методом ИК-спектроскопии, элементного анализа и определением температуры плавления.

Исходные растворы борной кислоты (H_3BO_3), лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$), NaOH, Трис, триэтиламина (ТЭА), трибутиламина (ТБА), диэтиламина (ДЭА) готовили растворением точной навески в метаноле (или ацетонитриле). Лактобионовую кислоту растворяли в смеси метанол/вода (2/1). Боратный и цитратный буферные растворы в метаноле готовили разведением исходных растворов кислот и соответствующего основания в метаноле или смеси метанол/ацетонитрил. Фосфатный буферный раствор (ФБ) готовили по навеске сухих солей дигидрофосфата и гидрофосфата калия, pH доводили до нужного значения раствором KOH. Водный боратный буферный раствор готовили растворением сухой соли тетрабората натрия в воде, pH доводили 0,1 М раствором соляной кислоты. Фоновые электролиты были приготовлены растворением точной навески антибиотиков в соответствующем буферном растворе. В качестве маркеров электроосмотического потока (ЭОП) использовали 2-пропанол, ацетон или метанол.

В работе использовали системы для капиллярного электрофореза «Капель-103Р», «Капель-105М» (НПФ АП «Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия) со спектрофотометрическим детектором (254 и 190-380 нм) и Agilent 7100 CE (Agilent Technologies, США). Использовали кварцевый капилляр длиной 45/35,5 см с внутренним диаметром 50 мкм и внешним диаметром 363 мкм (Polymicro Technologies, Phoenix, США). Величина приложенного напряжения составляла $\pm(10-30)$ кВ. Исследования проводили при термостатировании капилляра при 20 °С. Образцы вводили давлением (25 мбар, 15 с). Для приготовления водных растворов использовали деионизованную воду с сопротивлением 18,2 МОм*см, очищенную на установке «MilliQ» («Millipore», Франция). Подготовку растворов проводили в УЗИ-бане «Сапфир» (НПФ «Сапфир», Москва). pH водных растворов контролировали на pH-метре «Schott». Регистрацию спектров поглощения осуществляли на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония), ИК-спектров на ИК-спектрометре с Фурье преобразованием «Икар» (ЗАО «Микротех», Россия). Элементный анализ проводили с использованием элементного анализатора Vario MICRO Cube (Elementar, Германия).

Обсуждение результатов

Свойства исследуемых антибиотиков

Структурные формулы антибиотиков: эремомицина, азитромицина, эритромицина и кларитромицина, исследуемых в качестве хиральных селекторов представлены на рис.1. Необходимым условием использования потенциального хирального селектора в капиллярном электрофорезе является его растворимость и устойчивость в фоновом электролите, также предпочтительна незначительная адсорбция селектора на стенках немодифицированного кварцевого капилляра.

Растворимость антибиотиков. В неводном капиллярном электрофорезе выбор растворителя фонового электролита во многом определяется растворимостью исследуемых хиральных селекторов. Гликопептидный антибиотик эремомицин хорошо растворим в воде, мало растворим в метаноле и практически нерастворим в ацетонитриле. Получено, что максимальная растворимость эремомицина в ФЭ, состоящем из MeOH / 50 mM ФБ, pH 5.8 (60 / 40 об. %),

составляет 8,3 мМ. Растворимость эремомицина резко уменьшается при увеличении доли MeOH до 70 об. %, уже в растворах, содержащих 2 мМ антибиотика, со временем наблюдается образование осадка. При использовании ацетонитрила в качестве органической составляющей растворимость эремомицина уменьшается, в фоновом электролите с содержанием MeCN 50 об. % удается растворить только 2 мМ антибиотика.

Антибиотики азитромицин и эритромицин в форме оснований растворимы в метаноле, ацетонитриле и в водно-метанольных системах, однако в последних растворимость значительно хуже, чем в неводных. Например, азитромицин и эритромицин растворимы в ФЭ, содержащем 60 об. % MeOH, в концентрации 60 мМ, но в случае азитромицина при данной концентрации раствор склонен к образованию осадка, тогда как в 100 % MeOH растворы данных антибиотиков стабильны в концентрациях 100 мМ и более. Следует отметить, что растворимость макролидов в значительной мере зависит от того, в какой форме они находятся: основания или соли. Растворимость кларитромицина основания значительно отличается от азитромицина и эритромицина. Кларитромицин растворяется в водно-органических системах, метаноле и ацетонитриле только при добавлении кислот. Уксусная кислота улучшает растворимость во всех исследованных системах, лимонная – в MeOH и водно-метанольной, лактобионовая – только в водно-метанольной системе. Кларитромицин цитрат хорошо растворим в метаноле.

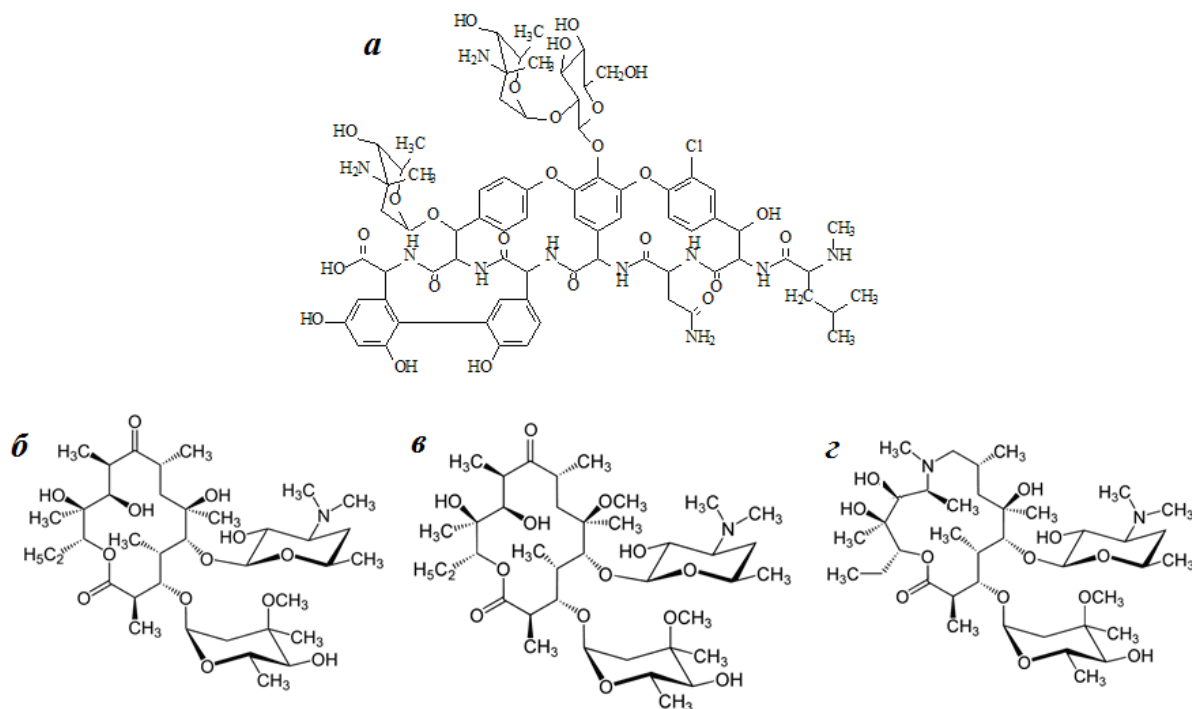


Рис. 1. Структуры антибиотиков, исследуемых в качестве хиральных селекторов (а - эремомицин, б - эритромицин, в - кларитромицин, z - азитромицин).

Стабильность антибиотиков. Устойчивость антибиотика в фоновом электролите является важным условием его применения, т.к. разложение хирального селектора при хранении/анализе может привести к уменьшению или полной потере его энантиораспознавательной способности и негативно сказаться на воспроизводимости результатов анализа.

Для изучения стабильности антибиотиков регистрировали УФ-спектры их растворов в фоновых электролитах в диапазоне длин волн 190 – 330 нм через

различные промежутки времени. Установлено, что вид спектров поглощения макролидов не изменяется при хранении в течение суток и более. Тем не менее, несмотря на приемлемую стабильность антибиотиков в водно-органических и неводных системах, рекомендуется в работе использовать свежеприготовленные растворы фоновых электролитов.

