

Két homológ szerkezetű fluorokinolon származék elválasztása kapilláris elektroforézissel

Simon Brigitta¹, Hancu Gabriel², Gyéresi Árpád²

¹Pharmafarm, Marosvásárhely, Nagykereskedelmi Központi Lerakat, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék

Separarea a două fluorochinolone cu structură similară prin metoda electroforezei capilare

Grupa chinolonelor cuprinde o serie de agenți antibacterieni sintetici după modelul acidului nalidixic, un derivat de naftiridină, introdus pentru tratamentul infecțiilor tractului urinar în anul 1962. Ca rezultat al cercetărilor extinse structură – activitate, s-a ajuns la compuși cu potență ridicată, spectru de activitate extins, proprietăți de absorbție și distribuție îmbunătățite. Acești analogi moderni sunt uneori clasificați separat ca fiind fluorochinolone, toți membrii grupului având în comun un 6-fluoro substituent. Pe parcursul experimentelor noastre am studiat doi derivați de fluorochinolona cu structură și caracteristici chimice asemănătoare: ciprofloxacina și norfloxacina. Scopul cercetărilor noastre a fost elaborarea unei metode pentru separarea, respectiv identificarea simultană celor doi compuși. În acest scop am ales electroforeza capilară, ținând cont de faptul că permite o separare rapidă și necesită cantități mici de probă. Separarea cea mai eficientă s-a realizat cu soluție tampon conținând 25mM tetraborat de sodiu, 100 mM dodecilsulfat de sodiu și 100 mM acid boric, în intervalul de pH = 7,9 – 8,3. Ordinea de migrare a celor doi compuși este: ciprofloxacina și norfloxacina. Pentru a studia influența parametrilor de lucru asupra separării s-a studiat efectul voltajului aplicat, a temperaturii, respectiv a timpului și presiunii de injectare. Creșterea tensiunii respectiv a temperaturii a condus la scăderea timpilor de migrare; condițiile de injectare influențând doar în mică măsură timpii de migrare. S-au verificat și unii parametri analitici ai metodei, având ca scop demonstrarea reproductibilității respectiv linearității metodei.

Cuvinte cheie: fluorochinolone, ciprofloxacina, norfloxacina, electroforeză capilară

Separation of two homologous fluoroquinolone derivatives by capillary electrophoresis

Quinolones include a number of synthetic antibacterial agents, modelled on nalidixic acid, introduced in therapy in 1962 for the treatment of urinary tract infections. As a result of extensive structure-activity research, highly potent compounds with extended spectrum of activity and improved absorption and distribution properties were synthesised. These modern analogues are classified separately as fluoroquinolones, because all group members share a 6-fluoro substituent. In our experiments we studied two fluoroquinolone derivatives: ciprofloxacin and norfloxacin, compounds with similar structure and chemical properties. The aim of our study is the development of an analytical method, which allows the simultaneous separation and identification of these compounds. In order to achieve the separation, we have chosen capillary electrophoresis, a method which gains ground in the analysis of pharmaceutical substances. The buffer solution containing 25 mM sodium tetraborate, 100 mM sodium dodecyl sulfate and 100 mM boric acid permitted an efficient separation in the pH interval of 7,9–8,3, the migration order being: ciprofloxacin and norfloxacin. In order to improve the separation, we studied the influence of the applied voltage, temperature and the injection pressure and duration. The increase of the applied voltage and temperature resulted in the decrease of the migration times. The injection parameters don't have a significant influence on the migration times. Some analytical parameters of the method have also been checked out, in order to demonstrate the reproducibility and linearity of the method.

