

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.779.9+547.979+543.422

ЭКСТРАКЦИОННО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ
ОСНОВНЫМ КРАСИТЕЛЕМ АКРИДИНОВЫМ ОРАНЖЕВЫМ

С. В. ВАРТАНЯН, К. А. ГАЛОЯН, П. А. КАЗАРЯН и А. Г. ХАЧАТРЯН

Ереванский государственный университет

Поступило 14 IX 2007

Разработана экспрессная, простая в исполнении, точная и надежная методика экстракционно-спектрофотометрического определения бензилпенициллина в крови человека с использованием органического основного красителя акридинового оранжевого. Установлены оптимальные условия определения. Величина относительного стандартного отклонения (S_r) не превышает 2,8%. Проведено апробирование разработанной методики на образцах донорской крови методом добавок.

Рис. 2, табл. 1, библиографических ссылок 10.

Антибиотики применяются не только в медицине, но также в различных других отраслях (пищевая промышленность, ветеринария, сельское хозяйство). Как следствие – пищевые продукты зачастую загрязняются антибиотиками. Необходимо определять антибиотики как в лекарственных препаратах, так и в различных объектах окружающей среды, а также в физиологических жидкостях (кровь, сыворотка, моча).

Предложен ряд спектрофотометрических, электрохимических, хроматографических, биологических методов количественного определения β -лактамовых антибиотиков [1-5]. Однако большинство этих методов или требует использования дорогостоящей труднодоступной аппаратуры, или весьма длительны, трудоемки, недостаточно точны и воспроизводимы. Описано применение этих методов для определения пенициллина в плазме крови (сыворотке) и моче человека, а также в пищевых продуктах [6-9].

Ранее нами была предложена методика экстракционно-спектрофотометрического определения бензилпенициллина (БП) основным красителем акридиновым оранжевым (АО) [10], которая была успешно применена для количественного определения натриевой и калиевой солей бензилпенициллина в лекаственных препаратах.

Настоящая работа посвящена изучению возможности применения упомянутой методики для определения БП в крови человека.

Экспериментальная часть

Раствор натриевой соли бензилпенициллина готовили растворением в дистиллированной воде точной навески соединения (500 ЕД/мл). Все исследования проводили со свежеприготовленными растворами БП.

Раствор акридинового оранжевого с концентрацией 0,1% готовили растворением точной навески красителя квалификации «ч.д.а.» в дистиллированной воде.

С целью очистки продажный дихлорэтан квалификации «ч.» подвергали перегонке при 79-81°С.

Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре «СФ-16», рН водной фазы определяли при помощи рН-метра-милливольтметра «рН-121». Экстракцию проводили в делительных воронках объемом 50 мл.

Пробы донорской крови были предоставлены Институтом переливания крови им. проф. Р.Еоляна Министерства здравоохранения РА.

Предварительно, до начала основных экспериментов, были сняты спектры светопоглощения дихлорэтановых экстрактов АО и его соединения с БП, а также был построен градуировочный график для количественного определения содержания БП.

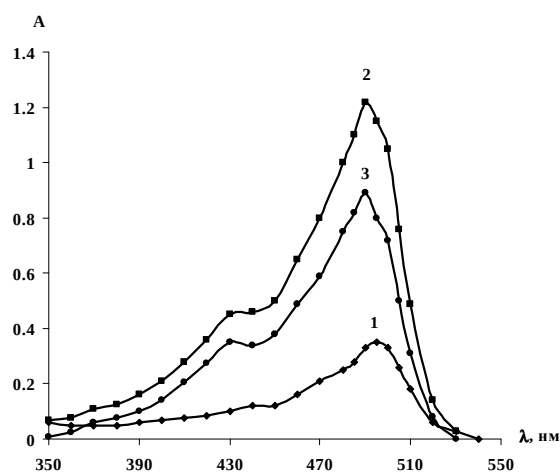


Рис. 1. Спектры светопоглощения дихлорэтановых экстрактов ($l = 0.5 \text{ см}$): 1 — АО (2,0 мл 0,1% раствора, $V_{\text{конечн.}} = 5,0 \text{ мл}$); 2 — соединение БП-АО (250 ЕД БП + 2,0 мл 0,1% раствора АО, $V_{\text{конечн.}} = 5,0 \text{ мл}$); 3 — дифференциальная кривая.

