

Béta-laktám szerkezetű antibiotikumok elválasztása kapilláris elektroforézissel

Simon Brigitta¹, Gyéresi Árpád²

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

Separarea antibioticelor beta-lactamice prin electroforeză capilară

Tot mai multe cercetări au ca obiect identificarea și determinarea cantitativă a substanțelor antibacteriene care poluează mediul înconjurător. Acești compuși ajung, sub formă de metaboliți, forme conjugate sau substanțe medicamentoase nemetabolizate, în apă, aer și sol. Sursa principală de poluare o formează unitățile spitalicești; de aici provin aproximativ 40% din antibioticele care ajung în mediul înconjurător. Deoarece transformarea lor metabolică este în jur de 50-60%, ajung cantități relativ mari de antibiotice în mediu. Având în vedere utilizarea extinsă a beta-lactamelor în terapia umană și animală, prezenta lucrare are ca obiect de studiu elaborarea unei metode de separare a patru compuși: benzilpenicilină, amoxicilină, oxacilină și ampicilină, în perspectiva analizei unor probe colectate din mediu. În acest scop am ales electroforeza capilară, ținând cont de faptul că permite o separare rapidă și necesită cantități mici de probă. Aparatura utilizată este Agilent Capillary Electrophoresis System; detecția se face în lumină UV la 210 respectiv 220 nm. Salvarea, prelucrarea și interpretarea rezultatelor obținute s-a realizat cu ajutorul softului Chemstation. Separarea cea mai eficientă s-a realizat cu soluție tampon conținând 25mM de tetraborat de sodiu respectiv 100 mM dodecilsulfat de sodiu. Ordinea de migrare a acestor compuși este: amoxicilină, ampicilină, benzilpenicilină și oxacilină. Pentru a studia influența parametrilor de lucru, s-au variat tensiunea și temperatura intracapilară, timpul și presiunea de injectare respectiv pH-ul soluției tampon.

Cuvinte cheie: antibiotice beta-lactamice, electroforeză capilară

Separation of beta-lactam antibiotics by capillary electrophoresis

Many studies are based on the identification and separation of the polluting antibacterial substances. These compounds reach the environment (water, air, soil) in form of metabolites, conjugated and / or unmetabolized forms. The main pollution source is represented by hospitals, as these units supply about 40% of the antibiotics that reach the environment. As their metabolic transformation has a rate of about 50-60%, these compounds are eliminated in the environment in relatively high quantities. Taking into account the extended utilization of the beta-lactams in the human and veterinary therapy, the aim of the authors was to elaborate a method for the separation of four compounds: benzilpenicillin, amoxicillin, oxacillin and ampicillin. In order to achieve a fast separation, we chose capillary electrophoresis. The analysis was performed on the Agilent Capillary Electrophoresis System equipped with an UV-detector. The acquisition, analysis and interpretation of the results was performed by the Chemstation software. The buffer solution containing 25 mM sodium tetraborate and 100 mM sodium dodecyl sulfate permitted the most efficient separation of the four compounds, the migration order being: amoxicillin, ampicillin, benzilpenicillin and oxacillin. In order to study the influence of the work parameters, we modified the intracapillary tension and temperature; the injection time and pressure and the pH of the buffer solution was modified as well.

Keywords: beta-lactam antibiotics, capillary electrophoresis

Orvostudományi Értesítő, 2010, 83 (3): 206-209

www.orvtudert.ro

Az utolsó évtizedben egyre több tanulmány témája a környezetbe kerülő antibakteriális szerek kimutatása és mennyiségi meghatározása. Ezek a gyógyszeres anyagok metabolitok, konjugált formák vagy nem metabolizált vegyületek formájában a vízbe, talajba jutnak. A fő szennyező forrást a kórházak képezik - a környezetben található antibiotikumok közel 40%-a innen származik. Mivel lebomlásuk mértéke 50-60%-ra tehető, érthető hogy a környezetbe jutó antibiotikumok mennyisége számottevő [6].