Keywords: fluoroquinolones, ciprofloxacin, norfloxacin, capillary electrophoresis

Orvostudományi Értesítő, 2012, 85 (1): 42-46

www.orvudert.ro

A kinolonok szintézis útján nyert, Gram-negatív kórokozókra hatékony, széles körben alkalmazott antibakteriális vegyületek. A fluortartalmú vegyületek jóval szélesebb hatásspektrummal rendelkeznek mint az őket megelőző kinolin-származékok. A fluorokinolonok közé tartozik az 1978-ban bevezetett norfloxacina, az ofloxacin, a ciprofloxacina (1981), a pefloxacin (1982), illetve a lomefloxacina (1985). Az utolsó generációs fluorokinolonok nemcsak húgyúti fertőzések kezelésére alkalmasak, hanem szisztémás fertőzések esetében is sikerrel adagolhatók. Kísérleteink során a fluorokinolonok két fontos, hasonlószerkezetű képviselőjét tanulmányoztuk, a ciprofloxacint és a norfloxacint (1. ábra) [8].

A fluorokinolonok gyengén oldódnak vízben, viszont

aránylag jól oldódnak lipofil oldószerekben. Kémiai szempontból amfoter vegyületek; a szilárd anyagok ikerion formában vannak jelen (7,4-es pH-nál 84%-ban). Két pKa értékkel rendelkeznek. A pKa₁ értéke általában 5,5-6,3 között van és a 3-as pozícióban levő karboxil csoportnak tulajdonítható. A 7-es pozíció nitrogénje a bázikus jelleget befolyásolja; ezt a heterociklus jelenléte (pirolidin, piperazin gyűrű) fokozza. Amfoter jellegüknek köszönhetően, a fluorokinolonok savas és lúgos közegben is ionizálnak, ezért elválasztásuk savas és lúgos kémhatású puffer jelenlétében is lehetséges.

Az Európai Gyógyszerkönyv [13] azonosításukra és mennyiségi meghatározásukra a magas nyomású folyadékkromatográfiai módszert (HPLC) írja elő; a szakirodalmi források is legtöbbször erre a módszerre hivatkoznak; a kapilláris elektroforézist ritkábban alkalmazzák. Kísérleteink célja egy alternatív analitikai módszer kidolgozása, két széles körben alkalmazott, homológ

Simon Brigitta
Négyfalu - Săcele, Brassó megye
Martin Luther 79
E-mail: viragorlan@yahoo.com

1. táblázat. A ciprofloxacin és norfloxacin elválasztása változó bórsav tartalmú tompító oldatok jelenlétében (migrációs idők; csúcscsúszélesség; felbontás)

H_3BO_3 (mM)	pH	Migrációs idő (perc)		Csúcscsúszélesség (perc)		Felbontás
		CIP (t_1)	NOR (t_2)	CIP (w_1)	NOR (w_2)	
0	9,07	5,22	5,22	0,10	0,10	0,00
45	8,52	7,33	7,76	0,15	0,19	2,57
90	8,11	7,99	8,47	0,13	0,12	3,66
135	7,89	8,67	9,03	0,10	0,09	3,72
180	7,68	8,90	9,33	0,08	0,07	5,48
225	7,65	9,15	9,43	0,07	0,08	3,67
270	7,61	9,23	9,47	0,07	0,08	3,21

2. táblázat. A ciprofloxacin és norfloxacin elválasztása változó acetonitril tartalmú tompító oldatok jelenlétében (migrációs idők; csúcscsúszélesség; felbontás)

ACN%	Migrációs idő (perc)		Csúcscsúszélesség (perc)		Felbontás
	CIP (t_1)	NOR (t_2)	CIP (w_1)	NOR (w_2)	
20	7,23	7,78	0,13	0,13	4,20
40	4,63	4,87	0,06	0,08	3,39
60	4,29	4,45	0,05	0,07	2,72
80	3,92	4,03	0,05	0,08	1,73

fluorokinolon származék – a ciprofloxacin (CIP) és a norfloxacin (NOR) - azonosítására és elválasztására. Erre a célra a kapilláris elektroforézist alkalmaztuk, figyelembe véve, hogy ez a módszer nagy felbontású elválasztást tesz lehetővé, gyors és nem igényel nagy mennyiségű mintákat [2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13].

