

Рис. 2. Зависимость коэффициента воспаления сереежек (K) у цыплят от величины прививной дозы (lgD) штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур

Дано распределение экспериментальных значений относительного коэффициента воспаления сереежек (K) соответственно испытанным прививным дозам вируса (lgD).

Пунктиром показан график зависимости величины относительного коэффициента воспаления сереежек у кур от прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур, построенный по регрессионному уравнению: $K = \text{antilg}[0,2863(\text{lgD}) - 0,6932]$, где K — прогнозируемый относительный коэффициент воспаления сереежек для заданной величины прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур (lgD).

Линия синего цвета, параллельная оси абсцисс, соответствует пороговому значению отрицательного контроля, которое составляет 0,21.

Диаграмма иллюстрирует монотонное возрастание значения коэффициента воспаления соответственно испытанным дозам. Коэффициент корреляции величин K и lgD составил величину $R = 0,987$, и соответствующая модель связи (регрессионная модель) имела вид $K = \text{antilg}[0,2863(\text{lgD}) - 0,6932]$, где K — прогнозируемое значение коэффициента воспаления для заданной дозы вируса (lgD). Приведенная модель имела коэффициент адекватности $R^2 = 0,976$, что позволяло использовать ее для целей обратного прогноза. А именно, уравнение вида: $\text{lg}^*D = (0,6932 - \text{lg}K) / 0,2863$ по результатам оценки среднего коэффициента воспаления сереежек (K) позволяет определить ожидаемую величину прививной дозы вируса (lgD) и прогнозировать степень защищенности птицы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недостатком ранее опубликованной работы [4] можно считать то, что результаты теста «замедленной реакции сереежек» были соотнесены с результатами РТМЛ, которые между собой имели слабую связь, а не с непосредственно установленной напряженностью иммунитета в группе птиц.

При объяснении явления замедленной реакции сереежек необходимо исходить из следующего определения иммунитета — как направленной на поддержание гомеостаза способности организма распознавать, специфически реагировать и элиминировать генетически чужеродные вещества эндо- и гетерогенного происхождения. При повторном введении вируса оспы у привитых цыплят «включается» вторичный иммунный ответ.

Можно предположить, что тест «замедленной реакции сереежек» является проявлением реакции типа IV — группы патологических иммунных реакций, опосредованных клетками (или гиперчувствительности замедленного типа). Реакции этого типа обусловлены взаимодействием антигена с презентированными лимфоцитами, что приводит к повреждению тканей в результате неадекватного функционирования механизмов клеточного иммунитета, проявляемого в виде альтернативного воспаления [3].

Интрадермальная инъекция аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе больше $10 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^2$ обеспечивает индукцию иммунитета у привитых цыплят, выявляемую в тесте «замедленной реакции сереежек», что согласуется с предыдущими данными (для штамма «КЭМ-7» регламентированная прививная доза в составе эмбрион-вакцины против оспы птиц составляет не менее $100 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^2$) [2].

Таким образом, результаты описанного исследования являются доказательством пригодности теста «замедленной реакции сереежек» для экспресс-оценки напряженности иммунитета против оспы птиц в течение 24–48 ч. Для этого цыплят опытной группы (не менее 10 голов) можно будет считать защищенными от заражения вирусом оспы птиц, если на 24–48 ч после введения вирусной суспензии и суспензии гомогената ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур в равном объеме ($0,1 \text{ см}^3$) среднее значение разности толщины правой и левой сереежек будет статистически отличаться ($p \leq 0,05$) от аналогичного показателя у неиммунных птиц контрольной группы.

ВЫВОДЫ

1. Тест «замедленной реакции сереежек» обеспечивает быструю оценку напряженности иммунитета против оспы у вакцинированных цыплят в течение 24–48 ч.
2. Показана зависимость между долей защищенных птиц в группе против оспы птиц и проявлением местной реакции на введение вирусосодержащего материала в сереежки цыплятам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во МГУ, 1970. — 367 с.
2. Похвальный С.А., Кулаков В.Ю. Иммунобиологические свойства аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур // Ветеринария и кормление. — 2011. — № 6. — С. 43–45.
3. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ. / под ред. Р.Г. Василовой, А.Ф. Киркина. — М.: Мир, 1991. — 328 с.
4. Dharsana R., Spradbrow P.B. The demonstration of cell-mediated immunity in chickens vaccinated with fowlpox virus // Zbl. Vet. Med. R. B. — 1985. — Bd. 32, № 8. — P. 628–632.
5. Fowl pox // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 7th ed. — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.3.10. — P. 507–513.
6. Morita C. Role of humoral and cell-mediated immunity on the recovery of chickens from fowlpox virus infection // J. Immunol. — 1973. — Vol. 111, № 5. — P. 1495–1501.
7. Tripathy D.N., Hanson L.E. Immunity to fowlpox // Am. J. Vet. Res. — 1975. — Vol. 36, № 4. — P. 541–544.