Mivel az antibiotikumok leggyakrabban alkalmazott csoportját a béta-laktám szerkezetű vegyületek képviselik, jelen munkánkban 4 penicillin származék (amoxicillin, ampicillin, benzilpenicillin és oxacillin, 1. ábra) kimutatására összpontosítottunk.

Ezeknek a vegyületeknek a szétválasztására a kapilláris elektroforézist alkalmaztuk, figyelembe véve azt, hogy ez a módszer gyors, nagy felbontású elválasztást tesz lehetővé és kis mennyiségű mintákat igényel [3, 5].

Kísérleteink célja 4 béta-laktám szerkezetű antibiotikum elválasztása vizes oldataikból (benzilpenicillin, amoxicillin, oxacillin és ampicillin) és egy olyan analitikai módszer kidolgozása amely lehetővé teszi ezek azonosítását környezeti mintákban.

Anyag és módszer

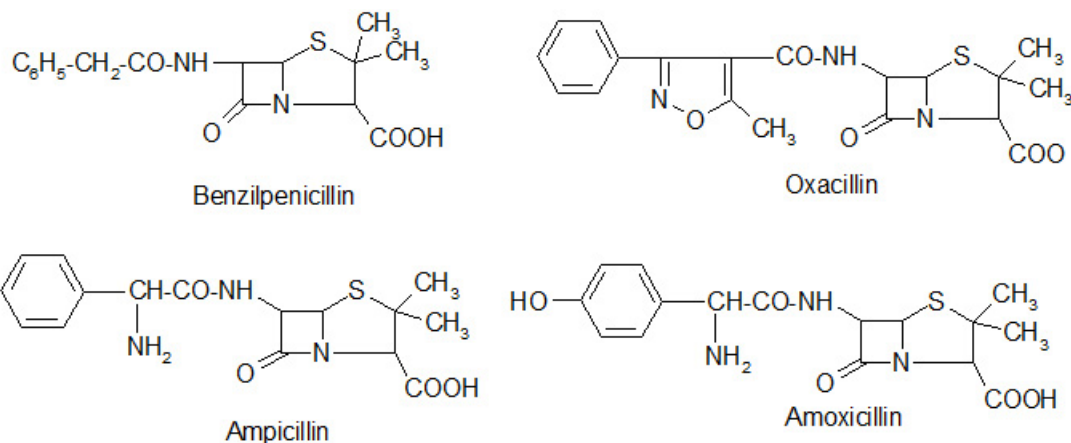
A kapilláris elektroforézis gyors és nagy felbontású analitikai módszer, amelynek alapelve az elektromos töltéssel rendelkező részecskék eltérő vándorlása egy tompító oldatban, elektromos feszültség hatására. A vegyületek elválasztása az eltérő vegyérték / ionméret arányokon alapszik. Minél nagyobb ez az arány, a vegyület vándorlási sebessége annál nagyobb. A tanulmányozott vegyületek elválasztására a micelláris kapilláris elektroforézis bizonyult a leghatékonyabbnak, ahol az elválasztás a részecskéknek az elektrolit és a micellák közötti megoszlásán alapszik. A felületaktív tulajdonságokkal rendelkező nátrium-dodecil-szulfát hozzáadása olyan micellák képződését eredményezi, melyek felülete negatív töltésű,

Simon Brigitta

505600 Négyfalu - Săcele

Martin Luther 79,

E-mail: viragorlan@yahoo.com



1. ábra. A tanulmányozott vegyületek képlete

belső része pedig hidrofób [1, 4, 7, 9].

Kísérleteink során az Antibiotice Iași gyógyszergyár jóvoltából beszerzett 4 penicillin származékot tanulmányoztuk: nátrium-benzilpenicillin, amoxicillin-trihidrát, nátrium-oxacillin monohidrát és ampicillin-trihidrát. Mivel a vizsgált vegyületek vízben oldódnak, minden antibiotikumból, illetve ezek keverékéből 1 g / L töménységű törzsoldatokat készítettünk, melyeket a mérések között hideg helyen tároltunk.

Reagensként analitikai tisztaságú bórsavat, nátrium-tetraborátot (NaTB), nátrium-dodecil-szulfátot (NaDDS) és 0,1M-os nátrium hidroxid oldatot használtunk.

