



близки, однако наиболее оптимальный коэффициент корреляции ($R^2 = 0.9947$) получен для канала R.

Список литературы

1. Симонян А. В., Саламатов А. А., Покровская Ю. С., Аванесян А. А. Использование нингидриновой реакции для определения α -аминокислот в различных объектах : метод. рекомендации. Волгоград, 2007. 106 с.

2. Khan A. A. Studies of kinetics and mechanism of interaction of α -aminoacids with ninhydrin // J. Indian Chem. Soc. 1989. Vol. 66, № 7. P. 454–456.

3. Hamabaha A., Chang S., Hippel P. H. Model studies on the effects of neutral salts on the conformational stability of biological macromolecules. III. Solubility of fatty acid amino in ionic solutions // Biochem. 1973. Vol. 12, № 7. P. 1271–1278.

4. Мокшина Н. Я. Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж, 2007. 246 с.

УДК 543.544:577.18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО И ХИНОЛОНОВОГО РЯДОВ МЕТОДОМ ТСХ

Т.Д. Смирнова, А.Ю. Удалова, С.А. Птицкая

Саратовский государственный университет
E-mail: Smimova@sgu.ru

Представлены результаты выбора оптимальных подвижных фаз, содержащих различные ПАВ, α -, β -, γ -циклодекстрины, ионы европия, позволяющих осуществить эффективное разделение антибиотиков, присутствующих в комбинированных лекарственных препаратах методом тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, поверхностно-активные вещества, циклодекстрины, антибиотики.

Determination of Some Antibiotics of Quinolone and Tetracycline Groups Using TLC

T.D. Smimova, A.Yu. Udalovala, S.A. Ptickaya

The results of the study of the influence of various surfactants, α -, β -, γ -cyclodextrins, and ions of Europium on the antibiotics separation according to the method of the thin layer chromatography in medical products are presented.

Key words: thin-layer chromatography, surfactants, cyclodextrins, antibiotics.

Хинолоновые и тетрациклиновые антибиотики являются важнейшими биологически активными веществами, клиническими препаратами, обладающими широким спектром действия и имеющие высокую химиотерапевтическую эффективность. В зависимости от конкретной задачи, стоящей перед исследователем для анализа антибиотиков, используют спектрофотометрические [1], флуориметрические [2, 3] методы, а также методы колоночной [4, 5] и планарной хроматографии (ТСХ) [6]. Необходимо отметить, что метод ТСХ является наиболее пер-



спективным для осуществления контроля качества сырья и готовой продукции комбинированных лекарственных препаратов.

В последнее время для определения биологически активных веществ, таких как антибиотики, антикоагулянты, нуклеотиды и белки, широко используют флуориметрический метод анализа. Однако интенсивность собственной флуоресценции органических соединений невелика, поэтому актуальны различные подходы, позволяющие увеличить квантовый выход флуоресценции. Одним из них является метод сенсibilизированной люминесценции, возникающей при внутримолекулярном переносе энергии возбуждения в хелатах европия и тербия [7, 8]. Он отличается высокой чувствительностью, простотой выполнения и применяется для решения задач токсикологии, медицинской диагностики, фармакокинетики, контроля качества лекарственных препаратов.

Второй подход к увеличению квантового выхода антибиотиков заключается в использовании мицеллярных растворов поверхностно-активных веществ и циклодекстринов, роль которых заключается в изменении микровязкости, полярности среды, к формированию более «жесткой» структуры молекулы антибиотика и экранирования ее

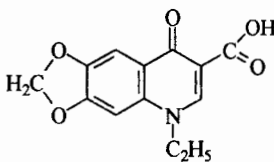
от посторонних тушителей. Солюбилизация реагентов в мицеллы различной природы поверхностно-активных веществ сопровождается изменением подвижности компонентов смеси и возрастанию ΔRf . Образование комплексов включения антибиотиков с циклодекстринами также может оказывать влияние на эффективность разделения компонентов в силикагеле. Подобные эффекты не изучены для исследуемых антибиотиков на поверхности сорбента.

