



УДК 543:615.33

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕФЕПИМА В ВОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Е. Г. Кулапина¹, О. И. Кулапина², В. А. Каренко¹

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

²Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

E-mail: kulapinaeg@mail.ru

Разработаны потенциометрические сенсоры на основе органического ионообменника цефепим-тетрафенилборат, чувствительные к цефепиму. Установлен оптимальный состав мембран. Исследованы поверхностные и объемные свойства мембран сенсоров. По стационарным сопротивлениям оценена константа диссоциации электродноактивного компонента в фазе мембраны. Показана возможность ионометрического определения цефепима в водных и биологических средах.

Ключевые слова: цефепим, потенциометрические сенсоры, водные и биологические среды.

Potentiometric Sensors for Determination of Cefepime in Water and Biological Environments

E. G. Kulapina, O. I. Kulapina, V. A. Karenko

Potentiometric cefepime sensors based on an organic ion-exchanger such as cefepime with tetraphenylborate are developed. The optimum membrane composition is established. The surface and volume properties of membranes are investigated. The constant of dissociation of the ion-exchanger in a membrane phase is calculated by stationary resistance. Potentiometric determination of cefepime in water and biological environments is present.

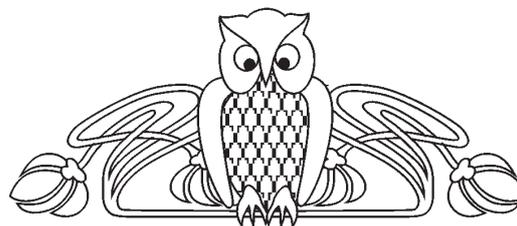
Key words: cefepime, potentiometric sensors, water and biological environments.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-138-143

Введение

С момента открытия цефалоспоринов – одного из наиболее популярных классов антибиотиков – прошло чуть более 65 лет. За эти годы они по праву заняли достойное место в арсенале средств борьбы человека с инфекциями [1].

Основа всех цефалоспоринов представлена дигидротиазолидиновым кольцом, соединенным с β -лактамным кольцом. Синтезировано более 50 лекарственных средств этой группы. В схемах начальной эмпирической терапии инфекций различной локализации в большинстве случаев отдается предпочтение лекарственным средствам цефалоспоринового ряда, поскольку они имеют широкий спектр антимикробной активности, хорошие фармакокинетические характеристики, низкую токсичность и хорошую переносимость, хорошо сочетаются с другими антибактериаль-



ными лекарственными средствами, удобны в применении и дозировании.

Цефалоспорины IV поколения относятся к высокоэффективным антибиотикам с биполярной структурой. Цефемовое ядро этих антибиотиков несет отрицательный заряд, четвертичный азот циклопентопиридиновой группы – положительный заряд, что придает молекуле структуру цвиттер-иона [2].

Цефалоспорины IV поколения (цефепим и цефпиром) имеют наиболее широкий спектр активности среди цефалоспоринов. Они являются парентеральными лекарственными средствами, частично противостоят гидролизу плазмидными β -лактамазами [3, 4].

Важное свойство цефепима заключается в том, что он часто сохраняет активность даже в отношении штаммов, резистентных к цефалоспорином III поколения. Цефепим является парентеральным лекарственным средством, проявляет высокую активность в отношении неферментирующих микроорганизмов, действует на грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы, способен быстро поступать внутрь микробной клетки [3, 4].

Несмотря на все достоинства цефалоспориновых антибиотиков IV поколения, авторами [5] опубликован обзор, в котором продемонстрировано увеличение смертности больных с нейтропенической лихорадкой при лечении цефепимом по сравнению с терапией другими β -лактамными антибиотиками. Установлено увеличение смертности больных с инфекциями разных локализаций при лечении цефепимом на 26 % по сравнению с терапией другими β -лактамными антибиотиками [6].