УДК 619:615:543.54

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРИ АНАЛИЗЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Д.С. Большаков¹, В.Г. Амелин², Т.Б. Никешина³

¹научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

²ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В работе оценена возможность контроля качества готовых лекарственных средств методами капиллярного электрофореза. Выбраны оптимальные условия разделения и определения различных классов антибактериальных веществ: пенициллинов, фторхинолонов, нитрофуранов, сульфаниламидов, метронидазола и хлорамфеникола. Диапазон определяемых содержаний действующих компонентов составил 1–2500 мг/г для твердых образцов и 0,001–0,50% для жидких препаратов.

Ключевые слова: готовые лекарственные средства, капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, антибиотики, антибактериальные вещества.

UDC 619:615:543.54

CAPABILITIES OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF READY-TO-USE PHARMACEUTICAL PRODUCTS WITH AN ANTIBACTERIAL EFFECT

D.S. Bolshakov¹, V.G. Amelin², T.B. Nikeshina³

¹Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

²Leading Researcher, Doctor of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The capability to monitor quality of ready-to-use pharmaceuticals using capillary electrophoresis methods is evaluated in the paper. Optimal conditions for separation and determination of different classes of such antibacterial agents as penicillins, fluoroquinolones, nitrofurans, sulfanilamides, metronidazole and chloramphenicol are chosen. The range of content of active constituents is 1–2500 mg/g for solid samples and 0,001–0,50% for liquid preparations.

Key words: ready-to-use pharmaceuticals, capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, antibiotics, antibacterial agents.

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень развития химико-фармацевтической промышленности предъявляет серьезные требования к качеству производимой продукции: это касается как терапевтического эффекта готовых лекарственных средств (ГЛС), так и их подлинности. В отличие от первой проблемы, проблему аналитического контроля можно решить с использованием современных химических и физико-химических методов анализа.

Большую группу ГЛС составляют антибиотики и антибактериальные препараты. По данным ВОЗ, наибольшее количество подделок ГЛС (около 42%) приходится именно на антибиотики. Актуальной задачей фармакологического анализа антибиотиков является обеспечение его надежной аналитической базой. Традиционно для идентификации и количественного определения действующего начала антибактериальных препаратов применяют спектроскопические методы [2–4, 6, 14] и методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различными вариантами детектирования [7, 8, 11–13, 15, 17]. Зачастую эти методы трудоемки или труднодоступны в силу высокой стоимости применяемого оборудования. Более доступным и экспрессным методом анализа ГЛС является метод капиллярного электрофореза (КЭ), который по селективности разделения и экологичности превосходит многие аналитические методы (в том числе и ВЭЖХ).

Цель данной работы заключалась в оценке возможности применения метода КЭ для анализа ГЛС антибактериального действия на основе пенициллинов (ПЦ), фторхинолонов (ФХ), нитрофуранов (НФ), сульфаниламидов (СА), метронидазола и хлорамфеникола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аппаратура. Использовали систему капиллярно-электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), оснащенную спектрофотометрическим детектором, немодифицированным кварцевым капилляром внутреннего диаметром 75 и 50 мкм, эффективной длиной 50 и 60 см, соответственно. Регистрацию и обработку данных проводили с программным обеспечением «Мультихром» и «Эльфоран» (АО «Амперсэнд», Россия). В процессе подготовки проб использовали ультрацентрифугу Mini Spin (Eppendorf, Германия) и лабораторную центрифугу ОПН-3М («ПОЛИКОМ», Россия).

Растворители и реагенты. В работе использовали стандартные образцы следующих антибиотиков (Fluka Analytical, Sigma Aldrich, Dr. Ehrenstorfer): амоксициллина тригидрата, ампициллина тригидрата, данофлоксацина мезилата, диклоксациллина натриевой соли гидрата, клоксациллина натриевой соли моногидрата, левофлоксацина, ломефлоксацина гидрохлорида, метронидазола, нитрофуразона, оксациллина натриевой соли гидрата, пенициллина G натриевой соли, пефлоксацина метансульфоната моногидрата, сульфадиазина, сульфадиметоксина, сульфамеразина, сульфаклорпирозидина, фуразолидона, фуралтадона, хлорамфеникола, ципрофлоксацина, эноксацина и энрофлоксацина.

