

УДК 542.61+535.2+615.7+668.113

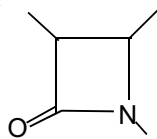
Экстракционно-фотометрическое определение бензилпенициллина красителем тиазинового ряда триметилтионином

Н.О. Геокчян

Кафедра аналитической химии ЕГУ
0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1

Ключевые слова: экстракция, фотометрия, реагент-краситель, экстрагент, тиазин, экспресс-метод, молярный коэффициент светопоглощения

Пенициллины являются первыми антимикробными препаратами (АМП), разработанными на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Они относятся к обширному классу β -лактамов антибиотиков, который включает также цефалоспорины и монобактамы. Общим в структуре этих антибиотиков является четырехчленное β -



лактамовое кольцо. β -лактамы составляют основу современной химиотерапии, так как занимают ведущее или важное место в лечении большинства инфекций. Родоначальником пенициллинов (и, вообще, всех β -лактамов) является бензилпенициллин (пенициллин G, или просто пенициллин H), применяющийся в клинической практике с начала 40-х годов. Из природных пенициллинов в медицинской практике применяются бензилпенициллин (БПЦ) и феноксиметилпенициллин. Другие препараты представляют собой полусинтетические соединения, получаемые в результате химической модификации различных природных АМП или промежуточных продуктов их биосинтеза. Пенициллины (и все другие β -лактамы) обладают бактерицидным эффектом.

По литературным данным, несмотря на наличие разных групп антибиотиков, а также новых эффективных синтетических антибактериальных препаратов, пенициллиновые препараты продолжают занимать значительное место в терапии инфекционных болезней. Бензилпенициллин – антибиотик широкого спектра действия, относится к лекарственным препаратам (ЛП), способным подавлять в организме развитие грамположительных бактерий [9].

Препарат не эффективен в отношении многих грамотрицательных бактерий и вирусов. Низкая активность препарата в отношении бактерий кишечной группы, синегнойной палочки и других микроорганизмов также связана в определенной мере с выработкой ими пенициллиназы. Систематическое поступление антибиотиков в организм человека вызывает различные аллергические реакции, нарушение обмена веществ, подавляет активность некоторых ферментов, нарушает деятельность микрофлоры кишечника. С другой стороны, часто в продуктах питания обнаруживаются остаточные количества лекарственных препаратов, применяемых в целях профилактики и лечения заболеваний домашних животных и птицы, ускорения их роста, улучшения качества и сохранности кормов и т.д. [7].

К сильнодействующим ЛП, используемым в ветеринарии и животноводстве, относятся антибиотики (в частности бензилпенициллин), которые обладают различными свойствами и спектром действия. Таким образом, наличие антибиотиков в пищевом сырье может отрицательно повлиять на качество выпускаемой продукции.

Остаточные количества антибиотиков регламентируются предельно допустимыми концентрациями (ПДК). Для пенициллина ПДК составляет 0,5 ед/г. Следовательно, определение остаточных количеств антибиотиков как одной из групп лекарственных веществ, получивших широкое распространение, но в то же время обладающих наибольшей потенциальной опасностью для здоровья человека, является одной из актуальных проблем клинической медицины, химии, ветеринарии и пищевой промышленности. Поэтому проблема и разработка новых методов определения микрограммовых количеств бензилпенициллина актуальны и требуют новых избирательных методов определения минимальных количеств препаратов, в частности БПЦ.

Материал и методы

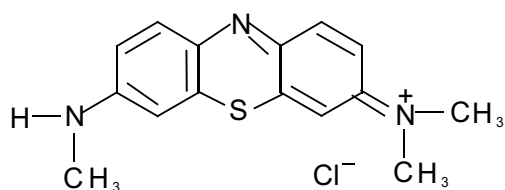
Для количественного определения антибиотиков используют различные физико-химические и биологические методы: это высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, электрофорез, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография [8,10-12]. Но эти методы трудоемки и требуют дорогостоящей аппаратуры.

В последние десятилетия одним из наиболее надежных экспрессных высокочувствительных и эффективных методов количественного определения антибиотиков и контроля ПДК являются экстракционно-спектрофотометрические методы с использованием органических основных красителей различных классов [2-4].

Настоящее исследование является продолжением разработки нового экстракционно-фотометрического метода определения малых количеств

БПЦ органическим основным красителем тиазинового ряда триметилтионином (ТриМТН) или Азуром II (Аз.II), который для этой цели нами применяется впервые. В доступной литературе мы не нашли аналогичного сообщения. Из тиазиновых красителей ранее для этой цели нами были применены тетраметилтионин – метиленовый голубой, ТетраМТН – МГ [5] и тионин (ТН) [6].

