



УДК 543.544.943.3

Применение нового варианта капиллярной тонкослойной хроматографии для анализа антибиотиков группы тетрациклина

Березкин В.Г.

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва

Онучак Л.А., Евтюгина Е.Н.

ГОУ ВПО «Самарский государственный университет», Самара

Аннотация

В работе предложен новый вариант ТСХ – капиллярная ТСХ, где хроматографический процесс реализован в тонком капилляре, наполненном сорбентом. Впервые изучено хроматографическое поведение окрашенных препаратов группы тетрациклина в условиях капиллярной ТСХ. Предложенный вариант капиллярной ТСХ отличается от традиционной планарной ТСХ лучшей воспроизводимостью вследствие отсутствия влияния газовой среды на хроматографический процесс, минимальный расход сорбента и элюента, отсутствие хроматографических камер

Введение

Тетрациклины являются антибиотиками широкого спектра действия. В основе механизма антибактериального действия препаратов этой группы лежит подавление ими биосинтеза белка микробной клетки на уровне рибосом [1]. Ранее для определения тетрациклинов использовали масс-спектрометрию, ВЭЖХ [2]. Для определения подлинности тетрациклиновых лекарственных препаратов и обнаружения тетрациклинов в пищевых продуктах широко используется также планарная тонкослойная хроматография [3,4]. Преимуществами метода являются высокая производительность, простота, доступность и экономичность [5]. Однако данный метод обладает рядом недостатков, таких как низкая эффективность, необходимость использования специальных камер, насыщенных парами подвижной фазы, и как, следствие, невысокая воспроизводимость хроматографических характеристик удерживания [5,6].

В работе рассмотрен новый вариант ТСХ – капиллярная тонкослойная хроматография. В капиллярной ТСХ хроматографический процесс реализован в тонком капилляре, наполненном сорбентом. Детектирование зон сорбатов

аналогично традиционной планарной ТСХ. Предлагаемый вариант хроматографии можно классифицировать также как одномерную высокоэффективную ТСХ, в отличие от традиционной планарной ТСХ, так как движение и размытие зон сорбатов происходит в очень тонком слое сорбента ($\leq 0,5$ мм), находящемся в капилляре, что уменьшает вклад гидродинамического (стеночного) эффекта в размытие зон сорбатов.

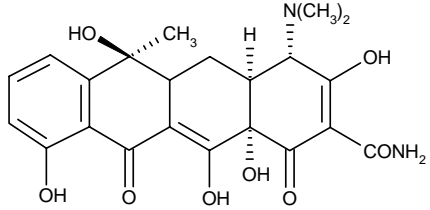
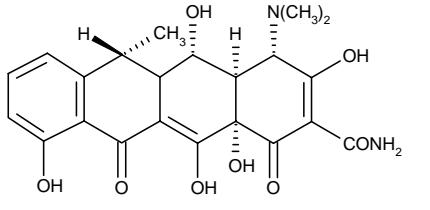
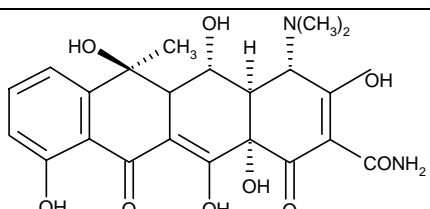
В настоящей работе проведена оценка нового варианта ТСХ. Изучена возможность использования капиллярной ТСХ для анализа окрашенных антибиотиков группы тетрациклина.

Эксперимент

Образцы исследуемых веществ готовили из лекарственных форм. Для этого таблетки измельчали, заливали 2 мл ацетонитрила и экстрагировали вещество в течение 0,5 ч.

В таблице 1 представлены структурные формулы и физико-химические свойства исследованных антибиотиков группы тетрациклина.