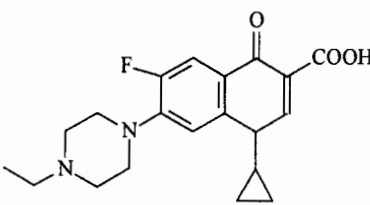
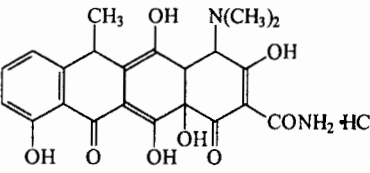
Для разделения и идентификации тетрациклинов и хинолонов в качестве неподвижной фазы (НФ) наиболее часто используют пластины с полярным сорбентом – силикагелем в качестве подвижной фазы (ПФ) – различные смеси водно-органических элюентов [9–11]. Так, для идентификации тетрациклина применяют *n*-бутанол, насыщенный водой в присутствии динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты [10], смеси этанола, уксусной кислоты и воды [11]. Методики предполагают детектирование компонентов в УФ-камере ($\lambda = 365$ нм) [10] или с помощью обработки пластинки ТСХ параамиода [11]. Ранее не рассматривалась возможность использования поверхностно-активных веществ (ПАВ), циклодекстринов (ЦД) и солей лантаноидов в качестве модификаторов водно-органических подвижных фаз для эффективного разделения и идентификации компонентов в смеси антибиотиков

Целью настоящей работы является изучение влияния природы различных ПАВ, циклодекстринов и солей Eu^{3+} на подвижность в тонком слое сорбента некоторых представителей антибиотиков: оксолиновой кислоты, энрофлоксацина и доксициклина (табл. 1).

Таблица 1

Формулы антибиотиков

Антибиотик	Формула
Оксолиновая кислота	

Антибиотик	Формула
Энрофлоксацин	
Доксициклин	

Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны оксолиновая кислота (ОК) (фирма «Merk»), доксициклин (ДЦ) и энрофлоксацин (ЭФ) (фирмы «Sigma») с содержанием основного вещества не менее 99%. В качестве ПФ использовали органические растворители: ацетонитрил, трихлорметан, изопропиловый спирт, ледяную уксусную кислоту марки «хч». В качестве модификаторов ПФ выступали $1 \cdot 10^{-1}$ М водные растворы ПАВ катионного типа – цетилпиридиний хлорид (ЦПХ), неионогенные – оксиэтилированный спирт Бридж-35 и оксиэтилированный алкилфенол Тритон X-100, (фирма «Serva»), анионные – додецилсульфат натрия (ДДС) (НПО «Синтез ПАВ», г. Шебекино), а также растворы с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М α -, β -, γ -циклодекстринов (фирма «Fluka»).

Растворы хлоридов Eu^{3+} и Tb^{3+} («ч.д.а.») исходной концентрации $1.0 \cdot 10^{-2}$ М стандартизировали комплексонометрически с ксилеоловым оранжевым индикатором.

В качестве НФ использовали пластины Сорбфил АТСХ (диаметр пор 9–12 нм, объем пор 0.8 мг/л, удельная поверхность 350 м²/г, толщина слоя 100–120 мкм, связующее – силиказоль).

Идентификацию хроматографических зон и расчет количественных характеристик разделения проводили с помощью видеоденситометра «Сорбфил» (ОАО «Сорбполимер», Россия) при УФ-облучении ($\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм).



Значение pH контролировали на pH-метре (pH-673 М) со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Результаты и их обсуждение

Исследуемые антибиотики – ОК, ЭФ и ДЦ – обладают незначительной собственной флуоресценцией, которая использовалась для детектирования образующихся хроматографических зон на видеоденситометре при $\lambda = 365$ нм путем сравнения полученных значений подвижности (R_f) со стандартными образцами, хроматографируемыми в тех же условиях.

Согласно [10] в качестве подвижных фаз использовались чистые растворители – ацетонитрил, трихлорметан, изопропиловый спирт, 2%-ная уксусная кислота – и их смеси. В качестве элюентов использовали также смеси компонентов, которые готовили в соотношениях, указанных в табл. 2.

