



УДК 615.281:543

## Выделение и анализ фторхинолонов в субстанциях лекарственных формах и биожидкостях с использованием хроматографии и спектрофотометрии

Сливкин А.И., Карлов П.М., Сипливая Л.Е.

*Курский государственный медицинский университет, Курск*

Поступила в редакцию 11.03.2009 г.

### Аннотация

Используя метод УФ-спектрофотометрии, получены методики качественного и количественного определения фторхинолонов в субстанциях, лекарственных формах и биожидкостях. В качестве метода экспресс-очистки биоматериала использована гелехроматография со сменой элюэнта.

**Ключевые слова:** анализ, спектрофотометрия, хроматография, антибиотики, фторхинолоны, субстанции, биожидкости

Ultraviolet spectrophotometry was applied to the identity and assay of fluoroquinolones in substances, remedies and biological fluids. As a basis method of purification of biomaterial is used gel-penetrating chromatography with changing eluent.

**Keywords:** identity, assay, spectrophotometry, antibiotics, fluoroquinolones, substances, biological fluids

### Введение

Фторхинолоны представляют собой молекулы, полученные путем химического синтеза, которые при дальнейшей направленной химической модификации путем изменения структуры заместителей могут быть трансформированы в соединения с улучшенными химиотерапевтическими и фармакологическими характеристиками [10].

Относительная простота структуры молекул фторхинолонов (ФХ) облегчает изучение структурно-функциональных зависимостей. К настоящему времени достаточно полно установлены закономерности связи химического строения фторхинолонов с их антимикробными свойствами, особенностями проявления побочных эффектов и лекарственных взаимодействий [10]. Отдельные представители ФХ могут существенно отличаться по характеру и степени выраженности побочного действия на различные системы организма.

В настоящее время препараты группы фторхинолонов широко применяются в медицинской практике как одни из наиболее эффективных классов синтетических

антибактериальных средств. Препараты класса хинолонов, используемые в клинической практике с начала 60-х годов, по механизму действия принципиально отличаются от других антимикробных препаратов (АМП), что обеспечивает их активность в отношении устойчивых, в том числе полирезистентных, штаммов микроорганизмов. ФХ, разрешенные для клинического применения с начала 80-х годов (II поколение), отличаются широким спектром антимикробного действия, включая стафилококки, высокой бактерицидной активностью и хорошей фармакокинетикой, что позволяет применять их для лечения инфекций различной локализации. Они активны в отношении ряда грамположительных аэробных бактерий (*Staphylococcus* spp.), большинства штаммов грамотрицательных, в том числе *E.coli* (включая энтеротоксигенные штаммы), *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Citrobacter* spp., *M.morganii*, *Vibrio* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Legionella* spp., *Brucella* spp., *Listeria* spp. Фторхинолоны характеризуются выраженным накоплением в клетках и тканях [6,12]. Особую актуальность имеет применение фторхинолонов для лечения сепсиса, туберкулеза и других опасных инфекционных заболеваний, связанных с внутриклеточной персистенцией возбудителей. Именно в этом случае клетки-эффекторы неспецифической резистентности, в первую очередь, макрофаги и нейтрофилы, являются мишенями как антимикробного, так и иммуномодулирующего действия химиопрепаратов.

Высокая бактерицидная активность фторхинолонов позволила разработать для ряда препаратов (ципрофлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин, норфлоксацин) лекарственные формы для местного применения в виде глазных и ушных капель. ФХ, в отличие от нефторированных хинолонов, имеют большой объем распределения, создают высокие концентрации в органах и тканях, проникают внутрь клеток [5].

Несмотря на обилие информации о фармакологических свойствах и клиническом применении ФХ, в доступной литературе имеется недостаточное количество данных о физико-химических, в том числе спектральных характеристиках фторхинолонов [4].

В связи с высокой востребованностью группы препаратов необходима разработка современных, простых в исполнении методик анализа.

Согласно нормативной документации, количественное определение проводят методом неводного титрования. Недостатком данной методики является необходимость предварительной стандартизации раствора хлорной кислоты, а также длительность и трудоемкость самой процедуры титрования.

Предложены методики определения фторхинолонов методом ВЭЖХ [2]. Метод ВЭЖХ позволяет получить надежные результаты, но стоимость оборудования и стандартных образцов, токсичность используемых растворителей, а также потребность в высококвалифицированных специалистах ограничивают его применение для массовых анализов.

