

УДК 543.544.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЕНДРОНАТ-ИОНА И РЯДА НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Е.П. Свидрицкий, М.Ш. Цзян, В.И. Ильин*, Д.И. Дыньков, А.В. Пирогов, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: shpigun@analyt.chem.msu.ru)

Предложен способ одновременного определения анионов алендроната, хлорида, фосфита, фосфата и метилсульфоната. Эти ионы являются основными примесями в синтетической алендроновой кислоте, и их содержание необходимо контролировать при производстве лекарственных препаратов из алендроновой кислоты. Разработанный способ позволяет определять все указанные ионы за 4 мин. Высокая эффективность (200–500 тыс. теор. тарелок) позволяет проводить определение ионов даже на фоне высокого содержания одного из компонентов. Пределы обнаружения составили 0,4–2,3 мг/л. Разработанный способ успешно использован для анализа регенерированной из реакционной смеси метансульфоновой кислоты.

Ключевые слова: алендроновая кислота, ионен, электрофорез.

Производные бифосфонатов, к которым относится и алендроновая кислота, проявляют крайне высокую биологическую активность. В основном они влияют на метаболизм кальция, способствуют его значительному удерживанию в костной ткани [1]. Поэтому в последние годы бифосфонаты применяют в медицине для лечения костных заболеваний, в том числе и саркомы. Получение высокочистой субстанции алендроновой кислоты накладывает дополнительные ограничения на способы синтеза этого вещества. Основная схема синтеза предусматривает реакцию γ -аминомасляной кислоты с трихлоридом фосфора и очень мягким окисляющим агентом. Часто в качестве мягкого окислителя и одновременно в качестве растворителя используют метансульфоновую кислоту [2]. В результате продукт синтеза имеет примесные анионные загрязнители, такие, как хлорид-, фосфит-, фосфат- и метилсульфонат-ионы. Эти же ионы всегда сопутствуют алендронат-иону (Ale) в реакционной смеси. Поэтому помимо установления чистоты синтезированной алендроновой кислоты важно определять содержание Ale и сопутствующих ионов в реакционной массе на всех стадиях синтеза.

В литературе описаны методы определения бифосфонатов, а также основных сопутствующих ионов, таких, как хлорид-, фосфат-, фосфит- и метилсульфонат-ионы методами капиллярного электрофореза (КЭ), газовой хроматографии, ионной хроматографии (ИХ) и

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В работе [3] описано определение алендроната в медицинских препаратах методом КЭ. Авторы использовали прямое спектрофотометрическое детектирование. Разделение компонентов проводили в фоновом электролите, содержащем 1,6 мМ HNO_3 и 2 мМ CuSO_4 . Добавка сульфата меди обеспечивала образование (*on-line*) окрашенного комплекса Ale с медью. Показано, что метод капиллярного электрофореза позволяет достичь более высокой эффективности (47 тыс. теор. тарелок) по сравнению с ИХ и ВЭЖХ (0,4 и 1,5 тыс. теор. тарелок соответственно). Для капиллярного электрофореза не требуется дополнительной пробоподготовки, которая в случае ВЭЖХ занимает 4 ч.

В работе [4] предложено определение Ale и памидроната в моче и в водном растворе методами изотахофореза и КЭ с использованием изотахофореза для предварительного разделения (*on-line*) и концентрирования.

В работе [5] описано разделение ибандронат-иона и двух сопутствующих примесей, фосфита и фосфата. Ибандронат-ион по структуре также относится к бифосфонатам, но обладает более высокой электрофоретической подвижностью, чем Ale. Разделение осуществляли методом КЭ с обращенной полярностью. В качестве фонового электролита использовали

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва.

10 мМ хромат натрия и 5 мМ ацетил триметиламмоний бромид, рН 10,0. Однако для решения таких задач более оправданным является применение полимеров.

Покрытие стенок капилляра катионным полимером приводит к обращению электроосмотического потока (ЭОП), которое достигается уже при концентрациях полимера в растворе 0,002–0,05% [6, 7]. ЭОП в данном случае отличается существенно большей устойчивостью, чем в немодифицированном капилляре, и практически не зависит от величины рН [8]. Преимуществами использования полимерных покрытий являются: устойчивость покрытия, увеличение абсолютной величины ЭОП, снижение времени анализа, высокая стабильность базовой линии, обращение ЭОП без использования ПАВ [9, 10]. В результате снижается токовая нагрузка на капилляр, упрощается промывка капилляра между анализами, отпадает необходимость в сильной дегазации рабочего электролита и обеспечивается более воспроизводимая величина ЭОП.