Стандартные растворы антибиотиков (1 мг/мл) готовили растворением точных навесок каждого компонента в дистиллированной воде, 0,1 М HCl или ацетонитриле (в зависимости от природы вещества) и хранили при температуре 4°C. Рабочие растворы готовили в день использования разбавлением исходных дистиллированной водой.

Для приготовления ведущего электролита применяли додецилсульфат натрия (ДДС) (Merck), ацетонитрил (Prolabo), 10-водный тетраборат натрия (Sigma-Aldrich),

12-водный фосфат натрия двузамещенный (Prolabo), 2-водный фосфат натрия однозамещенный (Prolabo), фосфат тетрабутиламмония (ТБА) (Fluca Analytical), α -, γ -циклодекстрины (ЦД) (Sigma-Aldrich), бидистиллированную воду (ГОСТ 7602-72).

Лекарственные препараты. В работе исследовали лекарственные препараты, которые были обезличены и закодированы:

- образец № 1 (таблетки, действующее вещество ципрофлоксацин, 250 мг);
- образец № 2 (таблетки, действующее вещество ципрофлоксацин, 500 мг);
- образец № 3 (таблетки, действующее вещество сульфадиметоксин, 500 мг);
- образец № 4 (таблетки, действующее вещество нитрофуразол, 20 мг);
- образец № 5 (таблетки, действующее вещество хлорамфеникол, 250 мг);
- образец № 6 (капли глазные, действующее вещество хлорамфеникол, 0,25%);
- образец № 7 (капли глазные, действующее вещество хлорамфеникол, 0,25%);
- образец № 8 (таблетки, действующее вещество хлорамфеникол, 0,5 г);
- образец № 9 (таблетки, действующее вещество фуразолидон, 50 мг);
- образец № 10 (раствор для инъекций, действующее вещество энрофлоксацин, 5%);
- образец № 11 (таблетки, действующее вещество метронидазол, 250 мг);
- образец № 12 (таблетки, действующее вещество амоксициллин тригидрат, 500 мг);
- образец № 13 (таблетки, действующее вещество ампициллин тригидрат, 250 мг).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования были выбраны получившие широкое распространение ФХ (лемефлоксацин, данофлоксацин, эноксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, энрофлоксацин, пефлоксацин), СА (сульфадиметоксин, сульфамеразин, сульфадиазин, сульфаклорпирозидин), НФ (фуразолидон, нитрофуразон, фуралтадон), ПЦ (амоксициллин, оксациллин, ампициллин, клоксациллин, пенициллин G, диклоксациллин), метронидазол (производное имидазола) и хлорамфеникол. Выбор данных антибактериальных препаратов обусловлен не только высокой эффективностью их действия, но и доступностью.

На выбор конкретного метода электрофоретического разделения влияет природа разделяемых компонентов. Самым простым вариантом КЭ является капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ). Компоненты сложной смеси движутся в среде электролита с разными скоростями, образуя дискретные зоны. Отличительная особенность КЗЭ состоит в том, что он пригоден для разделения только ионогенных компонентов пробы. В мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) — варианте КЭ, позволяющем проводить разделение соединений ионного и нейтрального характера, — использование поверхностно-активных веществ (ПАВ) приводит к формированию так называемой «псевдостационарной фазы», и аналиты распределяются между мицеллой и буферным электролитом. Применение органических растворителей, ион-парных и макроциклических реагентов зачастую способно значительно повысить селективность разделения смесей сложного состава.

Методика определения действующего вещества ГЛС антибактериального действия. Таблетки. Таблетку ГЛС (0,1–0,8 г) измельчали в ступке, отбирали 20–40 мг (точная навеска), растворяли в центрифужной пробирке в 10 мл подходящего растворителя (для ФХ использовали 0,1 М HCl; для СА, НФ, хлорамфеникола, метронидазола — ацетонитрил; для ПЦ — дистиллированную воду). Аликвоту 1 мл переносили в мерную колбу на 100 мл и растворяли в дистиллированной воде. **Растворы.** Жидкие лекарственные формы последовательно разбавляли дистиллированной водой до содержания определяемого вещества в интервале 0,5–20,0 мг/л. Полученный раствор центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и проводили электрофоретическое определение.