Представляется разумным воздерживаться от использования цефепима при нейтропенической лихорадке и, по-видимому, при инфекциях кожи и мягких тканей, в то время как этот антибиотик остается действенным средством лечения больных с пневмониями и инфекциями других локализаций как в виде монотерапии, так и, при



необходимости, в сочетании с другими антибиотиками (например, метронидазолом) [1].

Для определения цефалоспориновых антибиотиков в различных лекарственных препаратах, фармацевтических составах, в биосредах используются электрохимические, спектроскопические, хроматографические, микробиологические, иммунологические методы, капиллярный электрофорез [7, 8].

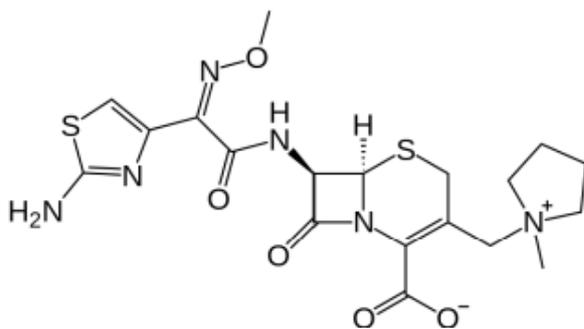
Одним из перспективных методов определения антибиотиков в фармацевтических формах и биологических жидкостях является прямая потенциометрия и потенциометрическое титрование с использованием различных сенсоров [7, 8].

Предложены ионоселективные электроды на основе органических ионообменников; в качестве противоиона использовался тетрадециламмоний. Определены основные электрохимические характеристики потенциометрических сенсоров: интервал линейности, время отклика электрода, дрейф потенциала, предел обнаружения, коэффициенты потенциометрической селективности. Показана возможность применения предложенных сенсоров для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков в фармацевтических формах и биологических субстратах (кровь, плазма, смешанная слюна); предел обнаружения 10^{-6} М [7].

Настоящее исследование посвящено разработке нового потенциометрического сенсора с пластифицированной мембраной, чувствительного к цефепиму, оценке его электроаналитических характеристик в водных средах и ротовой жидкости.

Экспериментальная часть

Цефепим. *Коммерческое название препарата:* «Цефепим»; *фирма-производитель:* «Линкольн Парентеральс», Индия; *форма выпуска:* порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения; *состав:* 1 флакон содержит цефепима гидрохлорида в пересчете на цефепим – 1 г.



Раствор цефепима $1 \cdot 10^{-2}$ М концентрации готовили растворением навески препарата $m = 0,1200$ г в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 25 мл. Рабочие растворы концентрацией $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-6}$ М готовили последовательным разбавлением исходных.

Исследуемые мембраны содержали в качестве инертной матрицы поливинилхлорид, растворитель-пластификатор (дибутилфталат) и электродноактивный компонент цефепим-тетрафенилборат (cefep-TФБ). С учетом сложности состояния цефепима необходимо было создать кислотность, при которой цефепим существует в виде катиона ($\text{pH} = 2$), поэтому синтез электродноактивного компонента (ЭАК) проводили из кислого раствора. Получали ЭАК смешением 50 мл 0,01 М ТФБ, 50 мл 0,01 М раствора цефепима и 5 мл 0,1 М HCl в стеклянном стакане. Осадок выпадал в течение 1 суток. Затем осадок центрифугировали и высушивали в сушильном шкафу при температуре 30°C в течение 2–3 часов.

Попытки синтезировать соединение цефепим-катионы тетраалкиламмония не привели к положительным результатам, так как в щелочной и нейтральной средах цефепим существует в виде цвиттер-иона [9].

