

Е. Г. Кулапина<sup>1</sup>, В. В. Барагузина<sup>1</sup>, О. И. Кулапина<sup>2</sup>**ИОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНТАМИЦИНА И КАНАМИЦИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ**<sup>1</sup> Саратовский государственный университет;<sup>2</sup> Саратовский государственный медицинский университет

В настоящее время аминогликозидные антибиотики занимают ведущее место в лечении тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний. Однако успешное применение этих препаратов из-за низкого терапевтического индекса возможно лишь при строгом контроле их концентраций в крови. Медленное выведение аминогликозидов может приводить к ото- и нефротоксическим эффектам [1, 2].

Практическая потребность в контроле за уровнем антибиотиков в крови стимулировала исследования по разработке методов определения аминогликозидов. Анализ литературных данных показал, что в основном количественное определение аминогликозидных антибиотиков проводится микробиологическими [3], спектроскопическими [4] и хроматографическими методами [5]. Электрохимическим методам определения антибиотиков аминогликозидного ряда посвящены единичные работы [6].

Настоящая работа посвящена разработке ионометрического способа определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах и биологических жидкостях.

*Экспериментальная часть*

В работе использовали сульфаты гентамицина (4 % - в ампулах) и канамицина (во флаконах). Исходные  $1 \cdot 10^{-2}$  М водные растворы готовили по точным навескам препаратов. Растворы  $1 \cdot 10^{-3}$  –  $1 \cdot 10^{-5}$  М получали последовательным разбавлением. В табл. 1 приведены названия, структурные формулы и некоторые характеристики используемых в работе веществ.

Электродноактивное вещество гентамицин-тетрафенилборат получали смешением эквимольных количеств растворов тетрафенилбората натрия (ТФБ) и раствора гентамицина сульфата ( $C_{\text{ТФБ}} = 10^{-2}$  М,  $V = 20$  мл;  $C_{\text{ген}} = 10^{-2}$  М,  $V = 20$  мл) при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отстаивали в течение трех суток, промывали декантацией дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С.

В работе использовались электроды с пластифицированными мембранами на основе ионного ассоциата гентамицина с тетрафенилборатом в соотношении ПВХ:ДФБ = 1:3;  $C_{\text{ЭАВ}} = 0,01$  моль/кг ДФБ. Конструктивно пленочные электроды с жидкостным заполнением представляли собой трубки из ПВХ, к тщательно отшлифованному торцу которых приклеивали ионоселективные мембранные диски, соответствующие диаметру трубки. Клей получали растворением 0,5 г ПВХ

в 5 мл тетрагидрофурана или циклогексанона. После высыхания клея внутри электродной трубки заливали стандартный раствор, состоящий из растворов соответствующего антибиотика ( $C = 10^{-3}$  М) и сульфата натрия ( $C = 10^{-3}$  М) в соотношении 1:1. Перед применением ИСЭ кондиционировали в  $10^{-3}$  М растворах соответствующего антибиотика.

Потенциометрические измерения проводили с использованием иономера И-130, погрешность измерения э.д.с.  $\pm 1$  мВ; электрод сравнения — хлоридсеребряный ЭВЛ — 1МЗ. Измерение рН проводили на иономере И 120,2 со стеклянным и хлоридсеребряным электродом.

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-46,  $l = 1$  см. В кварцевую кювету помещали 1 ампулу гентамицина сульфата (4 %-ный раствор) и измеряли оптическую плотность при  $\lambda = 220 - 340$  нм.

*Результаты и их обсуждение*

Для разработки методик ионометрического определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах и биологических жидкостях необходимо учитывать состояние антибиотиков в водных растворах. Проведенное в настоящей работе спектрофотометрическое исследование различных серий гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Ферейн) различных сроков хранения свидетельствует о различном составе исследуемых препаратов:  $\lambda_{\text{max}}$  находится в пределах 270 – 295 нм; оптическая плотность в максимуме колеблется от 0,3 до 0,9 (рис. 1). Растворы гентамицина сульфата имеют различную кислотность: рН 3,40 (Дальхимфарм, серия 3) — 4,64 (Ферейн, серия 1), которая увеличивается при хранении; оптическая плотность при этом возрастает (рис. 2, 3).