Anyag és módszer

Kísérleteink során az Antibiotice gyógyszergyár jóvoltából beszerzett ciprofloxacin és norfloxacin tanulmányoztuk. A vizsgálatok céljára a ciprofloxacin-hidrokloridot vízben, a norfloxacin acetonitrilben oldottuk és 1 g/l töménységű törzsoldatokat készítettünk. A két törzsoldatból 10 mg/100 mL-es töménységű, keverék oldatot készítettünk, amelyet a mérések között hideg helyen tároltuk. Reagensként analitikai tisztaságú bórsavat, nátrium-tetraborátot (NaTB) - Merck, nátrium-dodecil-szulfátot (NaDDS) - Merck, acetonitrilt (ACN) és 0,1M-os nátrium-hidroxid oldatot használtunk.

Méréseinket az Agilent 6100 CE (Hewlett Packard) készülékkel végeztük; 50 cm hosszúságú, 50 μ m átmérőjű kapillárist alkalmaztunk. A detektálás az UV-abszorbancia mérésével történt 210 és 220 nm-es hullámhosszon. Az

elektroforegramok rögzítésére, feldolgozására és az adatok kiértékelésére az Agilent Chemstation számítógépes programot használtuk [12]. A pufferoldat kémhatásának mérése az Inolab Terminal 740 pH-méterrel történt.

A minták injektálása hidrodinamikusan történik, a kapilláris anód felőli végénél; a katód a detektor oldalán helyezkedett el. Az injektálás időtartama 5 másodperc; az injektálási nyomás 30 mBar. Az alkalmazott kapilláris feszültség 25 kV, a hőmérséklet 25°C. A szennyeződések eltávolítására minden új mérési sorozat előtt a kapillárist 0,1M-os NaOH oldattal mostuk 15 percig; az egyes mérések előtt pedig az alkalmazott tompító oldattal 5 percig.

A kapilláris elektroforézis [2, 4, 5, 13] alapelve az elektromos töltéssel rendelkező részecskék eltérő vándorlása egy tompító oldatban, elektromos feszültség hatására, az eltérő vegyérték/ionméret függvényében. Minél nagyobb ez az arány, a vegyület vándorlási sebessége annál nagyobb.

A tanulmányozott vegyületek elválasztására a micelláris kapilláris elektroforézis bizonyult a leghatékonyabbnak. Ebben az esetben az elválasztás a részecskének az elektrolit és a micellák közötti megoszlásán alapszik. Felületaktív anyagként nátrium-dodecil-szulfátot használtunk; ennek jelenlétében olyan micellák képződnek, melyek felülete negatív töltésű, belső része pedig hidrofób [1, 4, 6, 10].

Eredmények

Kísérleteink során különböző összetételű és töménységű tompító oldatokkal próbálkoztunk. Első lépésben különböző töménységű nátrium-tetraborát oldattal, illetve nátrium-tetraborát és nátrium-dodecil-szulfát tartalmú oldatokkal próbáltuk elválasztani a két vegyületet. Azt tapasztaltuk, hogy 25-100 mM-os nátrium-tetraborát oldatokat használva, a két fluorokinolon elválasztása nem lehetséges. A továbbiakban felületaktív anyag alkalmazá-

3. táblázat. Reprodukibilitás tanulmányozása: migrációs idők és csúcs alatti terület

Minta száma	Csúcs alatti terület (mA)		Migrációs idő (perc)	
	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Ciprofloxacin	Norfloxacin
1	45,754	54,246	4,251	4,478
2	46,443	53,557	4,297	4,533
3	46,005	53,995	4,350	4,597
4	46,055	53,945	4,380	4,638
5	46,285	53,715	4,408	4,670
6	46,208	53,793	4,419	4,686
7	46,351	53,650	4,419	4,688
8	46,769	53,231	4,447	4,721
számtani közép-arányos	46,28	53,72	4,40	4,67
standard deviáció	0,31	0,31	0,07	0,08
ST%	0,66	0,57	1,54	1,81

sával próbálkoztunk. További méréseink során állandó nátrium-tetraborát koncentráció mellett (25 mM), változó koncentrációjú nátrium-dodecil-szulfát oldatot használtunk (25-100 mM). Elválasztást ebben az esetben sem értünk el.