Адсорбция антибиотиков на стенках кварцевого капилляра ухудшает форму пиков и воспроизводимость результатов анализа. Использование органического растворителя в составе фонового электролита позволяет уменьшить адсорбцию за счет снижения диссоциации силанольных групп поверхности кварца и молекул селектора. Для оценки адсорбции селекторов использовали зависимость общей электрофоретической подвижности антибиотиков или подвижности электроосмотического потока (ЭОП) от введенной концентрации. В исследованных условиях молекулы ХС имеют положительный заряд, поэтому мигрируют до ЭОП.

Адсорбция в водно-органических системах эремомицина, эритромицина и азитромицина на стенках немодифицированного кварцевого капилляра исследована в ФЭ, состоящем из MeOH / 50 mM ФБ, pH 5.8 (60 / 40 об. %). Общая электрофоретическая подвижность макролидов незначительно изменяется при их концентрации больше 7,5 mM, что свидетельствует о слабой адсорбции антибиотиков на стенках капилляра.

Адсорбция эремомицина изучена в диапазоне концентраций 0,01–8,3 mM, столь узкий диапазон объясняется ограниченной растворимостью антибиотика в использованном фоновом электролите. С увеличением концентрации эремомицина подвижность ЭОП падает из-за уменьшения суммарного отрицательного заряда стенок капилляра вследствие адсорбции, а общая подвижность эремомицина увеличивается, а затем выходит на плато, что свидетельствует о насыщении адсорбционных центров (рис. 2).

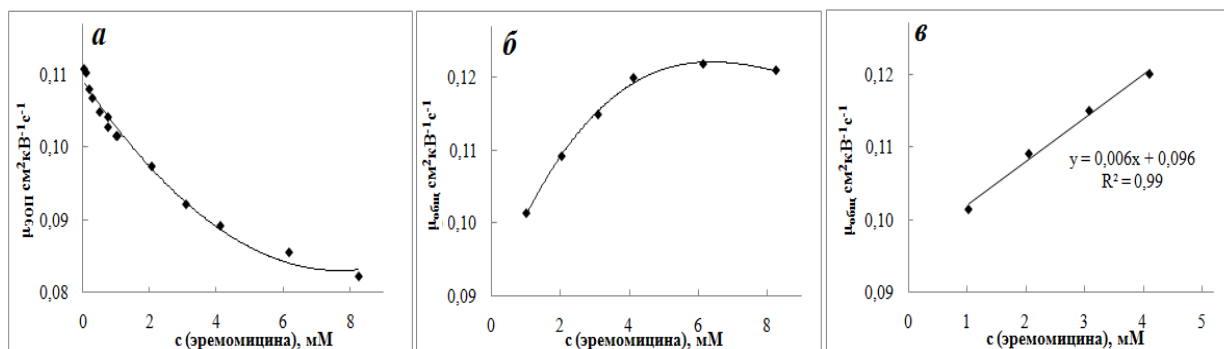


Рис. 2. Зависимость подвижности ЭОП (а), общей электрофоретической подвижности эремомицина (б) и начальный участок зависимости общей электрофоретической подвижности эремомицина (в) от концентрации. Условия: ФЭ – MeOH / 50 mM ФБ, pH 5.8 (60 / 40 об. %); +20 кВ, 280 нм.

Начальный участок зависимости общей электрофоретической подвижности от концентрации (первые четыре точки 1,0–4,1 mM) носит линейный характер (рис. 2 (в)), тангенс угла наклона ($\text{tg}\alpha = 0,006 \text{ см}^2\text{кВ}^{-1}\text{мм}^{-1}\text{с}^{-1}$) характеризует скорость изменения электрофоретической подвижности в зависимости от концентрации ХС и пропорционален степени заполнения поверхности стенки капилляра молекулами эремомицина. Аналогичные значения $\text{tg}\alpha$ при использовании водного электролита в модифицированных капиллярах составляют $0,007 \text{ см}^2\text{кВ}^{-1}\text{мм}^{-1}\text{с}^{-1}$ для капилляра, модифицированного

3-аминопропилтриметоксисиланом, и $0,088 \text{ см}^2 \text{кВ}^{-1} \text{мМ}^{-1} \text{с}^{-1}$ для капилляра, модифицированного эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан. Таким образом, использование водно-органического фонового электролита позволяет уменьшить адсорбцию в большей или равной степени, чем модифицирование стенок капилляра.

Адсорбция в неводных системах (ФЭ: 75 мМ ТБА, 30 мМ H_3BO_3 в MeOH) азитромицина и кларитромицина цитрата изучена в диапазоне концентраций 0,5 - 60 мМ. Молекулы антибиотиков в данных условиях имеют малый положительный заряд, об этом свидетельствует тот факт, что они мигрируют перед ЭОП в непосредственной близости к нему.

Т.к. в исследуемых условиях собственные электрофоретические подвижности антибиотиков очень малы и практически не изменяются с ростом концентрации (для азитромицина $0,01 \text{ см}^2 \text{кВ}^{-1} \text{с}^{-1}$ ($\text{Sr} < 11 \%$) и кларитромицина – $0,007 \text{ см}^2 \text{кВ}^{-1} \text{с}^{-1}$ ($\text{Sr} < 5 \%$)), то сравнительную оценку адсорбции проводили по изменению величины электроосмотического потока. С увеличением концентрации величина подвижности ЭОП вначале слабо уменьшается (азитромицин – на 6 %; кларитромицин – на 8 %), вследствие незначительного изменения поверхности кварцевого капилляра в неводных условиях из-за адсорбции, а затем остается практически неизменной, что свидетельствует о быстрой стабилизации внутренней поверхности капилляра.

Энантиоразделение энантимеров биологически активных соединений с использованием макроциклических антибиотиков

Известно, что гликопептидный антибиотик эремомицин энантиоселективен к соединениям кислотного характера, поэтому в качестве анализируемых соединений были выбраны профены, относящиеся к классу ароматических карбоновых кислот и применяемые как обезболивающие, противовоспалительные и жаропонижающие средства. При изучении азитромицина, кларитромицина и эритромицина как хиральных селекторов в качестве аналитов были выбраны соединения различного характера (основные, кислотные, нейтральные). Однако энантиоразделение в случае макролидов достигнуто только для основных соединений: аминов и аминоспиртов.

Эремомицин как хиральный селектор в водно-органических системах. В качестве ФЭ использовали смесь MeOH и 50 мМ фосфатного буферного раствора (рН 4.8; 5.8; 7.3) с различными добавками эремомицина (0,5–2,0 мМ). Содержание MeOH в фоновом электролите изменяли в диапазоне 0–70 об. %, использование добавки MeOH более 70 об. % невозможно из-за ограниченной растворимости эремомицина.

рН фонового электролита является важным параметром, определяющим подвижность компонентов пробы, т.к. оказывает влияние на заряд молекул аналитов, селектора и стенок капилляра. В качестве водного компонента фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор в диапазоне рН от 4.8 до 7.3. В водно-метанольных ФЭ собственные электрофоретические подвижности профенов больше подвижности ЭОП, и профены детектируются при использовании отрицательной полярности на входе. Время миграции, фактор

разрешения энантимеров и эффективность пиков профенов при различных рН фосфатного буферного раствора, входящего в состав ФЭ, приведены в табл.1.

Таблица 1. Влияние рН фосфатного буферного раствора на разделение энантимеров профенов в водно-метанольных растворах в присутствии эремомицина

| рН | 7.3 | | | 5.8 | | | 4.8 | | |
|--------------|-------------|-------|---------------------|-------------|-------|---------------------|-------------|-------|---------------------|
| | t_1 , мин | R_S | $N, \times 10^3$ тт | t_1 , мин | R_S | $N, \times 10^3$ тт | t_1 , мин | R_S | $N, \times 10^3$ тт |
| Индопрофен | 24,8 | 0,9 | 93/57* | 14,7 | 4,7 | 55/69* | 13,1 | 6,3 | 39/29* |
| Флурбипрофен | 19,5 | 1,6 | 104/102* | 12,7 | 5,9 | 93/83* | 12,4 | 7,9 | 28/17* |
| Кетопрофен | 21,0 | 0,6 | 133/98* | 13,2 | 3,8 | 185/166* | 14,0 | 7,8 | 23/14* |
| Фенопрофен | 18,9 | 0 | 22 | 12,7 | 2,0 | 82/98* | 13,5 | 2,3 | 24/15* |

Условия: ФЭ – МеОН / 50 мМ ФБ (60 / 40 об. %), 2 мМ эремомицина; -20 кВ, 254 нм; *для пиков первого и второго энантимеров, соответственно.

