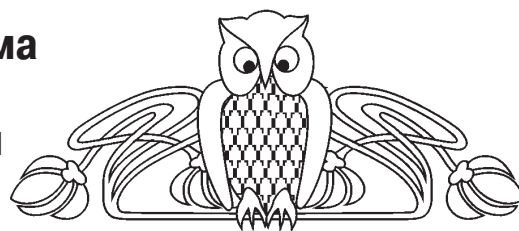




УДК 543:615.33

Исследование поведения цефиксима в водных и биологических средах спектрофотометрическим методом

Е. Г. Кулапина, О. И. Кулапина, В. Д. Анкина



Кулапина Елена Григорьевна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, kulapinaeg@mail.ru

Кулапина Ольга Ивановна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры детских болезней лечебного факультета, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, olgakulapina@mail.ru

Анкина Влада Денисовна, студент лечебного факультета, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, vlada.ankina@mail.ru

Проведено исследование поведения цефиксима в биосредах спектрофотометрическим методом. Показано, что максимум светопоглощения цефиксима на фоне ротовой жидкости наблюдается при $\lambda = 292$ нм, для сыворотки крови – при $\lambda = 289$ нм. Интервал линейной зависимости оптическая плотность – концентрация цефиксима составляет 3–50 мкг/мл. Выявлены оптимальные условия осаждения белков в исследуемых биосредах. Показано, что наблюдается корреляция между максимальной длиной волны (λ_{max} , нм) и оптической плотностью (A_{max}) для спектров поглощения цефиксима на фоне сыворотки крови (с дополнительным осаждением белков) и ротовой жидкости (с осаждением белков), т. е. поведение антибиотика в исследуемых биосредах аналогичное, что свидетельствует о возможности определения цефиксима в ротовой жидкости больных. Для оценки возможности применения спектрофотометрического определения цефиксима в лекарственных препаратах исследовано поведение цефиксима в водных средах. Определены диапазоны линейности и предел обнаружения антибиотика. Выявлено влияние кислотности среды на спектроскопические характеристики цефиксима. Установлено, что водные растворы антибиотика имеют различную кислотность pH 2,90–5,04 в зависимости от концентрации 10–50 мкг/мл. Показана возможность спектрофотометрического определения цефиксима в водных и биологических средах.

Ключевые слова: цефиксим, водные среды, ротовая жидкость, сыворотка крови, спектрофотометрия.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-1-10-15>

Введение

Антибиотики – вещества, которые продуцируются микроорганизмами и подавляют рост других микроорганизмов или уничтожают их. Некоторые антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение

бактерий, при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма и поэтому применяются в качестве лекарственных средств. В настоящее время антибиотики являются препаратами, наиболее широко используемыми в клинической практике для лечения больных с различными инфекционными процессами [1].

Бета-лактамы (β-лактамы) – самая большая группа антимикробных препаратов, которая составляет 25% от общего числа антибактериальных препаратов. Эта группа включает множество наименований, объединенных наличием в их химической структуре β-лактамного кольца, отвечающего за антимикробную активность; при разрушении β-лактамного кольца антимикробная активность препарата теряется. Основные особенности и преимущества перед другими группами лекарственных средств связаны со способностью этих препаратов подавлять рост возбудителей инфекций без серьезного побочного воздействия на организм больного [2].

Большую часть β-лактамных антибиотиков составляют пенициллины и цефалоспорины. В основном это препараты для парентерального применения, которые в настоящее время занимают ведущее место при лечении различных инфекций в стационаре. Цефиксим является полусинтетическим цефалоспорином III поколения для перорального применения, обладает широким спектром действия. Цефиксим действует бактерицидно, угнетая синтез клеточной мембраны, устойчив к действию β-лактамаз, продуцируемых большинством грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Для определения цефиксима в лекарственных препаратах используется спектрофотометрия [3], кинетическая спектрофотометрия [4], спектрофлуоресценция [5], циклическая и квадратно-волновая вольтамперометрия [6, 7]. Практически не описано определение цефиксима в биосредах. В литературе имеются сведения об определении лекарственных препаратов в крови и слюне [8].