Авторами [7] методом ВЭЖХ также установлено, что различные серии гентамицина сульфата имеют различные содержания отдельных составляющих ( $C_1$ ,  $C_{1a}$ ,  $C_2$  и др.).

**Электроаналитические свойства ионоселективных электродов в растворах гентамицина и канамицина.** Зависимость э.д.с. от концентрации растворов гентамицина и канамицина выполняются в интервале  $1 \cdot 10^{-1}$  ( $1 \cdot 10^{-2}$ ) –  $1 \cdot 10^{-6}$  М (рис. 4). Коэффициенты электродных функций близки к теоретическим для двузарядных ионов и составляют  $26 \pm 2$  мВ/рС, что свидетельствует о переносе двузарядных ионов. Стабильность электроаналитических характеристик со-

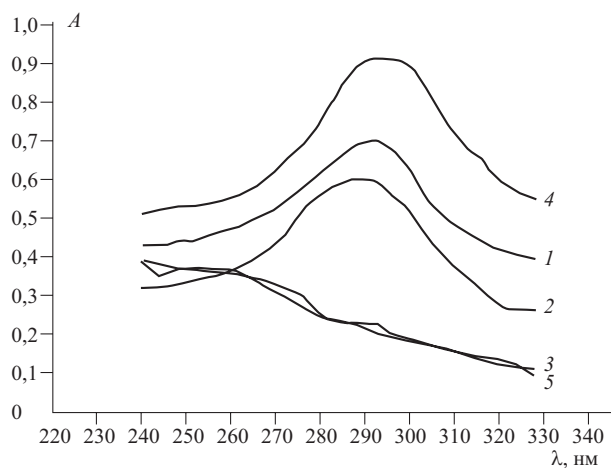


Рис. 1. Спектры светопоглощения растворов гентамицина различных серий: Дальхимфарм (1, 2, 3), Ферейн (4, 5)

храняется в течение 1,5 – 2 месяцев. Время установления стационарного потенциала около 2 мин, дрейф потенциала составляет 2 – 3 мВ/сут. Предел обнаружения для гентамицина и канамицина составляет  $8,6 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-5}$  М соответственно. Оптимальное значение рН — 5,5 – 6,0.

Коэффициенты потенциометрической селективности ( $K_{сел}$ ) электродов определялись по методу смешанных растворов.  $K_{сел}$  к канамицину при совместном присутствии с гентамицином близок к единице, что свидетельствует о возможности ионометрического определения индивидуальных антибиотиков или их суммарного содержания. Значения  $K_{сел}$  для неорганических ионов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  намного меньше единицы ( $n \cdot 10^{-2}$ ), что позволяет использовать электроды для определения антибиотиков в биологических жидкостях.

**Методика определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах.** Определение содержания антибиотиков в лекарственных препаратах проводили способом градуировочного графика. Исходный ( $1 \cdot 10^{-2}$  М) стандартный раствор гентамицина готовили разбавлением 2,3 мл 4 % ампульного раствора

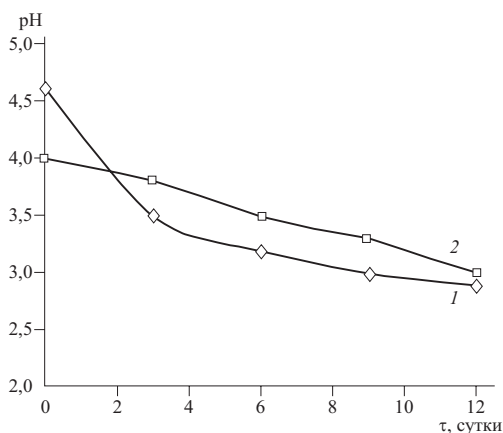


Рис. 2. Изменение рН растворов гентамицина от времени хранения (Ферейн — серии 1 и 2)