Таблица 2

Влияние состава подвижной фазы на R_f антибиотиков

п/п	Элюент	R_f (ОК)	R_f (ЭФ)	R_f (ДЦ)
1	Ацетонитрил	–	–	–
2	Трихлорметан	–	–	–
3	Уксусная к-та 2%	–	–	–
4	Изопропиловый спирт	–	–	–
5	Ацетонитрил/уксусная к-та (15:85)	0.11	0.12	0.11
6	Ацетонитрил/уксусная к-та (30:70)	0.22	0.23	0.21
7	Ацетонитрил/уксусная к-та (50:50)	0.33	0.22	0.22
8	Ацетонитрил/уксусная к-та (60:40)	0.75	0.24	0.23
9	Ацетонитрил/уксусная к-та (80:20)	0.61	0.22	0.15
10	Ацетонитрил/уксусная к-та (85:15)	0.60	0.12	0
Влияние ПАВ				
ПФ (ацетонитрил/уксусная к-та/ПАВ)				
11	Тритон X-100: 60:30:10	0.61	0.31	0.31
12	Тритон X-100: 45:45:10	0.52	0.22	0.51
13	Тритон X-100: 30:60:10	0.51	0.13	0.34
14	Бридж 35: 60:30:10	0.50	0.31	0.31
15	Бридж 35: 45:45:10	0.60	0.20	0.50
16	Бридж 35: 30:60:10	0.51	0.21	0.31
17	ДДС: 60:30:10	0.62	0.33	0.47

Окончание табл. 2

п/п	Элюент	R_f (ОК)	R_f (ЭФ)	R_f (ДЦ)
18	ДДС: 45:45:10	0.64	0.21	0.55
19	ДДС: 30:60:10	0.61	0.30	0.70
20	ЦПХ: 60:30:10	0.64	0.31	0.48
21	ЦПХ: 45:45:10	0.60	0.43	–
22	ЦПХ: 30:60:10	0.51	0.19	–
Влияние циклодекстринов				
ПФ (ацетонитрил/2%-ная уксусная к-та/ $1 \cdot 10^{-4}$ М ЦД)				
23	80:10:10	0.71	0.31	0.11
Влияние ионов Eu^{3+}				
ПФ (ацетонитрил/0.02М NaH_2PO_4 / $1 \cdot 10^{-2}$ М Eu^{3+})				
24	60:30:10	0.61	0.21	0.21
25	45:45:10	0.54	0.11	0.34
26	45:45:10	0.63	0.24	0.22
Влияние ионов Eu^{3+}				
ПФ (ацетонитрил/2%-ная уксусная к-та/ $1 \cdot 10^{-2}$ М Eu^{3+})				
27	60:30:10	0.71	0.43	0.51
28	45:45:10	0.52	0.41	0.66
29	30:60:10	0.45	0.23	0.27

Как видно из табл. 2, при использовании различных составов элюента значения R_f для ОК в подвижной фазе с преобладанием ацетонитрила находятся в диапазоне 0.61–0.75. При уменьшении полярности элюента значения R_f уменьшаются (0.11–0.33). Подвижности ЭФ и ДЦ незначительны и составляют 0.11–0.24 для всех исследуемых систем, что позволяет предположить возможность разделения антибиотиков в ПФ состава №9 и №10.

Влияние ПАВ

Изучение влияния природы ПАВ на подвижность антибиотиков проводили в условиях различных соотношений компонентов ПФ ацетонитрил/уксусная кислота/ПАВ (60:30:10, 45:45:10, 30:60:10), где концентрация ПАВ оставалась постоянной, равной $1 \cdot 10^{-2}$ М и превышающей критическую концентрацию мицеллообразования для всех исследуемых ПАВ. Однако присутствие в ПФ значительных количеств органических растворителей, например ацетонитрила (более 50%), препятствует мицеллообразованию. В этой связи в ПФ состава № 17 и 20 катионные и анионные ПАВ, по-видимому, выполняют роль только противоиона по отношению к определяемым антибиотикам. Установлено, что для других ПФ особенно



сти строения молекул антибиотиков проявляются в дифференцирующем и разделяющем влиянии ПАВ на подвижность веществ. Так, показатель Rf для ОК при незначительном содержании ацетонитрила (соотношение ацетонитрил/уксусная кислота/ПАВ 30:60:10) в присутствии всех типов ПАВ возрастает в 2–3 раза. Увеличение подвижности ОК возможно связано с солюбилизацией в мицеллы ПАВ молекулярной формы кислоты, которая преобладает в этих условиях.