Выбор условий электрофоретического разделения. Поскольку анализируемые антибактериальные вещества в нейтральных и щелочных растворах образуют органические анионы (структурные формулы и константы кислотности приведены в табл. 1), для их разделения, идентификации и определения предпочтительно использовать метод КЗЭ. При выборе оптимального ведущего электролита для ФХ и СА исследовали возможность тетрабората натрия (рН 9,2) и фосфатного буферного раствора (рН 7,0–8,5). Большую селективность разделения смеси 11-ти антибиотиков обеспечивает применение 25 мМ фосфатного буферного раствора, но из-за его высокой электрической проводимости необходимо использовать капилляр с внутренним диаметром 50 мкм. При этом рН ведущего электролита как определяет селективность разделения пиков аналитов, так и оказывает влияние на площади и высоты

этих пиков. Поэтому оптимальным является ведущий электролит с рН 8,5, эффективность применения которого продемонстрирована на рис. 1.

Для смеси ПЦ КЗЭ-разделение является малоэффективным, поскольку часть антибиотиков имеет близкие значения pK_a (табл. 1). Применение МЭКХ привело к полному разделению смеси 6-ти ПЦ. Наличие в составе ведущего электролита α -ЦД не оказывает существенного влияния на электрофоретическое поведение аналитов. γ -ЦД, напротив, уменьшает селективность разделения пиков антибиотиков. Присутствие ацетонитрила и ТБА изменяет константы распределения ампициллина, амоксициллина и оксациллина между фазой раствора и мицеллярной фазой, что снижает эффективность их разделения. Оценено влияние концентрации мицеллообразователя на электрофоретическое поведение аналитов: увеличение содержания ДДС в ведущем электролите с 20 до 50 мМ приводит к уменьшению высоты пиков ПЦ. Высокую селективность разделения с сохранением необходимой чувствительности обеспечивает электролит, содержащий 30 мМ ДДС.

Сравнивая возможности тетрабората натрия и фосфатного буферного раствора (10 мМ), установлено, что применение последнего (рН 6,0–8,5) обеспечивает большую разрешающую способность пиков ПЦ, несколько уступая по эффективности разделения. На рис. 2 представлена зависимость эффективности разделения смеси 6-ти ПЦ от рН ведущего электролита: оптимальным является использование ведущего электролита, состоящего из 10 мМ фосфатного буферного раствора рН 7,0 и 30 мМ ДДС.

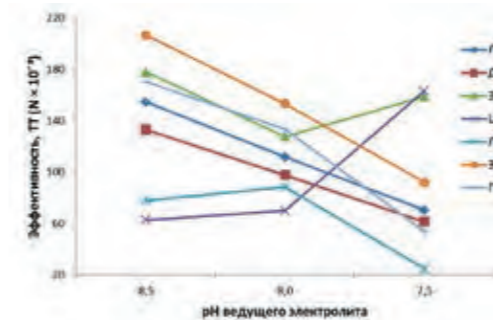


Рис. 1. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) ФХ от рН ведущего электролита (ЛМФ — ломефлоксацин, ДНФ — данофлоксацин, ЭНК — эноксацин, ЦПР — ципрофлоксацин, ЛВФ — левофлоксацин, ЭНР — энрофлоксацин, ПФЛ — пефлоксацин)

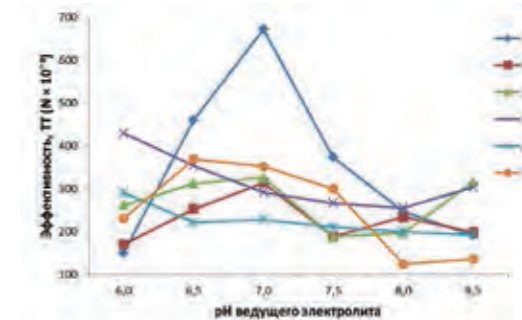


Рис. 2. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) ПЦ от рН ведущего электролита (концентрация ДДС 30 мМ) (АМО — амоксициллин, ОКС — оксациллин, АМП — ампициллин, КЛО — клоксациллин, ДКЛ — диклоксациллин, ПЕН — пенициллин G)