Для снятия спектров поглощения в делительную воронку помещали 2,0 мл 0,1% раствора АО, дистиллированной водой доводили объем до 5,0 мл, добавляли 5,0 мл дихлорэтана. После тщательного встряхивания в течение 0,5 мин отделяли органическую фазу.

Аналогично готовили раствор соединения, добавляя также 0,5 мл раствора БП.

Спектры светопоглощения дихлорэтановых экстрактов АО и соединения БП-АО приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, максимальное значение ОП для АО и соединения БП-АО наблюдается при $\lambda = 490$ нм. Для построения градуировочного графика был приготовлен ряд растворов, содержащих различные количества БП, 2,0 мл 0,1% раствора АО ($V_{\text{конечн.}} = 5,0$ мл). После добавления к указанным растворам 5,0 мл дихлорэтана и тщательного встряхивания в течение 0,5 мин были измерены значения ОП дихлорэтановых экстрактов против «холостых» дихлорэтановых экстрактов АО ($\lambda = 490$ нм, $l = 0,5$ см). Результаты приведены на рис. 2.

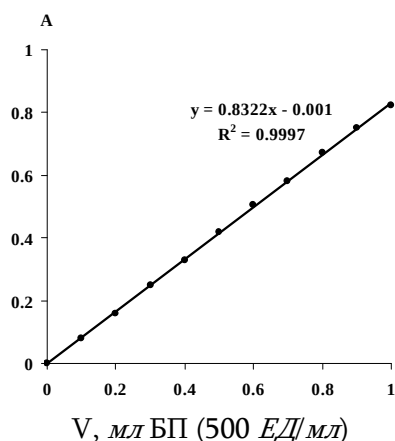


Рис. 2. Градуировочный график для определения содержания БП в дихлорэтановых экстрактах (спектрофотометр «СФ-16», $\lambda = 490$ нм, $l = 0,5$ см).

Оптические плотности могут быть измерены также на фотоэлектроколориметрах со светофильтром 490 нм.

Дальнейшие исследования были проведены на шести образцах донорской крови. Центрифугированием отделяли плазму (сыворотку) от общей массы крови. Так как в обычных образцах донорской крови БП не содержится, исследования проводили методом добавок.

В делительную воронку помещали 0,4 мл плазмы, 0,5 мл раствора БПР, дистиллированной водой доводили объем до 5,0 мл и после добавления 5,0 мл дихлорэтана встряхивали в течение 0,5 мин. В присутствии плазмы органическая фаза после экстракции долгое время остается мутной, и измерение ОП невозможно. От мути можно избавиться центрифугированием в течение 10 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Поскольку в присутствии плазмы увеличивается экстракция простой соли красителя, при приготовлении растворов сравнения добавляли то же количество плазмы, что и в исследуемых растворах.

Анализ проводили следующим образом. В делительную воронку помещали 0,2 мл плазмы крови, раствор БП, 2,0 мл 0,1% раствора АО, дистиллированной водой доводили объем до 5,0 мл, добавляли 5,0 мл дихлорэтана и встряхивали в течение 0,5 мин. Параллельно таким же образом готовили раствор сравнения, не содержащий БП. Полученные дихлорэтановые экстракты центрифугировали в течение 10 мин со скоростью вращения 3000 об/мин и измеряли ОП органических экстрактов (спектрофотометр "СФ-16", $\lambda = 490$ нм, $l = 0,5$ см). Содержание БП определяли по градуировочному графику.

Опыты были проведены с различными количествами плазмы и БП на различных образцах донорской крови. Полученные данные и результаты их математической обработки представлены в таблице.

Таблица

Статистическая обработка результатов $n = 5$; $t_{\alpha} = 2,87$; $P = 0,95$

Добавлено БП, мг	Найдено БП, мг	$\bar{x}$, мг	$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\%$
0,0625	0,0640 0,0640 0,0625 0,0668 0,0643	$6,43 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	2,80
0,1250	0,1297 0,1263 0,1220 0,1263 0,1260	$1,26 \cdot 10^{-1}$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	1,35
0,1812	0,1830 0,1812 0,1848 0,1881 0,1840	$1,84 \cdot 10^{-1}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	1,61

Как видно из таблицы, относительное стандартное отклонение (S_r) не превышает 2,8 отн.%, что находится в пределах допустимых погрешностей.

Разработанная методика предлагается для экспрессного точного определения БП в крови человека.