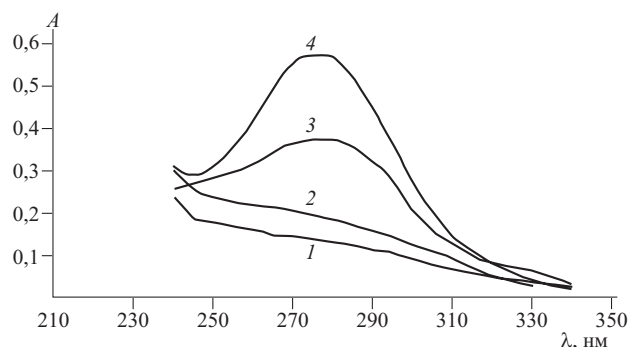


Рис. 3. Спектры светопоглощения растворов гентамицина сульфата при различной кислотности среды (Дальхимфарм, серия 2 рН 3,70 – 1; 3,00 – 2; 2,20 – 3; 2,00 – 4)

гентамицина, отвечающего требованиям фармакопейной статьи. Последовательным разбавлением исходного стандартного раствора в мерных колбах вместимостью 25 мл готовили серию стандартных растворов ( $1 \cdot 10^{-3}$  –  $1 \cdot 10^{-6}$  М) для калировки индикаторного электрода, к каждому раствору серии по каплям добавляли 0,1 М NaOH (рН  $6,0 \pm 0,1$ ). Измерение э.д.с. проводили в порядке возрастания концентраций лекарственного вещества. Градуировочные графики строили в координатах E, мВ — рС.

Навеску порошка гентамицина и канамицина (2,50 – 9,50 мг) переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили дистиллированной водой до метки. Аликвотную часть 5 мл переносили в мерную колбу на 25 мл, добавляли NaOH до рН 6,0 и измеряли э.д.с. Расчет содержания лекарственного вещества (г) проводили по формуле:

$$m = C_x \cdot M \cdot V,$$

где  $m$  — содержание лекарственного вещества, г;  $C_x$  — концентрация антибиотика, найденная по градуировочному графику, моль/л;  $M$  — молярная масса антибиотика, г/моль;  $V$  — объем разведения, л.

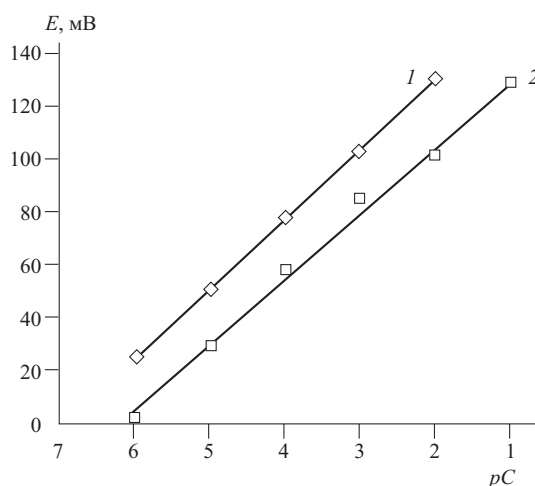
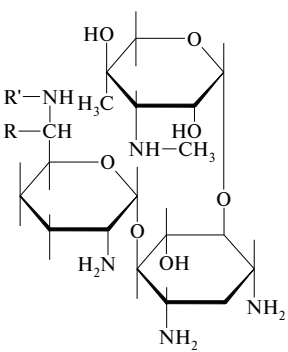
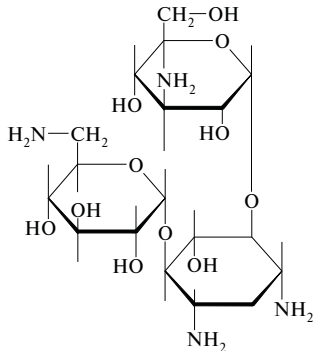
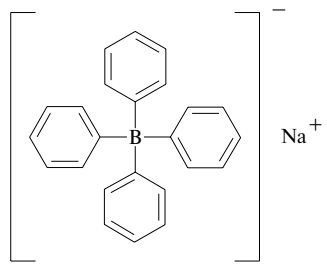


Рис. 4. Электродные функции ИСЭ в растворах гентамицина (1), канамицина (2)

## Названия и формулы используемых в работе веществ

Название вещества	Сокращение	Структурная формула	M, г/моль
Гентамицина сульфат	Gen		477
Канамицина сульфат	Kan		467
Тетрафенилборат натрия	ТФБ		342
Дибутилфталат	ДФБ	$C_6H_4(COOC_4H_9)_2$	278

Результаты определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах приведены в табл. 2.

