

STANOVENÍ NANOMOLÁRNÍCH KONCENTRACÍ ANTHRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU S UV DETEKČÍ*

ALEŠ GAVENDA^a, JURAJ ŠEVČÍK^{a,b}
a JITKA PSOTOVÁ^c

^aKatedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, e-mail: gavenda@prfnw.upol.cz,

^bCentrum analytické chemie molekulárních struktur, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 26 Olomouc, ^cÚstav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Došlo dne 10.IV.2000

Klíčová slova: anthracyklinová antibiotika, kapilární elektroforéza, UV detekce

Úvod

Vysokoučinná kapilární elektroforéza (HPCE) je metoda, kterou lze separovat látky s velice podobnou strukturou ve velmi krátkém čase. Velkou výhodou kapilární elektroforézy je vysoká účinnost separace a velmi malé objemy vzorku. S výhodou lze tuto metodu využít pro analýzy vzorků s relativně bohatou maticí, tedy zejména biologických vzorků.

Jako každá analytická metoda má však i kapilární elektroforéza své nedostatky. Jedním z nich je relativně vysoká mez detekce při použití UV/VIS detektoru, který se v HPCE běžně využívá. Koncentrační citlivost se u těchto detektorů pohybuje řádově v jednotkách až desítkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Zvýšení citlivosti lze dosáhnout několika způsoby. Prvním z nich je použití jiného detektoru. Ideálním řešením se jeví využití detektoru s laserem indukovanou fluorescencí^{1,2} (LIF). Tento způsob detekce vyniká zejména svou vysokou citlivostí, která se pohybuje v řádu 10^{-9} mol.l^{-1} . Nevýhodou laserem indukované fluorescence je však relativně vysoká pořizovací cena, která brání jejímu většímu rozšíření.

Druhou možností zlepšení detekce je zakoncentrování analytu. Toho lze dosáhnout například zakoncentrováním na kolonce (SPE), avšak u tohoto způsobu prekoncentrace vzorku je nutné provést optimalizaci.

Výhodnější metodou zakoncentrování analytu je on-line prekoncentrace, což je vlastně zakoncentrování v průběhu vlastní analýzy. V odborné literatuře jsou podrobně popsány tři základní možnosti on-line prekoncentrace. První z nich je přechodná izotachoforéza^{3,4}, jejíž princip spočívá v zakoncentrování analytu v izotachoforetickém módu. V průběhu izotachoforetické prekoncentrace se analyty ze vzorku separují do úzkých zón a ionty, které byly původně v nízké koncentraci, jsou zakoncentrovány řádově na koncentraci vedoucího elek-

trolytu. Po zakoncentrování je koncový elektrolyt nahrazen vedoucím elektrolytem a analýza pokračuje v módu zónové elektroforézy.

Další popsanou on-line prekoncentrací je využití tzv. stacking efektu (z angl. stack – nahromadit)⁵⁻⁸. Je to velmi jednoduchá prekoncentrační technika velmi často používaná v kapilární elektroforéze. Tímto způsobem lze zakoncentrovat i větší objemy vzorku do úzké zóny.

Posledním z publikovaných on-line prekoncentračních postupů je využití tzv. sweeping efektu (z angl. zametání). Je to speciální prekoncentrační technika používaná v micelární elektrokinetické chromatografii^{9,10} (MEKC). Tento způsob se používá pro neutrální analyty s velkou afinitou k pseudostacionární fázi. Princip prekoncentrace, jak už je z názvu patrné, spočívá v prostupování pseudostacionární fáze dlouhou zónou vzorku, při kterém pseudostacionární fáze před sebou sbírá (zametá) neutrální analyty do úzké zóny, čímž dochází k žádanému zakoncentrování vzorku. Analyty v této úzké zóně se v dalším průběhu analýzy od sebe separují do zón, které jsou detegovány. Tento princip je velmi jednoduchý a účinný, avšak je použitelný pouze v micelární elektrokinetické chromatografii.