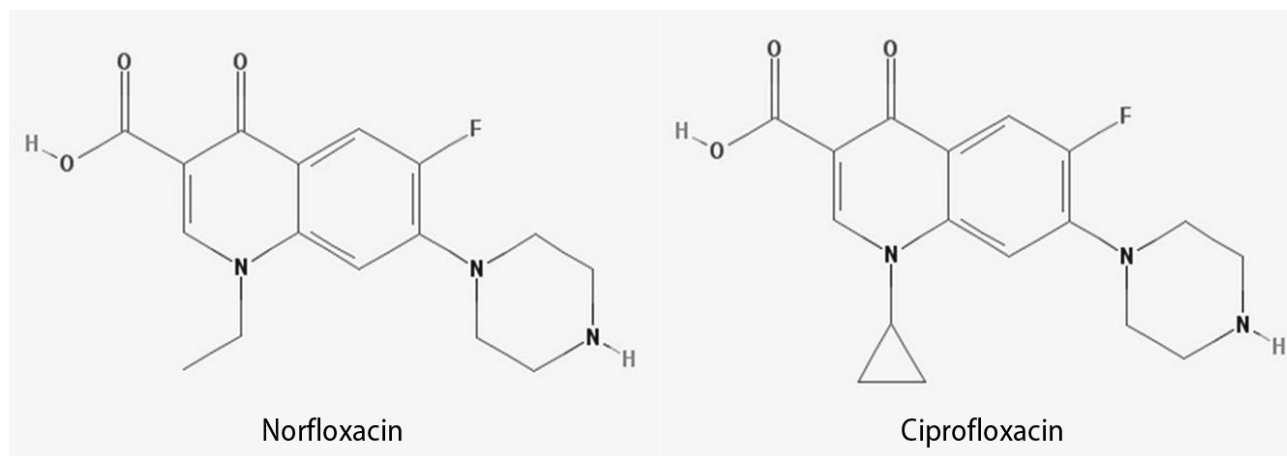
Mivel a fluorokinolonok ionizációja pH-függő, ezért a 25 mM NaTB és 100 mM NaDDS tartalmú oldathoz 0,5M-os H₃BO₃ oldatot adtunk, fokozatosan növekvő mennyiségben. Minden így nyert tompító oldat pH-ját