Настоящая работа посвящена исследованию поведения цефиксима в водных средах, в смешанной слюне (жидкости ротовой полости –



ЖРП) и сыворотке крови практически здоровых людей спектрофотометрическим методом, установлению корреляции содержания цефиксима в исследуемых биосредах.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были выбраны смешанная слюна (жидкость ротовой полости – ЖРП), сыворотка крови.

В работе использовались капсулы цефиксима (Cefix) (Хикма фармасьютикалс, Иордания), активное вещество – [6R-[бальфа,7бета(Z)]]-7-[[[(2-амино-4-тиазолил)](карбоксиметокси)имино]ацетил]амино]-3-этенил-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]октен-2-ен-2-карбоновая кислота (C₁₆H₁₅N₅S₂O₇, молярная масса 453,5 г/моль, Cefix) (рис. 1.)

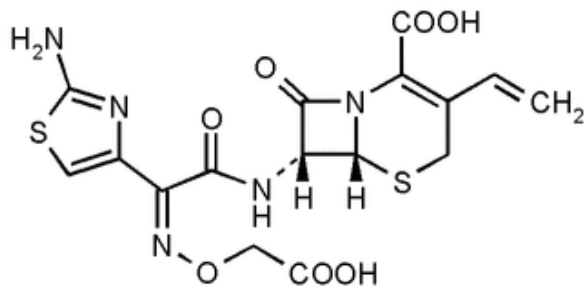


Рис. 1. Структурная формула цефиксима
Fig. 1. Structural formula of cefixime

Препарат имеет замещающую гидроксимино-аминотиазоловую боковую цепь в положении 7. Это обеспечивает, по сравнению с представителями антибиотиков I–II поколений, высокую стабильность к β-лактамазам широкого спектра действия. Дополнительно введенная метоксииминогруппа еще больше повышает устойчивость к β-лактамазам грамотрицательных бактерий.

Раствор цефиксима 1 мг/мл готовили путем растворения навески препарата в небольшом количестве дистиллированной воды, фильтровали, промывали осадок на фильтре дистиллированной водой до 25 мл. Для отделения вспомогательных веществ можно рекомендовать также центрифугирование навески пробы в небольшом количестве дистиллированной воды с последующим промыванием осадка дистиллированной водой. Объем промывных вод вместе с объемом исходной пробы – 25 мл. В дополнительных порциях промывных вод (на фильтре и при центрифугировании) полосы поглощения цефиксима отсутствуют. Раствор концентрации 100 мкг/мл готовили разбавлением исходного. Использовали

свежеприготовленные растворы цефиксима, так как антибиотик гидролизуется [2].

В работе использовали хлоридно-аммиачные буферные растворы (рН 3–9), стандартный 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, 0,1 М раствор гидроксида натрия, 0,5% раствор сульфата цинка.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, совмещенном с IBM PC, использовали кюветы из кварцевого стекла. Контроль кислотности проводили на рН-метре рХ-150Мп, погрешность измерения ±0,01 рН. Для отделения белковых компонентов из биосред использовали центрифугу Wirowka MPW-6.

Исследования проведены для группы практически здоровых лиц ($n = 8$, средний возраст 21 ± 2 года).

Пробоподготовка ЖРП. Отбор проб смешанной слюны у практически здоровых людей осуществляли путем сплевывания ротовой жидкости в чистые сухие полиэтиленовые пробирки. Пробы отбирали спустя 1–2 ч после приема пищи, перед сбором ротовую полость ополаскивали водой. Пробу ЖРП центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин. Затем к 7,5 мл центрифугата добавляли 0,5 мл гидроксида натрия ($c = 0,12$ моль/л) и 2,5 мл сульфата цинка ($c = 5,4$ г/л); центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин; после осаждения белков отбирали надосадочную жидкость.

Пробоподготовка сыворотки крови. Для осаждения белков в сыворотке крови необходимы 1 мл гидроксида натрия ($c = 0,12$ моль/л) и 4 мл сульфата цинка ($c = 5,4$ г/л) на 5 мл пробы. Смесь нагревали на водяной бане в течение 5 мин при $t = 60^\circ \text{C}$, затем центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин и к центрифугату добавляли еще 0,5 мл гидроксида натрия ($c = 0,12$ моль/л) и 1 мл сульфата цинка ($c = 5,4$ г/л). Снова центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин.