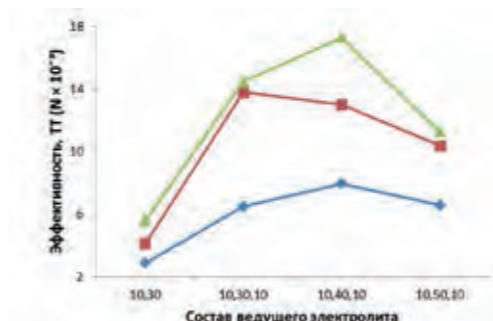


Рис. 3. Зависимость эффективности разделения (теоретические тарелки, ТТ) НФ от состава ведущего электролита (мМ тетрабората натрия, мМ ДДС, об.% ацетонитрила) (ФЗД — фуразолидон, НФЗ — нитрофуразон, ФТД — фуралтадон)

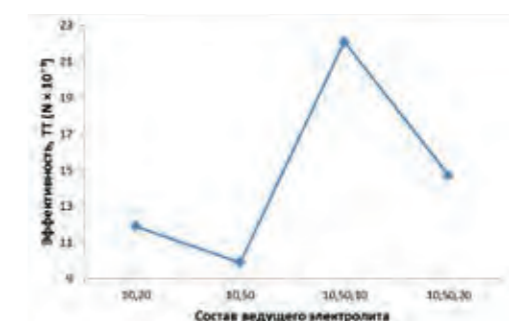


Рис. 4. Зависимость эффективности электромиграции (теоретические тарелки, ТТ) метронидазола от состава ведущего электролита (мМ тетрабората натрия, мМ ДДС, об.% ацетонитрила)

Таблица 1
Структурные формулы и константы кислотности анализируемых антибиотиков [12–18]

Ломефлоксацин гидрохлорид	Энрофлоксацин	Ципрофлоксацин	Эноксацин
 $pK_3(\text{COOH}) = 2,4$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,7$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,0$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,8$
Пефлоксацин	Данофлоксацин	Левифлоксацин	Сульфадиазин
 —*	 $pK_3(\text{COOH}) = 6,2$ $pK_3(\text{NH}^+) = 8,1$	 —*	 $pK_3 = 6,5$
Сульфамеразин	Сульфадиметоксин	Сульфалорпиразидин	Фуразолидон
 $pK_3 = 7,0$	 $pK_3 = 6,2$	 $pK_3 = 5,5$	 $pK_3 = 4,9$
Нитрофуразон (нитрофураг)	Ампициллин	Оксациллина моногидрат	Клоксациллина натриевая соль
 $pK_3 = 10,0$	 $pK_3(\text{COOH}) = 2,6$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,3$	 $pK_3 = 2,7$	 $pK_3 = 2,7$
Фуралтадон	Амоксициллин	Пенициллина G натриевая соль	Диклоксациллина натриевая соль гидрат
 $pK_3 = 5,0$	 $pK_3(\text{COOH}) = 2,6$ $pK_3(\text{NH}^+) = 7,3$ $pK_3(\text{ArOH}) = 9,7$	 —*	 $pK_3 = 2,7$
	Хлорамфеникол	Метронидазол	
	 —*	 $pK_3 = 2,4$	

* нет данных.

При разделении НФ использование КЗЭ не может быть эффективным, поскольку фуразолидон и фуралтадон имеют близкие значения pK_3 , а нитрофуразон — очень слабая органическая кислота (табл. 1). Применение ведущего электролита, состоящего из 10 мМ тетрабората натрия и 30 мМ ДДС, обеспечивает полное разделение смеси 3-х НФ. Дополнительное введение в его состав ЦД в качестве участников конкурирующих реакций с аналитами не оказывает влияния на эффективность разделения. Однако наличие органического растворителя — ацетонитрила (5–20 об.%) существенно повышает чувствительность определения, достигая максимальных значений при концентрации 10 об.%, что, с другой стороны, отрицательно сказывается на селективности (рис. 3). Дальнейшее изучение электрофоретического поведения НФ при различных составах фонового буферного раствора показало, что подходящим является электролит, состоящий из 10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС и 10 об. % ацетонитрила (табл. 2).

Метронидазол, являясь сильной кислотой (табл. 1), должен быть определен методом КЗЭ при использовании положительного источника высокого напряжения и ведущего электролита с $pH > 7$. Однако этого не наблюдали. Его идентификация и количественное определение возможны в условиях МЭКХ при использовании ДДС и ацетонитрила в качестве мицеллообразователя и модификатора электроосмотического потока. На рис. 4 показано влияние состава ведущего электролита на эффективность миграции метронидазола. Оптимальным является применение ведущего

электролита, состоящего из 10 мМ тетрабората натрия, 50 мМ ДДС, 10 об. % ацетонитрила.

