

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 541.43

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ПЕНИЦИЛЛИНОВОГО РЯДА

**М.А. Феофанова, А.Г. Зехова, В.В. Новикова, И.С. Цветкова,
Н.В. Баранова.**

Тверской государственный университет
Кафедра неорганической и аналитической химии

Предложена методика количественного определения антибиотиков ряда пенициллина – бицилина и амоксицилина на основе метода тонкослойной хроматографии, подобраны оптимальные условия для хроматографического разделения бицилина и амоксицилина.

Ключевые слова: *антибиотики, пенициллин, тонкослойная хроматография.*

С получением пенициллина как препарата (1949 г.) возникло новое направление в науке – учение об антибиотиках, которое необычайно быстро развивается в настоящее время. Из шести с лишним тысяч антибиотиков, известных к настоящему времени, лишь примерно сто находят применение в медицине. Большинство антибиотиков не находят применение в медицинской практике из-за их токсичности, инактивации в организме больного или других причин [1].

Антибиотические вещества – новые, ранее неизвестные по химическому строению соединения – представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений. Пенициллины широко применяются в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении образования клеточных стенок. Изучение путей образования антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности продуцентов этих биологически активных соединений, раскрытию основных этапов их метаболизма. Наиболее широкое применение в практике находят антибиотики пенициллинового ряда, вследствие их широкого спектра действия, малой токсичности для организма, несложности получения и невысокой стоимости [2].

Препараты пенициллинового ряда изучены достаточно хорошо, однако в основном это касается аспектов химического синтеза, молекулярного механизма действия и физико-химических свойств пенициллинов. В то же время анализ научной литературы показал, что аналитическая химия растворов пенициллинов остается малоизученной, а имеющиеся экспериментальные данные противоречивы. Кроме того, в

связи с широким распространением антибиотиков пенициллинового ряда возрастает вероятность фальсификации лекарственных средств. В настоящее время разработаны многочисленные методы аналитических процессов, микробиологические методы (применяются главным образом в клинических лабораториях и для количественного контроля), различные физико-химические методы.

Наиболее успешными методами изучения антибиотиков являются хроматографические методы [3], которые благодаря своей простоте, скорости и экономичности стали одними из наиболее распространенных аналитических методов, применяемых в фармации, токсикологии, биохимии. Поэтому целью работы явилось количественное определение антибиотиков ряда пенициллина – бицилина и амоксицилина методом тонкослойной хроматографии.

Методика. В качестве объектов исследования были выбраны антибиотики «Бицилин-3» (ОАО «Синтез», г. Курган) и «Амоксицилин» (Хемофарм А.Д. г. Вршац, Сербия), которые широко распространены в медицинской практике.

Выбранный метод тонкослойной хроматографии складывался из следующих последовательных операций:

- подготовка силуфола,
- подбор элюента,
- подготовка образца,
- нанесение образца,
- проведение хроматографического разделения,
- визуализация хроматограммы,
- обработка хроматограммы при помощи программы Хромоскан [4].

Подготовка силуфола. Для эксперимента использовались пластинки силуфол. Размер пластинок диктовался размерами имеющегося оборудования (хроматографических колонок).

Подбор элюента. В соответствии с литературными данными хорошие результаты разделения смеси пенициллинов получаются в системе этанол–вода–хлоруксусная кислота в соотношении 75:20:5. Но в результате эксперимента был подобран не менее эффективный растворитель бутанол–уксусная кислота–вода в соотношении 4:1:1, который дает те же результаты.

Подготовка образца. В работе использовались свежеприготовленные водные растворы указанных выше препаратов. Для построения калибровочных графиков эксперименты проводились с растворами различной концентрации. Готовился изначальный раствор антибиотика по навеске, высчитывалась концентрация, а затем разбавлялся в 2, 4, 6 и 8 раз соответственно.

Нанесение образца. Образцы наносятся на хроматограмму с помощью микрошприца. Диаметр стартового пятна не должен

превышать 5 мм. После нанесения исследуемого вещества полоску тщательно высушивают. В проведенных исследованиях высушивание проводилось на воздухе.

Хроматографирование. Процесс хроматографирования можно проводить в любом сосуде подходящих размеров, снабженном герметичной крышкой для исключения возможности испарения растворителя, которое ведет к нарушению хроматографирования. В работе в качестве хроматографических камер были использованы специальные цилиндры с плотно пригнанными крышками, к которым строго вертикально крепились полоски таким образом, чтобы хроматограмма не касалась стенок сосуда, а растворитель не достигал линии старта.