Méréseinket az Agilent 6100 CE (Hewlett Packard) készüléken végeztük; 50 cm hosszúságú, 50 µm átmérőjű kapillárist alkalmaztunk. A detektálás UV-abszorbancia méréssel történt 210 és 220 nm-es hullámhosszon. Az elektroforegramok rögzítésére, feldolgozására és az adatok kiértékelésére az Agilent Chemstation adatfeldolgozó számítógépes programot alkalmaztuk [10].

A tompító oldat kémhatásának mérése Inolab Terminal 740 pH-méterrel történt.

A minták injektálása hidrodinamikus módszerrel történt, a kapilláris anód felőli végénél, 5 másodpercig alkalmazott 30 mBar nyomással, a katód a detektor oldalán helyezkedett el; a kapilláris feszültsége 25 kV, hőmérséklete 25°C a mérések során. A szennyeződések eltávolítására minden mérési sorozat előtt a kapillárist 0,1 M-os NaOH oldattal mostuk 15 percig; az egyes mérések előtt pedig az alkalmazott tompító oldattal 5 percig.

Eredmények

Egy gyors és hatékony elválasztási módszer kidolgozása érdekében, különböző összetételű és töménységű tompító

oldatokkal próbálkoztunk. Erre a célra változó töménységű nátrium-tetraborát oldatokat, illetve nátrium-tetraborát és nátrium-dodecil-szulfát tartalmú oldatokat alkalmaztunk.

Azt tapasztaltuk, hogy különböző töménységű (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) nátrium-tetraborát tompító oldatokat használva, a 4 béta-laktám antibiotikum elválasztása kis hatékonyságú. A vizsgált vegyületek közül az ampicillin és az amoxicillin két esetben együtt vándorol, elválasztásuk nagyon gyenge. A tompító oldat töménységének növekedésével egyidőben a migrációs idők is meghosszabodnak.

Az elválasztás hatékonyságának növelésére felületaktív anyag alkalmazásával próbálkoztunk. Méréseink során állandó nátrium-tetraborát koncentráció mellett (25 mM), a nátrium-dodecil-szulfát koncentrációját változtattuk (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM). Megfigyeltük, hogy a felületaktív anyag koncentrációjának növekedése elősegíti a 4 vizsgált antibiotikum elválasztását. A legjobb eredményeket a 25 mM nátrium-tetraborátot és 100 mM nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó tompító oldat jelenlétében nyertük. A különböző összetételű tompító oldatok jelenlétében mért migrációs időket a 1. táblázatba foglaltuk.

Módszeroptimalizálás céljából az előző lépésben kiválasztott tompító oldat (25 mM nátrium-tetraborát és 100 mM nátrium-dodecil-szulfát tartalmú oldat) jelenlétében, a kapilláris feszültségét és hőmérsékletét, illetve az injektálási nyomást és ennek időtartamát módosítottuk. Állandó hőmérséklet mellett, a kapilláris feszültségének növelése a migrációs idők csökkenéséhez vezetett. Állandó feszültség mellett, a hőmérséklet növelése hasonló módon befolyásolja a migrációs időket. Az injektálási körülmények változtatásának (időtartam, nyomás) befolyása kismértékű. Eredményeinket a 2. táblázatba foglaltuk.

1. táblázat. Különböző összetételű tompító oldatok jelenlétében mért migrációs idők

Tompító oldat	Migrációs idő (perc)			
	Amoxicillin	Ampicillin	Benzilpenicillin	Oxacillin
NaTB 25 mM	2,97	2,97	3,04	3,12
NaTB 50 mM	3,72	3,77	3,85	4,09
NaTB 75 mM	4,01	4,07	4,16	4,52
NaTB 100 mM	3,38	3,38	3,52	3,52
NaTB 25 mM + DDS 25 mM	3,38	3,38	3,52	3,52
NaTB 25 mM + DDS 50 mM	3,50	3,59	3,64	3,75
NaTB 25 mM + DDS 75 mM	3,68	3,68	3,86	4,11
NaTB 25 mM + DDS 100 mM	3,41	3,85	4,36	5,12

A tompító oldat pH-jának befolyását az elválasztás hatékonyságára a migrációs idők változásával követtük. A méréseket pH=7-10,5 -ös tartományban végeztük, a tompító oldat kémhatását 1M-os bórsav oldat illetve 0,1M NaOH oldat hozzáadásával módosítottuk. A migrációs idők változása a pH függvényében a **2. ábrán** látható.