Проводить определение хлорамфеникола можно методами КЗЭ и МЭКХ. При использовании МЭКХ результаты отличаются лучшей воспроизводимостью в отличие от КЗЭ-определения. Для анализа ГЛС, содержащих хлорамфеникол, применяли электролит, содержащий 10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС и 10 об. % ацетонитрила.

Оптимальные условия идентификации и количественного определения антибиотиков различных классов в ГЛС и электрофореграммы стандартных растворов приведены в табл. 2 и рис. 5, соответственно. В табл. 3 представлены аналитические характеристики разработанных методик анализа ГЛС. Диапазон определяемых содержаний антибиотиков составляет 1–2500 мг/г для твердых образцов и 0,001–0,50% для жидких ГЛС.

Подобранные в работе условия электрофоретического разделения антибиотиков использовали для установления подлинности лекарственных препаратов и анализа соответствия заявленного количества действующего вещества.

Времена миграции идентифицируемых антибиотиков соответствуют используемым стандартным препаратам, что говорит о подлинности данных лекарственных средств. В табл. 4 приведены полученные результаты количественного анализа ГЛС, согласно которым содержание действующего вещества части лекарственных препаратов не соответствует заявленной на этикетке информации.

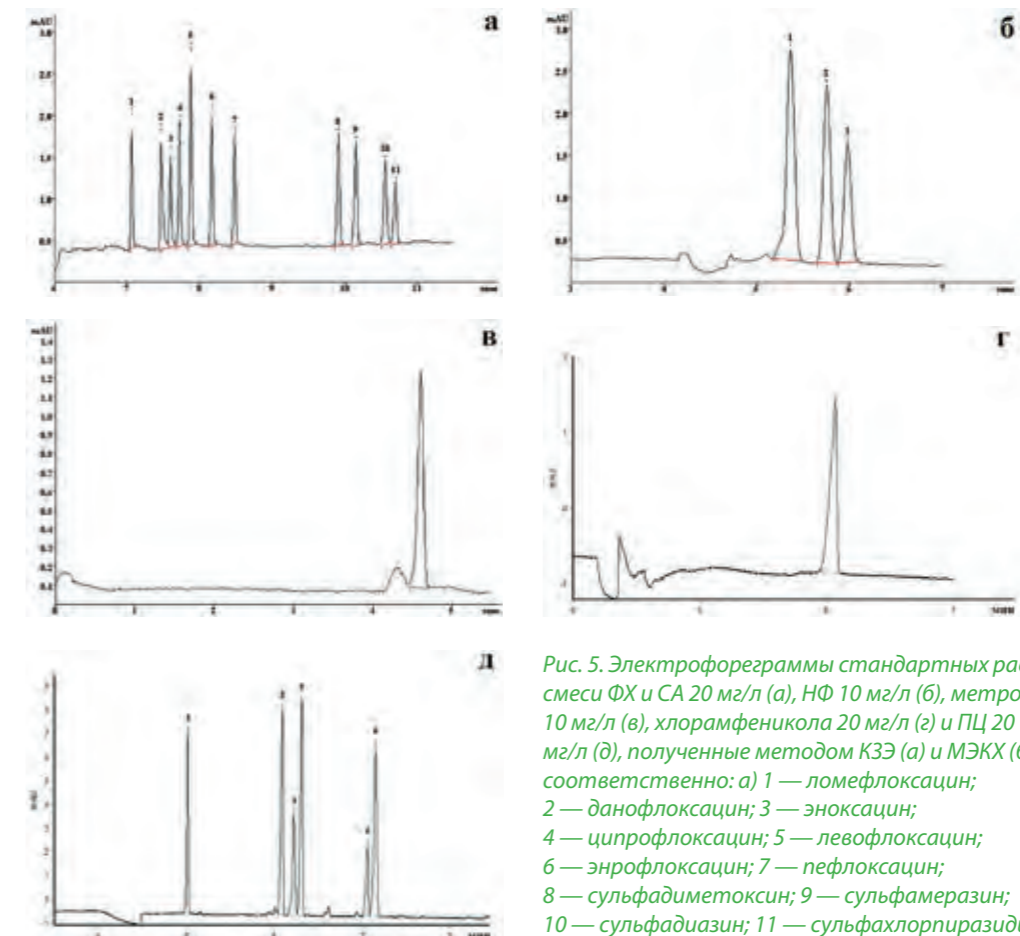


Рис. 5. Электрофореграммы стандартных растворов смеси ФХ и СА 20 мг/л (а), НФ 10 мг/л (б), метронидазола 10 мг/л (в), хлорамфеникола 20 мг/л (г) и ПЦ 20 мг/л (д), полученные методом КЗЭ (а) и МЭКХ (б–д) соответственно: а) 1 — ломефлоксацин; 2 — данофлоксацин; 3 — эноксацин; 4 — ципрофлоксацин; 5 — левофлоксацин; 6 — энрофлоксацин; 7 — пефлоксацин; 8 — сульфадиметоксин; 9 — сульфамеразин; 10 — сульфадиазин; 11 — сульфалорпиразидин; б) 1 — фуразолидон; 2 — нитрофуразон; в) метронидазол; г) хлорамфеникол; д) 1 — амоксициллин; 2 — оксациллин; 3 — пенициллин G; 4 — диклоксациллин

Таблица 2
Оптимальные условия электрофоретического разделения смесей антибиотиков различных классов

Смесь антибиотиков	Метод разделения	Условия разделения	Ведущий электролит
Ломефлоксацин, данофлоксацин, эноксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, энрофлоксацин, пефлоксацин, сульфадиметоксин, сульфамеразин, сульфадиазин, сульфаклорпиразидин	КЗЭ	капилляр 75 см × 50 мкм, 280 нм, 35 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	25 мМ фосфатного буферного раствора рН 8,5
