

УДК 543.258

## КУЛОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕВОМИЦЕТИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

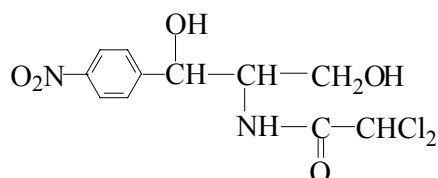
Г.К. Зиятдинова, А.И. Самигуллин, Г.К. Будников, С.Г. Абдуллина

### Аннотация

Найдены условия кулонометрического определения левомицетина. Установлено, что лишь восстановленная форма левомицетина взаимодействует с электрогенерированными хлором и бромом. Реакция протекает стехиометрично в соотношении 1 : 2 только с бромом. Разработан способ кулонометрического определения левомицетина в фармпрепаратах.

### Введение

Левомицетин (D(-)-трео-1-п-нитрофенил-2-дихлорацетатаминопропан-диол-1,3) является антибиотиком широкого спектра действия.



Левомицетин (хлорамфеникол)

Впервые как лекарственный препарат был получен из культуральной жидкости *Str. venezuelae*. В настоящее время производят путем химического синтеза.

Левомицетин эффективен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: к нему чувствительны эшерихии, сальмонеллы, пастереллы, стафилококки, стрептококки, диплококки, протеи и др. Действует на штаммы бактерий, устойчивые к пенициллинам, стрептомицину, сульфаниламидам. Активен против грамотрицательных анаэробов. Неэффективен в отношении кислотоустойчивых бактерий, клостридий и синегнойной палочки [1].

Устойчивость микроорганизмов к левомицетину развивается медленно, ступенчато. Перекрестная устойчивость к другим антибиотикам, как правило, не развивается, однако патогенные штаммы грамотрицательных бактерий, устойчивые к ампициллину, карбенициллину, тетрациклинам, стрептомицину, канамицину, гентамицину, чаще всего резистентны и к левомицетину.

В обычно применяемых дозах левомицетин действует бактериостатически, нарушая синтез белка микробной клеткой на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы. Действует на микроорганизмы, находящиеся

как в стадии размножения, так и в стадии покоя, однако по отношению к размножающимся микробам более эффективен. Препарат хорошо проникает в клетки макроорганизма и действует на внутриклеточно расположенных возбудителей [2].

Для количественного определения хлорамфеникола применяют различные физико-химические методы [3], и литература по этой проблеме достаточно обширна.

Разработан способ мембранного иммуноанализа для определения хлорамфеникола в водных растворах. Определение антибиотика может быть проведено полуколичественно (визуальная двухцветная детекция) или количественно в диапазоне концентраций 0.01–100 нг/мл (хемилюминесцентная детекция). Показаны преимущества хемилюминесцентной детекции по сравнению с колориметрической, заключающиеся в более низком пределе обнаружения (0.02 и 7 нг/мл хлорамфеникола соответственно) и более широком диапазоне определяемых концентраций [4].

Полярографический метод применен для определения левомицетина в фармацевтических препаратах (мазях, капсулах, глазных каплях, инъекционных растворах, суппозиториях). Применяя в качестве растворителя абсолютный спирт или уксусную кислоту, проводили прямое определение антибиотика без его предварительного экстрагирования. Метод основан на электрохимическом восстановлении спиртового раствора хлорамфеникола на фоне лимонной кислоты и гидроксида натрия с добавлением 1%-ного раствора желатины и соляной кислоты до pH 4.4 с последующим полярографированием исследуемого раствора (после продувания азота) от 0 до –0.86 В [5].

Предложен простой и быстрый способ определения хлорамфеникола в различных пищевых матрицах с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. D(5)-хлорамфеникол был использован в качестве внутреннего стандарта. Для извлечения хлорамфеникола из образцов мяса, морской еды, яиц, меда и молока использовали ацетонитрил. Для удаления воды добавляли хлороформ. После выпаривания сухой остаток растворяли в смеси метанол : вода (3 : 4) [6].