ԱՎԴԻԴԻՆԱՅԻՆ ՆԱԴԱԶԱԳՈՒՅՆ ՀԻՄՆԱՅԻՆ ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՆԵՐԿԱՆՅՈՒԹՈՎ ԱՐՅԱՆ ՊԼԱԶՄԱՅՈՒՄ ԲԵՆԶՈԼՊԵՆԻՑԻԼԻՆԻ ԷՔՍՏՐԱԿՑԻՈՆ-ՍՊԵԿՏՐԱԼ ՈՒՍԱԶՍՓԱԿԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ս. Վ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Կ. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Պ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ և Հ. Գ. ԽԱԶՍՏՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է ակրիդինային նարնջագույն հիմնային օրգանական ներկանյութով բենզիլպենիցիլինի որոշման նախկինում մեր կողմից մշակված էքստրակցիոն-սպեկտրալուսաչափական եղանակի կիրառման հնարավորությունը արյան անալիզի նպատակներով: Փորձերը կատարվել են դոնորային արյան նմուշների վրա՝ ավելացման եղանակով: Արյան ընդհանուր զանգվածից ցենտրիֆուգման միջոցով առանձնացվել է պլազման, որն էլ

օգտագործվել է հետագա ուսումնասիրությունների համար: Քանի որ պլազմայի ներկայությամբ մեծանում է ներկանյութի պարզ աղի լուծառիանումը, համեմատման լուծույթները պատրաստելիս դրանց մեջ ներմուծվել է նույնքան պլազմա, որքան հետազոտվող լուծույթներում է պարունակվում:

Հաստատվել են որոշման օպտիմալ պայմանները: Ստացված արդյունքների մաթեմատիկական մշակումը ցույց է տվել, որ հարաբերական ստանդարտ շեղման մեծությունը չի գերազանցում 2,8%:

Մշակված մեթոդիկան կարելի է առաջարկել արյան մեջ բենզիլպենիցիլինի միկրոքանակների որոշման համար որպես պարզ, արագ, հուսալի և ճշգրիտ եղանակ:

EXTRACTION-SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BENZYL PENICILLINUM IN DONOR BLOOD BY MEANS OF ACRIDINE ORANGE ORGANIC BASIC DYE

S. V. VARDANYAN, K. A. GALOYAN, P. A. GHAZARYAN and H. G. KHACHATRYAN

A possibility of the use of the extraction-spectrophotometric method worked out by us previously for the determination of benzylpenicillinum by means of Acridine Orange organic basic dye for the analysis of blood samples has been studied. The experiments were carried on the donor blood samples by means of the additions method. Blood plasma was separated from the blood main mass by means of centrifugation and used for further studies. Inasmuch the extraction of the dye simple salt increases in the presence of the plasma the “comparative” solutions were prepared adding to them the same amount of the plasma as the investigated samples contain.

The optimal conditions of determination process have been estimated. Mathematical treatment of the obtained data shows that the relative standard deviation values do not exceed 2,8%.

The technique elaborated may be suggested as a simple, rapid, reliable and accurate method to determine benzylpenicillinum micro-amounts in the blood samples.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Навашин И.П., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия. М., Медицина, 1982, с.57.
- [2] *Шведене Н.В., Боровская С.В.* // ЖАХ, 2003, т. 58, №11, с.1208.
- [3] *Fong G.W.K., Martin D.T., Johnson R.N., Kio B.T.* // J. Chromatogr., 1984, v.298, №3, p.351.
- [4] *Forsman U.* // Anal. Chim. Acta, 1983, v.146, p.71.
- [5] *Mioscu M., Haiduc J., Cormos D.C.* // Rev. Roum. Chim., 1998, v.33, №5, p.455.
- [6] *Coss Q.B., Pedrazzoli J.* // J. Chromatogr. A, 2003, v.987, №1-2, p.235.
- [7] *Wibawa J., Fowkes D.* // J. Chromatogr. B, 2002, v.774, №2, p.141.
- [8] *Кулагина Е.Г., Баринова О.В.* // Всероссийская конференция «Химический анализ веществ и материалов», тезисы докладов. М., 2000, с.64.
- [9] *Соколова Л.И., Черняев А.Л.* // ЖАХ, 2001, т. 56, №7, с.1177.
- [10] *Вартанян С.В., Хачатрян А.Г.* // Информационные технологии и управление, Ереван, Энциклопедия-Армения, 2001, т.3-2, с.86.