Anthracyklinová antibiotika

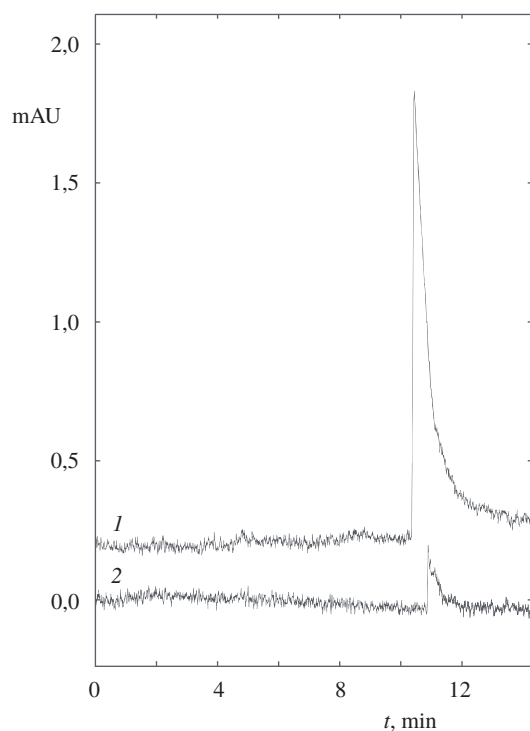
Tato skupina látek byla objevena a izolována v 60. letech z kultur plísně *Streptomyces peuceitius varietas Caesius*. Ve druhé polovině šedesátých let pak některé z nich našly uplatnění při léčbě onkologických onemocnění. Mezi nejvýznamnější z nich patří doxorubicin, daunorubicin a idarubicin. Tato léčiva mají řadu negativních účinků, zejména však mají za následek poškození srdečního svalu.

Zejména z důvodu kardiotoxicity je nutné monitorovat hladinu anthracyklinových antibiotik a jejich metabolitů v plazmě. Pro stanovení hladiny anthracyklinů se v minulosti používaly nejčastěji metody měření celkové fluorescence po extrakci okyseleným ethanolem^{11,12}, tenkovrstvá chromatografie s fluorescenční detekcí^{12,13} a radioimunoanalýza^{11,14} (³H). Od poloviny sedmdesátých let byly tyto metody postupně nahrazovány citlivějšími a selektivnějšími metodami. Obsah anthracyklinů v plazmě se pohybuje ve velmi malých koncentracích, řádově v desítkách až stovkách nanomolů na litr. Analýzu navíc znesnadňuje relativně složitá matrice reálných vzorků.

V dnešní době se pro stanovení hladiny anthracyklinů v plazmě používají výhradně separační metody a to vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí¹⁵⁻¹⁷ a vysokoúčinná kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí^{18,19} (LIF).

Cílem práce bylo navržení alternativního analytického postupu pro stanovení nízkých koncentrací anthracyklinových antibiotik v modelových vzorcích kapilární elektroforézou s UV/VIS detekcí, která by s úspěchem využila fyzikálně-chemických vlastností analytů a odstranila problémy, které se u používaných metod vysokoúčinné kapilární elektroforézy s použitím LIF detekce vyskytují. Jsou to především sorpce analytu na stěnu křemenné kapiláry a problematická reprodukovatelnost elektrokinetického nástřiku.

* Tato práce získala 3. místo v soutěži o cenu firmu Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně



Obr. 1. Separace doxorubicinu v kationtovém módu; pufr fosfát 100 mmol.l^{-1} pH 2,5, 20 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu o koncentraci 10^{-4} (1) a $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (2), nástřik 1 s hydrodynamicky, separační napětí 30 kV

Experimentální část

Chemikálie

Všechny použité látky byly čistoty p.a. od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Standardy anthracyklinových antibiotik byly získány jako dar firmy Pharmacia & Upjohn S.p.A., Itálie. Standardní roztoky anthracyklinových antibiotik byly připraveny pro hydrodynamické dávkování v základním elektrolytu a pro elektrokinetické dávkování ve směsi rozpouštědel acetonitril–voda (95:5 v/v).