Визуализация хроматограмм. В литературе имеется много сведений о способах визуализации хроматографических зон антибиотиков. Среди них отмечено успешное использование паров йода. В данной работе в качестве проявителя использовался нингидрин и пары йода. Оба проявителя дают контрастные хроматографические пятна. Но преимущество отдали нингидрину. Перед проявлением хроматограммы необходимо высушить на воздухе. После хроматографирования пластинку помещали в печь и высушивали при температуре 100°C.

Результаты и их обсуждение. Подвижность отдельных веществ характеризуется величиной R_f , представляющей собой отношение расстояния между центром пятна вещества и стартом к расстоянию между фронтом растворителя и стартом. Таким образом, вещества на старте имеют $R_f = 0$, а вещества на фронте растворителя – $R_f = 1,0$. Значения величин R_f , рассчитанные на основании экспериментальных данных с помощью программы Хромоскан.

Таблица 1.

Значение R_f для антибиотиков

Антибиотик	Значение R_f
Бициллин	0,47
Амоксициллин	0,21

Из табл.1 видно, что R_f для указанных антибиотиков значительно различаются. В целом предложенная методика хроматографического разделения и визуализации хроматографических зон позволяет провести количественное определение бициллина и амоксициллина как при совместном присутствии, так и отдельно. Для подтверждения этого был применен метод компьютерного денситометрирования полученных хроматограмм [4].

Этот метод заключается в предварительном оцифровывании тонкослойных хроматограмм при помощи планшетного сканера. Отсканированные изображения хроматограмм были сохранены в виде

файлов формата JPG и обработаны при помощи специальной компьютерной программы «Хромоскан».

Для того чтобы провести количественное определение исследуемых антибиотиков, мы решили воспользоваться методом калибровочного графика. Для его построения мы зафиксировали объем наносимой пробы в размере 2 мкл, а концентрацию изменяли в 2, 4, 6, 8 раз меньше начальной (см. рис. 1 и 2). В результате этих экспериментов были получены калибровочные графики.