Таблица 1. Структурные формулы и некоторые физико-химические параметры исследованных соединений [1]*)

Наименование	Структурная формула	M_r	$\alpha, \text{Å}^3$	μ, D	$V, \text{Å}^3$
Тетрациклин		444,44	43,23	4,45	1071,72
Доксициклин		444,44	43,91	5,82	1065,81
Окситетрациклин		460,44	43,87	6,67	1074,80

*) Примечание: поляризуемость молекул α , дипольный момент μ и молекулярный объем V рассчитаны с помощью программы Hyper Chem 7.0. Оптимизацию геометрии молекул проводили полуэмпирическим методом PM1.

Эксперимент проводили как в условиях традиционной планарной ТСХ, так и капиллярной ТСХ.

Для проведения эксперимента методом традиционной восходящей ТСХ использовали пластины для обращенно-фазной ТСХ «Плазмахром» (тип сорбента – силикагель с привитой фазой C_3 , $d_p = 8-12$ мкм, алюминиевая подложка, УФ-254 нм) размером 10×10 см, выпущенные фирмой «Манометр», (г.С.-Петербург, Россия). Хроматографирование проводили в камерах, насыщенных парами элюента, при комнатной температуре. Длина пути элюента составляла 7,5 см.

Для реализации нового метода капиллярной ТСХ использовали капилляры из плавленного кварца ($d = 0,5$ мм), изготовленные из колонки для капиллярной газовой хроматографии (Phenomenex, США). Длина капилляра не превышала 6,0 см. Предварительно капилляры промывали ацетонитрилом. В качестве сорбента использовали тот же силикагель с привитой фазой C_3 , который был предварительно снят с поверхности пластинки для обращенно-фазовой ТСХ «Плазмахром» и измельчен с помощью стеклянной палочки. Заполнение капилляра производили сухим сорбентом. Набивали капилляр, периодически постукивая по плоской поверхности. Пробу исследуемого вещества в ацетонитриле вносили в начальную часть капиллярной колонки капилляром меньшего размера ($d = 0,3$ мм). Капиллярную наполненную колонку вертикально помещали одним концом в элюент (на 1-2 мм). Эксперимент проводили при комнатной температуре. Длина пути элюента составляла 4,5 см. В качестве подвижной фазы использовали смешанный элюент состава: 0,5 М водный раствор щавелевой кислоты – метанол – ацетонитрил в объемном соотношении 6:2:2 [3].

Визуально определяли расстояния, пройденные элюентом (a) и окрашенной зоной элюента (b) от линии старта, в зависимости от времени. Текущие значения фактора задержки рассчитывали по формуле:

$$R_f = \frac{b(t)}{a(t)}, \quad (1)$$

Для определения конечной величины R_f для каждого из аналитов проводили не менее 3-х параллельных опытов ($n \geq 3$).

Высоту, эквивалентную теоретической тарелке, (ВЭТТ, H) для каждого исследуемого вещества определяли по формуле:

$$H = \frac{b}{N}, \quad (2)$$

N – число теоретических тарелок, b – конечное расстояние, пройденное зоной аналита от линии старта. Для определения N высушенные пластинки и капилляры сканировали с использованием программы Sorbfil Videodensitometr TLC Quantitative Evaluation (Ver 1.7.0.216) производства ЗАО «Сорбполимер» (г.Краснодар, Россия).

Обсуждение результатов

Для оценки нового метода капиллярной ТСХ в статье были исследованы закономерности движения подвижной фазы. Движение фронта элюента под действием капиллярных сил в обоих вариантах ТСХ описывается уравнением:

$$a^2 = kt + A, \quad (3)$$

где a^2 – квадрат расстояния от линии старта до фронта подвижной фазы, k – постоянная потока ("константа скорости"), t – время движения подвижной фазы.