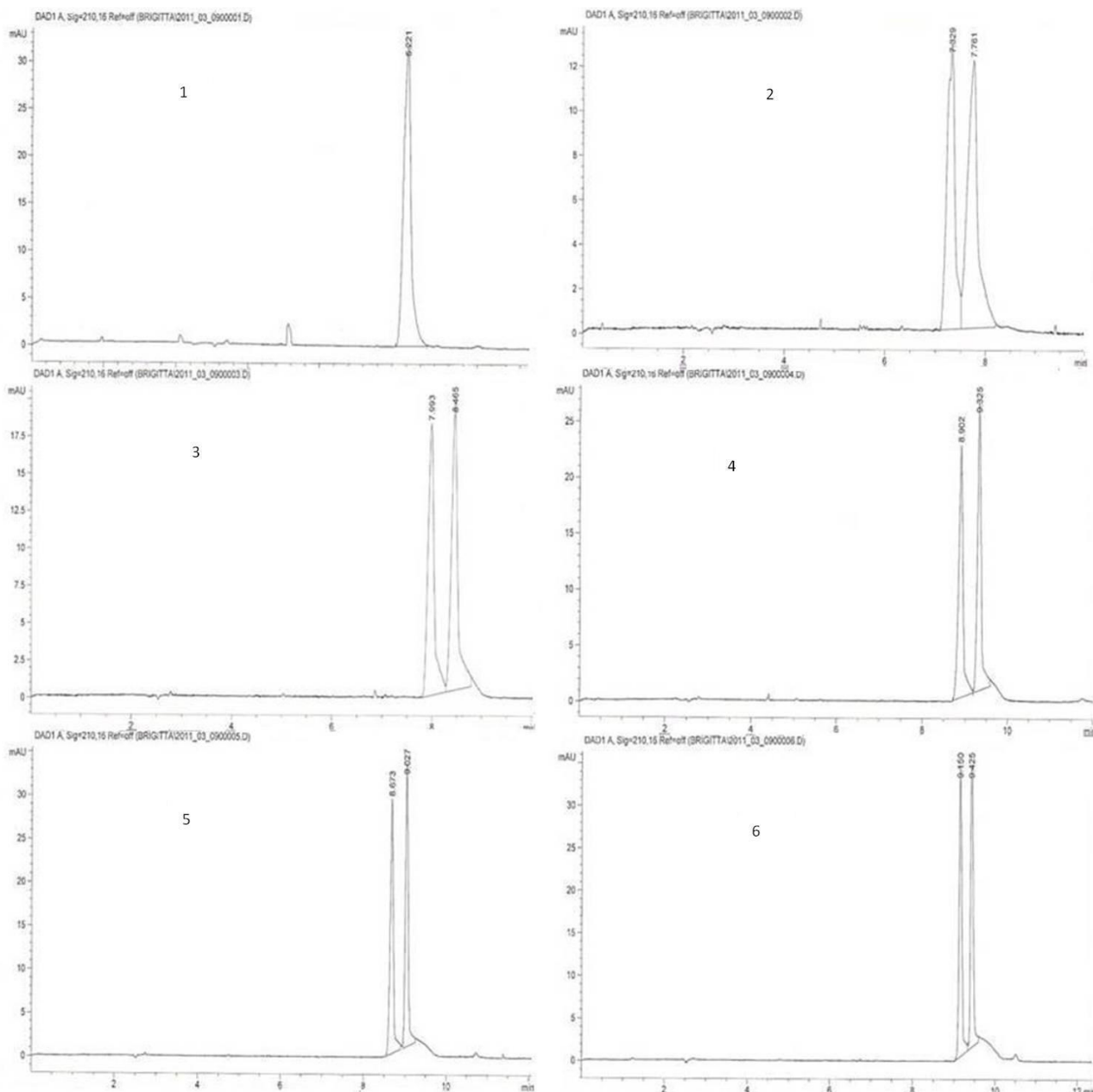
4. táblázat. Linearitás tanulmányozása

Koncentráció (mg/100 ml)	Csúcs alatti terület (mA)	
	CIP	NOR
20	49,92	58,91
10	31,63	35,87
8	21,46	24,03
6	18,08	19,88
4	12,98	13,90
2	9,02	9,30
1	6,42	6,47
egyenes meredeksége	2,3331	1,2054
tengely metszéspontja	4,3583	-1,6902
korrelációs együttható	0,9928	0,9998
standard hiba	1,99	0,39
LOD	2,56	0,98
LQD	8,54	3,25

megmértük. Elképzelésünk sikeresnek bizonyult, a legjobb elválasztást a 7,6–8,5-as pH intervallumban tapasztaltuk. A pH további csökkentése nem növeli az elválasztás hatékonyságát, sőt a bórsav mennyiség növekedése a tompító oldatban a két fluorokinolon együttes migrációjához vezet. A tompító oldat töménységének növekedésével egyidőben a migrációs idők is meghosszabbodnak. A különböző összetételű tompító oldatok jelenlétében mért migrációs időket és a felbontás értékét az 1. táblázatba foglaltuk. Az így nyert elektroforegramok a 2. ábrán láthatóak. A felbontás kiszámítására az alábbi képletet használtuk [4]:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

**1. ábra.** A tanulmányozott vegyületek szerkezeti képlete



2. ábra. A ciprofloxacin és norfloxacin elválasztása 25 mM nátrium-tetraborát, 100 mM nátrium-dodecil-szulfát és növekvő bórsav mennyiség jelenlétében (1-6 elektroforegramok)

A következő lépésekben 25 mM NaTB, 100 mM NaDDS és 100 mM H_3BO_3 tartalmú tompító oldatot használtunk. Ehhez az oldathoz szerves módosítóként acetonitril adtunk és az elválasztás hatékonyságát követtük. Azt tapasztaltuk, hogy acetonitril jelenlétében is elválasztható a két fluorokinolon származék; azonban a szerves oldószer koncentrációjának növekedése a migrációs idők és az elválasztás hatékonyságának csökkenéséhez vezet.