Дозатором отбирали 0,1–0,8 мл раствора цефиксима ($c = 100$ мкг/мл), до 3 мл добавляли центрифугат ЖРП или сыворотки крови. Снимали спектры поглощения цефиксима относительно биосред без добавки антибиотика.

Строили градуировочные графики в координатах оптическая плотность–концентрация цефиксима, мкг/мл. Статистическую обработку проводили согласно [9].

Результаты и их обсуждение

Цефалоспорины в растворенном состоянии неустойчивы. Стабильность растворов цефалоспоринов зависит от таких факторов,



как температура, рН раствора и др. Нами установлено, что водные растворы цефиксима устойчивы в течение суток. В данной работе спектрофотометрическим методом проведено исследование поведения цефиксима на фоне смешанной слюны и сыворотки крови практически здоровых людей.

Максимум светопоглощения цефиксима на фоне ЖРП наблюдается при $\lambda = 292$ нм (рис. 2), для сыворотки крови при $\lambda = 289$ нм (рис. 3). Интервал линейной зависимости оптическая плотность – концентрация цефиксима составляет 3–50 мкг/мл. Растворы цефиксима в ротовой жидкости устойчивы в течение суток.

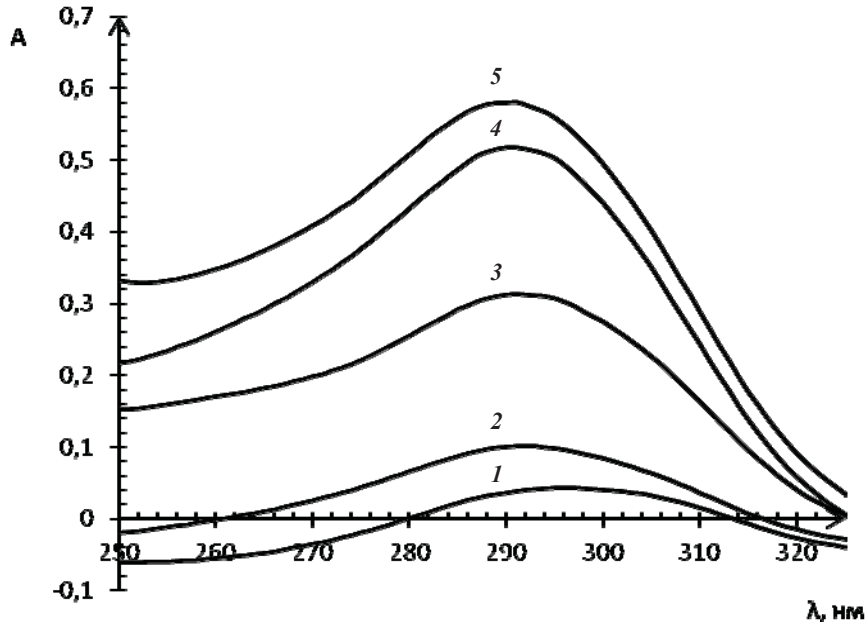


Рис. 2. Спектры поглощения цефиксима на фоне ротовой жидкости, C_{Cefix} , мкг/мл: 1 – 3.33; 2 – 6.66; 3 – 10.00; 4 – 13.33; 5 – 16.67
Fig. 2. Absorption spectra of cefixime on the background of oral liquid, C_{Cefix} , mkg/ml: 1 – 3.33; 2 – 6.66; 3 – 10.00; 4 – 13.33; 5 – 16.67