Разработана простая, точная и хорошо воспроизводимая методика определения хлорамфеникола в корме для рыб методом обращенно-фазной хроматографии. Хлорамфеникол извлекали из образца смесью вода : ацетонитрил. Часть отцентрифугированного экстракта пропускали через колонку Envi-Carb с твердой фазой. Методика позволяет количественно определять хлорамфеникол в диапазоне от 0.2 до 4.0 г/кг. Мера правильности составила 100.5% (относительное стандартное отклонение 1.2%). Пределы обнаружения и количественного определения равны 0.2 и 1.0 мг/кг соответственно [7].

Описан способ определения хлорамфеникола в креветках методом косвенного конкурентного хемилюминесцентного ферментного иммуноанализа (ic-CLEIA). Найдены оптимальные условия определения (время инкубации, концентрация Твин-20, pH). Пределы обнаружения составили 0.01 нг/мл, диапазон определяемых концентраций – 0.03–23.7 нг/мл, с ЛД<sub>50</sub> – 0.47 нг/мл [8].

Разработан способ определения остатков хлорамфеникола на поверхностях оборудования фармацевтической промышленности с применением тонкослой-

ной хроматографии с фотометрическим детектированием при 280 нм. Модельные растворы, содержащие 0.5, 1, и 1.2 мг/мл хлорамфеникола, готовили, нанося точно рассчитанное количество раствора хлорамфеникола на поверхности нержавеющей стали площадью 10 см<sup>2</sup>. После испарения растворителя остатки собирали 2-мя ватными тампонами, смоченными метанолом, а затем экстрагировали метанолом. Полученный экстракт анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Абсолютный предел обнаружения равен 3 нг и предел количественного определения – 10 нг [9].

Жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием применена для определения остаточных количеств хлорамфеникола в молоке, яйцах, мышцах и печени цыпленка, а также мышечной и почечной тканях говядины. Хлорамфеникол извлекали из образцов с помощью ацетонитрила и обезжиривали гексаном. После выпаривания остатки хлорамфеникола растворяли в 10 мМ ацетате аммония и вводили в систему жидкостной хроматографии. Хлорамфеникол определяли обращенно-фазной хроматографией с использованием колонки Inertsil ODS-2 и масс-спектрометрическим детектированием с электроаспылительной ионизацией отрицательных ионов. Градуировочные графики линейны в интервале 0.5 ÷ 5.0 нг/г для всех изученных образцов. Пределы обнаружения метода лежат в диапазоне 0.2 ÷ 0.6 нг/г, которые сопоставимы с имеющимися в литературе данными [10].

Предложен спектрофотометрический метод для определения левомецетина в препарате «Левовинизол» (извлечение левомецетина из состава с помощью соляной кислоты) [11].

Вольтамперометрия на углеродных волоконных микроэлектродах успешно применяется как метод определения хлорамфеникола в молоке. Градуировочные графики линейны ( $r = 0.9990$ ) в диапазоне концентраций от  $1.0 \cdot 10^{-7}$  до  $1.0 \cdot 10^{-5}$  М. Предел обнаружения равен  $4.7 \cdot 10^{-8}$  М [12].

Разработана методика определения хлорамфеникола в сыворотке крови человека методом капиллярного зонного электрофореза, используя колонку с амперометрическим детектированием с стеклоуглеродистым микродисковым электродом, при постоянном потенциале  $-1.00$  V (относительного насыщенного каломельного электрода). Изучено влияние кислорода на исследуемую систему. Установлено, что при площади стеклоуглеродного электрода менее  $1.1$  мм<sup>2</sup> влияние кислорода может быть устранено. Найдены рабочие условия определения. Градуировочный график линеен в диапазоне  $5 \cdot 10^{-6}$  ÷  $1 \cdot 10^{-3}$  М, предел обнаружения –  $9.1 \cdot 10^{-7}$  М [13].

Определение хлорамфеникола возможно проводить, используя проточно-инжекционный способ. Он основан на on-line контроле фотодеградации препарата в аммиачном буферном растворе с pH 10.4 в фотореакторе. Градуировочный график линеен, вплоть до 8 мг/мл хлорамфеникола; предел обнаружения – 0.05 мг/л, относительное стандартное отклонение – 0.4%. Предложенный метод использован для определения хлорамфеникола в коммерческих фармацевтических препаратах и моче человека [14].