A módszer optimalizálása céljából a kapilláris feszültségét és hőmérsékletét, illetve az injektálási nyomást és ennek időtartamát módosítottuk. Úgy találtuk, hogy az elválasztás szempontjából a következő kísérleti körülmények optimálisak: kapilláris feszültség 25 kV, kapillá-

ris hőmérséklet 25°C, injektálási nyomás 30 mBar és az injektálás időtartama 5 s.

A módszer teljesítőképességének kiértékelésére meghatároztuk a *reproduktibilitást* és a *linearitást*, a migrációs idők és a csúcs alatti terület mérésével. Az eredményeket a 3., illetve 4. táblázatba foglaltuk.

Megbeszélés, következtetések

A két homológ szerkezetű fluorokinolon származék elválasztása a 7,9–8,3-as pH intervallumban tapasztalható, tompító oldatként 25 mM nátrium-tetraborát és 100 mM

nátrium-dodecil-szulfát tartalmú oldatot alkalmazva, változó mennyiségű 0,5M-os bórsav oldat jelenlétében. A vándorlási sorrend a következő: ciprofloxacín és norfloxacín. Szerves módosító – acetonitril - jelenlétében is megfigyeltük a két fluorokinolon származék elválasztását.

A kidolgozott módszer egy kevésbé költséges alternatíva a fluorokinolonok elválasztására, a szakirodalomban jóval gyakrabban leírt HPLC-vel szemben. Figyelembe véve a tanulmányozott vegyületek homológ szerkezetét és azt, hogy a szakirodalomban kevés olyan módszert [9] írtak le, amely alkalmas a ciprofloxacín és norfloxacín elválasztására; kidolgozott módszerünk ilyen vonatkozásban új lehetőséget jelent.

Irodalom

- Altria D. K. - *Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft GmbH, Braunschweig / Wiesbaden, 1998, 1-39.
- Bojiță M. - *Analiza și controlul medicamentelor*; vol. 2. Editura Intelcredo, Deva, 2003, 240-288.
- Fülöp F., Noszál B., Szász Gy. et al. - *Gyógyszerészi kémia*, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010, 679-686.
- Gáspár A. - *Kapillaris zónaelektroforézis*, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2000, 5-183.
- Kékedy L. - *Műszeres analitikai kémia*, Erdélyi Múzeum Egyesület Kiadása, Kolozsvár, 2003, 195-220.
- Muntean L. D. - *Controlul medicamentelor – Metode spectrale, cromatografice și electroforetice de analiză*, Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, 2004, 283-299.
- Park H., Kim T. H., Bark K. - *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments*, Eur J Med Chem, 2002, 37:443-460.
- Rusu G., Dănila Gh. - *Medicamente chinolonice; Prezent și viitor în chimioterapie antiinfecțioasă*, Editura „Gh. Asachi”, Iași, 2001, 5-60.
- Sun H., He P., Yunkai L. - *Simultaneous determination of ciprofloxacin, ofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis*; Chem J Internet, 2006, 5:32.
- Sztaricskai F. - *Antibiotikus hatású szintetikumok; Fluorkinolon-karbonsavak szerkezete és aktivitása*, Gyógyszerészet, 2005, 49:467-473.
- Zhou S., Ouyang J., Baeyens W. et al. - *Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector*, J Chromatogr A, 2006, 1130:296-301.
- xxx - *Agilent Capillary Electrophoresis System*, User's guide, Agilent Technologies, Germany, 2000.
- xxx - *European Pharmacopoeia*, 7-th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2010.