Из представленных данных видно, что с уменьшением рН время миграции профенов уменьшается, и разрешение между энантиомерами увеличивается. Однако, при переходе от рН 5.8 к 4.8 эффективность системы значительно падает, в связи с этим значение рН 5.8 выбрано оптимальным. Число теоретических тарелок при разделении кетопрофена при рН 5.8 составляет около 2×10^5 тт. Такую высокую эффективность можно объяснить незначительной адсорбцией антибиотика на стенках капилляра и использованием водно-органического фонового электролита.

Эремомицин достаточно сильно поглощает в УФ-области, что уменьшает чувствительность детектирования, поэтому **концентрацию селектора** изменяли в интервале 0,5–2,0 мМ. Время миграции профенов с ростом концентрации селектора незначительно уменьшается, а разрешение пиков оптических изомеров увеличивается, что свидетельствует об образовании диастереомерных комплексов. Для всех исследуемых профенов достигнуто энантиоразделение до базовой линии при концентрации эремомицина 2 мМ. Разделение энантимеров уменьшается в ряду флурбипрофен > индопрофен > кетопрофен > фенопрофен. Даже при 0,5 мМ концентрации селектора достигается разделение энантимеров флурбипрофена и индопрофена практически до базовой линии (рис. 3).

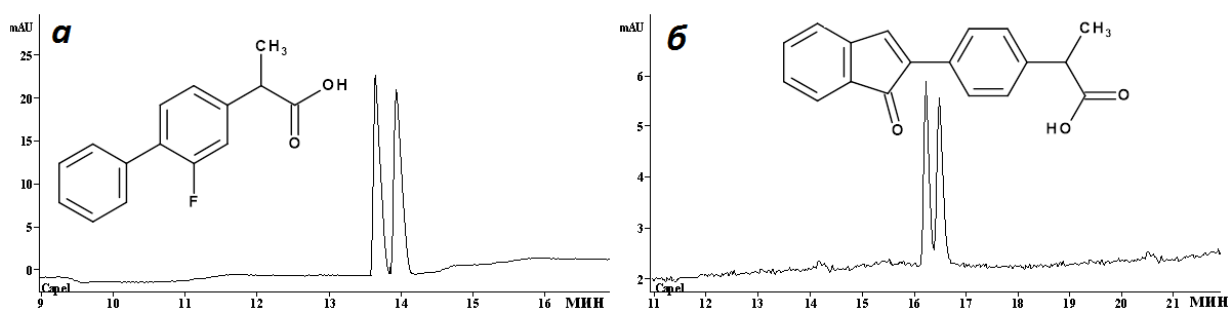


Рис. 3. Электрофореграммы рацемических смесей флурбипрофена (а) и индопрофена (б). Условия: ФЭ – МеОН / 50 мМ ФБ, рН 5.8 (60 / 40 об. %), 0,5 мМ эремомицина; -20 кВ, 254 нм.

Содержание метанола в фоновом электролите оказывает влияние на энантиоразделение и миграцию профенов (рис. 4), эксперимент начинали с ФЭ с 70 об. % МеОН, последовательно уменьшая долю органического растворителя.

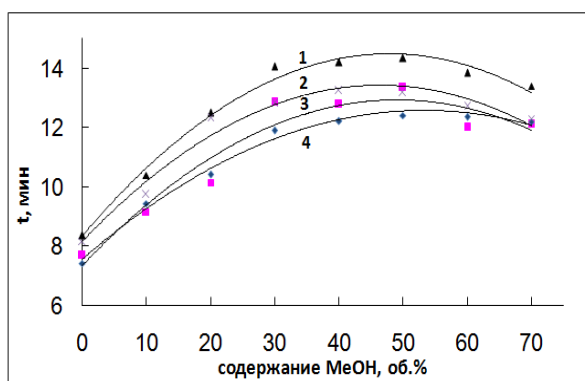


Рис. 4. Зависимость времени миграции профенов от содержания MeOH в ФЭ:

1 – индопрофен, 2 – кетопрофен, 3 – флурбипрофен, 4 – фенопрофен. Условия: ФЭ – 2 мМ эремомицина; 50 мМ ФБ, рН 5.8; -20 кВ, 254 нм.

Как видно из графика, время миграции профенов монотонно возрастает при увеличении доли метанола от 0 до 30 об. %, при дальнейшем увеличении содержания метанола до 60 об. % практически не изменяется, а затем несколько уменьшается. Из-за нелинейного изменения вязкости водно-метанольной смеси, и поскольку добавка метанола в разной степени влияет на электрофоретическую подвижность профенов и противоположно-направленный ЭОП, зависимость времени миграции от доли метанола в фоновом электролите не должна носить линейный характер, а, предположительно, должна иметь максимум или выходить на плато.

С ростом содержания метанола в ФЭ наблюдается ухудшение энантиоразделения, что связано с ослаблением взаимодействия между селектором и профенами. Но даже при содержании метанола в ФЭ 60 об. % разрешение между пиками энантиомеров достигается до базовой линии благодаря высокой эффективности.

Преимуществом добавки метанола является меньший генерируемый ток и, как следствие, меньшее количество выделяемого Джоулева тепла, что повышает устойчивость хирального селектора; меньшая адсорбция эремомицина, что улучшает воспроизводимость времен миграции и площадей пиков; а также стабильность базовой линии. В данном случае в оптимальных условиях время анализа не превышает 17 мин. Известно, что для уменьшения необходимой концентрации и адсорбции хирального селектора на стенках капилляра и времени анализа используют модифицированные капилляры. Однако получение модифицированных капилляров достаточно трудоемко, а также 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.

Азитромицин, кларитромицин и эритромицин как хиральные селекторы в водно-органических системах. В водно-органическом ФЭ (MeOH / 50 мМ ФБ, рН 5.8 (60 / 40 об. %)) в качестве ХС изучены азитромицин (30 мМ) и эритромицин (30, 60 мМ). В данных условиях энантиоразделения веществ не достигнуто. Возможно, что гидратирование молекул хиральных селекторов и аналитов предотвращает связывание между ними. Так, например, при использовании ФЭ, состоящего из 150 мМ эритромицина, 75 мМ Трис, 30 мМ H_3BO_3 в MeOH, достигнуто энантиоразделение некоторых аналитов (эфедрина, синефрина, триптофанола, норметанефрина и октопамина и др.) а при использовании для растворения ФЭ смеси MeOH / H_2O (80 / 20 об. %) энантиоразделения не наблюдается.

При исследовании кларитромицина в качестве хирального селектора в ФЭ, состоящем из метанола и боратного буферного раствора в присутствии

лактобионовой кислоты, которая улучшает растворимость антибиотика, не удалось добиться приемлемого энантиоразделения. При концентрации кларитромицина 35 мМ в ФЭ (60 об. % MeOH) пики некоторых аминоспиртов (метопролол, пиндолол, пропранолол, кленбутерол) выражены нечетко – раздвоены, что свидетельствует о незначительном разделении энантиомеров. Вследствие ограниченной растворимости антибиотика увеличить его концентрацию в ФЭ данного состава невозможно. Использование ФЭ с меньшим содержанием MeOH (55 об. %) и концентрацией кларитромицина 40 мМ не позволило добиться лучшего разделения, а, напротив, привело к пикам с четкими вершинами.

Азитромицин, кларитромицин и эритромицин как хиральные селекторы в неводных системах. Неводные фоновые электролиты оказались более успешными, чем фоновые электролиты, содержащие воду. В исследованных условиях с применением макролидов в качестве хиральных селекторов удалось разделить энантиомеры альпренолола, амфетамина, атенолола, кленбутерола, лабеталола, метоксифенамина, метопролола, норметанефрина, пиндолола, пропранолола, окспренолола, октопамина, *n*-гидроксинорэфедрина, *n*-хлорамфетамина, синефрина, соталола, тетрагидрозолина, триптофанола, фенотерола и эфедрина.