Для количественного определения препаратов перспективно применение метода спектрофотометрии. Отсутствие необходимости стандартизации титранта, сокращение времени на подготовительные операции, экспрессность и высокие метрологические характеристики дают методу явные преимущества.

Целью работы стала разработка хроматографических способов выделения ФХ и спектрофотометрических методик их определения в субстанциях, лекарственных формах и биожидкостях с использованием методов спектрофотометрии и колоночной хроматографии.

## Эксперимент

В работе использовались колонки с гель-сорбентами: G-10, G-15, G-50, G-75. ИК-спектроскопические исследования проводили на ИК-спектрофотометре «Avatar 360 FT-IR E.S.P.» (США) в области волновых чисел  $4000-400\text{ см}^{-1}$ . Для подготовки к ИК-анализу образцы готовили прессованием анализируемого вещества с KBr в соотношении 1:100. 1

В работе использован спектрофотометр СФ-56, исследование проводилось в ультрафиолетовой области спектра (220-350 нм). Использовались кварцевые кюветы с толщиной рабочего слоя 1 см. Работа проводилась по методике, описанной в Государственной Фармакопее X издания [1]. В качестве рабочих субстанций были использованы стандартные образцы, прошедшие контроль качества в контрольно-аналитической лаборатории ОАО «Фармстандарт – Лексредства».

В качестве растворителя использовалась вода очищенная, раствор кислоты хлороводородной, полученный из фиксаля качества ЧДА. Для гель-хроматографии использован бисерно-полимерный гель декстрана «Милицорб» разных марок. Исходные компоненты крови (плазма и эритроцитарная масса) получены на СПК г. Курска.

Статистическая обработка проведена по требованиям, предъявляемым X Фармакопеей для линейной зависимости с использованием метода наименьших квадратов.

## Обсуждение результатов

На первом этапе использовали химический метод идентификации железа хлоридом (III) в качестве экспресс анализа и инфракрасную спектроскопию - как подтверждающий метод.

Полученные спектры для офлоксацина представлены на рисунках 1 и 2.

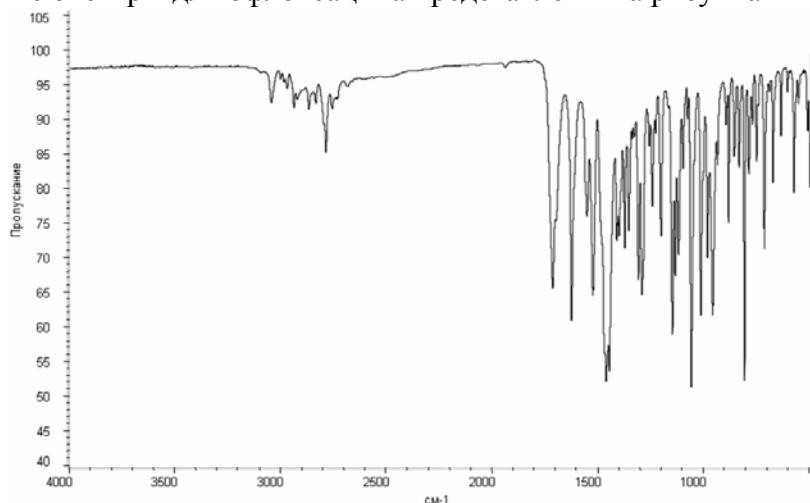


Рис. 1. ИК – спектр субстанции офлоксацина от 400 до  $4000\text{ см}^{-1}$

Следующим этапом стала разработка методики анализа субстанций фторхинолонов. В качестве растворителя и раствора сравнения использовалась вода очищенная.