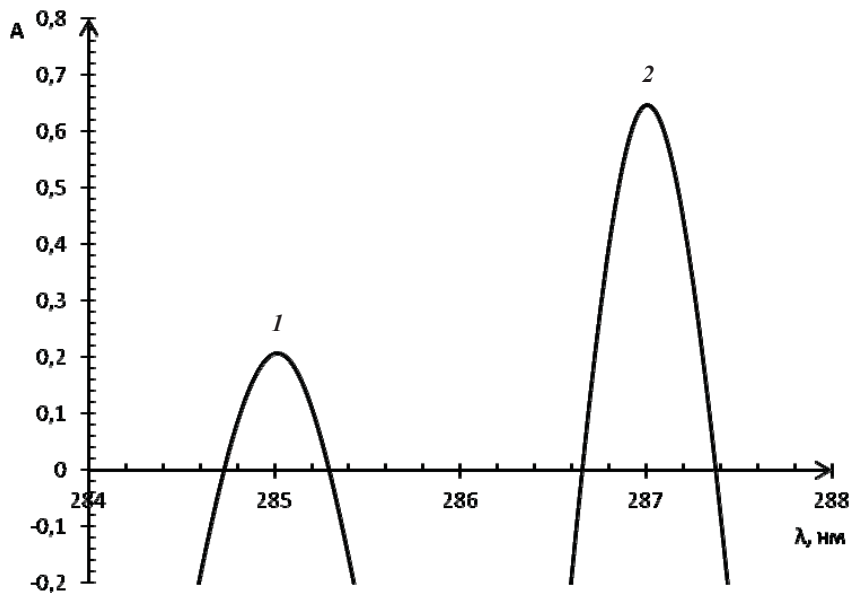


Рис. 3. Спектры поглощения цефиксима на фоне сыворотки крови с осаждением белков, C_{Cefix} , мкг/мл: 1 – 10.00; 2 – 16.67
Fig. 3. Absorption spectra of cefixime on the background of blood serum with protein precipitation, C_{Cefix} , μg/ml: 1 – 10.00; 2 – 16.67



Для оценки правильности определения цефиксима в ротовую жидкость вносили добавки антибиотика (20, 30, 40 мкг), проводили пробы через все стадии пробоподготовки. Снимали спектры поглощения. По градуировочному графику определяли концентрацию антибиотика (таблица).

Оценка правильности определения цефиксима на фоне ЖРП ($n = 3, P = 0,95$)

Assessment of the correctness of the definition of cefixime on the background of LRT ($n = 3, P = 0.95$)

Введено, мкг/мл / Introduced, mkg/ml	Найдено, мкг/мл / Found, mkg/ml	S_r	Относительная погрешность определения, $D, \%$ / Relative error of definition, $D, \%$
20	$20,3 \pm 0,9$	0,02	1,5
30	$30,2 \pm 0,6$	0,01	0,7
40	$40,3 \pm 0,8$	0,01	0,8

Данные таблицы свидетельствуют, что введенные содержания цефиксима соответствуют найденным (относительная погрешность не превышает 1,5%).

Показано, что наблюдается корреляция между λ_{max} , нм и A_{max} для спектров поглощения

цефиксима на фоне сыворотки крови (с дополнительным осаждением белков) и ЖРП (с осаждением белков), т. е. поведение антибиотика в исследуемых биосредах аналогичное. Последнее свидетельствует о возможности определения антибиотика в ротовой жидкости больных.

Для оценки возможности применения спектрофотометрического определения цефиксима в лекарственных препаратах исследовано поведение антибиотика в водных средах.

Спектры поглощения водных растворов цефиксима имеют максимум светопоглощения при $\lambda = 292$ нм. При указанной длине волны наблюдается прямолинейная зависимость оптическая плотность – концентрация антибиотика. Диапазон определяемых содержаний цефиксима в водных растворах составляет 1–50 мкг/мл.

Для растворов цефиксима ($C = 30$ мкг/мл) снимали спектры поглощения во времени (рис. 4). Показано, что происходит возрастание оптической плотности от времени хранения растворов цефиксима.

Цефиксим – амфотерный антибиотик с карбоксильными и аминотиазольными группами.