В качестве растворителей фонового электролита при использовании азитромицина как хирального селектора выбрали MeOH, MeCN и их смесь, т.к. они обладают хорошей растворяющей способностью и имеют низкий предел прозрачности УФ света. Влияние растворителя ФЭ на параметры миграции и разделение энантиомеров тетрагидрозолина показано в табл. 2.

Таблица 2. Влияние содержания ацетонитрила в ФЭ на параметры миграции и энантиоразделение тетрагидрозолина с использованием азитромицина в качестве хирального селектора

| | | | | |
|-----------------|------|-----|------|------|
| MeCN, об. % | 100* | 80 | 47,5 | 0 |
| MeOH, об. % | 0 | 20 | 52,5 | 100 |
| t_1 , мин | 2,5 | 4,7 | 5,2 | 8,4 |
| R_s | 0 | 1,0 | 0,8 | 1,6 |
| $t_{ЭОП}$, мин | 2,9 | 5,5 | 6,2 | 15,3 |

Условия: ФЭ – 75 мМ ТБА, 30 мМ H_3BO_3 , 70 мМ азитромицина; * ФЭ – 75 мМ ТЭА, 30 мМ CH_3COOH , 90 мМ азитромицина; +20 кВ, 254 нм.

С ростом содержания ацетонитрила в фоновом электролите время миграции тетрагидрозолина и ЭОП уменьшается, что приводит к ухудшению энантиоразделения. Поэтому для дальнейшей работы метанол был выбран в качестве растворителя фонового электролита.

Влияние борной кислоты. Для всех исследуемых антибиотиков (азитромицин, кларитромицин и эритромицин) в неводных условиях наличие борной кислоты в фоновом электролите является необходимым условием достижения энантиоразделения. Различные типы буферных систем были исследованы для доказательства исключительной роли борной кислоты. Энантиоразделения аналитов ни с одним из антибиотиков не происходит в отсутствие борной кислоты в составе фонового электролита.

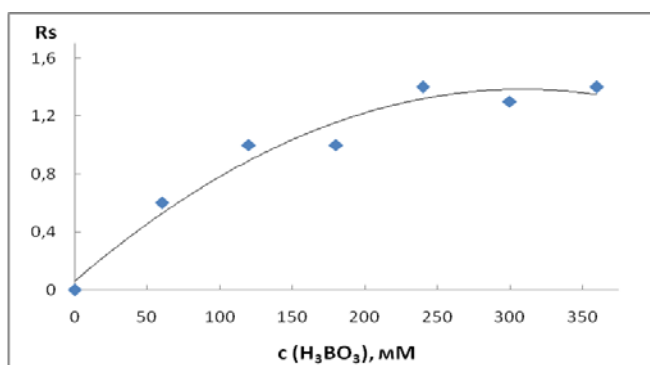


Рис. 5. Влияние концентрации H_3BO_3 в ФЭ на разрешение пиков энантимеров метопролола с кларитромицином в качестве ХС. Условия: ФЭ – 60 мМ кларитромицина, 100 мМ $C_6H_8O_7$, 20 мМ NaOH в MeOH; +20 кВ, 225 нм.

При увеличении содержания борной кислоты в фоновом электролите разрешение между пиками энантимеров улучшается. На рис. 5 приведена зависимость разрешения пиков энантимеров метопролола от содержания борной кислоты в фоновом электролите с использованием кларитромицина в качестве хирального селектора. С ростом концентрации H_3BO_3 до 240 мМ энантиоразделение улучшается и при дальнейшем увеличении борной кислоты остается практически неизменным.

Все исследованные антибиотики являются вицинальными диолами, которые образуют комплексы с борной кислотой, изменяя заряд антибиотика (рис. 6). Энантиоразделение обусловлено электростатическими взаимодействиями отрицательно заряженного комплекса антибиотик * борная кислота и положительно заряженными аminosоединениями.

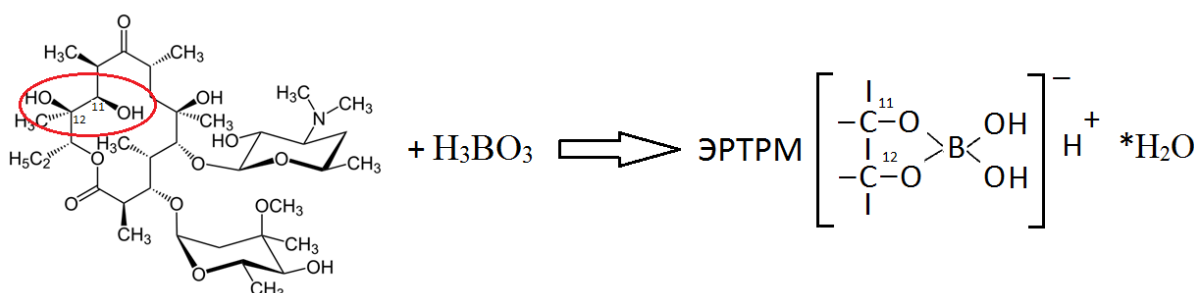


Рис. 6. Схема образования комплекса эритромицин * борная кислота.

Для подтверждения данной гипотезы был синтезирован комплекс эритромицин * борная кислота, структура которого подтверждена данными ИК – спектроскопии, элементного анализа и определением температуры плавления. При использовании данного комплекса в качестве хирального селектора энантиоразделение аналитов сохраняется (рис. 7).

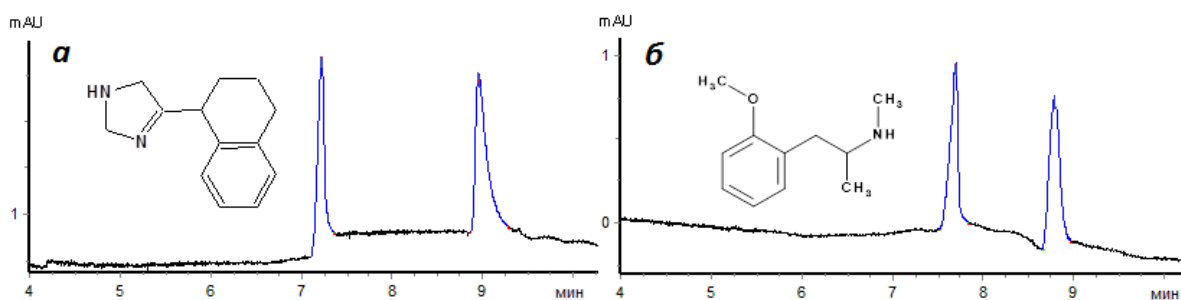


Рис. 7. Электрофореграммы рацемических смесей (а) тетрагидрозолина (R_s 5,3), (б) – метоксифенамина (R_s 3,3). Условия: ФЭ – 65 мМ Трис, 75 мМ комплекса ЭРТРМ* H_3BO_3 * H_2O в MeOH; +20 кВ, 225 нм.

Влияние природы и концентрации основания. В случае азитромицина и эритромицина природа основания, входящего в состав ФЭ, оказывает значительное влияние на параметры энантиоразделения. Энантиоразделение (R_S) тетрагидрозолина в присутствии азитромицина увеличивается в ряду Трис < ТЭА < ТБА (0,5; 0,5; 2,0, соответственно, рис. 8). Роль природы основания на механизм энантиоразделения до конца не ясна. Возможно, в процессе энантиоразделения имеет место конкурентное взаимодействие между основанием и аналитом за полость азитромицина.

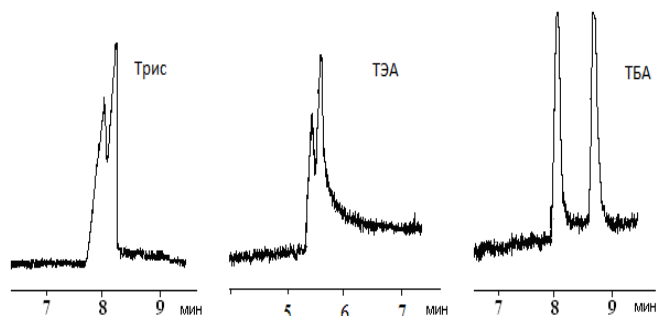


Рис. 8. Электрофореграммы рацемической смеси тетрагидрозолина в ФЭ с различными основными добавками. Условия: ФЭ – 75 мМ основания, 30 мМ H_3BO_3 , 90 мМ азитромицина в MeOH; +25 кВ, 254 нм.