Разработан способ электрохимического обнаружения хлорамфеникола в коре головного мозга крысы *in vivo* после внутривенной инъекции хлорамфеникола сукцината (170 мг/кг). Проведено классическое фармакокинетическое ис-

следование с применением ВЭЖХ для определения хлорамфеникола. Данные обоих методов (вольтамперометрии и ВЭЖХ) хорошо согласуются между собой [15].

Таким образом, чаще всего для определения левомицетина применяют хроматографические и спектрофотометрические методы, а также другие методы, в частности, электрохимические. Поэтому определенную перспективу представляет расширение возможностей последних, поскольку они являются доступными, чувствительными и экспрессными. Так, гальваностатическая кулонометрия с электрогенерированными титрантами является эффективным методом анализа органических биологически активных соединений различных классов.

Цель настоящей работы – изучить реакции левомицетина с электрогенерированными галогенами в условиях кулонометрии и разработать способ количественного определения левомицетина в лекарственных формах.

### 1. Экспериментальная часть

*Кулонометрическое определение.* Электрогенерацию галогенов осуществляли на потенциостате П-5827 М при постоянной силе тока 5.0 мА из водных 0.2 М растворов КСl и КВг в 0.1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и из 0.1 М раствора КI в тартратном буферном растворе с рН 3.56. Индикацию конечной точки титрования проводили амперометрически с двумя поляризованными платиновыми электродами ( $\Delta E = 300$  мВ). Рабочим электродом служила гладкая платиновая пластинка площадью 1 см<sup>2</sup>, вспомогательным электродом – платиновая спираль, отделенная полупроницаемой перегородкой от анодного пространства ячейки.

В кулонометрическую ячейку вносили 20.0 мл фонового раствора, опускали электроды, включали генераторную цепь и перемешивание. По достижении определенного значения индикаторного тока в ячейку вносили аликвоту исследуемого раствора (0.1–2.0 мл) и одновременно включали секундомер. Конечную точку титрования фиксировали по достижению первоначального значения индикаторного тока. При этом выключали секундомер и отключали генераторную цепь.

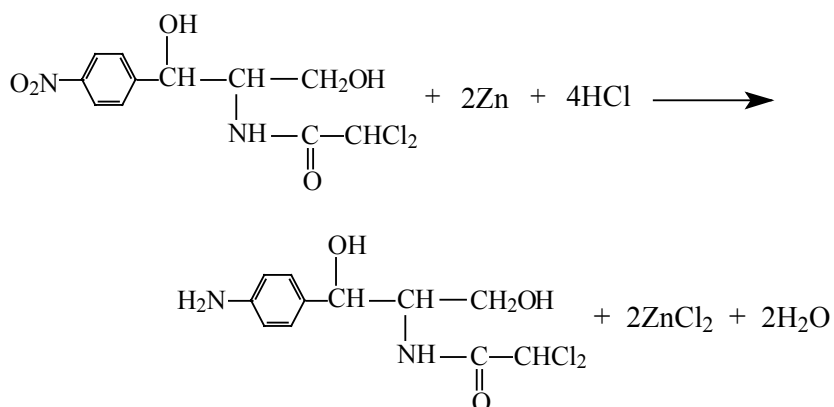
Массу вещества рассчитывали по формуле:

$$m = I \cdot t \cdot M / (n \cdot F),$$

где  $I$  – сила тока, А;  $t$  – время достижения конечной точки титрования, с;  $M$  – молярная масса вещества, г/моль;  $n$  – число электронов, участвующих в реакции;  $F$  – постоянная Фарадея, равная 96500 Кл/моль.

Стандартные растворы левомицетина готовили по точной навеске, растворяя 0.013 г в 1 М НСl в мерной колбе емкостью 50.0 мл.

Растворы восстановленного левомицетина готовили следующим образом. Навеску вещества или порошка растертых таблеток (0.5 г) помещали в коническую колбу емкостью 250 мл, добавляли 20 мл концентрированной НСl и осторожно, небольшими порциями, 5 г цинковой пыли. После чего добавляли еще 10 мл концентрированной НСl, обмывая стенки колбы. После полного растворения цинковой пыли полученный раствор использовали для последующего определения левомицетина:



*Методика количественного определения левомицетина в таблетках.* 10 таблеток, предварительно взвешенных, растирали в ступке. Около 0.02 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещали в колбу и готовили раствор восстановленного левомицетина, как описано выше. Затем аликвоту раствора (0.2 мл) вносили в кулонометрическую ячейку. Содержание левомицетина в таблетках в пересчете на окисленную форму рассчитывали по формуле:

$$m = I \cdot t \cdot M \cdot V_{\text{к}} \cdot m_{\text{табл}} / (n \cdot F \cdot V_{\text{ал}} \cdot a),$$

где  $V_{\text{к}}$  – объем колбы, мл;  $V_{\text{ал}}$  – объем аликвоты, мл;  $m_{\text{табл}}$  – средняя масса таблетки, г;  $a$  – масса навески порошка растертых таблеток, г.