Формула реагента-красителя



Триметилтионин – Азур II

Запасной раствор БПЦ (натриевая соль) готовили растворением точной навески препарата производства фирмы ОАО “Биосинтез” (Россия) в дистиллированной воде. Рабочие растворы БПЦ готовили ежедневно соответствующим разбавлением запасного раствора. Водный раствор триметилтионина Аз.II готовили растворением точной навески реагента-красителя (квалификации “ч.д.а.”) в дистиллированной воде и отфильтровывали.

Органические растворители квалификации “ч.д.а.” и “х.ч.” использовались без дополнительной очистки. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре СФ-16, pH-растворов – на потенциометре ЛПУ-01 со стеклянным электродом.

Результаты и обсуждение

Предварительными опытами было установлено, что натриевая соль бензилпенициллина с катионом Аз.II образует ионный ассоциат (ИА) голубого цвета.

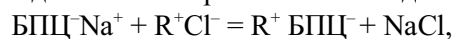
Исследованы оптимальные условия образования и экстракции ИА. В качестве растворителя испытаны хлорпроизводные насыщенных углеводородов, бензол и его гомологи, сложные эфиры уксусной кислоты. Из большого числа органических растворителей, а также их бинарных смесей, опробованных для извлечения образующегося ИА, наиболее эффективным оказался дихлорэтан (ДХЭ), который обеспечивает максимальный полезный аналитический сигнал при минимальном фоновом значении. Объемное соотношение водной и органической фаз составляет 2:1 (10 мл+5 мл). Были сняты спектры поглощения дихлорэтановых органических экстрактов образующегося ИА и “холостых”, а также водных

растворов красителя. Во всех случаях максимум светопоглощения наблюдается при одной и той же длине волны $\lambda=655$ нм. Совпадение максимумов светопоглощения может служить косвенным, однако довольно убедительным, доказательством факта образования именно ионного ассоциата. При установлении оптимальной кислотности водной фазы опыты проводили в широком интервале кислотности от pH 1,0–4,70 и 0,5–1,0 моль/л в HCl, а также pH 5,7–5,8 в дистиллированной воде. Максимальное извлечение образующегося соединения наблюдается при pH 5,7–5,8 в дистиллированной воде. Исходя из практических целей оптимальная кислотность водной фазы была принята 5,7–5,8 в дистиллированной воде. Как показали данные, полученные при высоких значениях кислотности, наблюдается резкое понижение значения оптической плотности экстракта ИА при 1,0 N в HCl. Это явление совпадает с химическими свойствами БПЦ. По литературным данным, БПЦ при высоких значениях кислотности не активен, он разлагается при воздействии концентрированных кислот, оснований и окислителей. С другой стороны, БПЦ при высоких значениях кислотности образует неактивную бензилпенициллиновую кислоту, что и отличает его от других антибиотиков. Нами установлено, что при низких значениях кислотности водной фазы экстракция протекает лучше, т.к. при повышении pH повышается значение ОП экстракта образующегося ИА. БПЦ практически полностью извлекается однократной экстракцией при pH 5,7–5,8 в дистиллированной воде в присутствии 1,2–1,8 мл 0,1% раствора Аз.П.

Экстракционное равновесие достигается за 1 минуту. Методом повторной экстракции был определен фактор извлечения ($R=96,0\%$). Окрашенные экстракты ИА устойчивы в течение 110 минут. Диапазон определяемой концентрации БПЦ составляет 5,0–360 мкг БПЦ/мл водной фазы. Кажущийся молярный коэффициент светопоглощения органических экстрактов ИА БПЦ с Аз.П $\bar{\epsilon}_{655} = 1100 \text{ л } \text{Моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Молярное соотношение между анионом БПЦ и катионом красителя ТриМТН в образующемся ИА было определено методом прямой линии Асмуса и оказалось равным 1:1 [1].

Реакция взаимодействия и образование ИА идет по уравнению



где БПЦ – молекула бензилпенициллина, RCl – молекула ТриМТН (Аз.П).

Таким образом, исходя из полученных экспериментальных данных, нами разработана новая экспрессная методика количественного определения микрограммовых количеств бензилпенициллина в ЛП органическим основным красителем тиазинового ряда – триметилтионином.

Разработанная методика отличается тем, что позволяет определять широкий концентрационный интервал БПЦ как в больших миллиграммовых, так и в микрограммовых количествах. С другой стороны, исходя из

экспериментальных данных, нами установлено, что тиазиновые красители отличаются от других классов основных красителей тем, что как водные растворы, так и ОП экстрактов ИА тиазиновых красителей очень устойчивы во времени. Они не разлагаются даже при действии дневного света, что проявляется неизменностью значений ОП соответствующих экстрактов ИА во времени, этим и обеспечивают воспроизводимые результаты ОП экстрактов ИА.