Таким образом, разрешение лучше в случае трибутиламина (ТБА), молекула которого больше, а, следовательно, из-за стерических препятствий хуже проникает в полость азитромицина, чем триэтиламин (ТЭА). В ФЭ с 80 об. % содержанием MeCN, влияние основания нивелируется, так наблюдаются сопоставимые R_S при использовании в качестве основных добавок ТБА и ТЭА.

Диэтиламин (ДЭА), Трис и NaOH исследованы в качестве основных компонентов ФЭ при использовании эритромицина. Лучшие результаты получены в случае добавки Трис. При замене Трис на ДЭА энантиоразделение первичных аминокислот значительно ухудшается (например, триптофанол, рис. 9 а), тогда как для вторичных аминов (эфедрин, рис. 9 б) такого эффекта не наблюдается.

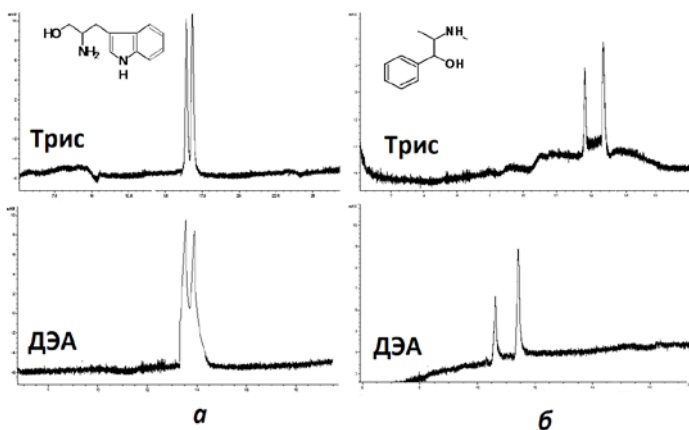


Рис. 9. Электрофореграммы рацемических смесей (а) триптофанол, (б) эфедрин. Условия: (а) ФЭ – 65 мМ Трис, 40 мМ H_3BO_3 в MeOH; (б) ФЭ – 10 мМ ДЭА, 40 мМ H_3BO_3 в MeOH; 150 мМ эритромицина, +30 кВ, 225 нм.

Вероятно, Трис в большей степени адсорбируется на стенках капилляра, чем ДЭА, предотвращая адсорбцию молекул аналитов. Отсутствие влияния природы основной добавки на энантиоразделение вторичных аминов возможно объяснить их меньшей склонностью к взаимодействию с силанольными группами поверхности кварцевого капилляра. Аналогичный эффект наблюдается при использовании ФЭ, состоящего из 10 мМ NaOH и 40 мМ H_3BO_3 .

Концентрация основания, входящего в состав ФЭ, так же оказывает влияние на параметры миграции и энантиоразделения, так как соотношение кислота/основание определяет степень кислотности (основности) ФЭ и влияет на степень взаимодействия хирального селектора и аналитов, а также на величину ЭОП. При использовании эритромицина в качестве ХС соотношение Трис/ H_3BO_3 в

метанольном ФЭ изменяли в диапазоне от 75 мМ / 30 мМ до 30 мМ / 75 мМ, значение 50 мМ / 55 мМ выбрано оптимальным.

При исследовании кларитромицина в качестве хирального селектора в ФЭ на основе метанола с добавкой смеси лимонной кислоты и основания наблюдаются сопоставимые R_s для аналитов при использовании в качестве оснований NaOH, ТБА и ТЭА. Влияние концентрации основания (NaOH) на разделение энантиомеров зависит от природы аналита (табл. 4). Например, на разделение энантиомеров метопролола, альпренолола, пиндолола содержание NaOH в ФЭ практически не влияет, для лабеталола при содержании NaOH 20 мМ разделение энантиомеров не происходит, для большинства веществ максимальное разрешение между оптическими изомерами получено при концентрации NaOH 10 мМ.

Таблица 4. Влияние концентрации NaOH в ФЭ на параметры миграции и энантиоразделение аминоспиртов при использовании кларитромицина как ХС

| Соединение | 20 | | 10 | | 5 | | 2 | |
|-------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | t_1 , мин | R_s | t_1 , мин | R_s | t_1 , мин | R_s | t_1 , мин | R_s |
| Метопролол | 10,2 | 1,6 | 11,1 | 1,4 | 11,3 | 1,3 | 11,2 | 1,4 |
| Пропранолол | 10,9 | 1,0 | 10,8 | 1,4 | 11,1 | 1,2 | 11,1 | 1,2 |
| Атенолол | 11,5 | 1,1 | 12,9 | 1,4 | 13,5 | 1,1 | 13,2 | 1,0 |
| Альпренолол | 9,5 | 1,1 | 10,2 | 1,0 | 10,0 | 1,1 | 10,2 | 1,0 |
| Пиндолол | 9,6 | 1,3 | 10,4 | 1,3 | 10,2 | 1,1 | 10,5 | 1,2 |
| Соталол | 11,3 | 0,5 | 12,3 | 0,8 | 12,4 | 0,5 | 13,0 | 0,7 |
| Синефрин | 11,0 | 0,9 | 11,9 | 0,8 | 12,0 | 0,8 | 12,5 | 0,7 |
| Лабеталол | 14,9 | 0 | 16,1 | 0,6 | 16,8 | 0,5 | 16,3 | 0,5 |

Условия: ФЭ – 60 мМ кларитромицина, 100 мМ $C_6H_8O_7$, 240 мМ H_3BO_3 в MeOH; +20 кВ, 225 нм.

Влияние концентрации хирального селектора. В большинстве случаев с ростом концентрации макролидов в ФЭ разделение энантиомеров улучшается, а время миграции аналитов увеличивается, что свидетельствует об образовании диастереомерных комплексов между селектором и энантиомерами аналита. Применение слишком больших концентраций ХС ограничено растворимостью антибиотиков и иногда критическим повышением вязкости, при которой энантиоразделение для некоторых соединений ухудшается. Оптимальная концентрация хирального селектора зависит от природы аналита и селектора. С использованием кларитромицина в качестве ХС достигнуть наилучших значений R_s для аналитов удалось в интервале концентраций 75 – 90 мМ. В частности, максимальное разделение между энантиомерами метопролола и пиндолола (R_s 2,1 и 1,7 соответственно) достигается при содержании кларитромицина 90 мМ, пропранолола и соталола - при 75 мМ (R_s 1,9 и 0,8). Для других веществ разрешение пиков энантиомеров при концентрациях ХС 75 – 90 мМ было примерно одинаково. При концентрации эритромицина 75 мМ достигнуто разделение до базовой линии рацемических смесей синефрина, триптофанола, эфедрина, *n*-хлорамфетамина, метоксифенамина и тетрагидрозолина. Добиться частичного энантиоразделения (R_s 0,6) для больших молекул аминоспиртов (метопролола, пиндолола и др.) удалось только при использовании высоких

концентраций эритромицина (150 мМ). С использованием 90 мМ азитромицина достигнуто энантиоразделение тетрагидрозолина до базовой линии

Влияние концентрации фонового электролита. Изучено влияния концентрации цитратного буферного раствора при постоянном соотношении $c(C_6H_8O_7) / c(NaOH) = 5/1$ на параметры энантиоразделения аналитов с использованием кларитромицина в качестве ХС. На рис. 10 приведена зависимость энантиоразделения некоторых аминокислот от концентрации ФЭ.

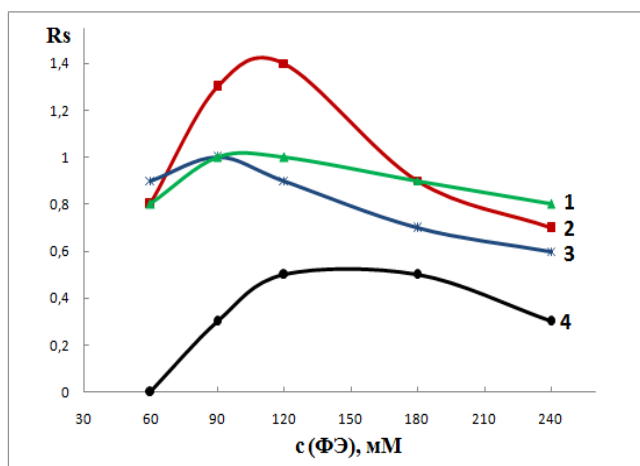


Рис. 10. Влияние суммарной концентрации лимонной кислоты и NaOH в ФЭ на разрешение пиков энантиомеров с кларитромицином: 1 - пропранолол, 2 - метопролол, 3 - альпренолол, 4- синефрин. Условия: ФЭ - 60 мМ КЛМ, $c(C_6H_8O_7) / c(NaOH) = 5/1$, 240 мМ H_3BO_3 в MeOH; +20 кВ, 225 нм.