Приготовление пластифицированных мембран осуществляли по следующей методике: навески ЭАК и растворителя-пластификатора дибутилфталата (ДФБ) помещали в бюкс, затем при перемешивании на магнитной мешалке прибавляли 1,5 мл тетрагидрофурана (ТГФ) и постепенно – навеску поливинилхлорида (ПВХ). Перемешивание продолжали до полной гомогенизации смеси (соотношение ПВХ: ДФБ по массе равно 1:3). Полученную мембранную композицию выливали в чашку Петри и оставляли на воздухе до полного удаления ТГФ на строго горизонтальной поверхности для получения мембраны одинаковой толщины. Мембраны имели вид эластичных пленок и хранились над парами растворителя-пластификатора. Изготовлены серии мембран с концентрацией ЭАК 1–5%. В работе использовались электроды с пластифицированными мембранами с жидкостным заполнением.

К отшлифованному торцу поливинилхлоридной трубки приклеивали селективные мембранные диски, диаметр которых соответствовал диаметру трубки. Клей получали растворением 0,5 г ПВХ и 0,25 г ДФБ в 5 мл ТГФ. После высыхания клея внутрь трубки заливали 1,5 мл стандартного $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора хлорида натрия и 1,5 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора цефепима (соотношение по объему 1:1).



Подготовка электродов к работе. Ионоселективные электроды требуют предварительного кондиционирования, так как отклик некондиционированных электродов замедлен и плохо воспроизводим. Перед работой электроды кондиционировали в 10^{-3} М растворе антибиотика в течение суток.

Электрохимические характеристики изучали методом ЭДС с использованием элемента с переносом:

$\text{Ag, AgCl, KCl}_{\text{нас}}/\text{исслед.раствор}/\text{мембрана}/\text{внутр.раствор}/\text{AgCl, Ag}$

Контакт между полуэлементами осуществляли с помощью солевого мостика, заполненного насыщенным раствором хлорида калия.

ЭДС цепи измеряли на иономере И-160 М при температуре $20 \pm 3^\circ \text{C}$ (погрешность измерения ЭДС ± 1 мВ); электрод сравнения – стандартный хлоридсеребряный ЭВМ-1МЗ. Измерения ЭДС в анализируемых растворах проводили от меньшей концентрации к большей. Для ускорения достижения значения потенциала внешний раствор перемешивали на магнитной мешалке.

Время установления стационарного потенциала электродов проводили при скачкообразном изменении концентраций лекарственных веществ на порядок. Измерения проводили в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ М от растворов с меньшей концентрацией к растворам с большей концентрацией.

Контроль pH растворов проводили на рН-метре рХ 150 мП со стеклянным (ЭСЛ-63-07) и хлоридсеребряным (ЭВМ-1МЗ) электродами.

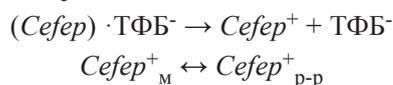
Произведение растворимости (K_s) определяли методом потенциометрического титрования. Точку эквивалентности находили графически.

Для исследования объемных свойств мембран под током была использована четырехэлектродная система, состоящая из пары платиновых (токопроводящих) и пары хлоридсеребряных (региструемых) электродов. Измерения проводились в гальваностатическом режиме при силе тока 5 мкА в течение 3 часов. Направление тока поляризации изменялось каждый час. При этом оценивалось падение напряжения на мембране при прохождении через ячейку постоянного тока и электрическое сопротивление мембран, контактирующих с раствором цефепима различных концентраций.

Результаты и их обсуждение

Электродные функции сенсоров выполняются в растворах цефепима в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$ М с угловыми

коэффициентами (52 ± 4) мВ/рС. Потенциалопределяющей является реакция ионного обмена на границе раздела мембрана – раствор с предварительной диссоциацией ионообменника в фазе мембраны:



При проведении серийных анализов важным фактором, определяющим возможность применения ИСЭ, является время отклика на изменение концентрации раствора. Показано, что стационарное значение потенциала сенсоров на основе *Cefep*-ТФБ с $C_{\text{ЭАК}} = 1,3,5\%$ устанавливается соответственно через 100, 80, 60 с ($C_{\text{cefep}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М, $1 \cdot 10^{-3}$ М).