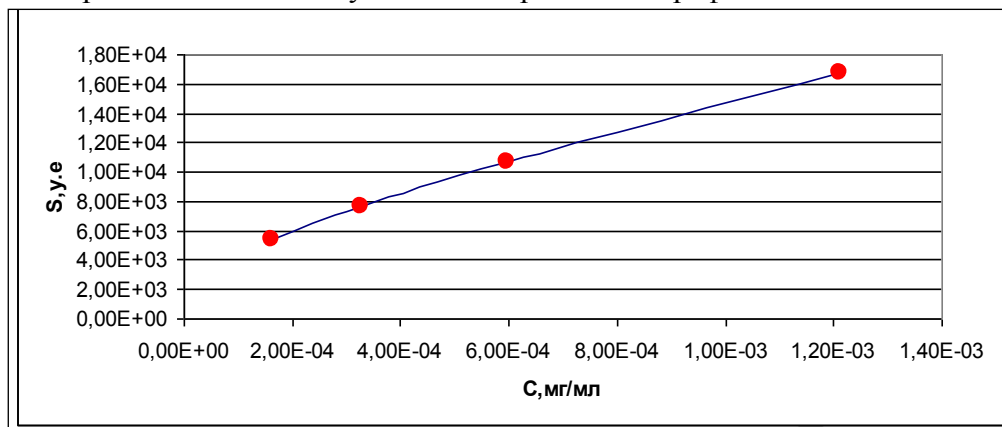


Рис. 1. Калибровочный график для амоксицилина

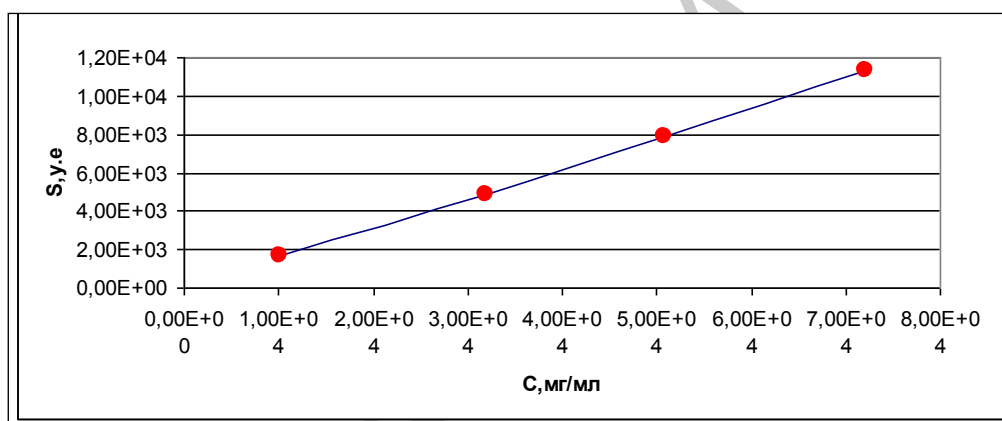


Рис. 2. Калибровочный график для бициллина

Как следует из графиков 1 и 2, экспериментальные точки хорошо ложатся на прямую, выходящей из начала координат. Линейность калибровочных графиков была подтверждена методами математической статистики.

В дальнейшем эти калибровочные графики были использованы для количественного определения антибиотиков в готовых лекарственных формах. Результаты этих измерений представлены в табл. 2.

Таблица 2
Значения количественного определения антибиотиков
в готовых лекарственных формах

Антибиотик	Навеска, г	Результат, г	X_{cp} , г	ΔX , г
Бициллин	0,046	0,043	0,045	0,001
		0,045		
		0,048		
Амоксициллин	0,037	0,035	0,036	0,001
		0,036		
		0,038		

Из табл. 2 следует, что взятые и найденные количества антибиотиков находятся в соответствии. Таким образом, можно считать, что предложенная методика количественного определения взятых антибиотиков обеспечивает надежные результаты.

Данный метод количественного определения антибиотиков был апробирован на модельной биологической системе, содержащей простейшую аминокислоту – глицин и биометалл Ca^{2+} .

Таблица 3
Результаты количественного определения антибиотиков в модельной
биологической системе

Антибиотик	Навеска, г	Результат, г	X_{cp} , г	ΔX , г
Бициллин	0,036	0,033	0,035	0,001
		0,035		
		0,038		
Амоксициллин	0,047	0,045	0,046	0,001
		0,046		
		0,048		

Проведенный литературный анализ и результаты исследовательской работы по разделению и количественному определению антибиотиков группы пенициллина методом тонкослойной хроматографии позволяют сделать следующие выводы:

1. Подобраны оптимальные условия для хроматографического разделения бициллина и амоксициллина.
2. Подобрана методика количественного определения пенициллинов (бициллина и амоксициллина) методом тонкослойной хроматографии.

3. Показана высокая надежность данной методики для определения бициллина и амоксициллина в готовых лекарственных формах.
4. Предложенная методика апробирована на модельной биологической системе.

Список литературы

1. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках – М.: Высшая школа, 1964. 448 с.
2. Шемякин М. М., Колосов А. С., Хохлов М. Н. Химия антибиотиков: в 2 т. М.: изд-во АН СССР, 1961. т. 1. 568 с.
3. Гранжан А. В., Чарыков А. К. Применение ионоселективных электродов в фармацевтическом анализе (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1993. Т. 28, № 7. С. 51 – 56.
4. Рясенский С.С. Компьютерная сканирующая денситометрия. // Вестник ТвГУ. Сер. «Химия». 2006. № 8 (25). С. 116–120.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBIOTICS PENICILLIN RANGE

**M.A. Feofanova, A.G. Zehova, V.V. Novikova, I.S. Tsvetkova,
N.V. Baranova**

Tver State University
Chair of inorganic and analytical chemistry

The technique of quantitative determination of some antibiotics penicillin - bitsilina and amoxicillin on the basis of TLC, Optimal conditions for chromatographic separation bitsilina and amoxicillin.

Keywords: *antibiotics, penicillin, biochemical control.*

Сведения об авторах:

ФЕОФАНОВА Мариана Александровна - доцент, канд. хим. наук, зав. каф. неорганической и аналитической химии, ТвГУ, e-mail: m000371@tversu.ru.

ЗЕХОВА Анна Геннадьевна - студентка 1 курса магистратуры, химико-технологический ф-т, ТвГУ.

НОВИКОВА Виктория Владимировна - студентка 3 курса, химико-технологический ф-т, ТвГУ.

ЦВЕТКОВА Иллона Сергеевна - студентка 3 курса, химико-технологический ф-т, ТвГУ.

БАРАНОВА Надежда Владимировна - канд. хим. наук, доцент, каф. неорганической и аналитической химии, ТвГУ, e-mail: nbaranova78@mail.ru.