Наилучшее разделение наблюдается при использовании цитратного буферного раствора с концентрацией 120 мМ, только при данной концентрации удалось добиться частичного разделения энантиомеров соталола. Для оптических изомеров атенолола, пиндолола, фенотерола и лабеталола максимум R_s также соответствует 120 мМ концентрации буферного раствора. Кроме того, для данной концентрации ФЭ наблюдается наименьшее время миграции соединений. С увеличением концентрации буферного раствора выше 120 мМ происходит уменьшение общей подвижности исследуемых соединений, что можно объяснить увеличением вязкости ФЭ.

Влияние инструментальных факторов: температуры термостатирования капилляра, приложенного напряжения, длины капилляра на энантиоразделение изучено на примере миграции некоторых соединений (тетрагидрозолина, норметанефрина, альпренолола и пропранолола). Значение прикладываемого напряжения изменяли в интервале от +10 до +25 кВ. С ростом напряжения время миграции уменьшается, эффективность системы увеличивается. Изменение напряжения от +10 до +25 кВ практически не влияет на разрешение пиков энантиомеров. Несмотря на то, что напряжение 25 кВ обеспечивает быстрый анализ с высокой эффективностью, рекомендуется работать при более низких напряжениях (20 кВ), что связано с особенностями использованных моделей установок для капиллярного электрофореза.

Увеличение температуры от 15 °С до 30 °С приводит к незначительному уменьшению разрешения пиков энантиомеров тетрагидрозолина на 0,2 и времени миграции на 1 мин из-за уменьшения вязкости ФЭ и константы связывания между аналитом и ХС (табл. 5).

Таблица 5. Влияние температуры на параметры миграции и энантиоразделения тетрагидрозолина в присутствии азитромицина

| Температура, °С | 15 | 20 | 25 | 30 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| t_1 , мин | 5,6 | 5,3 | 5,0 | 4,8 |
| $t_{ЭОП}$, мин | 7,0 | 6,5 | 6,2 | 5,9 |
| R_s | 1,1 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |

Условия: ФЭ –70 мМ азитромицина, 30 мМ H_3BO_3 , 75 мМ ТБА в смеси MeCN / MeOH (80 / 20 об. %); +20 кВ, 254 нм.

Геометрические параметры капилляра, такие как длина, оказывают влияние на энантиоразделение, т.к. определяют время взаимодействия аналита и ХС. Влияние длины капилляра на энантиоразделение исследовали на примере изучения эритромицина в качестве ХС в ФЭ, состоящем из 150 мМ эритромицина, 10 мМ NaOH, 40 мМ H_3BO_3 в MeOH. При использовании более короткого капилляра (общая длина 33,5 см вместо 45 см) время миграции норметанефрина уменьшается в 2 раза (с 16,1 мин до 8,1 мин), но ухудшается разрешение (с 0,95 до 0,50). Следовательно, использовать короткий капилляр для уменьшения времени анализа не разумно.

Сравнение энантиораспознавательной способности исследованных макролидов. Установлено, что азитромицин, кларитромицин и эритромицин энантиоселективны к соединениям основного характера: аминам и аминок спиртам. Несмотря на схожесть структур, энантиоразделяющая способность антибиотиков и оптимальные условия разделения различны. В табл. 6 приведены соединения, к которым антибиотики проявляют энантиоселективность в исследованных системах. Азитромицин энантиоселективен только к тетрагидрозолину, тогда как для кларитромицина и эритромицина ряд энантиоразделяемых соединений значительно шире. Азитромицин и эритромицин проявляют большую энантиоселективность к молекулам маленького размера, тогда как кларитромицин – к более крупным молекулам (аминок спиртам).

Для всех исследуемых в неводных условиях антибиотиков (азитромицин, кларитромицин и эритромицин) борная кислота в составе ФЭ играет принципиальную роль в энантиоразделении. Антибиотики являются вицинальными диолами, которые образуют комплексы с борной кислотой. Энантиоразделение обусловлено электростатическими взаимодействиями отрицательно заряженного комплекса антибиотик * борная кислота и положительно заряженными аминок соединениями. В связи с этим, макролиды в исследуемых условиях не энантиоселективны к соединениям кислотного характера, которые в растворе могут быть заряжены отрицательно. Меньшую энантиоразделяющую способность азитромицина по сравнению с эритромицином и кларитромицином можно объяснить тем, что комплекс азитромицина с борной кислотой, возможно, менее устойчив, чем комплексы с другими антибиотиками, т.к. они стабилизируются атомом кислорода карбоксигруппы.

Исследованные хиральные селекторы проявляют большую энантиоселективность по отношению к исследованным анализам при использовании в качестве ФЭ метанола, содержащего добавки основания (ТЭА,

ТБА, Трис, NaOH) и борной кислоты. Выбор основания зависит от антибиотика: при использовании азитромицина лучшие результаты получены с добавкой ТБА, эритромицина – Трис. Наилучшим ФЭ при использовании кларитромицина является метанол с добавкой лимонной кислоты и основания (NaOH) для растворения ХС и поддержания определенной кислотности смеси, а также с добавкой борной кислоты для образования комплекса кларитромицин * борная кислота. Для азитромицина и эритромицина добавление в ФЭ на основе метанола смеси лимонной кислоты и основания негативно влияет на энантиоразделение аналитов.

Таблица. 6. Тестовые соединения, энантиомеры которых разделены в присутствии исследованных антибиотиков в неводных системах

| Фоновый электролит | Азитромицин | Эритромицин | Кларитромицин |
|--|-----------------|---|--|
| H_3BO_3 + основание в MeOH | тетрагидрозолин | амфетамин, эфедрин, синефрин, триптофанол, <i>n</i> -хлорамфетамин, тетрагидрозолин, метоксифенамин; <i>частичное разделение</i> - метопролол, окспренолол, атенолол, альпренолол, пиндолол, октопамин, <i>n</i> - гидроксинорэфедрин, норметанефрин | * кленбутерол, метоксифенамин; <i>частичное разделение</i> - метопролол |
| $C_6H_8O_7$ + основание в MeOH (+ H_3BO_3) | - | ** <i>частичное разделение</i> - тетрагидрозолин | атенолол, альпренолол, метопролол, пиндолол, пропранолол; <i>частичное разделение</i> – лабеталол, синефрин, соталол, фенотерол |

* Кларитромицин цитрат

** ФЭ нестабилен, капилляр быстро забивается, т.к. образуется осадок

Известно, что энантиоразделение в КЭ связано с образованием диастереомерных комплексов энантиомеров аналита с ХС, а селективность разделения в основном определяется различием в устойчивости данных комплексов. В работе проведена оценка устойчивости диастереомерных комплексов тетрагидрозолина с азитромицином и синефрина с эритромицином. Константы устойчивости комплексов энантиомеров тетрагидрозолина с азитромицином ($(8 \pm 1) M^{-1}$, $(7 \pm 1) M^{-1}$), для первого и второго энантиомеров соответственно) меньше, чем аналогичные константы для синефрина и эритромицина ($(80 \pm 8) M^{-1}$, второго – $(89 \pm 6) M^{-1}$). Эритромицин менее энантиоселективен к синефрину ($R_s = 3,9$), чем к тетрагидрозолину ($R_s = 12,2$). Из полученных данных можно сделать вывод, что эритромицин обладает большей энантиораспознавательной способностью, чем азитромицин.

Благодаря хорошей селективности и эффективности, в изученных системах получено одновременное разделение смесей веществ и их энантиомеров. На рис. 11 (а, б) и 12 представлены электрофореграммы искусственных смесей 1 (альпренолол, пропранолол, атенолол), 2 (пиндолол, пропранолол, синефрин, соталол, фенотерол), 3 (эфедрин, *n*-хлорамфетамин, триптофанол, норметанефрин) соответственно.