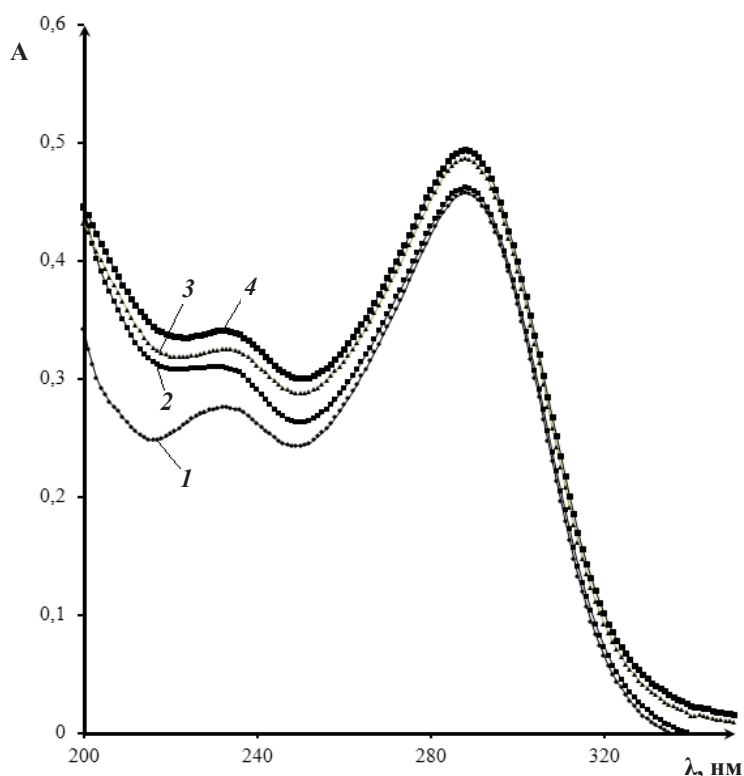


Рис. 4. Спектры поглощения водных растворов цефиксима ($c = 30$ мкг/мл) во времени: 1 – 24 ч; 2 – 48 ч; 3 – 6 сут.; 4 – 8 сут.

Fig. 4. Absorption spectra of aqueous cefixime solutions ($c = 30 \mu\text{g/ml}$) over time: 1 – 24 hours; 2 – 48 hours; 3 – 6 days; 4 – 8 days



Слабоосновный атом азота тиазольного цикла способен принимать протон. Этот антибиотик существует в виде катиона (в сильнокислой среде), цвиттер-иона (в слабокислой) и аниона (в нейтральной и щелочной) [10]. Установлено, что водные растворы цефиксима имеют различную кислотность $pH = 2,90-5,04$ в зависимости от концентрации (10–50 мкг/мл).

Исследовано поведение цефиксима при различной кислотности среды ($pH = 2,92-8,70$ при добавлении соляной кислоты или гидроксида натрия). На спектрах наблюдается две полосы поглощения, причем происходит смещение λ_{max} при различной кислотности среды. Наблюдается уменьшение оптической плотности с возрастанием pH ($\lambda_{max} = 286$ нм) (рис. 5).