Коэффициенты потенциометрической селективности, определенные методом бионных потенциалов, по отношению к некоторым цефалоспориновым антибиотикам оказались равными $6,2 \cdot 10^{-2}$ (цефотаксим, цефуроксим); $6,9 \cdot 10^{-2}$ (цефалексин).

Дрейф потенциала составил 2–4 мВ/сут. Как правило, дрейф потенциала ИСЭ обусловлен изменением в структуре поверхности электрода и растворением ионообменника в исследуемом растворе.

Для определения **срока службы** снимались электродные функции сенсора на основе *Cefep*-ТФБ ($C_{\text{ЭАК}} = 3\%$) в свежеприготовленных растворах цефепима на протяжении длительного времени и по изменению угла наклона электродной функции судили о чувствительности данного электрода к антибиотику. Срок службы сенсоров составил 2–3 мес.

Оценены некоторые физико-химические характеристики электродноактивных компонентов в водных средах и фазе мембраны. Стехиометрическое соотношение компонентов и растворимость ионных ассоциатов определяли методом потенциометрического титрования $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора ТФБ $1 \cdot 10^{-2}$ М раствором цефепима и $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора цефепима $1 \cdot 10^{-2}$ М раствором ТФБ. В качестве индикаторного электрода использовался сенсор на основе *Cefep*-ТФБ ($C_{\text{ЭАК}} = 3\%$). Пример кривой потенциометрического титрования представлен на рис. 1.

Соотношение реагирующих компонентов в органическом ионообменнике оказалось равным 1:1.

Для оценки величины произведения растворимости (K_s) ионного ассоциата использован подход потенциометрического титрования по реакции осаждения с использованием электрода,

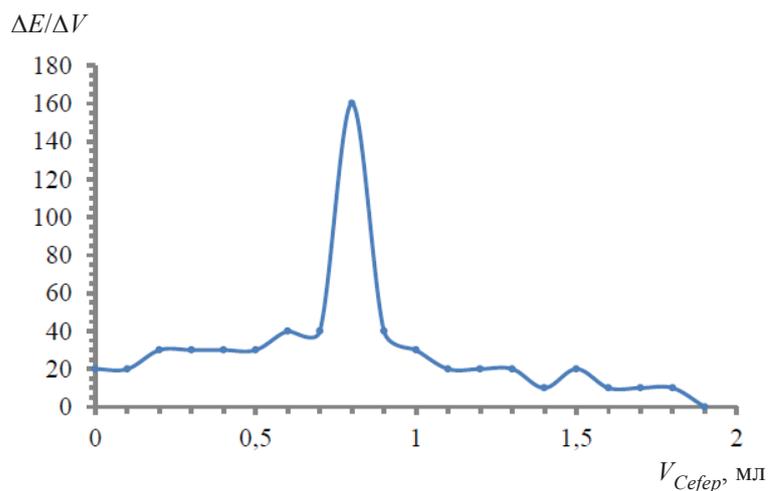


Рис. 1. Дифференциальная кривая титрования 10 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора ТФБ $1 \cdot 10^{-2}$ М раствором цефепима

обратимого к титруемому иону и с учетом того, что электрод сохраняет функцию на титруемый ион после точки эквивалентности [10]. Величину K_s труднорастворимых соединений рассчитывали по формуле

$$K_s = 10^{\frac{E-E_0}{S}} \cdot \frac{C_{\text{тит.}}(V_2 - V_{\text{к.т.т.}})}{V_1 - V_2},$$

где E – значение потенциала, найденное по кривой титрования после к.т.т., мВ; E_0 – начальная величина потенциала при $V_{\text{ант.}} = 0$, мВ; S – угловой коэффициент электродной функции, мВ/рС; V_1 – объем аликвоты, взятой для титрования, мл; V_2 – объем титранта после к.т.т.; $V_{\text{к.т.т.}}$ – объем титранта в к.т.т., мл; C – концентрация титранта, моль/л.