Полибрен™ (3,6-ионен) – наиболее популярный поликатион, использующийся в КЭ [11, 12]. Другие ионены пока не получили распространения в качестве модификаторов в КЭ. Однако их применение является перспективным, так как в этом классе полимеров при незначительном изменении структуры молекул (удлинении углеводородных цепочек) значительно меняются параметры полярности и гидрофобности, а также конформация молекул.

Данная работа посвящена поиску условий оптимального совместного разделения Ас, метилсульфонат-иона и таких неорганических ионов, как хлорид, фосфит и фосфат, с использованием катионного полимера в фоновом электролите. Это необходимо для контроля производства алендроновой кислоты и контроля качества лекарственных средств на ее основе.

Экспериментальная часть

Оборудование, материалы и техника эксперимента

В работе использовали системы капиллярного электрофореза «Капель 103Р» («Люмэкс», Россия) со спектрофотометрическим детектором и «Капель 105М» («Люмэкс», Россия), укомплектованную диодно-матричным детектором. Для сбора и обработки данных использовали программы «Мультихром 1.4» («Амперсенд», Россия) и «Эльфран» («Люмэкс», Россия). Для разделения использовали кварцевые капилляры («Phoenix», США) внутренним диаметром 50 мкм длиной 48,5 см (40 см эффективная длина) и

60 см (50 см эффективная длина). Перед использованием новый капилляр обрабатывали последовательно 1 М и 0,1 М растворами NaOH (по 60 мин каждым) и водой. Далее капилляры модифицировали в течение 4 ч 0,01%-м раствором ионена в хроматном буферном растворе. Ежедневно перед использованием капилляр промывали водой (30 мин) и рабочим электролитом (30 мин) для уравнивания капилляра. Кондиционирование капилляра между последовательными анализами проводили по следующей схеме: вода (5 мин), рабочий электролит (5 мин), затем капилляр на 5 мин оставляли в покое. Ввод пробы осуществляли давлением 50 мБар в течение 10 с. В конце рабочего дня капилляр промывали водой (30 мин). Детектирование осуществляли одновременно при 254 нм. Температуру капилляра поддерживали на уровне 25°C. Рабочее напряжение составляло 20–25 кВ, полярность отрицательная. В работе использовали деионизатор воды «D-301» («Аквилон», Россия). Для гомогенизации растворов применяли ультразвуковую баню («Canpur», Россия). Для взвешивания точных навесок использовали весы аналитические электронные «Explorer» («Orhaus», США). Точные объемы отмеряли с помощью микродозаторов жидкости («Labmate», Польша) вместимостью 2–20; 10–100; 100–1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более ±5%. Для определения рН использовали рН-метр лабораторный с основной погрешностью измерения не более ±0,05 единиц рН («Mettler» Toledo, Швейцария).

Реактивы и растворители

Для приготовления рабочих буферных растворов использовали: оксид хрома (VI) «ч.д.а.» («Реахим», Россия), гидроксид натрия 50%-й раствор («Fluka», США), 2,10-ионен, 3,4-ионен, 3,Х-ионен (X = $n\text{-C}_6\text{H}_4(\text{CH}_2)_2$) (все синтезированы на кафедре аналитической химии МГУ), 3,6-ионен (98%) («Sigma», США). Для приготовления стандартных растворов были использованы: хлорид натрия («х.ч.»), дигидрофосфат натрия («ч.д.а.»), фосфористая кислота («х.ч.»), метансульфоновая кислота («х.ч.»), алендронат натрия (98%) («ДИОД», Россия).

Подготовка объектов к анализу

В качестве объекта анализа использовали регенерированную из реакционной смеси синтеза алендроновой кислоты (по схеме предприятия «ДИОД», Россия) метансульфоновою кислоту. Для определения содержания большинства ионов образец регене-

рата массой 1 г разбавляли деионизованной водой в мерной колбе на 100 мл. Для определения содержания метилсульфонат-иона 1 мл полученного раствора дополнительно разбавляли в 100 раз водой (общее разбавление 1 г кислоты на 10 л воды). Затем пробу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и вводили в прибор для КЭ.

