ВВЕДЕНИЕ

Для идентификации антибиотиков и их отнесения к той или иной группе антибактериальных препаратов служит ряд хроматографических методов. До недавнего времени наиболее распространенным методом была бумажная хроматография (восходящая, нисходящая, круговая, центрифужная, одно- и двумерная бумажная хроматография, хроматография на бумаге, пропитанной буферами, на ионообменной бумаге и т. п.), однако впоследствии широкое распространение получила также ТСХ (преимущественно на силикагеле или на оксиде алюминия), отличающаяся простотой аппаратурного оформления и высокой скоростью анализа . Чтобы придать сорбенту определенные свойства, его можно предварительно обработать соответствующим реагентом. Например, для разделения тетрациклинов, способных образовывать хелаты, Нишимото и др. использовали пластинки с силикагелем, пропитанным раствором динатриевой соли ЭДТА. Известны примеры хроматографическогоанализа антибиотиков на пластинках с целлюлозой, сефадексом и активным углем.

Для идентификации многих антибиотиков можно использовать также электрофорез и противоточное распределение. Что же касается разделения и идентификации антибиотиков с помощью ГЖХ то в последние годы этот метод в значительной степени заменен на ВЭЖХ, основные преимущества которой заключаются в том, что она обеспечивает высокую скорость и эффективность разделения и детектирование элюата не сопряжено с разрушением компонентов анализируемой смеси. Вместе с тем ВЭЖХ не лишена и некоторых недостатков: во-первых, при переходе от одного антибиотика к другому часто бывает необходимо менять систему растворителей и режим детектирования, и, во-вторых, ВЭЖХ в отличие от бумажной и тонкослойной хроматографии не позволяет одновременно анализировать несколько смесей.

Лишь для небольшого числа из тысяч известных антибиотиков разработаны системы классификации и идентификации. В работе на основании данных ТСХ и биоавтографии предложена классификация 151 антибиотика, обладающего противоопухолевой активностью; в работах для классификации 91 антибиотика использован метод «мгновенной ТСХ», а в работе рассмотрены вопросы, связанные с применением ТСХ-систем для классификации и идентификации антибиотиков. Существуют два справочника по хроматографии антибиотиков. В «Руководстве по хроматографии» приведены таблицы с данными по хроматографическим свойствам этих соединений. Описание ТСХ-методик можно найти в подробном обзоре Лотта и др.

Методы обнаружения антибиотиков на протяжении ряда лет практически не претерпели никаких изменений. Обычно они включают биоавтографию с помощью чувствительных к данному антибиотику микроорганизмов, посеянных на агаре, или проявление хроматограмм путем их опрыскивания растворами соответствующих реагентов с последующим просмотром при УФ-освещении. Для обнаружения антибиотиков наиболее пригоден метод биоавтографии, суть которого заключается в следующем. Высушенную бумажную хроматограмму, тонкослойную пластинпластинку или электрофореграмму прижимают к поверхности агара, содержащего культуру подходящего микроорганизма, и выдерживают в течение определенного времени. За время инкубации число бактерий увеличивается лишь в тех участках агара, которые не соприкасались с антибиотиком. По положению зон, в которых подавляется рост бактерий, определяют значения Rf соединений, проявляющих свойства антибиотика. Мейерс и Чанг предложили способ увеличения чувствительности обнаружения антибиотиков с помощью Trichomonas, основанный на использовании монофосфата фенолфталеина.

В этой курсовой работе мы не будем углубляться в вопросы, касающиеся препаративной хроматографии, а ограничимся лишь описанием методологии идентификации антибиотиков.