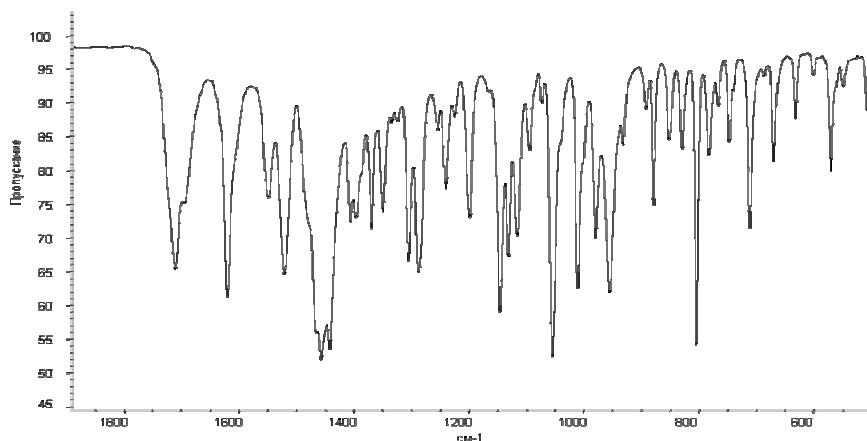


Рис. 2. ИК – спектр субстанции офлоксацина от 400 до 2000  $\text{см}^{-1}$

Спектрофотометрическое исследование фторхинолонов показало, что спектры данных веществ имеют по одному выраженному максимуму: при длине волны 276 нм – норфлоксацин, 291 нм – офлоксацин и 278 нм - ципрофлоксацин.

Стандартные растворы анализируемых веществ готовили последовательным разбавлением из основного раствора. По данным калибровочных графиков методом наименьших квадратов выведены уравнения для расчета концентрации фторхинолонов:

$$D=0,0847 \cdot C - 0,001867 \text{ для офлоксацина};$$

$$D=0,10315 \cdot C - 0,00023 \text{ для ципрофлоксацина};$$

$$D=0,1298 \cdot C - 0,00151 \text{ для норфлоксацина};$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;  $C$  – концентрация соответствующего фторхинолона, мкг/мл.

#### **Методика определения фторхинолонов в субстанции.**

Навеска субстанции фторхинолона 0,100 г растворялась в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл. Затем аликвота (4-6 мл) полученного раствора переносилась в мерную колбу на 100 мл. Оптическую плотность раствора определяли при соответствующих длинах волн на спектрофотометре СФ-56, в качестве раствора сравнения использовалась очищенная вода.

#### **Методика определения фторхинолонов в лекарственных формах.**

Точную навеску порошка растертых таблеток растворяли в дистиллированной воды, отфильтровали через беззольный фильтр и фильтрат доводили до метки в мерной колбе до 100 мл. Далее проводилось измерение оптической плотности полученного раствора при соответствующей длине волны на фоне воды очищенной.

Результаты спектрофотометрического определения фторхинолонов в субстанции и таблеточной массе представлены в таблицах 1 и 2. Как видно из таблиц относительные ошибки полученных методик не превышают погрешности метода и могут быть использованы в лабораторном анализе наравне с неводным титрованием и ВЭЖХ.

Методика легко воспроизводима и общее время выполнения анализа не превышает 30 минут, в то время как анализ с использованием других методов значительно дольше и требует наличия специалистов, имеющих навыки по работе со сложным оборудованием и с высокотоксичными реактивами.

Разработка методик анализа ФХ в биологических жидкостях, в частности, в плазме и эритроцитарной массе, представляющих собой сложные для анализа гетерогенные системы, явилась логическим продолжением работы.

Таблица 1. Спектрофотометрическое определение фторхинолонов в субстанциях

| № п/п | Препарат       | Взято, г | Найдено, г | Метрологические характеристики  |
|-------|----------------|----------|------------|---|
| 1     | норфлоксацин   | 0,101    | 0,101      | $S_x = 0,000748$<br>$X \pm \Delta X = 0,100 \pm 0,00208$<br>$\varepsilon = 2,08 \%$ |
| 2     | норфлоксацин   | 0,100    | 0,099      |   |
| 3     | норфлоксацин   | 0,098    | 0,099      |   |
| 4     | норфлоксацин   | 0,100    | 0,100      |   |
| 5     | норфлоксацин   | 0,098    | 0,099      |   |
| 6     | Офлоксацин     | 0,100    | 0,100      | $S_x = 0,000632$<br>$X \pm \Delta X = 0,100 \pm 0,00176$<br>$\varepsilon = 1,76 \%$ |
| 7     | Офлоксацин     | 0,100    | 0,099      |   |
| 8     | Офлоксацин     | 0,099    | 0,099      |   |
| 9     | Офлоксацин     | 0,101    | 0,101      |   |
| 10    | Офлоксацин     | 0,099    | 0,100      |   |
| 11    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,100      | $S_x = 0,0004$<br>$X \pm \Delta X = 0,0998 \pm 0,00111$<br>$\varepsilon = 1,11 \%$  |
| 12    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,099      |   |
| 13    | ципрофлоксацин | 0,099    | 0,099      |   |
| 14    | ципрофлоксацин | 0,101    | 0,101      |   |
| 15    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,100      |   |

Примечание:  $S_x$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – абсолютная ошибка,  $\varepsilon$  – относительная ошибка

Определение ФХ в биожидкостях требует предварительной очистки. Белки плазмы мешают определению фторхинолонов, в связи с чем нами были рассмотрены различные способы предварительной очистки проб. Так, в качестве способа очистки были рассмотрены различные осадители для компонентов плазмы и гемолизата.