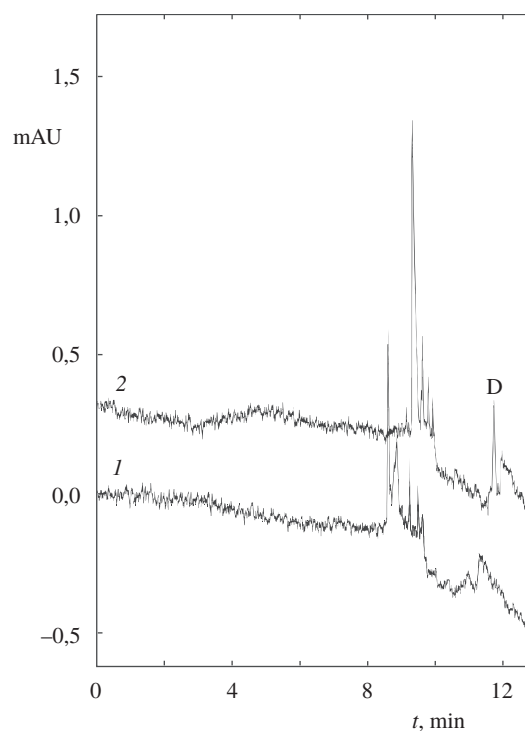
Aparatura a experimentální podmínky

Měření bylo prováděno na přístroji Spectra PHORESIS 100 s rychle snímajícím UV/VIS detektorem SpectraFOCUS (TSP). Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem $50 \mu\text{m}$ o celkové délce 75 cm (efektivní délka 40 cm). Aplikované separační napětí bylo 30 kV. Všechny analýzy byly prováděny při laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr 100 mmol.l^{-1} , pH 2,5 s obsahem 20 % methanolu (v/v). Ve vstupní části byl fosfátový pufr 100 mmol.l^{-1} , pH 2,5 s obsahem 100 mmol.l^{-1} dodecylsulfátu sodného a 20 % methanolu.

Popis „on-line“ prekoncentrace

Fosfátový pufr pH 2,5 umožňuje kladnou ionizaci anthracyklinů, proto bylo elektrokinetické dávkování vzorku prováděno



Obr. 2. Elektroforeogram doxorubicinu s elektrokinetickým dávkováním; pufr fosfát 100 mmol.l^{-1} pH 2,5, 100 mmol.l^{-1} SDS, 40 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu s koncentrací $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ ve směsi acetonitril–voda v poměru 95:5 (v/v), elektrokinetický nástřik 50 s při 30 kV, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (acetonitril–voda 95:5 v/v), 2 – doxorubicin (D) $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$

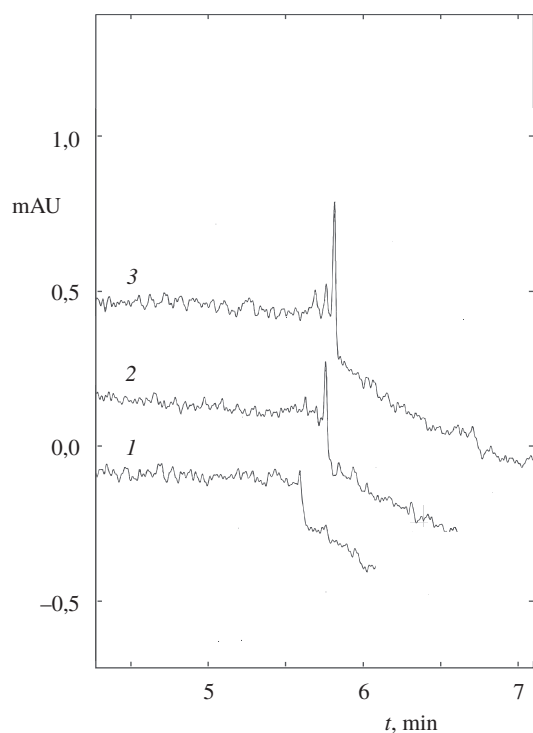
děno při kladné polaritě elektrod. Při hydrodynamickém dávkování analytu byla vzorkem naplněna téměř celá efektivní délka kapiláry.