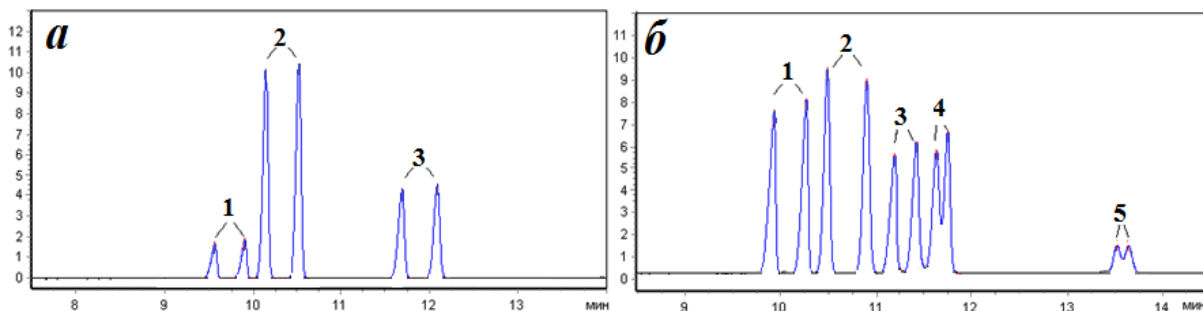


Рис. 11. Электрофореграммы смеси рацематов: а - (1) альпренолола (R_S 1,6), (2) пропранолола (R_S 1,6) и (3) атенолола (R_S 1,5); б - (1) пиндолола (R_S 1,4), (2) пропранолола (R_S 1,6), (3) синефрина (R_S 1,1), (4) соталола (R_S 0,7), (5) фенотерола (R_S 0,7). Условия: ФЭ – 75 мМ кларитромицина, 100 мМ $C_6H_8O_7$, 10 мМ NaOH, 240 мМ H_3BO_3 в MeOH; +20 кВ; 225 нм.

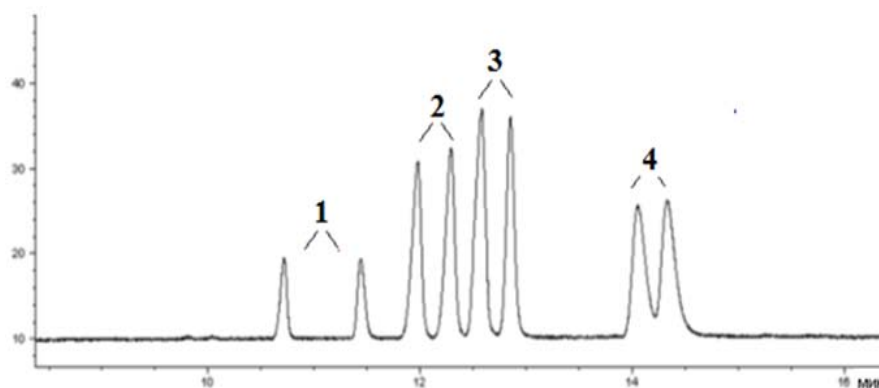


Рис. 12. Электрофореграмма смеси рацематов: (1) эфедрина (R_S 2,5), (2) *n*-хлорамфетамина (R_S 1,1), (3) триптофанола (R_S 1,0), (4) норметанефрина (R_S 0,9), Условия: ФЭ – 100 мМ эритромицина, 65 мМ Трис, 40 мМ H_3BO_3 в MeOH; +30 кВ; 214 нм.

Почти все вещества и изомеры (кроме соталола, фенотерола и норметанефрина) разделены в достаточной для количественного анализа степени ($R_S \geq 1$). Следовательно, при данных условиях возможно разделение энантиомеров сразу нескольких соединений. Для эфедрина и триптофанола определен порядок миграции энантиомеров. В исследуемых условиях (-)-эфедрин мигрирует быстрее чем (+)-эфедрин и L-триптофанол детектируется перед D-триптофанолом.

Определение энантиомерного состава лекарственных препаратов

Применимость разработанных подходов с исследуемыми антибиотиками в качестве хиральных селекторов для разделения и определения энантиомеров показана на примере определения активных компонентов фармацевтических препаратов (таблеток, гелей, капель). Во всех расчетах использовали метод внешнего стандарта, определение % энантиомерного состава препарата проводили методом нормализации. При построении градуировочной зависимости по оси ординат откладывали площадь, нормированную на время миграции (S/t). Результаты определения представлены в табл. 7, а электрофореграммы на рис. 13. Найденные содержания активных веществ совпадают с содержаниями, заявленными производителем, показано, что активные компоненты во всех исследованных препаратах являются смесью энантиомеров. Разработанные методики для определения оптически активных соединений, входящих в состав лекарственных препаратов, обладают хорошими метрологическими характеристиками.

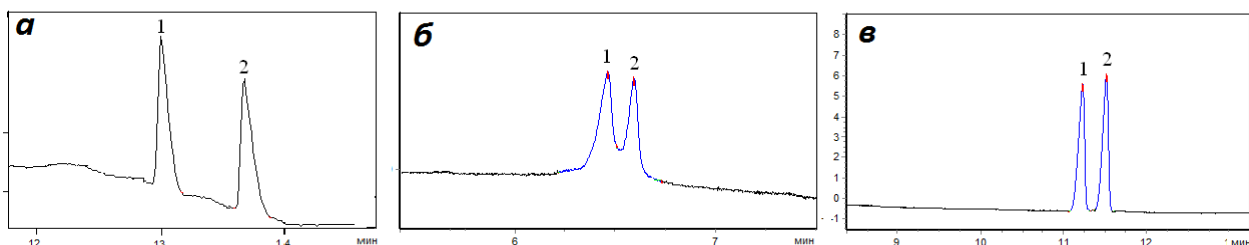


Рис. 13. Электрофореграммы препаратов *а* - «БЫСТРУМ ГЕЛЬ» (1,2 - кетопрофен). Условия: ФЭ – 2 мМ эремомицина в MeOH / 50 мМ ФБ, pH 5.8, (60 / 40 об. %); -20 кВ, 254 нм; *б* - «ВИЗИН» (1, 2 - тетрагидрозолин). Условия: ФЭ – 90 мМ азитромицина, 30 мМ H_3BO_3 , 75 мМ ТБА в MeOH; +20 кВ, 254 нм; *в* - «АНАПРИЛИН» (1,2 - пропранолол). Условия: ФЭ – 60 мМ кларитромицина, 240 мМ H_3BO_3 , 10 мМ NaOH, 100 мМ $C_6H_8O_7$ в MeOH, +20 кВ, 225 нм.

Таблица 7. Результаты определения содержания кетопрофена, тетрагидрозолина и пропранолола в лекарственных препаратах (n=3, P=0,95).

| Активное вещество | Кетопрофен | Тетрагидрозолин | Пропранолол г.хл. |
|---|--|--|--|
| Объект | Гель «БЫСТРУМ ГЕЛЬ» | Глазные капли «ВИЗИН» | Таблетки «АНАПРИЛИН» |
| Хиральный селектор | Эремомицин | Азитромицин | Кларитромицин |
| Фоновый электролит | 2 мМ эремомицина в MeOH / 50 мМ ФБ, pH 5.8 (60 / 40 об. %) | 70 мМ азитромицина, 30 мМ H ₃ BO ₃ , 75 мМ ТБА в MeCN / MeOH (80 / 20 об. %) | 60 мМ кларитромицина, 240 мМ H ₃ BO ₃ , 10 мМ NaOH, 100 мМ C ₆ H ₈ O ₇ в MeOH |
| Уравнение градуировочной зависимости | $y = 133,5 x - 0,5$ | $y = 34,1 x + 0,3$ | $y = 555,6 x - 3,3$ |
| R ² , коэффициент корреляции | 0,999 | 0,999 | 0,999 |
| Диапазон линейности градуировочной зависимости, мг/мл | 0,02 – 0,20 | 0,05 – 1,00 | 0,025 – 0,300 |
| Время анализа, мин | 14 | 7 | 12 |
| Предел обнаружения C _{min1} , C _{min2} , мкг/мл | 4,6 4,8 | 4,7 4,9 | 0,5 0,5 |
| Sr (S/t _{сумм}), % | 0,8 | 1,3 | 2,0 |
| Энантиомерный состав, % | 51±2 49±2 | 65±1 35± 1 | 50,3±0,2 49,7±0,2 |
| Найдено | (2,4±0,1) % | (0,51±0,02) мг/мл | (40±3) мг/табл |
| Заявлено производителем | 2,5 % | 0,50 мг/мл | 40 мг/табл |