МЕТАБОЛИТЫ АКТИНОМИЦЕТОВ

Метод ТСХ применяли для выделения, очистки и идентификации различных продуктов метаболизма актиномицетов. Бек и др. приводят величины Rf для нонактина и некоторых его гомологов, полученные на силикагеле G со смесью хлороформ—этилацетат (1:2): нонактин 0,62, монактин 0,48, динактин 0,32 и тринактин 0,15. Бикель и др. установили значения Rf акумицина и ряда стандартных антибиотиков в трех различных растворителях на силикагеле G (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Величины Rf X 100 акумицина и стандартных антибиотиков группы макролидов, полученные на силикагеле G

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Антибиотики | Метанол | Хлороформ-метанол (95:5) | Хлороформ-метанол (1:1) |
| Акумицин  Анголамицин  Тилозин  Карбомицин  Форомацидин А  Форомацидин В  Форомацидин С  Эритромицин  Нарбомицин  Пикромицин  Ланкамицин | 66  65  68  75  32  34  37  16  22  22  74 | 35  18  7  40  2  5  6  3  12  7  37 | 82  82  81  88  59  61  64  29  41  36  87 |

Обнаружение пятен они проводили обработкой серной кислотой или методом биоавтографии. С этой целью на поверхность заряженного бактериями слоя агарового студня помещали слои фильтровальной бумаги, после чего к бумаге прижимали в течение примерно 20 мин пластинку размером 20X20 см с усилием около 2 кг. Слой агара инкубировали от 16 до 18 ч при 37 °С.

Кассани и др. описали хроматографический анализ актиномицина на силикагеле и оксиде алюминия. Отделить группу С от группы F можно на силикагеле с помощью ряда различных растворителей, среди которых лучшим оказалась смесь бутанол—уксусная кислота—вода (10 : 1 : 3); в этой смеси Rf для группы F равна 0,5, а для группы С — 0,7 при длине пути разделения 15 см. Отдельные соединения можно выделить на оксиде алюминия, проводя элюирование нижним слоем смеси растворителей этилацетат—симм-тетрахлорэтан—вода (3:1:3); при этом (длина пути разделения 12,5 см) получены следующие величины Rf : d — 0,44; С2 — 0,51; С3 — 0,58;" Fi — 0,21 и F2 — 0,35; эти соединения легко обнаружить по ярко-оранжевой окраске при наблюдении в УФ-свете.

Кондо и др. провели разделение водорастворимых основных антибиотиков, продуцируемых стрептомицинами на активном угле, используя четыре типа пластинок из нейтрального и подкисленного активного угля с гипсом в качестве связующего и без него. Лучшие результаты получены на подкисленном угле. Для незакрепленных слоев суспензию готовили, смешивая 10 г активного угля, 30 мл 0,5 н. соляной кислоты и 30 мл метанола. Для слоев, содержащих гипс в качестве связующего, добавляли 0,5 г гипса и серную кислоту заменяли на соляную. Исследовали шесть смесей; лучшие результаты получены для смеси метанол—0,5 н. кислота (1:4) с добавкой соляной или серной кислот в зависимости от того, какую из кислот использовали при приготовлении золя для тонкослойного покрытия. Таким методом антибиотики были разделены на 4 группы: стрептомицин, стрептотрицин, фрадиомицин и канамицин. Насбаумер и Шордере использовали тонкие слои силикагеля со смесями н-бутанол—вода—метанол (40 : 20 : 10) + n-толуолсульфокислота для идентификации стрептомицина и дигидрострептомицина.

Катаяма и Икеда разработали методику двумерного разделения стрептомицинов, сочетающую ТСХ на силикагеле и последующий электрофорез. Полного разделения всех компонентов удалось достичь методом ТСХ в четыре этапа, используя 1) насыщенный водой бутанол, содержащий по 2% п-толуол сульфокислоты и пиперидина (растворитель Si), с последующим электрофорезом в 1 %-ном тетраборате натрия; 2) ТСХ с 3 %-ным ацетатом натрия (растворитель S2) с последующим электрофорезом в 1 %-ном тетраборате натрия; 3) ТСХ с S2 с последующим электрофорезом в буфере Михаэлиса—Веронала, рН 8,0, и 4) ТСХ с S2 с последующим электрофорезом в 0,04 М буферном растворе формиата аммония, рН 3. Соединения обнаруживали реактивом Т-239.

Стрептомицин, дигидродезоксистрептомищин. и дигидростреп-томицин делили на силикагеле, элюируя 3 %- или 4 %-ным ацетатом натрия . Стрептомицин и другие туберкулостатиче-ские антибиотики (канамицин, виомицин, циклозерин, рифами-цин SV и капреомицин) разделяли вначале смесью ацетон— 2 %-ный ацетат натрия (9:1), а затем смесью н-бутанол—пиридин—метанол—уксусная кислота—вода (30 : 20: 20 : 1 :30) на силикагеле G.