Vlastní analýza pak byla prováděna v aniontovém módu (záporně nabitá vstupní elektroda). V inletové části byl fosfátový pufr s obsahem dodecylsulfátu sodného (SDS). V průběhu analýzy migruje kladně nabitý analyt k inletové konci kapiláry a proti němu migruje zóna záporně nabitého SDS, který na rozhraní se zónou vzorku tvoří komplexy s anthracykliny. Tyto komplexy pak díky celkovému efektivnímu zápornému náboji migrují k detektoru.

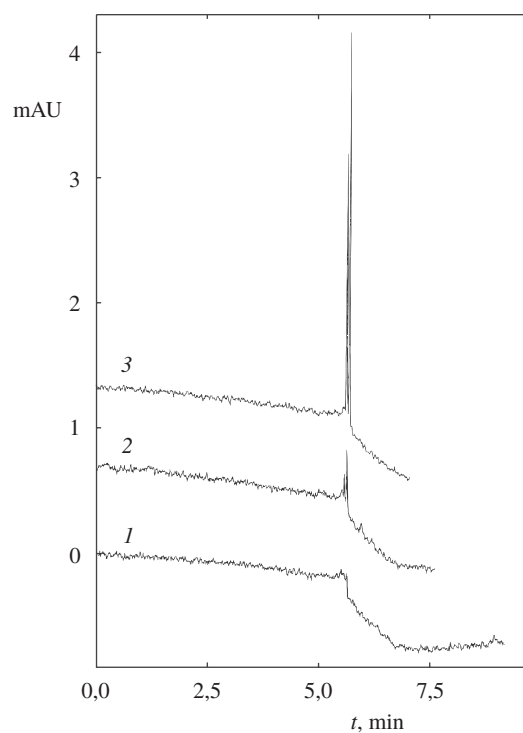
Výsledky a diskuse

Při zakoncentrování s využitím tzv. sweeping efektu jsme použili oba běžně využívané způsoby dávkování vzorku do kapiláry. Tedy jak elektrokinetické, tak i hydrodynamické dávkování.

Dosažené detekční limity ilustrují obrázky 2 a 3. V případě elektrokinetického dávkování vzorku je dosažený limit detekce $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$. Při použití hydrodynamického nástřiku vzorku je dosažený limit detekce $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$. Ve srovnání s limitem detekce při analýze kapilární elektroforézou bez on-line prekoncentrace (obr. 1), který byl s použitím UV/VIS detektoru $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, je zvýšení citlivosti UV/VIS detekce velmi výrazné. Při analýze bez tzv. sweeping prekoncentrace se



Obr. 3. **Elektroforeogram doxorubicinu s hydrodynamickým dávkováním**; pufr fosfát 100 mmol.l^{-1} pH 2,5, 100 mmol.l^{-1} SDS, 20 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu v základním elektrolytu, nástřik tlakem 20 s, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (základní elektrolyt), 2 – doxorubicin $1.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$, 3 – doxorubicin $5.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$



Obr. 4. **Separace modelové směsi doxorubicinu (DOX) a daunorubicinu (DAU)**; pufr fosfát 100 mmol.l^{-1} pH 2,5, 100 mmol.l^{-1} SDS, 20 % methanolu (v/v), nástřik tlakem 20 s, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (základní elektrolyt), 2 – modelová směs $1.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$, 3 – modelová směs $1.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$

navíc uplatňuje silná sorpce anthracyklinů na stěnu kapiláry. Velkou výhodou „sweeping“ efektu je kromě samotné prekoncentrace také odstranění již naadsorbovaného analytu. Odstranění sorpce na kapiláru je velkou výhodou zejména při využití elektrokinetického nástřiku vzorku, protože sorpcí analytu na stěnu kapiláry se značně měnil charakter povrchu kapiláry a způsoboval špatnou reprodukovatelnost elektroosmotického toku a tím také elektrokinetického nástřiku. Také se výrazně zlepšila reprodukovatelnost migračních časů anthracyklinů.