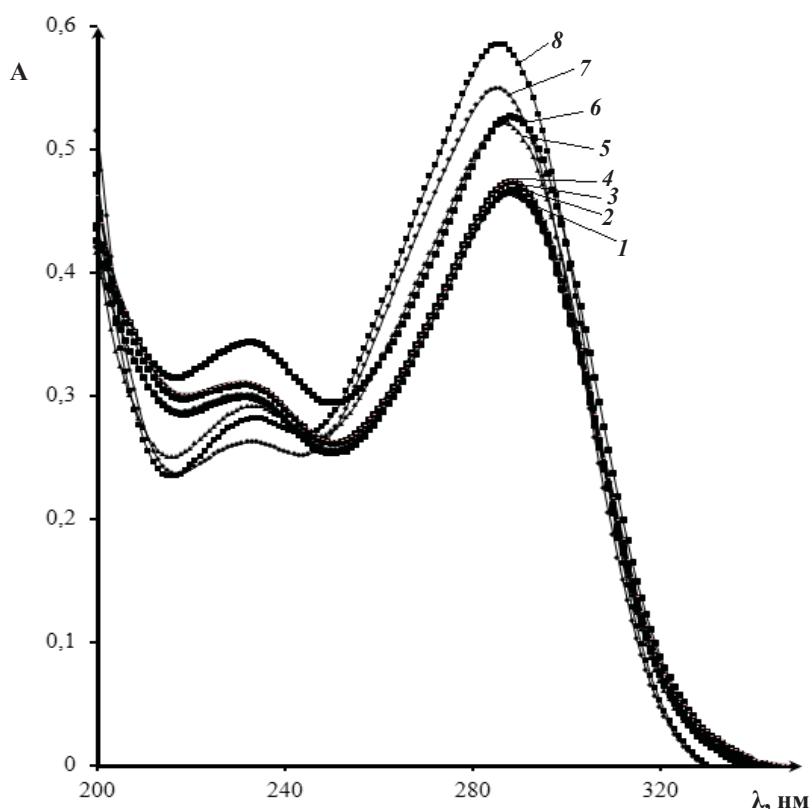


Рис. 5. Спектры поглощения водных растворов цефиксима ($c = 20$ мкг/мл) при различной кислотности среды pH : 1 – 2,92; 2 – 3,20; 3 – 4,00; 4 – 5,24; 5 – 6,50; 6 – 6,90; 7 – 7,70; 8 – 8,70

Fig. 5. Absorption spectra of cefixime aqueous solutions ($c = 20$ $\mu\text{g/ml}$) at different acidity of pH medium: 1 – 2,92; 2 – 3,20; 3 – 4,00; 4 – 5,24; 5 – 6,50; 6 – 6,90; 7 – 7,70; 8 – 8,70

Таким образом, исследовано поведение цефиксима спектрофотометрическим методом в ротовой жидкости и сыворотке крови практически здоровых людей. Методика отличается экспрессностью определения активной концентрации антибиотика в широком концентрационном интервале 3–50 мкг/мл и дает возможность определения цефиксима в смешанной слюне больных при инфекционных заболеваниях.

Показана возможность определения цефиксима в водных растворах, что может быть использовано при контроле качества фармацевтических препаратов.

Список литературы

1. Яковлев В. П. Антибактериальная терапия // Антибиотики и химиотер. 2003. Т. 48, № 7. С. 3–4.
2. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
3. Ahmed S. M. A., Elbashir A. A., Aboul-Enein H. Y. New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations // Arab. J. Chem. 2011. Vol. 76. P. 332–346.
4. El-Shaboury S. R., Mohamed F. A., Saleh G. A., Rageh A. H. Analysis of cephalosporin antibiotics // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. Vol. 45. P. 1–19.
5. Shah J., Rasul M. J., Shah S. Spectrofluorimetric method



- for determination and validation of cefixime in pharmaceutical preparations through derivatization with 2-cyanoacetamide // *J. Fluores.* 2011. Vol. 21, № 2. P. 579–585.
6. Jain R., Gupta V. K., Jadon N., Radhapyari K. Voltammetric determination of cefixime in pharmaceuticals and biological fluids // *Anal. Biochem.* 2010. Vol. 407, № 1. P. 79–88.
 7. Ojani R., Raoof J.-B., Zamani S. A novel sensor for cephalosporins based on electrocatalytic oxidation by poly(o-anisidine)/SDS/Ni modified carbon paste electrode // *Talanta.* 2010. Vol. 81, № 4–5. P. 1522–1528.
 8. Кондратенко С. Н., Стародубцев А. К., Золкина И. В., Ковачевич И. В., Кондратенко Н. А., Сенник Б. А. Методики моделирования фармакокинетики некоторых лекарственных средств по динамике их распределения в слюне // *Биомедицинская химия.* 2014. Т. 60, № 2. С. 221–222.
 9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.
 10. Алексеев В. Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь: Твер. гос. ун-т, 2009. 104 с.

Образец для цитирования:

Кулапина Е. Г., Кулапина О. И., Анкина В. Д. Исследование поведения цеффиксима в водных и биологических средах спектрофотометрическим методом // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2020. Т. 20, вып. 1. С. 10–15. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-1-10-15>

The Research of the Behavior of Cefixime in Aquatic and Biological Media by Spectrophotometric Method

E. G. Kulapina, O. I. Kulapina, V. D. Ankina

Elena G. Kulapina, <https://orcid.org/0000-0002-5644-5039>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, kulapinaeg@mail.ru

Olga I. Kulapina, <https://orcid.org/0000-0002-4101-1877>, Saratov State Medical University, 112 Bolshaya Kazachya St., Saratov 410012, Russia, olgakulapina@mail.ru