Боровицкая делила стрептомицин, неомицин, канамицин, паромомицин, гентамицин, мицерин (форма неомицина), фрамицетин и линкомицин на слоях силикагель—кизельгур (1:2), применяя смесь метанол—этилацетат—вода— 25 %-ный аммиак—пиридин—3,85 %-ный ацетат аммония (10:2:6:2: 1 :20).

Келлер-Ширлайн и Ронкари исследовали гидролиз продуктов ланкамицина.

ЭРИТРОМИЦИНЫ

Андерсон разделял эти антибиотики на тонких слоях силикагеля, элюируя смесью метиленхлорид—метанол—бензол— формамид (80:20:20:2—5). Влажность атмосферы лаборатории определяет процентное содержание формамида в раство-. рителе. Чем выше влажность, тем меньше требуется формамида для разделения. Так, при 20 %-ной ОВ (относительная влажность) требуется 5 объемов формамида, а при 30—40 %-ной — 3—2 объема. Пятна обнаруживали опрыскиванием 10 %-ной фосфомолибденовой кислотой в этаноле или 50 %-ным раствором серной кислоты. В обоих случаях после опрыскивания пластинки нагревали на горячей плитке. Фосфомолибденовая кислота — более чувствительный реактив, но обработанные ею пятна обесцвечиваются через 1—2 ч, поэтому, если хромато-грамму нужно сохранить, следует предпочесть обугливание серной кислотой.

Мальчевска-Конецка и др. разделяли эритромицины А и С и ангидроэритромицин на силикагеле, используя верхний слой смеси этилацетат—изопропанол—15 %-ный ацетат аммония (9:7:8), рН которого доведен до 10,1. Обнаружение прово проводили смесью 0,15 %-ный раствор ксантидрола в смеси соляная кислота—уксусная кислота (12:1). Чувствительность определения составляла 0,05 мкг. Ричард и др. использовали смеси метанол — 0,02 н. ацетат натрия (4:1) на силикагеле G, приготовленном с 0,02 н. ацетатом натрия, для отделения эритромицина, эстолата эритромицина и этилсукцината эритромицина от некоторых продуктов разложения и фармацевтических сопутствующих продуктов. Эти же авторы определили Rf 23 других антибиотиков. Радецка и др. [26] применили прямой денситометрический метод для определения эритромицина и эстолата эритромицина в капсулах с теми же разделяющими средами. Обнаружение осуществляли реактивом Т-139. Точность данных колебалась от 2,1 до 3,4 % при чувствительности определения 5 мкг.

Майерс и Смит описали методику биоавтографического анализа на незакрепленных слоях эритромицина и других антибиотиков. После завершения разделения хроматограммы сушат и покрывают увлажненной фильтровальной бумагой, положенной на чистую стеклянную пластинку. Затем хроматографиче-скую пластинку переворачивают и края фильтровальной бумаги загибают назад, «а носитель слоя. Удалив .наружную стеклянную пластинку, прижимают бумагу, покрывающую слой, к зернистому слою агара (авторы приводят подробную методику приготовления такого слоя агара с использованием Streptococcus lactis) и выдерживают 2 ч при 37 °С.

Истербрук и Херсей разработали метод тонкослойного анализа эритромицина и его эфиров с Sarcina lutea ATCC 9341 в качестве организма для испытания. Площадь зоны торможения измеряли, проецируя изображение на экран при 12-кратном увеличении. Установлена линейная зависимость между логарифмом концентрации вещества и корнем квадратным из площади пятна. Чувствительность определения на слоях, нанесенных на алюминий, колеблется в пределах от 0,03 мкг для оснований и стеаратов и до 0,05 мкг для эстолатов. Системами разделения служили системы Ричарда и др. ; пластинки предварительно промывались.