Таким образом, разработана новая экстракционно-фотометрическая методика количественного определения БПЦ в лекарственных препаратах тиазиновым красителем триметилтионином.

Поступила 14.03.11

Բենզիլպենիցիլինի էքստրակցիոն-ֆոտոմետրիկ որոշումը թիագինային շարքի ներկանյութ՝ եոմեթիլթիոնինով

Ն.Օ. Գյուկչյան

Բենզիլպենիցիլինի և եոմեթիլթիոնինի փոխազդեցությունից առաջացած միությունը (իոնական ասոցիատը) լուծահանելու համար լավագույն էքստրակցիոն է ընտրվել դիքլորէթանը, որն էլ ապահովում է իոնական ասոցիատի էքստրակցիոն օպտիկական խտության մաքսիմալ արժեք, իսկ «կույր» էքստրակցիոն՝ համեմատաբար մինիմալ արժեք: Մաքսիմում լուսակլանում դիտվում է $\lambda=655$ նմ ալիքի երկարության տակ: Ջրային ֆազի օպտիմալ թթվայնության մարզը ընկնում է $pH - 5,7-5,8$ թորած ջրում:

Եոմեթիլթիոնինի 0,1%-անոց լուծույթի օպտիմալ կոնցենտրացիան է 1,2–1,8 մլ: Կորզման աստիճանը $R=96\%$: Մեկ թափահարելիս իոնական ասոցիատը ջրային ֆազից անցնում է օրգանական ֆազ: Իոնական ասոցիատի էքստրակցիոն կայուն է 110 րոպե: Բենզիլպենիցիլինի որոշվող կոնցենտրացիոն սահմաններն են 5,0–360 մկգ/մլ ջրային ֆազում: Մարման մոլյար գործակիծը՝ $\bar{\epsilon}_{655}=1100$ լ, մոլ⁻¹, սմ⁻¹: Առաջացած միացության մեջ կոմպոնենտների մոլյար հարաբերությունն է 1:1: Մշակվել է բենզիլպենիցիլինի որոշման նոր էքստրակցիոն-ֆոտոմետրիկ եղանակ՝ դեղանյութում թիագինային շարքի ներկանյութ եոմեթիլթիոնինով:

Extraction-photometric determination of benzilpenicillinum by the trimethilthionin of thiazin raw

N.O. Geokchyan

Interaction of benzilpenicillinum anion with thiazin raw has been studied. Compound forming in the system is extracted by dichloretane. Maximal light absorbance (extinction) for extracts forming compound as well as for “blind” extracts is observed at 655 nm wavelength. At the optimal acidity conditions (pH – 5,7–5,8) benzilpenicillinum is extracted almost quantitatively ($R=96$) to the organic solvent phase by means of single extraction during 1 minutes shaking. The range of determined concentration of benzilpenicillinum is 5,0–360 mkg/ml. The molar coefficient of extinction is $\bar{\epsilon}_{655} = 11001, \text{ mol}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$.

Литература

1. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа. Л., 1976.
2. Геокчян Н.О., Микаелян Дж.А., Егиазарян А.А., Хачатрян А.Г. ДНАН РА, 2002, т. 102, 4, с. 330–334.
3. Геокчян Н.О. Вестник хирургии Армении им. Г.С. Тамазяна, 2007, 4(61), с. 112–118.
4. Геокчян Н.О., Егиазарян А.А. Вестник хирургии Армении им. Г.С. Тамазяна, 2009, 1(66), с. 30–37.
5. Геокчян Н.О. Вестник хирургии Армении им. Г.С. Тамазяна, 2010, 1(70), с. 60–64.
6. Геокчян Н.О. Вестник хирургии Армении им. Г.С. Тамазяна, 2010, 3(72), с. 89–93.
7. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках. М., 1998, с. 455.
8. Соколова Л.И., Чучалина И.В. ЖАХ, 2006, т. 61, 12, с. 1238–1242.
9. Харкевич Д.А. Фармакология. 3-е изд. М., 1987, с. 408–416.
10. Baily F., Britt P.N. J. Chromatogr., 1973, v. 83, p. 431.
11. Horwitz W. J. Assoc. of Anal. Chem., 1981, v. 538, p. 259.
12. Huang H.S., Winn J.R., Chen M.Z. Chromatogr., 1991, v. 564, p. 195.
13. Smither R., Vaughan D.R. Appl. Bacteriol., 1978, v. 44, p. 421.