Результаты и их обсуждение

Выбор значения pH рабочего буферного раствора

При $pH < 7,7$ хромат-ион CrO_4^{2-} , входящий в состав фонового электролита, переходит в форму дихромат-иона $Cr_2O_7^{2-}$, что, вследствие образования нерастворимого комплекса с ионеном, приводит к помутнению рабочего электролита, а также закупорке капилляра. При высоких значениях pH (10–12) щелочной фоновый электролит постепенно смывает ионен с поверхности капилляра и способствует увеличению токовой нагрузки на капилляр, ухудшая таким образом воспроизводимость результатов. На основании вышеизложенного pH всех рабочих электролитов устанавливали в диапазоне 7,8–10,5.

Подбор оптимального полимера-модификатора

Первоначально в качестве модификаторов поверхности капилляра мы выбрали ряд ионенов с различной полярностью и гидрофобностью молекул: 2,4-; 3,6-; 2,10- и 3,Х-ионены. Для изучения разделяющей способности этих полимеров была выбрана смесь

ионов: хлорид, фосфит, фосфат, метилсульфонат и алендронат. Разделить указанные ионы удалось только при использовании 3,6- и 3,Х-ионенов в качестве модификаторов. Значения R_s пар ионов, полученные при использовании разных модификаторов, представлены в табл. 1.

На рис. 1 показано, что минимальных пределов обнаружения позволяет достичь использование 3,6-ионена. Кроме того, использование 3,6-ионена не приводит к значительному дрейфу базовой линии. Таким образом, 3,6-ионен является наиболее оптимальным полимером-модификатором из исследуемой группы. Время анализа достаточно мало – около 4 мин (рис. 2).

Концентрация модификатора во всех случаях составляла 1 мМ, такое содержание является достаточным для обеспечения стабильного ЭОП [6, 7]. Несмотря на то, что 3,6-ионен оказался наиболее подходящим модификатором, обеспечивающим необходимую вязкость среды и оптимальную токовую нагрузку на капилляр, данные условия разделения ионов еще не являются оптимальными для анализа объектов ввиду низкой эффективности разделения фосфат-иона, недостаточно высокого разрешения пиков и сравнительно высоких пределов обнаружения. Необходима дальнейшая оптимизация условий разделения ионов.

Для улучшения селективности разделения общая длина капилляра была увеличена с 48,5 до 60 см, а эффективная длина – с 40 до 50 см.

Таблица 1

Влияние модификаторов на селективность разделения анионов

Модификатор	Разрешение пар ионов, R_s			
	$Cl^-/H_2PO_3^-$	$H_2PO_3^-/H_2PO_4^-$	$H_2PO_4^-/CH_3SO_3^-$	$CH_3SO_3^-/Ale$
3,6-Ионен	8,9	5,6	1,4	1,9
2,10-Ионен	8,7	н/р	5,9	н/р
3,Х-Ионен	6,9	4,7	1,7	2,0
3,4-Ионен	7,5	6,3	*	4,2

*Пики не разрешены.