ПЕНИЦИЛЛИНЫ

Насбаумер разделил пенициллины после кислотного гидролиза. Анализируя продукт разложения пенициллина, он исследовал влияние 40 различных компонентов на идентификацию пенициллияов методом ТСХ. Этот же автор изучил возможность спектрофотометрического определения пенициллинов в различных фармацевтических препаратах. Прямому анализу этих антибиотиков мешают полиэтиленгликоли и стеараты натрия, однако предварительное разделение методом ТСХ позволяет отделить пенициллины от мешающих анализу соединений. Слои для хроматографического разделения приготавливают так: смешивают 20 % рисового крахмала с силикагелем G в фосфатном буфере (рН 5,8). Элюирование проводят смесью бутилацетат—н-бутанол—уксусная кислота—фосфатный буфер (рН 5,8) — метанол (80 : 15 : 40 : 24 : 5).

Мак-Гильверей и Стрикленд разделили группу пенициллинов на слоях целлюлозы MN 300 и на слоях силикагеля G. Для разделения ампициллина и гетациллина на слоях силикагеля вполне пригодна также смесь ацетон—ускусная кислота. Эти системы не позволяют отделить диклоксациллин от нафциллина или фенициллин от феноксиметилпенициллина. Нафциллин можно обнаружить по интенсивной желтой окраске, которую он дает с 50 %-ной серной кислотой. Кроме нафциллина желтую окраску дает только метициллин, но у него другая величина Rf. Биаджи и др. исследовали влияние рН на разделение методом ТСХ с обращением фаз пенициллинов и сефалоспоринов. Экстраполированные величины RM для пенициллинов приведены в табл. 18.6. Аутергофф и Кинцлер делили пенициллины на силикагеле G, элюируя пробу смесью бензол—этилформиат— муравьиная кислота (80:15:6). Продукты расщепления окса-циллина и феноксиметилпенициллина были проанализированы хроматографически Корчагиным и сотрудниками . Вандамм и Фоетс использовали 4 следующие смеси растворителей при разделении продуктов спонтанного химического и ферментативного разложения пенициллинов и двух цефалоспоринов на силикагеле G: н-бутанол—вода—этанол—уксусная кислота (5:2:1,5:1,5), н-бутанол—вода—уксусная кислота (4:1:1), ацетон—уксусная кислота (19:1) и 85 %-ный ацетон.

Манни и др. применили метод измерения отражательной способности in situ для определения натрийпенициллина G в фармацевтических препаратах. После хроматографического разделения на силикагеле со смесью ацетон—хлороформ—уксусная кислота (10:9: 1) авторы измеряли отражательную способность пятен в области 230 нм. Стандартное отклонение составило 5% для зон, содержавших 1 мкг пробы, и 1,5% для зон, содержавших 10 мкг. Синсхаймер и др. определяли флуоресцентным методом in situ следы пенициллина. Бензил-пенициллин гидролизовали пенициллиназой, подвергали затем хроматографическому разделению на силикагеле G со смесью диметилформамид—хлороформ—28 %-ный аммиак (10:5:4) и измеряли при 510 нм интенсивность флуоресценции пятна с Rf 0,50 (длина волны возбуждающего излучения составляла 410 нм). Интенсивность флуоресценции пятен феноксиметил-пенициллина, полученного в результате гидролиза (Rf 0,88), измеряли в области 480 ом при длине волны возбуждающего излучения 260 нм. Метициллин гидролизовали и измеряли интенсивность флуоресценции пятна с Rf 0,73 при 480 нм при возбуждающем излучении 350 нм. Пределы чувствительности в перечисленных выше определениях равны 3, 0,76 и 0,12 мкг соответственно. Пенициллановую кислоту определяли методом флуоресцентной денситометрии пятна с Rf 0,45 при 440 нм с возбуждением при 350 нм. В этом случае после разделения на силикагеле смесью хлороформ—этилацетат—муравьиная кислота (60:40: 1) пластинку выдерживали 3 мин в парах аммиака, чтобы образовался флуоресцирующий продукт. Полуколичественное определение пенициллинов и продуктов их превращения проводили визуально, сравнивая размеры пятен и их окраску .