Двукратное увеличение подвижности ЭФ в среде катионного ПАВ – ЦПХ наблюдается только при соотношении компонентов элюента ацетонитрил/уксусная кислота/ЦПХ = 45:45:10. В других случаях значения Rf остаются без значительных изменений (0.13–0.33).

Для ДЦ установлено трехкратное возрастание Rf в случае использования в ПФ анионного ПАВ. Возрастание подвижности можно объяснить солюбилизацией антибиотика в мицеллы ДДС, при этом значение Rf для элюента состава № 19 ацетонитрил/уксусная кислота/ДДС = 30:60:10 составляет 0.70. Введение в ПФ катионного ПАВ (составы № 21 и 22) приводит, по-видимому, к гидрофобизации неподвижной фазы и уменьшает Rf ДЦ, удерживая его зону на линии старта.

Для наиболее эффективного разделения смеси антибиотиков можно рекомендовать ПФ состава ацетонитрил/уксусная кислота/Бридж-35 (45:45:10), где наблюдаются максимальные ΔRf , равные от 0.10 до 0.30, а Rf -факторы ОК, ЭФ и ДЦ имеют соответственные значения 0.60, 0.20 и 0.50.

Влияние циклодекстринов

Циклодекстрины – это циклические олигосахариды, включающие от шести до восьми D-глюкопиранозидных единиц, соединенных 1,4-гликозидными связями. Они образуют в пространстве жесткую трехмерную полость в виде конусообразного тора. В ПФ состава ацетонитрил/2%-ная уксусная кислота 80:20 вводили добавки α -, β - и γ -циклодекстринов (ЦД) с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М. Взаимодействие ЦД с неполярной молекулой – гостем, например, ОК, приводит к об-

разованию комплексов включения состава 1:1, в которых гость входит в полость ЦД. При этом ЦД могут проявлять свойства микросевдофазы по отношению к молекуле – гостю с присущими ей локальными свойствами среды и способствовать десорбции антибиотиков с полярной поверхности силикагеля и переносу элюентом. Установлено, что в полярном элюенте в зависимости от концентрации β -ЦД подвижность ОК характеризуется Rf -фактором в диапазоне 0.51–0.71, ЭФ – 0.15–0.31, ДЦ – 0.11–0.18. Таким образом, подвижность более гидрофобных реагентов ЭФ и ДЦ в условиях модификации ПФ β -ЦД изменяется незначительно по сравнению с водно-органическими элюентами. В то же время наиболее эффективное разделение ($\Delta Rf = 0.20$ –0.60) антибиотиков с использованием β -ЦД можно достичь с помощью элюента состава № 23.

Влияние комплексообразования

Известно [7, 8], что исследуемые антибиотики образуют с Eu^{3+} хелатные соединения состава $\text{Eu}^{3+}:\text{ДЦ} = 1:1$ и $\text{Eu}^{3+}:\text{ЭФ(ОК)} = 1:2$, которые характеризуются более высокой интенсивностью флуоресценции, что позволит понизить предел обнаружения в исследуемых объектах. Применение хелатообразования в плоскостной хроматографии возможно окажет влияние на разделение реагентов в элюенте с различным содержанием органического растворителя.

Проведенные исследования влияния добавок солей Eu^{3+} в водно-органический элюент на подвижность антибиотиков позволили установить, что значения Rf полученных хелатов зависят от природы буферного раствора и содержания полярного растворителя. В случае использования 2%-ной уксусной кислоты в качестве буфера наиболее эффективное разделение антибиотиков наблюдается при составе № 27 с преобладанием ацетонитрила, ΔRf составляет 0.28–0.08, а Rf ОК, ЭФ и ДЦ соответственно равны 0.71, 0.43, 0.51. При использовании фосфатного буфера в элюенте подвижность хелатов незначительно, но уменьшается, что может быть объяснено усилением гидрофобности сорбата при взаимодействии комплекса с фосфат-ионом и



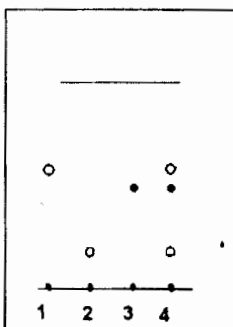
более сильным удерживанием его неподвижной фазой. Состав элюента № 25 позволяет эффективно разделить антибиотики со значениями R_f 0.54, 0.11, 0.34 для ОК, ЭФ, ДЦ соответственно. При этом ΔR_f составляет 0.2–0.43.