Таблица 2 Спектрофотометрическое определение фторхинолонов в таблеточной массе

| № п/п | Препарат       | Взято, г | Найдено, г | Метрологические характеристики  |
|-------|----------------|----------|------------|---|
| 1     | норфлоксацин   | 0,150    | 0,151      | $S_x = 0,001414$<br>$X \pm \Delta X = 0,150 \pm 0,00393$<br>$\varepsilon = 2,62 \%$ |
| 2     | норфлоксацин   | 0,150    | 0,150      |   |
| 3     | норфлоксацин   | 0,149    | 0,151      |   |
| 4     | норфлоксацин   | 0,150    | 0,149      |   |
| 5     | норфлоксацин   | 0,149    | 0,147      |   |
| 6     | офлоксацин     | 0,141    | 0,141      | $S_x = 0,0016$<br>$X \pm \Delta X = 0,140 \pm 0,00445$<br>$\varepsilon = 3,18 \%$   |
| 7     | офлоксацин     | 0,140    | 0,141      |   |
| 8     | офлоксацин     | 0,139    | 0,137      |   |
| 9     | офлоксацин     | 0,141    | 0,139      |   |
| 10    | офлоксацин     | 0,140    | 0,142      |   |
| 11    | ципрофлоксацин | 0,141    | 0,139      | $S_x = 0,00136$<br>$X \pm \Delta X = 0,140 \pm 0,00377$<br>$\varepsilon = 2,69 \%$  |
| 12    | ципрофлоксацин | 0,139    | 0,137      |   |
| 13    | ципрофлоксацин | 0,140    | 0,140      |   |
| 14    | ципрофлоксацин | 0,141    | 0,141      |   |
| 15    | ципрофлоксацин | 0,140    | 0,141      |   |

Примечание: обозначения в табл. 1.

Самым эффективным осадителем показала себя кислота трихлоруксусная в 60% концентрации в соотношении 1:2 с пробой. Однако данный способ очистки оказался недостаточно эффективным, т.к. в области определения оптическая

плотность оставалась слишком высокой и не давала провести количественное определение. Поэтому в качестве способа очистки нами была применена гель-хроматография. Для заполнения колонки были взяты различные марки бисерно-полимерного геля декстрана (G-10, G-15, G-50, G-75). Оптимальным оказался гель сорбента марки G-10. При использовании в качестве элюэнта воды очищенной движения ФХ по колонке практически не наблюдалось, но проходило полное удаление элементов плазмы и гемолизата эритроцитов.

Основываясь на особенностях и химических свойствах фторхинолонов, в качестве элюентов были использованы различные кислоты. Лучше всего в качестве элюэнта себя показала кислота хлороводородная 0,01 моль/л. Этой концентрации достаточно для полной протонизации атома азота, проявляющего основные свойства. Наблюдалось быстрое продвижение препаратов по колонке с сорбентом без растягивания по ней.

#### **Методика определения фторхинолонов в плазме крови и гемолизате эритроцитов (модельная смесь).**

Пробу, в виде модельной смеси плазмы крови с препаратом или эритроцитарной массы с препаратом, подвергнутой предварительной деструкции, вносят на поверхность сорбента, затем пропускают через колонку 40 мл воды очищенной для удаления элементов плазмы или гемолизата, затем проводят смену элюэнта на 0,01 молярную кислоту хлороводородную, собирают соответствующие фракции элюата и измеряют в них концентрацию препарата по разработанным ранее методикам.

Результаты спектрофотометрического определения фторхинолонов в плазме крови и гемолизате эритроцитов (модельная смесь) представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы относительная ошибка не превышает 3,5 %, что вполне достаточно для контроля концентраций препаратов в крови в условиях клиники или биологической лаборатории, а также позволяет проводить дальнейшие исследования по взаимодействию препаратов с элементами крови.