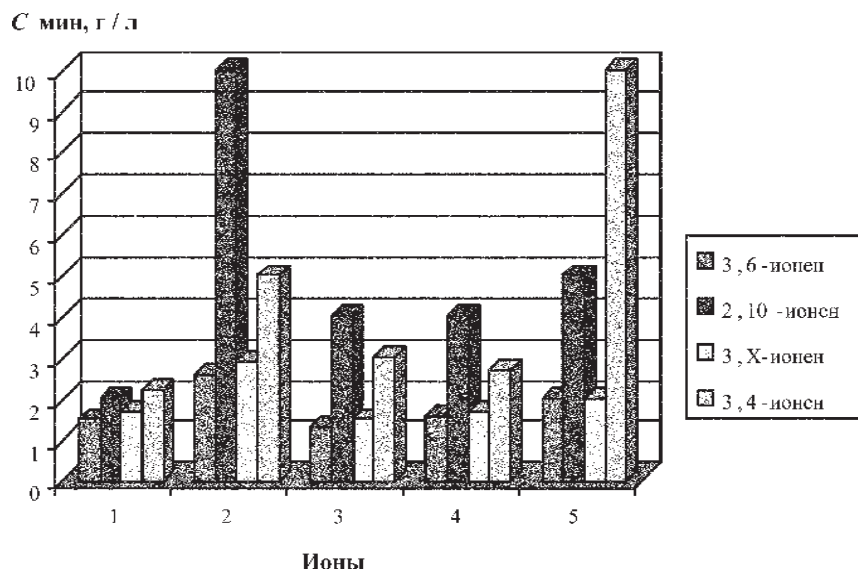


Рис. 1. Пределы обнаружения для определяемых анионов (1 – хлорид, 2 – фосфат, 3 – фосфит, 4 – метилсульфонат, 5 – алендронат) при использовании разных полимеров для динамической модификации поверхности капилляра. Напряжение 20 кВ, температура 20°C; фоновый электролит – 5 мМ хромат натрия, 1 мМ ионен; рН 7,9. Ввод пробы гидродинамический (50 мбар в течение 10 с)

Выбор концентрации хромат-иона в буферном растворе

Концентрация хромат-иона влияет на чувствительность метода и эффективность разделения. При косвенном детектировании увеличение концентрации

хромата приводит к увеличению уровня шума. Однако при недостаточной буферной емкости удовлетворительное разделение оказывается невозможным. В табл. 2 показана зависимость пределов обнаружения от концентрации хромат-ионов. На рис. 3 пока-

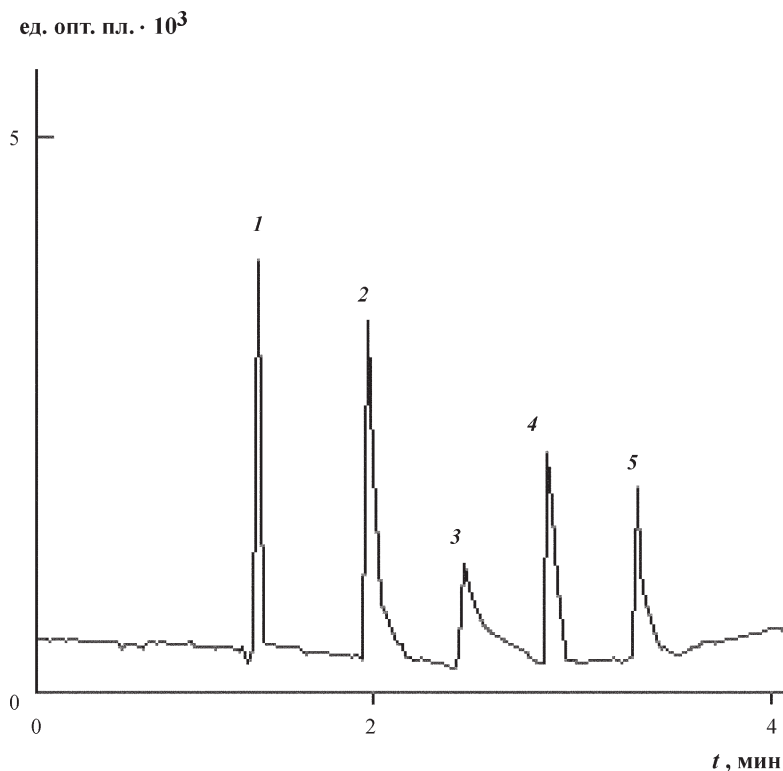


Рис. 2. Электрофореграмма модельной смеси ионов. Полимер 3,6-ионен. Пики: 1 – хлорид, 2 – фосфит, 3 – фосфат, 4 – метилсульфонат, 5 – алендронат. Концентрации всех ионов 20 мг/л. Условия представлены в подписи к рис. 1

зана диаграмма зависимости эффективности разделения (N) от молярности буферного раствора. Оптимальная эффективность для всех ионов достигается лишь при 50 мМ хромат-иона. Большие концентрации не оправданы ввиду резкого повышения уровня шума и снижения величины ЭОП.