ВЫВОДЫ

1. Изучены растворимость, спектры поглощения, стабильность и адсорбция на стенках немодифицированного кварцевого капилляра эремомицина, азитромицина, эритромицина и кларитромицина в водно-органических и неводных системах. На основании полученных данных предложен возможный состав фоновых электролитов для исследования энантиоразделяющей способности новых хиральных селекторов.
2. Исследовано влияние содержания метанола в составе ФЭ, рН, концентрации хирального селектора на энантиоразделение профенов в присутствии эремомицина. Показано, что использование водно-метанольной системы позволяет снизить адсорбцию эремомицина на стенках кварцевого капилляра, и является альтернативой использования модифицированных капилляров в хиральном капиллярном электрофорезе.
3. Выявлена значимая роль борной кислоты в составе ФЭ на энантиоразделение в присутствии исследованных хиральных селекторов в неводных фоновых электролитах. Влияние борной кислоты определяется образованием комплекса хирального селектора и борной кислоты, который участвует в энантиоразделении.
4. Показано, что добавки основания и кислоты, их соотношение в фоновом электролите, а также природа растворителя значительно влияют на энантиоразделение в присутствии эритромицина, азитромицина и кларитромицина. Использование ФЭ на основе метанола наиболее эффективно для разделения энантиомеров в присутствии исследованных антибиотиков, в водно-органических ФЭ оно не достигается ни с одним из селекторов.
5. Установлено, что наиболее универсальными из изученных хиральных селекторов в неводных системах являются эритромицин и кларитромицин. В присутствии эритромицина разделены энантиомеры 11 аминоспиртов (альпренолол, атенолол, метопролол, норметанефрин, окспренолол, октопамин, *n*-гидроксинорэфедрин, пиндолол, синефрин, триптофанол, эфедрин) и 4 амина (амфетамин, метоксифенамин, *n*-хлорамфетамин, тетрагидрозолин). В присутствии кларитромицина разделено 10 аминоспиртов (альпренолол, атенолол, кленбутерол, лабеталол, метопролол, пиндолол, пропранолол, синефрин, соталол, фенотерол) и метоксифенамин. Азитромицин проявил энантиоселективность только к тетрагидрозолину. Выбор состава ФЭ для достижения максимального разрешения пиков энантиомеров зависит как от природы селектора, так и аналита.
6. Предложены методики определения кетопрофена, тетрагидрозолина пропранолола и разделения их энантиомеров в лекарственных препаратах. Определен энантиомерный состав действующих компонентов в препаратах «БЫСТРУМ ГЕЛЬ», «ВИЗИН» и «АНАПРИЛИН».

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих статьях:

1. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Староверов С.М., Кузнецов М.А.* Адсорбция эремомидина на стенках кварцевого и модифицированных капилляров при электрофоретическом разделении энантиомеров ароматических кислот. // Сорб. хром.проц. 2011.Т. 11. № 5. С. 589 – 599.
2. *Lebedeva M.V., Bulgakova G.A., Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Chernobrovkin M.G., Shpigun O.A.* Azithromycin for Enantioseparation of Tetrahydrozoline in NACE. // Chromatographia. 2013. V. 76. № 7 – 8. P. 375–379.
3. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А.* Электрофоретическое энантиоразделение профенов в водно-метанольных растворах с использованием эремомидина в качестве хирального селектора. // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2013. Т. 54. № 5. С. 247 – 251.

и тезисах докладов:

4. *Prokhorova A., Lebedeva M., Shapovalova E., Staroverov S., Shpigun O.* Enantioseparation of anionic compounds using erythromycin as chiral selector by different variants of capillary electrophoresis // 17th International Symposium on Capillary Electrophoresis Techniques. Baltimore, USA. 2010, August 20 – September 1. P. 79.
5. *Прохорова А.Ф., Лебедева М.В., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Кузнецов М.А., Шпигун О.А.* Определение некоторых лекарственных средств и их энантиомеров в фармацевтических композициях в присутствии эремомидина методом капиллярного электрофореза. // II Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». г. Краснодар, Россия. 26 сентября – 1 октября 2010. С. 264.
6. *Prokhorova A., Matveev P., Lebedeva M., Shapovalova E., Staroverov S., Shpigun O.* Application of erythromycin as a chiral selector for the analysis of ketoprofen in pharmaceuticals by capillary electrophoresis. // Nordic Separation Science Society 6th Conference (6th NoSSS). Riga, Latvia. 2011, August 24 – 27. P. 107.
7. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н.* Разделение энантиомеров органических кислот в присутствии эремомидина методом неводного капиллярного электрофореза. // III Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». г. Краснодар, Россия. 2 – 8 октября 2011. С. 118.
8. *Прохорова А.Ф., Лебедева М.В., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А.* Электрофоретическое разделение и концентрирование оптических изомеров. // III Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». г. Краснодар, Россия. 2 – 8 октября 2011. С. 131.
9. *Prokhorova A.F., Lebedeva M.V., Svidrnoch M., Maier V., Sevcik J., Shpigun O.A.* Fast and efficient erythromycin-mediated enantioseparation of biologically active amines by NACE. // Advances in Chromatography and Electrophoresis & ChirAnal 2012. Olomouc, Czech Republic. 2012, June 11 – 14. P. 191 – 193.

10. *Lebedeva M.V., Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Chernobrovkin M.G., Shpigun O.A.* Azithromycin for enantioseparation of amines in non-aqueous capillary electrophoresis. // *Advances in Chromatography and Electrophoresis & ChirAnal* 2012. Olomouc, Czech Republic. 2012, June 11 – 14. P. 124 – 125.
11. *Prokhorova A.F., Lebedeva M.V., Svidrnoch M., Maier V., Sevcik J., Shpigun O.A.* Use of erythromycin for chiral separation of biologically active amines in NACE // *29th International Symposium on Chromatography ISC 2012*. Torun, Poland. 2012, September 09 – 13.
12. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А.* Электрофоретическое разделение энантиомеров профенов в водно-метанольных растворах в присутствии эремомицина. // *3-ая научная конференция с международным участием «Химия-2013. Физическая химия. Аналитическая химия. Нанохимия. Теория, эксперимент, практика, преподавание»*. г. Москва, Россия. 14– 16 марта 2013. С. 56 – 58.
13. *Prokhorova A.F., Lebedeva M.V., Bulgakova G.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A., Maier V., Sevcik J.* Enantiorecognition of amines using macrolide antibiotics as chiral selectors in non-aqueous capillary electrophoresis. // *29th International Symposium on Microscale Bioseparations*. Charlottesville, VA, USA. 2013.
14. *Булгакова Г.А., Лебедева М.В.* Комплексообразование тетрагидрозолина с хиральным селектором азитромицином в неводном капиллярном электрофорезе. // *XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013»*. г. Москва, Россия. 8 – 13 апреля 2013. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2013.
15. *Lebedeva M.V., Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpigun O.A.* Approach to enhance the enantioseparation of basic drugs using clarithromycin as a chiral selector. // *39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2013*. Amsterdam, the Netherlands. 2013, June 16 – 20. P. 286.
16. *Prokhorova A.F., Lebedeva M.V., Bulgakova G.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A.* Complexation of some chiral amines and amino alcohols with antibiotics in NACE. // *9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*. Siofok, Hungary. 2013, September 4-6. P. 113.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 09-03-00519-а, № 12-03-00405-а, № 12-03-31255.

*Автор выражает искреннюю благодарность к.х.н., доценту кафедры аналитической химии МГУ имени М.В. Ломоносова Шаповаловой Е.Н. и к.х.н., ст. преподавателю кафедры аналитической химии МГУ имени М.В. Ломоносова Прохоровой А.Ф. за участие в постановке задач и обсуждении результатов исследований; Макухину Н.Н. за помощь в выделении и идентификации комплекса эритромицин * борная кислота; д.х.н. Староверову С.М. (ЗАО «БиоХимМакСТ») за предоставленный хиральный селектор эремомицина сульфат.*