Цефалоспорин В и некоторые из его производных анализировали хроматографически на силикагеле G, используя смесь н-бутанол—уксусная кислота (10:1), насыщенную водой, а также смесь н-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода (17:12:4:15) . Для некоторых специфических соединений применяли различные комбинации ацетона с бензолом (1:4; 2 : 3) и толуолом (2:3; 1 : 4; 3 : 7; 1 : 9), а также толуола и этил-ацетата (1:1). Биаджи и др. разделили методом ТСХ с обращением фаз 13 цефалоспоринов. Разделение эти авторы проводили на силикагеле, пропитанном силиконом, применяя буферный раствор (рН 7,4) ацетат натрия—веронал, содержавший от 0 до 24 % ацетона. По полученным данным были рассчитаны величины RM. Бури хроматографировал цефалоспорин В, цефалотин и цефалоридин на слоях силикагеля, забуференных фосфатным буфером (рН 5,8), элюируя их смесью изопропанол – метанол – фосфатный буфер с рН 5,8 (2:7:1).

РИФАМИЦИНЫ

Эти антибиотики разделяли с помощью ряда спиртов и ацетона на слоях силикагеля G . Ацетон оказался лучшим растворителем; проводя элюирование ацетоном, удается отделить рифамицин В от рифамицина О, рифамицин SV от ри-фамицина S, а рифамицин В от рифамицина SV. Эти соединения интенсивно окрашены, и поэтому при достаточно высоких концентрациях их можно обнаружить на пластинках, не применяя реактив. Однако микробиологическим методом их можно обнаружить при гораздо более низких концентрациях. Для 2 — 20 мкг рифамицина и дезацетилрифамицина Колос и Эйдус приводят величины Rf (0,55 и 0,37 соответственно), полученные при хроматографировании смесью хлороформ—этанол—0,1 н. соляная кислота (84:15,9:0,1) на хроматографических полосах № 6060 фирмы Eastman. Меджи и др. провели хроматографический анализ группы полусинтетических рифамицинов на силикагеле с ацетоном.

ТЕТРАЦИКЛИНЫ

Николаус и др. исследовали также разделение тетрациклинов на тонких слоях силикагеля G. Они изучили большое число растворителей; четыре лучших растворителя указаны в табл. 1.2, там же даны соответствующие величины Rf. В дополнение к приведенным в таблице результатам следует указать, что окситетрациклин и диметилтетрациклин можно отделить от тетрациклина, хлортетрациклина и дезокситетрациклина, элюируя смесь 10 %-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным бутанолом. Обнаруживают тетрациклины, опрыскивая пластинки 1 н. соляной кислотой и затем нагревая их при 50 °С. Тетрациклины обнаруживают в виде желтых пятен. Для обнаружения дезокситетрациклина используют реакцию сочетания с солью диазония. При проведении микробиологической пробы агар заражают Bacterium subtilis.

Таблица 2.1

Величины Rf X 100 некоторых тетрациклинов, полученные с различными хроматографическими системами

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Соединение | Силикагель | | | | Кизельгур | | |
| А | Б | В | Г | Д | Е | Ж |
| Тетрациклин  Хлортетрациклин  Ангидротетрациклин  Окситетрациклин  Ангидрохлортетрациклин  Диметилхлортетрациклин  Метациклин  Доксициклин  4-Эпитетрациклин  Эпиангидротетрациклин  4-Эпихлортетрациклин | 36  30  0-20  58  0-20 | 38  43  45  41  46 | 61  72  68  70  75 | 50  60  50  55  52 | 53  76  93  60  83  73  44  53  20  47  33 | 36  60  83  20  57  44  29  27  12  50  21 | Ро  Ро  Ро  Ж  Ро  Ро  Ро-Ко  Ро-Ко  Ж  Ж-Ро  Ж-Ро |

Авторы работы разделяли тетрациклин, хлортетрациклин, диметилхлортетрациклин и их ангидро- и эпипроизводные на промытом кислотой кизельгуре G, пропитанном 20 %-ным раствором полиэтиленоксидгликоля 400 в смеси глицерин — 0,1 М ЭДТА при рН 7 (1 : 19). Разделяющим растворителем был органический слой смеси этилацетат — 0,1 М ЭДТА, рН 7 (6:1). При рассмотрении пластинок в длинноволновом УФ-свете можно обнаружить 0,05 мкг антибиотика. В работе описана методика разделения тетрациклинов и продуктов их превращения на кизельгуре, пропитанном ЭДТА; величины Rf и применявшиеся растворители указаны в табл. 1.2.