Фуразолидон, нитрофуразон, фуралатдон	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 362 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Метронидазол	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 312 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 50 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Хлорамфеникол	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 220 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ тетрабората натрия, 40 мМ ДДС, 10 об.% ацетонитрила
Амоксициллин, оксациллин, ампициллин, клоксациллин, пенициллин G, диклоксациллин	МЭКХ	капилляр 60 см × 75 мкм, 210 нм, 20 °С, +25 кВ, ввод пробы 30 мбар × 10 с	10 мМ фосфатного буферного раствора рН 7,0, 30 мМ ДДС

Таблица 3
Аналитические характеристики методики определения ПЦ, ФХ, НФ, СА, метронидазола и хлорамфеникола в ГЛС методом КЭ

№ п/п	Антибиотик	Время миграции, мин.	Уравнение градуировочной характеристики	R ²	Диапазон определяемых содержаний, мг/г
Фторхинолоны и сульфаниламиды					
1	Ломефлоксацин	7,18 ± 0,19	y = 0.8714 x	0.9999	3–1500
2	Данофлоксацин	7,57 ± 0,23	y = 0.9560 x	0.9989	4–2000
3	Эноксацин	7,70 ± 0,21	y = 1.3590 x	0.9999	5–2000
4	Ципрофлоксацин	7,81 ± 0,23	y = 0.8662 x	0.9999	3–1500
5	Левофлоксацин	7,97 ± 0,24	y = 0.8463 x	0.9996	3–2000
6	Энрофлоксацин	8,30 ± 0,23	y = 0.8245 x	0.9999	4–2000
7	Пефлоксацин	8,63 ± 0,23	y = 0.9123 x	0.9998	4–1500
8	Сульфадиметоксин	9,97 ± 0,28	y = 0.7725 x	0.9997	4–2000
9	Сульфамеразин	10,16 ± 0,31	y = 0.7642 x	0.9998	5–2000
10	Сульфадиазин	10,54 ± 0,32	y = 1.0321 x	0.9997	6–2000
11	Сульфаклорпиразидин	10,66 ± 0,34	y = 1.4685 x	0.9997	10–2500
Нитрофураны					
12	Фуразолидон	5,17 ± 0,05	y = 0.1017 x	0.9999	2–1000
13	Нитрофуразон	5,50 ± 0,05	y = 0.1458 x	0.9999	2–1000
14	Фуралатдон	5,69 ± 0,05	y = 0.1971 x	0.9999	3–1500
Пенициллины					
15	Амоксициллин	5,01 ± 0,06	y = 0.2249 x	0.9997	2–2000
16	Оксациллин	6,09 ± 0,06	y = 0.1243 x	0.9999	1–2000
17	Ампициллин	6,22 ± 0,10	y = 0.1894 x	0.9999	2–1500
18	Клоксациллин	6,31 ± 0,11	y = 0.1169 x	0.9998	1–2000
19	Пенициллин G	7,06 ± 0,11	y = 0.3171 x	0.9998	4–2000
20	Диклоксациллин	7,15 ± 0,13	y = 0.1093 x	0.9998	1–2000
Метронидазол, хлорамфеникол					
21	Метронидазол	4,67 ± 0,04	y = 1.7626 x	0.9998	2–1000
22	Хлорамфеникол	6,04 ± 0,06	y = 0.3221 x	0.9999	4–2500