Выбор и концентрация органической добавки

В КЭ добавка небольших количеств органического растворителя в качестве модификатора часто позволяет улучшить процесс разделения за счет изменения вязкости, z -потенциала стенок капилляра и других

факторов. Для изучения этого явления мы использовали ацетонитрил, этанол и 2-пропанол в объемных концентрациях 0,1; 1 и 5% соответственно. В табл. 3 показано влияние органической добавки в разных концентрациях на пределы обнаружения определяемых ионов. С ростом концентрации органического растворителя до 1% наблюдается рост эффективности для большинства ионов. В случае алендронат-иона происходит обратный эффект. Влияние органической добавки на селективность разделения находится в пределах погрешности измерения. Применение органического модификатора позволяет значительно улучшить

Таблица 2

Пределы обнаружения определяемых компонентов при различной концентрации бихромат-иона в фоновом электролите. Полимер 3,6-ионен. Условия представлены в подписи к рис. 1

Концентрация бихромат-иона, мМ	Пределы обнаружения, мг/л					
	5	10	20	30	40	50
Ион						
Cl ⁻	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
PO ₃ ³⁻	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
PO ₄ ³⁻	0,8	0,4	0,3	0,3	0,5	0,5
SO ₃ H ⁻	*	*	*	0,3	0,2	0,5
Ale	н/в	2,0	13,9	2,7	6,0	1,6

* Вычисление предела обнаружения невозможно.

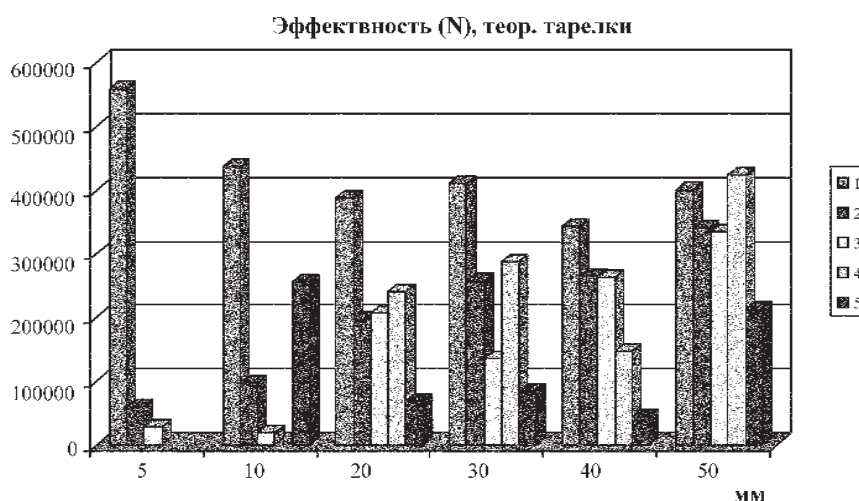


Рис. 3. Эффективность разделения ионов (1 – хлорид, 2 – фосфит, 3 – фосфат, 4 – метилсульфонат, 5 – алендронат) при разной концентрации хромат-иона в фоновом электролите. Полимер 3,6-ионен. Условия представлены в подписи к рис. 1

Т а б л и ц а 3

Влияние вида и концентрации органического модификатора на основные характеристики разделения

Вид добавки		Ацетонитрил			Этанол			Изопропанол		
Ион		N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л
Cl	0%	412000	1,40	0,2	412000	1,40	0,2	412000	1,40	0,2
HPO ₃		258000	1,09	0,3	258000	1,09	0,3	258000	1,09	0,3
PO ₄		136000	1,06	0,5	136000	1,06	0,5	136000	1,06	0,5
MeSO ₃		288000	1,34	0,5	288000	1,34	0,5	288000	1,34	0,5
Alc		84000		3,2	84000		3,2	84000		3,2
Ион		N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л
Cl	0,1%	492000	1,39	0,4	351000	1,39	0,3	429000	1,40	0,4
HPO ₃		538000	1,09	0,3	260000	1,09	0,3	277000	1,09	0,3
PO ₄		337000	1,05	0,5	143000	1,05	0,5	162000	1,06	0,4
MeSO ₃		374000	1,34	0,6	247000	1,34	0,5	372000	1,38	0,5
Alc		168000		2,3	35000		2,9	63000		3,9
Ион		N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л
Cl	1%	501000	1,39	0,4	496000	1,40	0,3	345000	1,40	0,4
HPO ₃		432000	1,09	0,3	269000	1,09	0,3	311000	1,09	0,3
PO ₄		287000	1,05	0,5	192000	1,05	0,5	141000	1,05	0,4
MeSO ₃		316000	1,36	0,5	299000	1,34	0,5	184000	1,35	0,5
Alc		78000		2,9	70000		2,6	73000		3,1
Ион		N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л
Cl	5%	407000	1,39	0,4	453000	1,41	0,4	477000	1,41	0,4
HPO ₃		476000	1,09	0,3	288000	1,09	0,3	261000	1,09	0,3
PO ₄		378000	1,04	0,5	244000	1,03	0,5	158000	1,04	0,4
MeSO ₃		342000	1,37	0,4	320000	1,39	0,5	295000	1,40	0,5
Alc		64000		2,8	86000		3,6	86000		4,0
Ион		N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л	N, теор. т.	α	ПО, мг/л