Další výhodou je také skutečnost, že i přes velkou zónu vzorku při hydrodynamickém dávkování nedochází k výraznému zhoršení či úplné ztrátě separace jednotlivých anthracyklinů (obr. 4).

Závěr

Prezentovaná metoda on-line prekoncentrace s využitím tzv. sweeping efektu umožňuje rychlé, jednoduché a účinné zakoncentrování anthracyklinových antibiotik. Tato prekoncentrace umožňuje využití UV/VIS detektoru pro stanovení anthracyklinů a mohla by být alternativou k běžně používaným metodám stanovení anthracyklinových antibiotik v plazmě.

Autoři děkují grantům MŠMT ČR VŠ 96021 a MSM 153100013 za podporu této práce.

LITERATURA

- Hempel G., Haberland S., Schulze-Westhoff P., Möhling N., Blaschke G., Boos J.: *J. Chromatogr. B* 698, 287 (1997).
- Hempel G., Schulze-Westhoff P., Flege S., Laubrock N., Boos J.: *Electrophoresis* 19, 2939 (1998).
- Foret F., Sustacek V., Boček P.: *J. Microcol. Sep.* 2, 229 (1990).
- Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: *J. Chromatogr. A* 716, 35 (1995).
- Chien R. L., Burgi D. S.: *Anal. Chem.* 64, 1046 (1992).
- Gebauer P., Thormann W., Boček P.: *J. Chromatogr.* 608, 47 (1992).
- Gebauer P., Thormann W., Boček P.: *Electrophoresis* 16, 2039 (1995).
- Burgi D. S., Chien R. L.: *Anal. Chem.* 63, 2042 (1991).
- Quirino J. P., Terabe S.: *Science* 282, 465 (1998).
- Quirino J. P., Terabe S.: *Anal. Chem.* 71, 1638 (1999).
- Israel M., Pegg W. J., Wilkinson P. M., Garnick M. B.: *J. Liquid Chromatogr.* 1, 795 (1978).
- Eksborg S., Ehrsson H., Andersson B., Beran M.: *J. Chromatogr.* 153, 211 (1978).
- Hulhoven R., Desager J. P.: *J. Chromatogr.* 125, 369 (1976).
- Oosterbaan M. J. M., Dirks R. J. M., Vree T. B., Van der Kleijn E.: *J. Chromatogr.* 306, 323 (1984).

15. Breda M., Basileo G., Fonte G., Long J., James C. A.: *J. Chromatogr. A* 854, 81 (1999).
16. Shim H. J., Lee E. D., Yoon E. J., Lee S. D., Kim W. B., Yang J., Lee M. G.: *J. Chromatogr. B* 656, 407 (1994).
17. Van Lancker M. A., Nelis H. J. C. F., De Leenheer A. P.: *J. Chromatogr.* 254, 45 (1983).
18. Hempel G., Haberland S., Schulze-Westhoff P., Möhling N., Blaschke G., Boos J.: *J. Chromatogr. B* 698, 287 (1997).
19. Hempel G., Schulze-Westhoff P., Flege S., Laubrock N., Boos J.: *Electrophoresis* 19, 2939 (1998).

A. Gavenda^a, J. Ševčík^{a,b}, and J. Psotová^c (^a*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký Univer-*

sity, ^b*Center of Analytical Chemistry of Molecular Structures, Faculty of Medicine, Palacký University,* ^c*Institute of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Determination of Nanomolar Concentrations of Anthracyclines by Capillary Electrophoresis with UV Detection**

On-line preconcentration was used to get better UV detection limits in capillary electrophoresis. The sweeping effect in micellar electrokinetic chromatography was used to detect trace amounts of the biologically active group of anthracyclines in model samples. The improved sweeping preconcentration technique provides for excellent detection limits decreasing down to concentration 10^{-9} mol.l⁻¹.