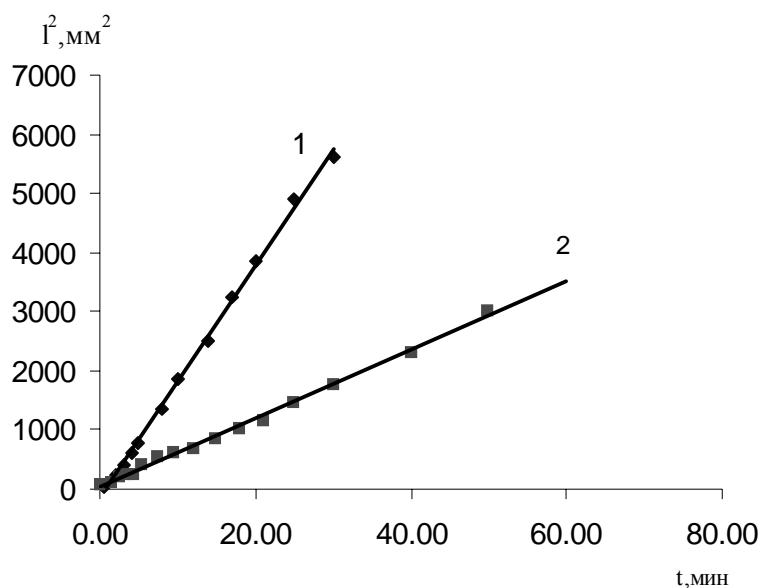


Рис. 1. Зависимости движения фронта элюента (a^2) от продолжительности эксперимента (t) полученные методами планарной ТСХ (1) и капиллярной ТСХ (2): элюент «0,5 М раствор щавелевой кислоты – метанол – ацетонитрил» (6:2:2), сорбент – силикагель с привитой фазой C_3

Установлено, что движение фронта подвижной фазы в планарной ТСХ описывается уравнением $a^2 = 196.2t - 142.4$ (коэффициент линейной корреляции $R^2 = 0.9980$), а в капиллярном варианте ТСХ – уравнением $a^2 = 58.078 + 21.242t$ (коэффициент линейной корреляции $R^2 = 0.996$). Фронт подвижной фазы в капиллярном варианте движется медленнее, чем в традиционном варианте ТСХ (рис. 1). Снижение скорости движения элюента может быть вызвано высокой плотностью набивки объема капилляра сорбентом и снижением проницаемости.

Типичные зависимости расстояний, пройденных элюентом $a = a(t)$ и центром зоны сорбата $b = b(t)$ по пластине и в капилляре, представлены на рис.2.

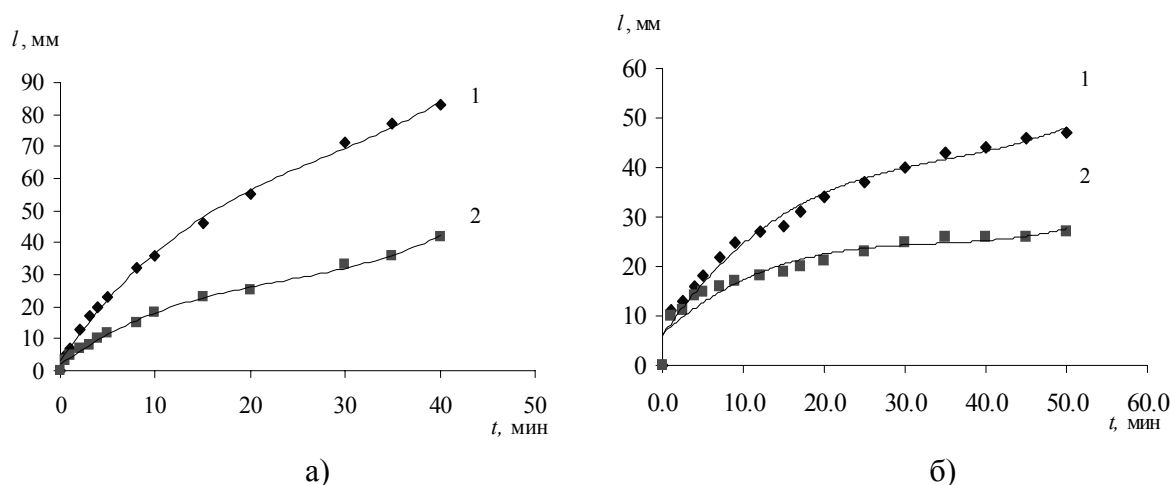


Рис. 2. Зависимости расстояний, пройденных элюентом (1) и доксициклином (2) (условия эксперимента – см. рис.1)