Vlada D. Ankina, <https://orcid.org/0000-0001-8733-3710>, Saratov State Medical University, 112 Bolshaya Kazachya St., Saratov 410012, Russia, vlada.ankina@mail.ru

The research of behavior of cefixime in biological media was conducted by spectrophotometric method. It was shown that the maximum of light absorption of cefixime against the background of oral fluid is observed at $\lambda = 292$ nm and for blood serum at $\lambda = 289$ nm. The interval of linear dependence optical density – concentration of cefixime is 3–50 mg/ml. The optimal conditions of precipitation of proteins in the studied biological media were revealed. It was shown that the correlation between the maximum wavelength (λ_{max} , nanometer) and the optical density (A_{max}) for absorption spectra of cefixime is observed in blood serum (with additional precipitation of proteins) and oral liquid (with precipitation of proteins), i.e. behavior of an antibiotic in the studied biological media is similar. This fact indicates the possibility of identification of cefixime in oral fluid of patients. The behavior of cefixime in aquatic media is investigated to assess the possibility of using spectrophotometric identification of cefixime in medicines. Ranges of linearity and the limit of detection of an antibiotic are determined. Influence of acidity of media on spectroscopic characteristics of cefixime was revealed. It was found that aqueous solutions of an antibiotic have various acidity pH 2.90–5.04 depending on concentration 10–50 mg/ml. The possibility of spectrophotometric identification of cefixime in aquatic and biological media was shown.

Keywords: cefixime, aqueous media, oral fluid, blood serum, spectrophotometry.

References

1. Yakovlev V. P. Antibacterial Therapy. *Antibiotics and Chemother.*, 2003, vol. 48, no. 17, pp. 3–4.
2. Egorov N. S. *Osnovy ucheniya ob antibiotikakh* [The Bases of Doctrine about Antibiotics]. Moscow, Nauka Publ., 2004. 528 p. (in Russian).
3. Ahmed S. M. A., Elbashir A. A., Aboul-Enein H. Y. New Spectrophotometric Method for Determination of Cephalosporins in Pharmaceutical Formulations. *Arab. J. Chem.*, 2011, vol. 76, pp. 332–346.
4. El-Shaboury S. R., Mohamed F. A., Saleh G. A., Rageh A. H. Analysis of Cephalosporin Antibiotics. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, vol. 45, pp. 1–19.
5. Shah J., Rasul M. J., Shah S. Spectrofluorimetric Method for Determination and Validation of Cefixime in Pharmaceutical Preparations Through Derivatization with 2-cyanoacetamide. *J. Fluores.*, 2011, vol. 21, no. 2, pp. 579–585.
6. Jain R., Gupta V. K., Jadon N., Radhapyari K. Voltammetric Determination of Cefixime in Pharmaceuticals and Biological Fluids. *Anal. Biochem.*, 2010, vol. 407, no. 1, pp. 79–88.
7. Ojani R., Raoof J.-B., Zamani S. A novel Sensor for Cephalosporins Based on Electrocatalytic Oxidation by Poly(o-anisidine)/SDS/Ni Modified Carbon Paste Electrode. *Talanta.* 2010, vol. 81, no. 4–5, pp. 1522–1528.
8. Kondratenko S. N., Starodubtsev A. K., Zolkina I. V., Kovacevic I. V., Kondratenko N. A., Senik B. A. Techniques of Modeling of Pharmacokinetics of Some Medicines on Dynamics of Their Distribution in Saliva. *Biomedical Chemistry*, 2014, vol. 60, no. 2, pp. 221–222 (in Russian).
9. Rebrova O. Y. *Statisticheskii analiz meditsinskikh dannykh* [Statistical Analysis of Medical Data]. Moscow, MediaSfera Publ., 2002. 312 p. (in Russian).
10. Alekseev V. G. *Bioneorganicheskaya khimiya penitsillinov i tsefalosporinov* [Bioinorganic Chemistry of Penicillin and Cefalosporin]. Tver, Tver. gos. un-t, 2009. 104 p. (in Russian).

Cite this article as:

Kulapina E. G., Kulapina O. I., Ankina V. D. The Research of the Behavior of Cefixime in Aquatic and Biological Media by Spectrophotometric Method. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 1, pp. 10–15 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-1-10-15>