A reprodukibilitás tanulmányozására egy mérési sorozatot készítettünk; a migrációs időket, a csúcsok magasságát és a csúcs alatti terület értékeit követtük. Középarányost és standard deviációt számoltunk. Az így mért paraméterek közeli értékeket vettek fel, amint a standard deviáció 1% alatti értéke is igazolja.

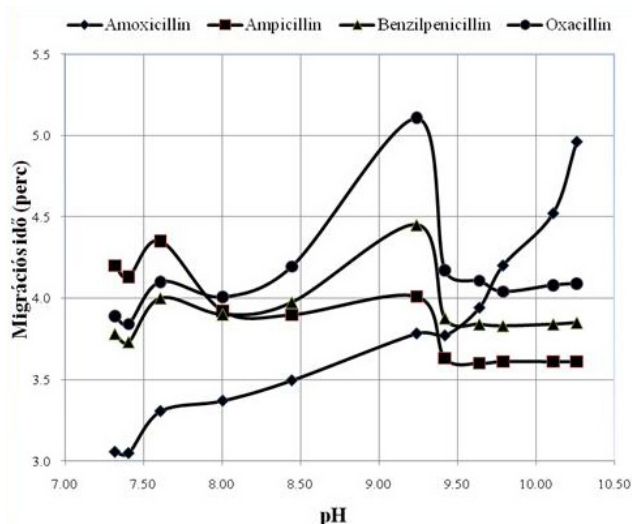
Megbeszélés

A penicillin származékok vizsgálatára az Európai Gyógyszerkönyv [11] a magas nyomású folyadék kromatográfiát (HPLC) írja elő; a béta-laktám antibiotikumokkal kapcsolatos szakirodalmi források is legtöbbször erre a módszerre hivatkoznak. Az analitikai módszer kiválasztásánál a kapilláris elektroforézis mellett döntöttünk, előnyei miatt: kis minta méretet igényel, a felhasznált reagensek mennyisége jóval kisebb mint a HPLC esetében és alkalmas a fel nem dolgozott biológiai minták mérésére is.

Perez és társai [2] illetve Nozal és társai [8] is kapilláris elektroforézissel választották el a penicillin származékokat oldataikból, nátrium-dodecil-szulfát tartalmú tompító

2. táblázat. A feszültség, illetve a hőmérséklet változtatása nyomán mért migrációs idők

Feszültség (kV)	Hőmérséklet (°C)	Injektálási nyomás (mBar)	Injektálás időtartama (sec)	Migrációs idő (perc)			
				Amoxicillin	Ampicillin	Benzilpenicillin	Oxacillin
20	20	10	5	5,49	6,40	7,25	8,82
25	20	10	5	3,76	4,25	4,84	5,79
30	20	10	5	2,54	2,77	3,16	3,67
20	25	10	5	5,01	5,68	6,46	7,74
25	25	10	5	3,43	3,78	4,30	5,05
30	25	10	5	2,31	2,47	2,81	3,21
20	30	10	5	4,61	5,22	5,96	7,11
25	30	10	5	3,16	3,50	4,00	4,67
30	30	10	5	2,30	2,46	2,80	3,19
25	25	10	5	3,43	3,78	4,30	5,05
25	25	20	5	3,41	3,82	4,35	5,13
25	25	30	5	3,39	3,81	4,33	5,09
25	25	10	10	3,38	3,81	4,32	5,10
25	25	10	15	3,37	3,80	4,31	5,08