*Методика определения левомицетина в глазных каплях.* Аликвоту препарата (5 мл) вносили в колбу, добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты и 10-кратный избыток цинковой пыли. Аликвоты полученного раствора восстановленного левомицетина вносили в ячейку для кулонометрического титрования.

Полученные результаты подвергались статистической обработке. При оценке результатов из  $n$  определений использовали значения среднего арифметического, стандартного отклонения  $S$  и относительного стандартного отклонения  $S_r$ , которые находили по известным формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}, \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}, \quad S_r = \frac{S}{\bar{X}}.$$

Для выбора доверительного интервала среднего значения полагали  $P = 0.95$ .

## 2. Результаты и обсуждение

Электрогенерированные галогены – хлор, бром и йод – были использованы для установления возможности количественного реагирования и стехиометрии реакций с левомицетином. Установлено, что левомицетин не взаимодействует с электрогенерированными галогенами в условиях гальваностатической кулонометрии. Поэтому все дальнейшие исследования проводили с восстановленной формой левомицетина.

Табл. 1

Результаты кулонометрического определения левомецитина в модельных растворах по реакции с электрогенерированным бромом ( $n = 5, P = 0.95$ )

Введено, мкг	Найдено, мкг	$S_r$
45	45 ± 2	0.04
90	87 ± 2	0.02
134	131 ± 3	0.02

Табл. 2

Результаты кулонометрического определения левомецитина в лекарственных формах с помощью электрогенерированного брома ( $n = 5, P = 0.95$ )

Лекарственный препарат	Содержание действующего вещества, г, %	Найдено, г, %	$S_r$
Левомецитин, таблетки	0.5 <sup>1</sup>	0.48 ± 0.02	0.03
	0.5 <sup>2</sup>	0.50 ± 0.04	0.06
Левомецитин, глазные капли	*0.25 <sup>1</sup>	*0.22 ± 0.01	0.05
	*0.25 <sup>3</sup>	*0.239 ± 0.009	0.03

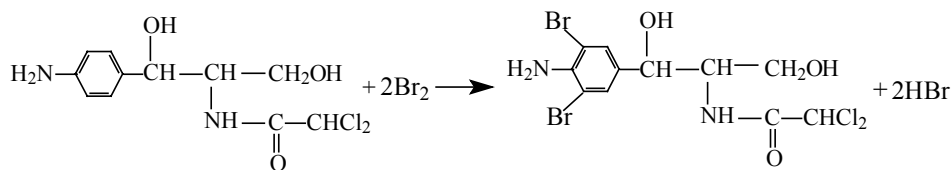
<sup>1</sup> ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань.

<sup>2</sup> ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», г. Томск.

<sup>3</sup> ЗАО «Фармацевтическая фирма ЛЕККО», п. Вольгинский.

Восстановленная форма левомецитина вступает в реакцию с электрогенерированными хлором и бромом. Электрогенерированный иод не взаимодействует с исследуемым соединением, вероятно, вследствие его меньшей реакционной способности. Необходимо отметить, что реакция с электрогенерированным хлором протекает нестехиометрично, вероятно, вследствие высокой реакционной способностью последнего, который может реагировать по нескольким направлениям.

Результаты кулонометрического титрования позволили установить, что восстановленный левомецитин взаимодействует с электрогенерированным бромом в соотношении 1 : 2. На основе литературных и полученных экспериментальных данных предложена схема взаимодействия восстановленного левомецитина с электрогенерированным бромом с образованием дибромпроизводного:



Результаты кулонометрического определения левомецитина в модельных растворах представлены в табл. 1. Правильность полученных результатов оценена по методу «введено-найденно».