Примечание. ПО – предел обнаружения.

разрешение системного пика и пиков определяемых компонентов. Данный пик возникает из-за присутствия в растворе бромид-иона, являющегося противоионом для используемых ионенов. Пример мешающего влияния системного пика бромида показан на рис. 4. При использовании в качестве органического модификатора

ацетонитрила в концентрации 0,1% мешающее влияние системного пика почти полностью нивелируется. Помимо этого при использовании такой добавки значения эффективности разделения для всех ионов, кроме Alc, возрастают. На рис. 5 представлен пример электрофореграммы смеси ионов в оптимальных условиях.

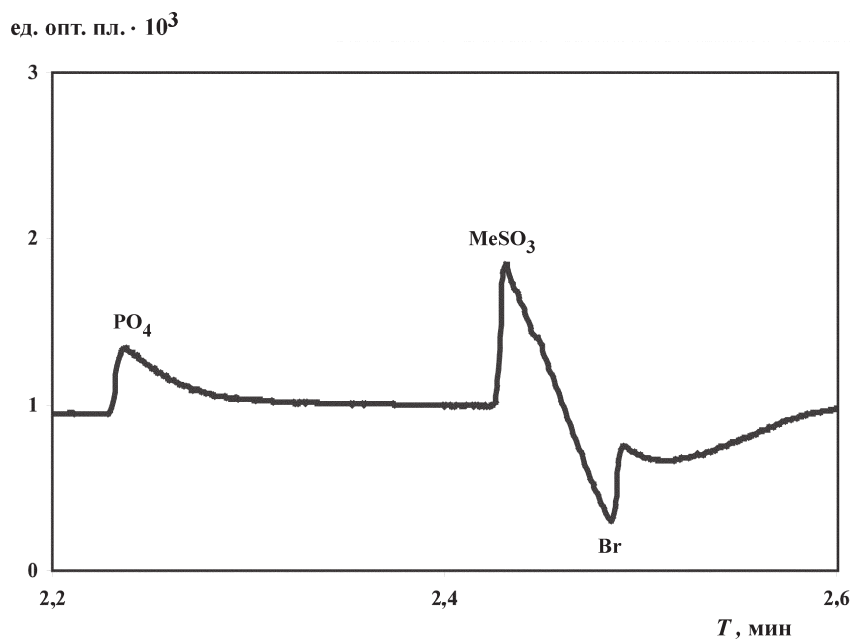


Рис. 4. Мешающее влияние системного пика бромид-иона. Полимер 3,6-ионен. Условия представлены в подписи к рис. 1