Произведение растворимости оказалось равным $(9,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$.

С целью получения некоторых данных о транспорте ионов в мембранах на основе *Cefep*-ТФБ была определена зависимость сопротивления мембран от времени при различных концентрациях электродноактивного компонента. Электрическое сопротивление мембраны определяли по закону Ома:

$$R = U/I, \text{ Ом},$$

где U – падение напряжения на мембране, В; I – сила тока, А.

Временные зависимости сопротивления мембран на основе *Cefep*-ТФБ представлены на рис. 2.

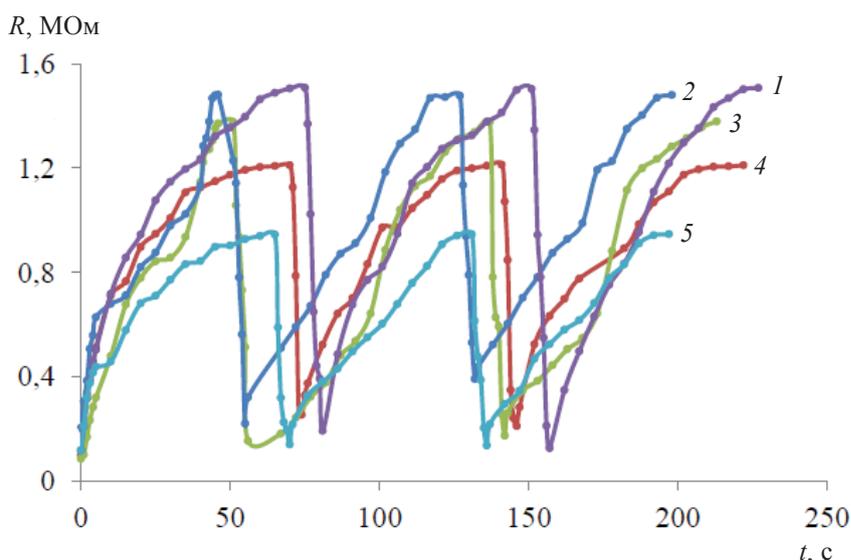


Рис. 2. Зависимость сопротивления мембран от времени при смене полярности в $1 \cdot 10^{-3}$ М растворе цефепима; цифры на кривых соответствуют концентрации ЭАК



При увеличении концентрации электро-одноактивных компонентов, стационарное сопротивление мембран уменьшается, что связано с увеличением концентрации ионообменных центров в фазе мембраны (рис. 3).

По величинам стационарного сопротивления графическим методом Краусса–Брея [11] рассчитывали кажущиеся константы диссоциации электро-одноактивных соединений в фазе мембраны. При этом полагали, что равновесие между ионами и ассоциатами при низких концентрациях подчиняется закону разбавления Оствальда: $K_d = a^2c / (1 - a^2)$, где c – общая молярная концентрация соединения, a – степень

диссоциации [12]. Выражая a через относительную эквивалентную электропроводность λ/λ_0 (λ – эквивалентная электропроводность, λ_0 – предельная электропроводность), получаем следующее выражение для константы диссоциации: $K_d = c\lambda^2 / (\lambda_0^2(1 - \lambda/\lambda_0))$. Константу диссоциации мембранноактивных компонентов оценивали с помощью метода Фуосса–Крусса, преобразуя последнее выражение как $1/\lambda = 1/\lambda_0 + (\lambda c) / K_d \lambda_0^2$ [12]. Рассчитанная таким образом кажущаяся константа диссоциации органического ионообменника *Cefep-TФБ* в мембранной фазе оказалась равной $(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$.