Полученные данные позволили предложить способ количественного определения левомецитина в лекарственных формах (табл. 2). Установлено, что вспомогательные компоненты таблеточной массы и капельной основы не взаи-

модействуют с электрогенерированным бромом и не мешают определению действующего вещества.

Таким образом, разработана простая, чувствительная и экспрессная методика количественного определения левомицетина в лекарственных формах методом гальваностатической кулонометрии. Полученные результаты позволяют рекомендовать способ к внедрению в практику фармацевтических предприятий и центров контроля качества лекарственных средств.

### Summary

*G.K. Ziyatdinova, A.I. Samigullin, H.C. Budnikov, S.G. Abdullina.* Coulometric determination of levomycetin in pharmaceuticals.

The working conditions of levomycetin coulometric determination have been found. The reduced form of levomycetin reacts with electrogenerated chlorine and bromine. Reaction proceeds stoichiometrically in 1 : 2 ratio with bromine only. Method for coulometric determination of levomycetin in pharmaceutical dosage forms has been proposed.

### Литература

1. *Машковский Д.М.* Лекарственные средства. – Харьков: Торсинг, 1998. – Т. 1. – 624 с.
2. Регистр лекарственных средств России «Энциклопедия лекарств» / Под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: РЛС, 2002. – Вып. 9. – 1504 с.
3. *Максютина Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А.* Методы анализа лекарств. – Киев: Здоровье, 1984. – 221 с.
4. *Самсонова Ж.В., Рубцова М.Ю., Чикишева Л.В., Егоров А.М.* Мембранный иммуноанализ хлорамфеникола // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2002. – Т. 43, № 6. – С. 396–398.
5. *Мискиджьян С.П., Кравченко Л.П.* Полярография лекарственных препаратов. – Киев: Вища шк., 1976. – С. 217.
6. *Ronning H.T., Einarsen K., Asp T.N.* Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC // J. Chromatogr. A. – 2006. – V. 1118, No 2. – P. 226–233.
7. *Hayes J.M.* Determination of florfenicol in fish feed by liquid chromatography // J. AOAC Int. – 2005. – V. 88, No 6. – P. 1777–1783.
8. *Chuanlai X., Cifang P., Kai H., Zhengyu J., Wukang W.* Chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the determination of chloramphenicol residues in aquatic tissues // Luminescence. – 2006. – V. 21, No 2. – P. 126–128.
9. *Vovk I., Simonovska B.* Development and validation of a thin-layer chromatographic method for determination of chloramphenicol residues on pharmaceutical equipment surfaces // J. AOAC Int. – 2005. – V. 88, No 5. – P. 1555–1561.
10. *Penney L., Smith A., Coates B., Wijewickreme A.* Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry // J. AOAC Int. – 2005. – V. 88, No 2. – P. 645–653.
11. *Korchagin V.B., Satarova D.E., Kochetkova E.V., Mikailova S.M., Druzhinina E.N.* Determination of levomycetin in the aerosol preparation “Levovinyol” // Antibiotiki. – 1975. – V. 20, No 8. – P. 695–697.

12. *Agüi L., Guzmán A., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M.* Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 461, No 1. – P. 65–73.
13. *Wenrui J., Xiaoying Y., Daiqing Y., Qian D.* Measurement of chloramphenicol by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection at a carbon fiber micro-disk array electrode // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* – 2000. – V. 741, No 2. – P. 155–62.
14. *Bautista J.A.G., Mateo J.V.G., Calatayud J.M.* Flow injection biamperometric determination of chloramphenicol and related nitro compounds by on-line chemical photodegradation // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 404, No 1. – P. 141–150.
15. *Meulemans A., Henzel D., Brun-Pacaud M., Mohler J., Vicart P., Huy P.T.* On-line pharmacokinetics of chloramphenicol in rat cortex by in vivo electrochemical detection // *Chemotherapy.* – 1984. – V. 30, No 6. – P. 353–357.

Поступила в редакцию  
27.06.07

---

**Зиятдинова Гузель Камилевна** – кандидат химических наук, ассистент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Ziyatdinovag@mail.ru*

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*

**Абдуллина Светлана Геннадиевна** – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии Казанского государственного медицинского университета.

E-mail: *s.abdullina@mail.ru*

**Самигуллин Айдар Ильдусович** – студент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.