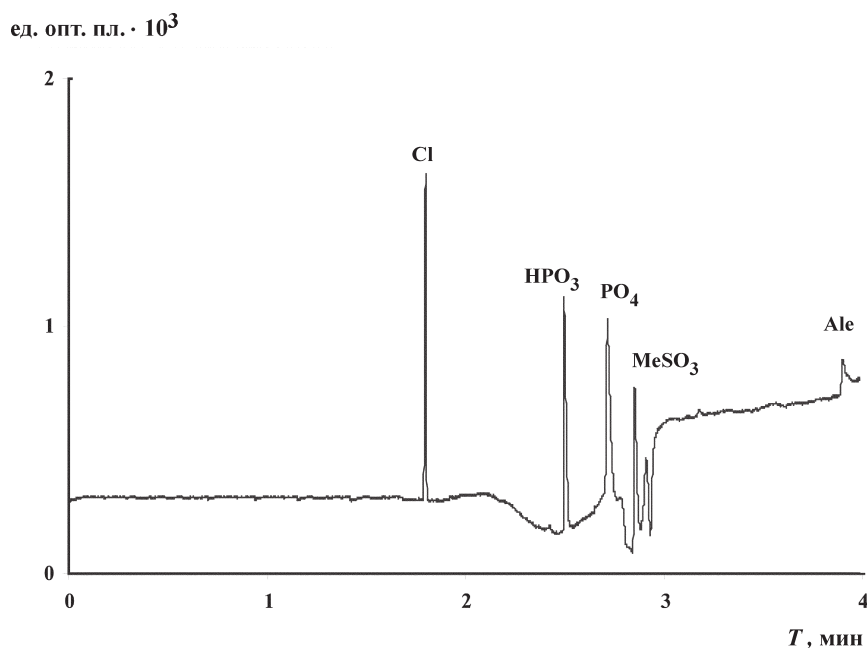


Рис. 5. Разделение смеси ионов в оптимальных условиях. Напряжение 25 кВ, температура 25°C. Фоновый электролит – 50 мМ хромат натрия, 1 мМ 3,6-ионен, 0,1% ацетонитрил; pH 9,0. Ввод пробы гидродинамический (50 мбар в течение 10 с); концентрация ионов 20 мг/л

Анализ объекта

В качестве объекта анализа использовали образец метансульфоновой кислоты, полученный в результате регенерации реакционной массы при производстве алендроновой кислоты. Данные образцы подлежали возвращению назад, в производство алендроновой кис-

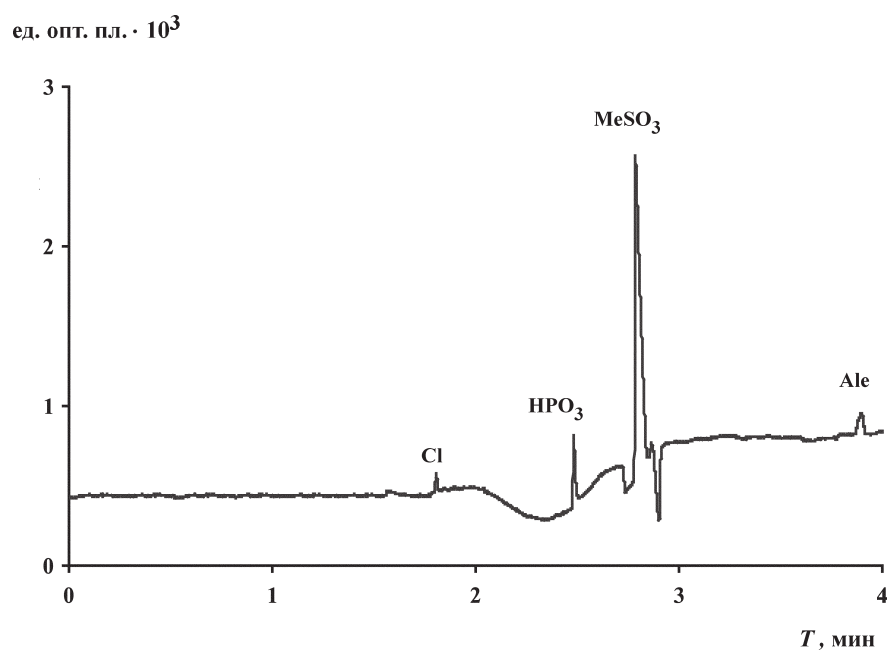
лоты, и поэтому необходимо было установить точное содержание в них как самого метилсульфонат-иона, так и сопутствующих примесей: хлорида, фосфита, фосфата и Ale. Для проверки правильности анализа в качестве независимого метода применяли ионную хроматографию (ИХ). Содержание компонентов и основ-

Таблица 4

Влияние вида и концентрации органического модификатора на основные характеристики разделения ($n = 3, P = 0,95$)