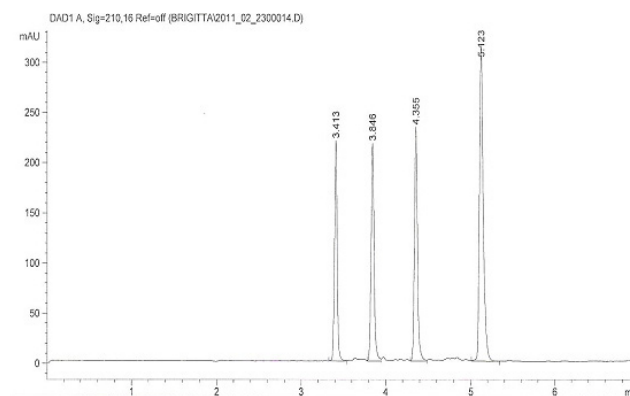
2. ábra. A migrációs idők változása a pH függvényében

oldatok jelenlétében, viszont az elválasztáshoz szükséges idő jóval hosszabb, 10 perc felett van mindkét módszer esetében. Az általunk javasolt módszerben nagyobb feszültséget alkalmazunk (25 kV), amely lehetővé teszi a tanulmányozott vegyületek gyors elválasztását, anélkül, hogy az elválasztás hatékonysága csökkenne.

Következtetések

A leghatékonyabb elválasztást a 25mM nátrium-tetraborát és 100 mM nátrium-dodecil-szulfát tartalmú tompító oldat jelenlétében tapasztaltuk (ld. 3-es számú ábra). A 4 penicillin származék a következő sorrendben vándorol: amoxicillin, ampicillin, benzilpenicillin és oxacillin. A kísérleti körülmények befolyásának tanulmányozása céljából az alkalmazott feszültséget, a kapilláris hőmérsékletét, az injektálási nyomást és ennek időtartamát változtattuk, illetve az eredeti tompító oldat pH-ját módosítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy úgy a feszültség, mint a hőmérséklet növekedése a migrációs idők csökkenéséhez vezet; míg az injektálási nyomás és időtartam csak kismértékben befolyásolja a migrációs időket.

A tompító oldat kémhatása befolyásolja a migrációs sorrendet. Az amoxicillin 9,5-ös pH érték felett eltérő módon viselkedik, a migrációs idő növekedésével, ami feltehetőleg a molekulában levő fenolos -OH csoport által, kettős só képződésével állhat összefüggésben. pH=8 alatti tartományban az elválasztás hatékonysága csökken. A módszer reprodukibilitásának kiértékelésére készített mérési sorozatnál a migrációs időket, a csúcs magasságát és a csúcs alatti területet követtük. Az így mért paraméterek közeli értékeket mutattak, ezért a módszert megbízhatónak tekinthetjük.



3. ábra. A penicillin származékok elválasztásánál nyert elektroforeogram

Irodalom

- Altria D. K. - *Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig / Wiesbaden, 1998.
- Bailon Perez M.I. et al. - *Analysis of different beta-lactams antibiotics in pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic capillary chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43, 746-752.
- Bojită M. et al. - *Analiza și controlul medicamentelor*; vol. 2. Editura Intelcredo, Deva, 2003.
- Gáspár A. - *Kapilláris zónaelektroforézis*, Debreceni Egyetem, Debrecen, 2000.
- Kékedy L. et al. - *Műszeres analitikai kémia, válogatott fejezetek*, Erdélyi Múzeum Egyesület Kiadása, Kolozsvár, 2003.
- Kümmerer K. - *Pharmaceuticals in the Environment, sources, fate, effects and risks*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
- Muntean L.D. et al. - *Controlul medicamentelor – Metode spectrale, cromatografice și electroforetice de analiză*, Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj Napoca, 2004.
- Nozal L. et al. - *Development of a screening method for analytical control of antibiotic residues by micellar electrokinetic capillary electrophoresis*; Analytica Chimica Acta, 2004, 523, 21-28.
- Szőkő É. et al. - *A kapilláris elektroforézis alkalmazása a gyógyszeranalitikában; A kapilláris elektroforézis módszerének bemutatása*; Gyógyszerészet, 1994, 38, 707-710.
- ***Agilent Capillary Electrophoresis System, User's guide, Agilent Technologies 2000, Germany.
- ***European Pharmacopoeia, 7-th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2010.