Таблица 3. Спектрофотометрическое определение фторхинолонов в плазме крови (модельная смесь).

| № п/п | Препарат       | Взято, г | Найдено, г | Метрологические характеристики  |
|-------|----------------|----------|------------|---|
| 1     | норфлоксацин   | 0,100    | 0,096      | $S_x = 0,001166$<br>$X \pm \Delta X = 0,0952 \pm 0,003242$<br>$\varepsilon = 3,41 \%$ |
| 2     | норфлоксацин   | 0,099    | 0,095      |   |
| 3     | норфлоксацин   | 0,099    | 0,092      |   |
| 4     | норфлоксацин   | 0,100    | 0,095      |   |
| 5     | норфлоксацин   | 0,098    | 0,094      |   |
| 6     | Офлоксацин     | 0,101    | 0,097      | $S_x = 0,00102$<br>$X \pm \Delta X = 0,0944 \pm 0,002835$<br>$\varepsilon = 3,00 \%$  |
| 7     | Офлоксацин     | 0,100    | 0,095      |   |
| 8     | Офлоксацин     | 0,099    | 0,093      |   |
| 9     | Офлоксацин     | 0,101    | 0,095      |   |
| 10    | Офлоксацин     | 0,098    | 0,091      |   |
| 11    | ципрофлоксацин | 0,099    | 0,093      | $S_x = 0,0012$<br>$X \pm \Delta X = 0,0946 \pm 0,003336$<br>$\varepsilon = 3,53 \%$   |
| 12    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,096      |   |
| 13    | ципрофлоксацин | 0,099    | 0,092      |   |
| 14    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,095      |   |
| 15    | ципрофлоксацин | 0,100    | 0,096      |   |

Примечание: обозначения в табл. 1.

## Заключение

1. Разработана методика предварительной очистки препарата методом гель-хроматографии;

2. Предложены точные, быстрые, легко воспроизводимые, несложные в исполнении методики определения фторхинолонов в субстанциях и лекарственных формах, с использованием УФ.

3. Методики могут применяться не только для анализа препаратов и контроля качества, но и дают возможность вести контроль концентрации препаратов в крови медицинскими работниками в биологических лабораториях, что особенно актуально в свете индивидуального подхода к конкретному больному и подбору оптимальных терапевтических концентраций.

## Список литературы

1. Государственная Фармакопея СССР X изд.-М.: Медицина.
2. Дорофеев В.Л., Использование метода ВЭЖХ для анализа чистоты лекарственных средств группы фторхинолонов / В.Л. Дорофеев, С.Е. Сюбаева, А.П. Арзамасцев // ВЕСТНИК ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2004. № 2. с. 199-204.
3. Падейская Е. Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. М.: 1998; 352 с.
4. Титов И.В., Использование метода УФ спектрофотометрии для установления подлинности лекарственных средств группы фторхинолонов / И.В. Титов, В.Л. Дорофеев, А.П. Арзамасцев // ВЕСТНИК ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2004. № 2. с. 264-269.
5. Bergan T. Pharmacokinetics of the fluoroquinolones. The Quinolones/ 2nd ed., Andriole V. T. ed. Academic Press, 1998; p. 143—182.
6. Holmes B., Brogden R. N., Richards D. M. Norfloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 1985; 30: p. 482-513.
7. Nicolle L.E. Use of quinolones in urinary tract infection and prostatitis. The Quinolones/2nd ed. Andriole V.T.ed. Academic Press, 1998; p. 183—202.
8. Rubinstein E. History of quinolones and their side effects. Penetration-international update on levofloxacin and ofloxacin. *Biomedis Int Ltd* 2000; 71p.
9. Lipsky B. A., Baker C. A. Fluoroquinolones toxicity profile: a review focusing on newer agents. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 352-364 p.
10. Lode H. Potential interaction of the extended-spectrum fluoroquinolones with the CNS. *Drug Safety* 1999; 2: p.123-135.
11. Peterson L. R. Quinolone molecular structure — activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 2001; 33: Suppl 3: p. 180-186.
12. Wilson A.P.R., Gruneberg R.N. Ciprofloxacin: 10 years of clinical experience. Oxford 1997; 275 p.

---

**Сливкин Алексей Иванович** - д.фарм.н., проф., зав.кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета, Воронеж

**Slivkin Aleksey I.** - doctor of pharmaceutical science, professor, head of department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh state university

---

**Карлов Павел Михайлович** - аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

**Сипливая Любовь Евгеньевна** - д.б.н., профессор, зав.кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

**Karlov Pavel M.** - post-graduate of department of pharmaceutical, toxicological, analytical chemistry, Kursk state medical university

**Siplivaya Lyubov' E.** - doctor of biological science, professor, head of department of pharmaceutical, toxicological, analytical chemistry, Kursk state medical university;