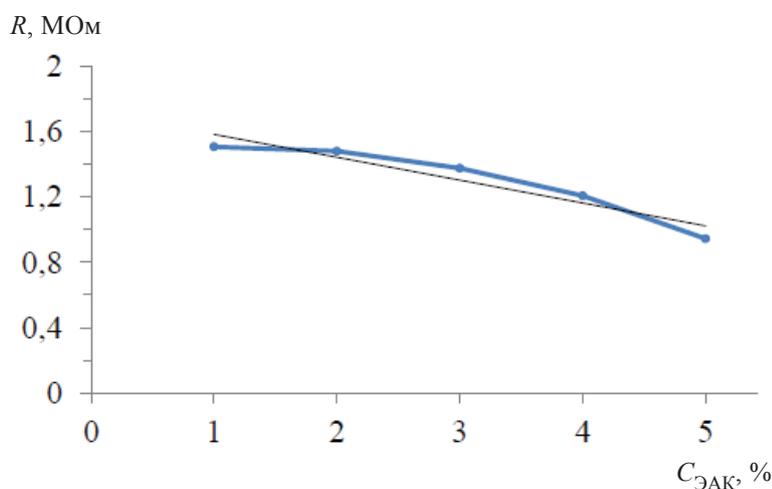


Рис. 3. Зависимость стационарного сопротивления мембран на основе *Cefep-TФБ* от концентрации электро-одноактивного компонента в мембране

Исследованы также зависимости сопротивления мембраны от времени при смене поляр-

ности при различной концентрации цефепима (рис. 4).

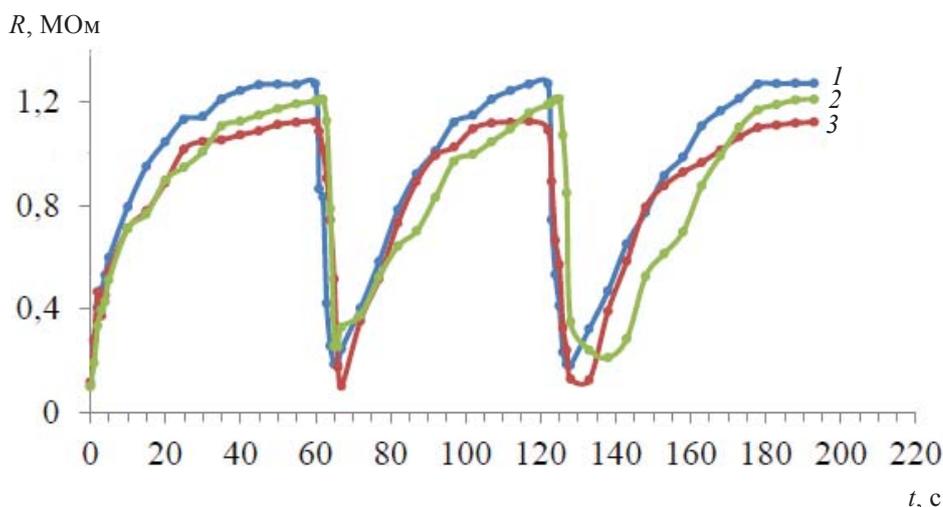


Рис. 4. Зависимость сопротивления мембраны на основе *Cefep-TФБ* от времени при различной концентрации цефепима, М: $1 \cdot 10^{-4}$ (1); $1 \cdot 10^{-3}$ (2); $1 \cdot 10^{-2}$ (3); $C_{ЭАК} = 4\%$



Стационарное сопротивление мембран уменьшается с возрастанием концентрации цефепима в примембранных растворах, что свидетельствует о проникновении антибиотика в среду мембран (рис. 5).

Поведение сенсора на основе Cefep-TФБ на фоне ЖРП

Пробоподготовка жидкости ротовой полости (ЖРП). Сбор ЖРП производили не ранее, чем через 15 мин после еды, перед сбором

рекомендуется прополоскать ротовую полость. В чистые полиэтиленовые пробирки собирали ЖРП, центрифугировали ее в течение 10 мин, при скорости 3500 об/мин для осаждения белков. Надосадочную жидкость отбирали в ячейку (3–5 мл), погружали индикаторный и хлоридсеребряный электроды и при перемешивании измеряли величину ЭДС. Предварительно индикаторный электрод кондиционировали в ЖРП без антибиотика.