Параметр	Ион				
	хлорид	фосфит	фосфат	метилсульфонат	Alc
T_M , мин	1,8	2,5	2,7	2,9	3,9
Уравнение градуировочного графика	$S = 0,9156C + 1,1093$	$S = 1,0684C + 1,648$	$S = 0,8898C + 4,1777$	$S = 0,8269C + 2,164$	$S = 0,3311C - 0,4694$
R^2	0,9999	0,9959	0,9937	0,9869	0,9999
Найдено, мг/г	$0,3 \pm 0,1$	39 ± 1	*	790 ± 5	32 ± 2
Найдено методом ИХ, мг/г	$0,3 \pm 0,1$	41 ± 2	$0,12 \pm 0,03$	788 ± 22	28 ± 6

* Не обнаружено.

Рис. 6. Электрофореграмма образца регенерированной метансульфонової кислоты, разбавленного в 10^3 раз. Условия представлены в подписи к рис. 5

ные характеристики предложенного способа анализа представлены в табл. 4. Определить содержание фосфата в образце не удалось, так как содержание его было ниже предела обнаружения. Тем не менее ИХ позволяет определить содержание фосфата. Некоторый недостаток чувствительности не является для разработанного способа критичным и компенси-

руется быстротой и удобством проведения анализа без пробоподготовки. На рис. 6 представлена электрофореграмма образца метансульфонової кислоты, полученная при разбавлении в 10^3 раз.

В заключение можно сказать, что разработанный способ позволил реализовать задачи по определению примесей в синтетической алендроновой кислоте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Francis R.M. // Curr. Trer. Res. 1997. **58**. P. 657.
2. Process for recovery and recycle of methanesulfonic acid and phosphorous acid. United States Patent 5589691.
3. Fubler R., Schafer H., Seubert A. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. **372**. P. 705.
4. Kitahara K., Hirai Y., Toshihama I., Hanada T., Nagashima K., Arai S., Yamashita Y. // Anal.Sci. 2001. **17**. P. 1225.
5. Li J., Fritz J.S. // J. Chromatogr. A. 1998. **793**. N 2. P. 231.
6. Yu B., Cong H., Liu H., Li Yu., Liu F. // Electrophoresis. 2005. **28**. N 17. P. 2390.
7. Timerbaev A.R. // Electrophoresis. 2002. **23**. N 22-23. P. 3884.
8. Stathakis C., Cassidy R.M // Anal. Chem. 1994. **66**. N 13. P. 2110.
9. Fabrea H., Blanchina M.D., Bosc N. // Anal. Chim. Acta. 1999. **381**. P. 29.
10. Zemann A.J. // J.Chromatogr.A. 1997. **787**. N 1-2. P. 243.
11. Kopecky K., Tesarova E., Pirogov A., Gas B. // J. Sep. Science 2002. **25**. N 15-17. P. 1027.
12. Пирогов А.В., Юрьев А.В., Шпигун О.А. // ЖАХ. 2003. **58**. № 8. С. 876.

Поступила в редакцию 22.04.08

DETERMINATION OF ALENDRONATE AND INORGANIC ANIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS**E.P. Svidritskiy, M.Sh. Jiang, V.I. Il'in, D.I. Dynkov, A.V. Pirogov, O.A. Shpigun***(Division of Analytical Chemistry)*

The method of the simultaneous and selective determination of alendronate, chloride, phosphite, phosphate and methylsulfonate was developed. These ions are the major contaminants in the synthetic alendronic acid. Therefore, it is important to control the amounts of these impurities because alendronic acid is a component of different pills and drugs. The method proposed in this paper allows the separation of all ions for 4 minutes. It is possible to determine low concentrations of ions at high concentrations of other listed ions due to excellent performance of the separation (200 – 500 thousands of theoretical plates). Limits of the detection are 0.4 – 2.3 ppm. The method was successfully used for the analysis of regenerated methanesulfonic acid.

Key words: *Alendronate, ionene, electrophoresis.*

Сведения об авторах: Свидрицкий Егор Петрович – аспирант химического факультета МГУ (e_svidritskiy@mail.ru); Цзян Мин Шеен – аспирант химического факультета МГУ (msjiang@gmail.com); Ильин Вадим Игоревич – аспирант Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (vadimilin@yandex.ru); Пирогов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (pirogov@analyt.chem.msu.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН (shpigun@analyt.chem.msu.ru).