Количественное определение ангидротетрациклинов в разложившихся таблетках тетрациклина проводили, экстрагируя зоны ТСХ и измеряя коэффициент поглощения при 428 нм . При определении эпитетрациклина и хлортетрациклина зону первого соскребали, элюировали 0,1 н. соляной кислотой и измеряли поглощение элюента при 356 нм. Хлортетрациклин после элюирования 0,2 н. гидроксидом натрия измеряли по интенсивности флуоресценции в области 414 нм (длина возбуждающего излучения 356 нм). Радека и Вильсон проводили определение тетрациклина в фармацевтических препаратах in situ. Хотя этот метод менее точен, чем спектрофотометрический метод Альварца Фернандеца и др., он более чувствителен, требует меньше времени и более точен, чем официальные микробиологические методы. Ван Хоек и др. разработали для этой группы соединений флуорометрический метод определения in situ.

ПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

Полимиксиновые антибиотики представляют собой пептиды очень близкого строения. Кроме аминокислот в их молекулу входят жирные кислоты. Иглой и др.разделяли поли-миксины В, D и М на силикагеле G, используя смесь ацетон— вода—уксусная кислота—2 н. гидроксид аммония (15:5:1:2). Полимиксин Е (колистин) не удается отделить от полимик-сина В. Хоулетт и Зельцер разработали метод дифференциации этих двух соединений: пробу гидролизуют 5 н. соляной кислотой в запаянной трубке 6 ч при 120°С и определяют аминокислотный состав хроматографически в камере с насыщенной атмосферой на слое силикагеля MNG, используя раствор 68 мг иодида калия в 84 мл 90 %-ного фенола и 16 мл воды. Нингид-риновая проба позволяет обнаружить L-2,4-диаминомасляную кислоту, L-треонин, фенилаланин и лейцин в пробе полимиксина В, в то же время при хроматографировании колистина пятно фенилаланина обнаружено не было. Хамерс и Моерлуз предпочитают проводить 22-часовой гидролиз при ПО "С, чтобы избежать появления ложных пятен.

Хиномициновые антибиотики — это пептидные лактоны с хи-ноксалиновым кольцом, отличающиеся друг от друга только своей N-метиламинокислотной долей. Шой подвергал хро-матографическому разделению соединения А, В, Во, С, D и Е методом круговой хроматографии на оксиде алюминия, применяя нижнюю фракцию смеси этилацетат—1,1,2,2-тетрахлор-этан—вода (3:1:3). Таким способом удалось разделить все компоненты, кроме В и Во. Хроматографирование проводили на флуоресцентном слое и рассматривали пластинки в УФ-свете.

Штудер и др. при определении строения энниатина В синтезировали ряд циклических пептидов с активностью антибиотиков. В смеси бензол—эфир—метанол (17:2: 1) на силикагеле энниатины А и В характеризуются Rf 0,39.

ПОЛИЕНОВЫЕ МАКРОЛИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

Икекава и др. разделили шесть полиенов на силикасиликагеле G, используя смесь н-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1), и получили при этом следующие величины Rf. нистатин 0,18; пимарицин 0,34; унамицин А 0,36; амфотерицин А 0,33; пентамицин 0,67 и трихомицин 0,17. Бержи и Эбле разделили на силикагеле HF, забуференном смесью 0,2 М ди-гидрофосфат калия—0,2 М гидрофосфат натрия (1:1), элюи-руя пробу смесью метиленхлорид—мета«ол (17:3). Выделенные компоненты характеризуются следующими величинами Rf. I 0,8; II 0,7; III 0,6; IV 0,5. Охаб разделил на силикагеле трихомицин, фумагиллин, натамицин, нистатин, амфотерицин А и амфотерицин В. Лучшие результаты дают смеси этанол— аммиак—вода—диоксан (8:1:1:1) и н-бутанол—пиридин— вода (3:2: 1). Мартин и Мак-Даниел разделили комплекс кандигексина на силикагеле G на пять компонентов со следующими величинами Rf. А 0,26; В 0,29; D 0,36; Е 0,39 и F о',43. Комплекс кандидина удалось разделить на две фракции с Rf 0,27 (А) и 0,32 (В). Третий компонент с Rf 0,36, о наличии которого в сырых препаратах кандидина сообщили Боровский и др., в очищенных препаратах обнаружить не удалось. Элюирование проводилось нижней фракцией смеси хлороформ— метанол—20 %-ный гидроксид аммония (2:2:1). Количественное разделение достигается денситометрированием in situ кандигексина при 340 нм и кандидина при 360 нм.

РАЗЛИЧНЫЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Берд и Стевенс использовали ТСХ для выявления примесей в нитрофуразоне — синтетическом антибактериальном соединении. При хроматографировании на силикагеле G смесью бензол—ацетон Rf нитрофуразона составляет 0,23. Одна из примесей, 5-нитро-2-фуральдазин, перемещается с фронтом растворителя, Rj другой примеси равен 0,65.

Маер и Шафнер исследовали антибиотики методом ТСХ на силикагеле со смесью хлороформ—метанол—28 %-ный гидроксид аммония—вода (1:4:2:1), дополнив ТСХ при определении некоторых ацетилпроизводных хроматографированием на бумаге. В результате эти авторы показали, что в данный комплекс входит 16 антибиотиков. Вагман и др. выделили из этого комплекса четыре примесных компонента. Вильсон и др. осуществили хроматографическое разделение в этой же системе некоторых примесных компонентов.

Патулин, фурапираноновый антибиотик, выделенный из ряда грибов, был подвергнут хроматографическому анализу с применением большого числа растворителей. Скотт и Кеннеди разработали количественный метод обнаружения этого антибиотика в яблочном соке, основанный на установлении минимально определимой флуоресценции, когда слой силикагеля опрыскивают 0,5%-ным раствором 3-метил-2-бензотиазолингидразона и нагревают 15 мин при 130°С.

Фишер и Ригельман] разработали флуоресцентный метод определения in situ гризеофульвина и его 4'-спиртовых производных в плазме. Разделение проводили на силикагеле, содержавшем 6,7 % коллоидного оксида алюминия (бемит) (Du Pont); элюентом служила смесь безводных эфира и ацетона (3: 2). Антибиотики экстрагировали из плазмы эфиром. Каднер и др. использовали смесь силикагель G—нейтральный оксид алюминия с активностью I (30:2); после разделения соединения элюировали и измеряли интенсивность флуоресценции при 385 нм при длине возбуждающего излучения 365 нм.

Бержи и Эбле [92] разделили комплексы филипина на четыре фракции: филипин II, филипин III, филипин IV и комплекс филипина I; последняя фракия представляет собой смесь по крайней мере пяти компонентов. Разделение проводили на силикагеле HF, забуференном смесью 0,2М растворов одно- и двузамещенного фосфата натрия, с применением смеси метиленхлорид—метанол (17:3). Перечисленным фракциям соответствуют следующие величины Rf: 0,7; 0,6; 0,5 и 0,8.

Нифимицин удалось разделить на четыре компонента Ai и А2, Bi и В2 методом двойного элюирования смесью этилацетат—этанол—вода (150:45:28) на слоях силикагеля GF. Вариамицин анализировали на слоях кремневой кислоты, применяя смесь метанол—хлороформ (9:1). Количественное определение проводят, измеряя коэффициент поглощения элюата при 280 нм. Клиндамицин и его метаболиты сульфоксид-клиндамицин, N-деметилклиндамицин и сульфоксид-N-деметил-клиндамицин хроматографировали на листах со слоем силикагеля 6061 (фирма Eastman) смесью ацетон—метилэтилкетон— вода (20,1:72,1:7,8). Пятна обнаруживали и детектировали методом биоавтографии. Азалос и др. приводят перечень микроорганизмов для детектирования 84 антибиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кашкин П.Н., Безбородов А.М. Антибиотики.Ленинградское отделение: «Медицина». 1970.-375с.
2. Кирхнер Ю.Тонкослойная хроматография т.1.М.: «МИР» 1981.-616с.