Из рис. 2 видно, что подъем элюента и аналита по пластине и в капилляре происходит аналогично с установлением некоторого постоянного значения R_f . На основании зависимостей $a = a(t)$ и $b = b(t)$, полученных визуально для каждого из анализов, были определены текущие зависимости R_f анализов. На рис. 3 представлены значения R_f доксициклина от времени с момента начала эксперимента. В начале эксперимента отмечается характерный разброс значений величины R_f , обусловленный конкурентным взаимодействием молекул аналита и элюента с поверхностью сорбента. В конце процесса хроматографирования наблюдается постоянство R_f и для обоих вариантов ТСХ. Величины R_f несколько больше в случае капиллярной ТСХ по сравнению с планарной ТСХ, что может быть связано с уменьшением испарения подвижной фазы с поверхности сорбента в закрытом капилляре по сравнению с испарением подвижной фазы с пластинки в планарной ТСХ. Так, для тетрациклина в случае капиллярной ТСХ R_f больше на 10,4 % по сравнению с планарной ТСХ, для доксициклина – на 21,5 %, а для окситетрациклина – на 25,8 %. Заметное отличие величины подвижности R_f окситетрациклина может быть связано с тем, что зона аналита движется вблизи фронта элюента, где испарение элюента в случае планарной ТСХ максимально. В таблице 2 представлены конечные значения величин R_f , полученных обоими способами для исследуемых соединений. Относительная погрешность результата измерения меньше в варианте капиллярной ТСХ, что может быть обусловлено отсутствием влияния газовой фазы.

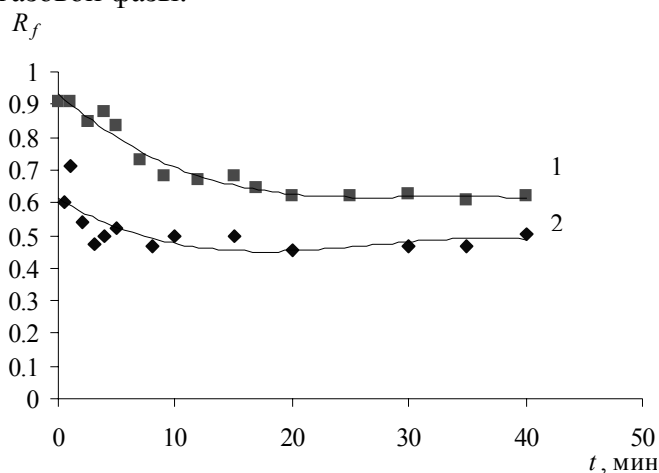


Рис.3. Зависимости величины R_f доксициклина от продолжительности эксперимента (t), полученные методами капиллярной ТСХ (1) и планарной ТСХ (2)(условия эксперимента – см. рис.1)

Удерживание исследуемых соединений в обращенно-фазовом варианте ТСХ, как известно, определяется конкуренцией между дисперсионным взаимодействием аналитов с неподвижной фазой и диполь-дипольным взаимодействием с подвижной фазой. Наличие полярных групп в молекулах

тетрациклинов приводит к усилению специфического межмолекулярного взаимодействия с элюентом и, таким образом, к уменьшению удерживания.

Таблица 2. Величины R_f тетрациклинов, полученные с использованием планарной и капиллярной восходящей ТСХ при индивидуальном хроматографировании анализов

Аналит	Планарная ТСХ		Капиллярной ТСХ	
	$\bar{R}_f \pm \Delta R_f$	$\varepsilon, \%$	$\bar{R}_f \pm \Delta R_f$	$\varepsilon, \%$
Тетрациклин	0,48±0,04	8,3	0,53±0,04	7,5
Доксициклин	0,51±0,03	5,9	0,62±0,03	4,8
Окситетрациклин	0,62±0,04	6,5	0,78±0,03	3,8

Величины R_f тетрациклинов находятся в интервале от 0,48 до 0,62 для планарной ТСХ и – от 0,53 до 0,78 для капиллярной ТСХ. Видно, при переходе от тетрациклина к окситетрациклину удерживание уменьшается. Так как α и V молекул исследуемых антибиотиков близки, то различия в величинах R_f могут быть связаны с величиной дипольного момента μ . С ростом μ происходит увеличение R_f , обусловленное усилением диполь-дипольных взаимодействий в связи с образованием водородных связей молекул анализов с молекулами ацетонитрила и метанола (при переходе от тетрациклина к окситетрациклину в структуре соединений увеличивается число гидроксильных групп).