**Методика определения содержания гентамицина и канамицина в сыворотке крови.** При использовании ИСЭ для определения антибиотиков в сыворотке крови больных ангинами и паратонзиллитами для

предотвращения белкового отравления электроды кондиционировались в донорской сыворотке крови в течение 15 – 20 мин.

Подготовка образцов сыворотки крови: образец крови объемом 4 – 5 мл, отобранной из локтевой вены, без добавления стабилизатора выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин. Надосадочную

Таблица 2

Результаты определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах (порошок) ( $n = 3, p = 0,95$ )

Определяемый антибиотик	Содержание действующего вещества, ( $m \pm \Delta m$ ), мг/г	Относительное стандартное отклонение, $S_r$
Гентамицин	$0,86 \pm 0,12$	0,06
	$0,79 \pm 0,17$	0,09
	$0,84 \pm 0,14$	0,07
Канамицин	$0,83 \pm 0,12$	0,03
	$0,76 \pm 0,05$	0,03
	$0,90 \pm 0,18$	0,08

Таблица 3

Концентрация гентамицина в сыворотке крови больных ангинами и паратонзиллитами ( $n = 3, p = 0,95$ )

Больной	Концентрация гентамицина, мкг/мл	$S_r$
1	$0,089 \pm 0,004$	0,01
2	$0,194 \pm 0,029$	0,05
3	$0,09 \pm 0,06$	0,04
4	$0,11 \pm 0,01$	0,04
5	$0,19 \pm 0,02$	0,04

жидкость (сыворотку крови) далее анализировали на содержание антибиотиков. Кровь для исследования у больных ангины и паратонзиллитами отбиралась дважды: при поступлении в стационар и на 5 – 6 день пребывания в клинике.

Определение содержания антибиотиков в биологических жидкостях проводили способом стандартных добавок (табл. 3). Для этого измеряли потенциал электрода в анализируемой сыворотке крови ( $V_x = 1 - 2$  мл) —  $E_1$ , затем в вводили добавку стандартного  $1 \cdot 10^{-2}$  М раствора антибиотика ( $V_\delta = 0,1 - 0,2$  мл), для изменения э.д.с. приблизительно на 20 – 30 мВ —  $E_2$ .

Концентрацию антибиотиков в анализируемом растворе рассчитывали по формуле:

$$C_x = \frac{V_\delta C_\delta}{V_x + V_\delta} \left( 10^{\frac{|E_1 - E_2|}{S}} - \frac{V_x}{V_\delta + V_x} \right)^{-1},$$

где  $C_x$  — концентрация определяемого антибиотика, моль/л;  $V_x$  — объем пробы, мл;  $C_\delta$  — концентрация добавки, М;  $V_\delta$  — объем добавки, мл;  $E_1, E_2$  — потенциал электродов в исследуемом растворе и в растворе с добавкой, соответственно, мВ;  $S$  — угол наклона электродной функции.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что препараты гентамицина различных производителей, серий не являются идентичными, необходимо проводить контроль их кислотности. Разработаны методики ионометрического определения гентамицина и канамицина в лекарственных формах и биологических жидкостях, которые отличаются экспрессностью, широким диапазоном определяемых содержаний, простотой аппаратного оформления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. М. Навашин, И. П. Фомина, Ю. О. Сазикин, *Антибиотики группы аминогликозидов*, Медицина, Москва (1977), с. 212.
2. Ю. Б. Белоусов, Е. А. Ушкалова, *Антибиотики и химиотерапия*, **46**(11), 23 – 35 (2001).
3. R. Evangelista and E. Schapoval, *Rev. Cienc. Farm.*, № 5, 17 – 20 (1983).
4. S. Sampath and D. Robinson, *J. Phar. Sci.*, **79**(5), 428 – 431 (1990).
5. O. Barends and J. Blauw, *J. Chromatogr.*, **322**(2), 321 – 331 (1985).
6. Е. В. Халдеева, Э. П. Медянцева, Н. А. Иманасва и др., *Журн. аналит. химии*, **57**(12), 1284 – 1289 (2002).
7. А. В. Выдрин, И. В. Шихалеев, В. Л. Махортов и др., *Хим-фарм. журн.*, **37**(8), 52 – 54 (2003).

Поступила 27.01.04