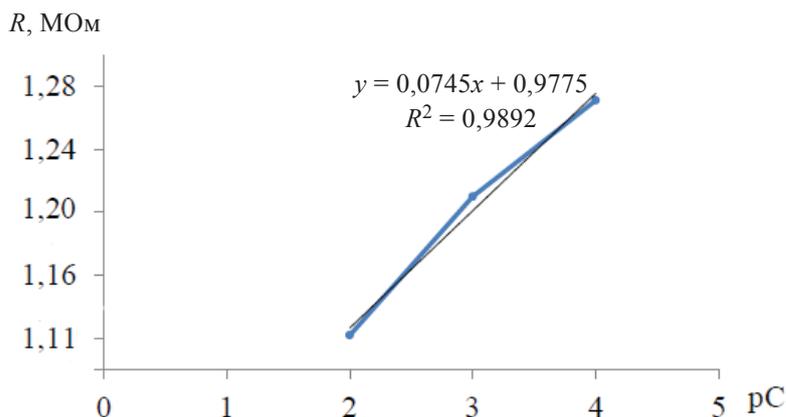


Рис. 5. Зависимость стационарного сопротивления мембраны на основе Cefep-TФБ с от концентрации растворов цефепима. $C_{ЭАК} = 4\%$

Интервал линейности электродной функции составил $1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$ М, при этом уменьшается угловой коэффициент, что свидетельствует о белковом отравлении поверхности сенсора.

Проведено определение цефепима на фоне ЖРП в модельных растворах; относительная погрешность составляет 8–10%.

Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности (базовая часть) по заданию № 4.121.22.2014/к, шифр «Флуорофор».

Список литературы

1. Березняков И. Г. Цефепим сегодня и завтра // *Болезни и антибиотики*. 2011. Т. 5, № 2. С. 95–103.
2. Яковлев С. В. Цефепим – цефалоспориновый антибиотик IV поколения // *Антибиотики и химиотерапия*. 1999. № 7. С. 32–37.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М. : Наука, 2004. 528 с.
4. Богомолова Н. С., Орешкина Т. Д., Большаков Л. В. Перспективы использования цефалоспоринового антибиотика четвертого поколения в хирургии // *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. Т. 48, № 7. С. 20–22.
5. Paul M., Yahav D., Fraser A., Leibovici L. Empirical antibiotic monotherapy for febrile neutropenia : systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. Vol. 57. P. 89–176.
6. Yahav D., Paul M., Fraser A., Sarid N, Leibovici L. Efficacy and safety of cefepime : a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* 2007. Vol. 7. P. 48–338.
7. Кулапина Е. Г., Снесарев С. В., Кулапина О. И., Баринава О. В. Некоторые проблемы обеспечения избирательности и чувствительности определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах // *Проблемы аналитической химии* : в 20 т. Т. 16. Фармацевтический анализ. М. : Аргамак-Медиа. 2013. С. 326–361.
8. Кулапина О. И., Кулапина Е. Г. Антибактериальная терапия. Современные методы определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах. Саратов : Сарат. источник, 2015. 91 с.
9. Алексеев В. Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь : Твер. гос. ун-т, 2009. 104 с.
10. Марьянов Б. М. Методы линеаризации в инструментальной титриметрии. Томск : Изд-во Томск. ун-та, 2001. 154 с.
11. Фиалков Ю. Я., Житомирский А. Н., Тарасенко Ю. А. Физическая химия неводных растворов. Л. : Химия, Ленингр. отд-ние, 1973. 376 с.
12. Кулапина Е. Г., Барагузина В. В., Кулапина О. И., Чернов Д. В. Электрохимические свойства мембран на основе ассоциатов β -лактамных антибиотиков с тетрадециламмонием // *Электрохимия*. 2005. Т. 41, № 8. С. 981–986.