В работе была также исследована возможность практического разделения смеси тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин, окситетрациклин) методом капиллярной ТСХ с использованием программного комплекса Sorbfil Videodensitometr TLC Quantitative Evaluation (Ver 1.7.0.216). Хроматограмму разделения смеси получили непосредственным сканированием капилляра с разделенными компонентами смеси и обработкой полученного изображения.

Основные хроматографические характеристики процессов планарной и капиллярной ТСХ, полученные при практическом разделении смеси тетрациклинов, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные хроматографические характеристики планарной ТСХ и капиллярной ТСХ при разделении смеси тетрациклинов

Аналит	Планарная ТСХ			Капиллярная ТСХ		
	R_f	H , мкм	t , мин	R_f	H , мкм	t , мин
Тетрациклин	0,47	150	40	0,37	25	50
Доксициклин	0,51	109		0,65	13	
Окситетрациклин	0,64	71		0,78	8	

Из таблицы 3 видно, что при использовании капиллярной ТСХ для каждого из компонентов разделяемой смеси тетрациклинов значительно уменьшается ВЭТТ, что связано с малым размытием зоны аналита в объеме капилляра ($d = 0,5$ мм) по сравнению с размытием зоны на пластине в планарной ТСХ. При использовании нового варианта ТСХ увеличивается время анализа на 25 % по отношению к традиционному варианту планарной ТСХ, что может быть обусловлено высокой плотностью набивки капилляра.

Таким образом, в работе был впервые применен метод капиллярной ТСХ для анализа окрашенных препаратов группы тетрациклина. Установлено, что размытие зон анализов в капиллярной ТСХ на порядок меньше, чем в традиционной, плоскостной ТСХ. Преимуществом капиллярной ТСХ является лучшая воспроизводимость вследствие отсутствия влияния состава газовой среды на

хроматографический процесс, минимальный расход сорбента и растворителя, отсутствие специального оборудования (хроматографических камер).

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные препараты. М.: Медицина, 2006. 1803 с.
2. Hisao Okaa, Yuko Itoa, Yoshitomo Ikaia, Tadaaki Kagamia, Ken-ichi Haradab
Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods.//Journal of Chromatography A. 1998. P. 309–319.
3. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. СПб.: Химиздат., 2005. С. 147-148.
4. Separation of tetracyclines by thin-layer chromatography/Choma Irena//Chem. anal. 2001 V.6 № 1. P 1-9.
5. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Перевод под ред. В.Г. Березкина. М.: Мир, 1981. Т. 1 и 2. 1100с.
6. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Изд-во при совете по хроматографии РАН, 1999. Т. 1 и 2. 753 с.
7. Березкин В.Г., Кормишкина Е.В. Вариант традиционной тонкослойной хроматографии с контактно закрытым сорбционным слоем («бескамерная» ТСХ)// ЖАХ. 2006. Т.61, № 10, С. 1074-1080.

Use of a new version capillary thin-layer chromatography for analysis of tetracycline antibiotics

Berezkin V.G.*, Onuchak L.A., Evtyugina E.N.**

**Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Science, Moscow, ** Samara State University, Samara*

In the present paper a new version TLC – a capillary TLC is proposed, where a chromatographic process is realized inside the thin capillary filled with sorbent. Chromatographic behavior of colored tetracycline antibiotics was studied by capillary thin-layer chromatography for the first time. The proposed TLC version is more reproducibile comparing with conventional TLC because of absence of influence of gaseous medium on chromatographic process, minimal consumption of sorbent and eluent and absence of chromatographic chamber as well.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, капиллярная тонкослойная хроматография, тетрациклины