Таблица 4
Результаты анализа ГЛС коммерческого изготовления (n = 4, P = 0,95)

№ п/п	Обезличенный и закодированный образец ГЛС	Заявленное содержание действующего вещества, мг (%)	Установленное содержание действующего вещества, мг (%)	
			X _ф ± ΔX	S _r
1	Образец № 1	250	241 ± 14	0,02
2	Образец № 2	500	292 ± 17	0,02
3	Образец № 3	500	241 ± 9	0,01
4	Образец № 4	20	19 ± 1	0,02
5	Образец № 4 (просроч.)	20	22 ± 1	0,01
6	Образец № 5	250	211 ± 8	0,02
7	Образец № 6	(0,25)	0,18 ± 0,01	0,03
8	Образец № 7	(0,25)	0,11 ± 0,01	0,01
9	Образец № 8	500	377 ± 20	0,03
10	Образец № 9	50	34 ± 2	0,02
11	Образец № 10	5	5,7 ± 0,4	0,03
12	Образец № 11	250	285 ± 2	0,01
13	Образец № 12	500	532 ± 14	0,01
14	Образец № 13	250	246 ± 16	0,03

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментальные данные показывают возможность применения метода капиллярного электрофореза для идентификации и определения содержания антибиотиков в ГЛС с целью контроля качества фармацевтической продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. — Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. — 104 с.
- Amin A.S., El-Ansary A.L., Issa Y.M. Colorimetric determination of amoxicillin in pure form and in pharmaceutical preparations // Talanta. — 1994. — Vol. 41, № 5. — P. 691–694.
- El-Shabrawy Y. Fluorimetric determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceutical preparations and biological fluids // Spectroscopy Letters. — 2002. — Vol. 35, № 1. — P. 99–109.
- Emara K.M., Askal H.F., Saleh G.A. Spectrophotometric determination of tetracycline and oxytetracycline in pharmaceutical preparations // Talanta. — 1991. — Vol. 38, № 11. — P. 1219–1221.
- Jiang T.F., Lv Z.H., Wang Y.H. Separation and determination of nitrofurantoin antibiotics in turbot fish by microemulsion electrokinetic chromatography // Anal. Sci. — 2009. — Vol. 25. — P. 861–864.
- Khashaba P.Y. Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 27. — P. 923–932.
- Kothekar K. M., Jayakar B., Khandhar A. P. Quantitative determination of levofloxacin and ambroxol hydrochloride in pharmaceutical dosage form by reversed-phase high performance liquid chromatography // Eurasian J. Anal. Chem. — 2007. — Vol. 2. — P. 21–31.
- Liquid chromatography — tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review / M. Petrovic, M. D. Hernando, M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo // J. Chromatogr. A. — 2005. — Vol. 1067. — P. 1–14.
- Lu H., Wu X., Xie Z. Separation and determination of seven fluoroquinolones by pressurized capillary electrochromatography // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 2210–2217.
- Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis / C.E. Lin, W.C. Lin, Y.C. Chen, S.W. Wang // J. Chromatogr. A. — 1997. — Vol. 792. — P. 37–47.
- Monser L., Darghouth F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2000. — Vol. 23. — P. 353–362.
- Niessen W.M.A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography — mass spectrometry // J. Chromatogr. A. — 1998. — Vol. 812. — P. 53–75.
- Pajchel G., Pawłowski K., Tyski S. CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 29. — P. 75–81.
- Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β-lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations // Anal. Chim. Acta. — 2004. — Vol. 515. — P. 333–341.
- Samanidou V.F., Demetriou C.E. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 375. — P. 623–629.
- Schmitt-Kopplin P., Burhenne J., Freitag D. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase // J. Chromatogr. A. — 1999. — Vol. 837. — P. 253–265.
- Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / M. Lombardo-Agui, L. Gamiz-Gracia, A.M. Garcia-Campana, C. Cruces-Blanco // Anal. Bioanal. Chem. — 2010. — Vol. 396. — P. 1551–1557.
- <http://rupest.ru/ppdb/metronidazole.html>