Таким образом, в результате проведенных исследований можно рекомендовать для разделения ОК, ЭФ и ДЦ подвижные фазы, модифицированные неионогенным ПАВ Бридж-35, а также солью Eu^{3+} в среде уксусной кислоты (2%). Использование в ПФ добавок β -ЦД изменяют значения R_f исследуемых антибиотиков аналогично ПАВ Бридж-35 с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М.

Разделение смеси антибиотиков

Хроматографическую пластинку выдерживали при температуре 40°C в сушильном шкафу в течение одного часа, на линию старта наносили по 3 мкл стандартных растворов, содержащих ОК, ЭФ и ДЦ с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М и исследуемой смеси антибиотиков. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами элюента состава ацетонитрил/уксусная кислота (2%)/Бридж-35 (45:45:10). Хроматографировали восходящим способом в течение 20 мин, после достижения растворителем линии фронта пластинку вынимали и высушивали на воздухе, а затем проводили детектирование на видеоденситометре при $\lambda = 365$ нм.

Результаты разделения смеси антибиотиков представлены на рисунке.



Хроматографическое разделение образцов-стандартов и пробы на ТСХ-пластинках Сорбфил: 1 – ОК, 2 – ЭФ, 3 – ДЦ, 4 – смесь веществ

Таким образом, в результате проведенных исследований предложены методики разделения смеси ОК, ЭФ и ДЦ методом ТСХ. Они могут быть использованы для рутинного анализа лекарственных препаратов в фармацевтической промышленности, а также на предмет их фальсификации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-03-00725а).

Список литературы

1. Abdelgawad F. M., Aboutia F. M. Spectrophotometric determination of Flumequine using Iron (III) Chloride as a Color Developer // *Microchem. J.* 1994. Vol. 50. P. 106–110.
2. Das T., Saha U. Spectrofluorimetric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate // *Talanta.* 1990. Vol. 37, № 12. P. 1193–1196.
3. Jin J. Spectrofluorimetric method of determination of norfloxacin after dissolving in hydrochloric acid // *Anal. Abstr.* 1991. Vol. 53. P. 5–39.
4. Tyczkowska K. L., Voyksner R. D., Anderson K. L. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 1994. Vol. 658. P. 341–343.
5. Schneide M. J., Braden S. E., Reyes-Herrera I., Donoghue D. J. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection // *J. Chromatogr. B.* 2007. Vol. 846, № 1–2. P. 8–13.
6. Войкова Т. А., Тяглов Б. В., Антонова С. В. Анализ макролидных, тетрациклиновых и пептидных антибиотиков методом тонкослойной хроматографии // *Биотехнология.* 2008. № 2. С. 74–87.
7. Штыков С. Н., Смирнова Т. Д., Былинкин Ю. Г., Жемеричкин Д. А. Флуориметрическое определение тетрациклинов с помощью хелата европия с 1,10-фенантролином в мицеллярных растворах анионных ПАВ // *Журн. аналит. химии.* 2005. Т. 60, № 1. С. 30–34.
8. Штыков С. Н., Смирнова Т. Д., Неврюева Н. В., Былинкин Ю. Г., Жемеричкин Д. А. Определение ципрофлоксацина и энрофлоксацина методом сенсibilизированной флуоресценции // *Журн. аналит. химии.* 2007. Т. 62, № 2. С. 153–157.
9. Sherma J. *Planar Chromatography* // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 4253–4267.
10. Березкин В. Г., Онучак Л. А., Евтюгина Е. Н. Применение нового варианта капиллярной тонкослойной хроматографии для анализа антибиотиков группы тетрациклина // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2008. Т. 8, № 4. С. 570–576.
11. Choma I. Separation of tetracyclines by thin-layer chromatography // *Chem. Anal.* 2001. Vol. 6, № 1. P. 1–9.