



УДК 543.554.6:

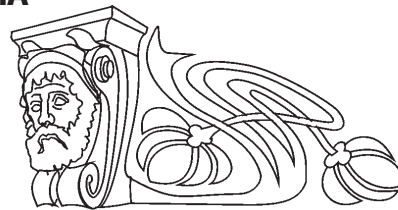
ИОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФУРОКСИМА И ЦЕФУРОКСИМ АКСЕТИЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДАХ

О. И. Кулапина¹, М. С. Михайлова², Е. Г. Кулапина²

¹Саратовский государственный медицинский университет

²Саратовский государственный университет

E-mail: Kulapinaeg@mail.ru



Разработаны потенциометрические сенсоры на основе ионных ассоциатов цефуроксима с катионами тетраалкиламмония. Сенсоры обеспечивают широкий диапазон определяемых содержаний антибиотиков $1 \cdot 10^{-4}$ ($8 \cdot 10^{-5}$) – $1 \cdot 10^{-2}$ М; предел обнаружения антибиотиков составляет $n \cdot 10^{-5}$ (10^{-6}) М, что позволяет использовать сенсоры для определения цефуроксима и цефуроксим аксетила в биологических средах (ротовой жидкости) для корректировки и оптимизации курса лечения, а также для определения основного вещества в лекарственных препаратах.

Ключевые слова: цефуроксим, цефуроксим аксетил, водные среды, ротовая жидкость, сенсоры.

Ionometric Determination of Cefuroxime and Cefuroxime Axetil in Biological and Medical Treatment

O. I. Kulapina, M. S. Mikhailova, E. G. Kulapina

Potentiometric sensors based on ion associates cefuroxime with tetraalkylammonium cations were developed. Sensors exhibited linear response toward antibiotics in the range from $1 \cdot 10^{-4}$ ($8 \cdot 10^{-5}$) to $1 \cdot 10^{-2}$ M. The detection antibiotic limit was $n \cdot 10^{-5}$ (10^{-6}) M. Therefore sensors may be used for determination of cefuroxime and cefuroxime axetil in biological liquid (oral fluid) to correction and optimize of the medical treatment, as well as to pure identify of drugs.

Key words: cefuroxime, cefuroxime axetil, water objects, oral fluid, sensors.

Введение

Бета-лактамы – самая большая группа антимикробных препаратов, которая составляет 25% от общего числа антибактериальных препаратов. Эта группа включает в себя 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 [1].

Большую часть β-лактамов составляют пенициллины и цефалоспорины. В основном это препараты для парентерального применения, которые в настоящее время занимают ведущее место при лечении различных инфекций в стационаре.

В амбулаторной практике широко применяются парентеральные и пероральные цефалоспорины II поколения. Цефуроксим и цефуроксим аксетил в настоящее время рассматриваются как основные препараты для лечения любых внебольничных респираторных инфекций (внебольничной пневмонии, хронического бронхита и других инфекционно-соматических патологий) [1–3]. Авторами работы [4] была показана возможность ступенчатой терапии цефуроксимом больных с внебольничной пневмонией – парентерально, а затем перорально цефуроксим аксетилом. Уровень концентраций цефуроксима в крови при замене цефуроксима на цефуроксим аксетил несколько снижался, но превышал минимально подавляющие концентрации для основных возбудителей.

Высокая эффективность цефуроксим аксетила отмечена у детей и взрослых с острым средним отитом, а также при стрептококковом тонзиллите, фарингите и синусите. Цефуроксим аксетил может назначаться при стафилококковых инфекциях кожи и мягких тканей (мастит, фурункулы), а также при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей, главным образом пиелонефрите [5].

Замена карбоксильной группы в цефуроксиме эфирным радикалом (цефуроксим аксетил) придает устойчивость данному соединению в желудочном соке. Известно, что цефуроксим аксетил разлагается в кишечнике до цефуроксима [2]; pH в кишечнике 5,8–6,5 [6].

В настоящее время для определения цефуроксима используются спектроскопические, хроматографические, электрохимические методы [7]. Многие из этих методов требуют дорогостоящего оборудования, реактивов, высококвалифицированных операторов, отличаются длительностью и не применимы для экспресс-контроля за содержанием антибиотиков в клинических и биохимических лабораториях.

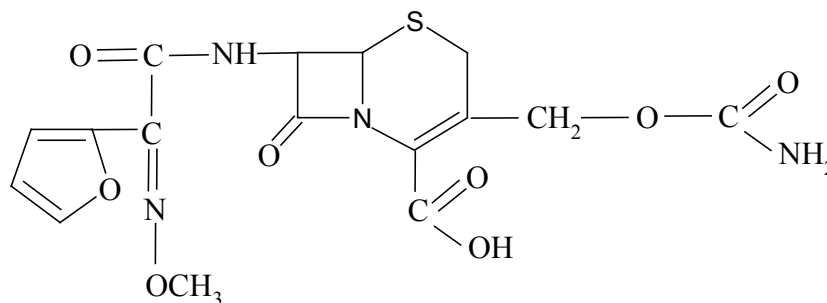
Для экспрессного определения цефуроксима и цефуроксим аксетила в водных средах и ротовой жидкости (ЖРП) нами разработаны потенциометрические сенсоры на основе органических ионообменников антибиотиков с катионами тетраалкиламмония.



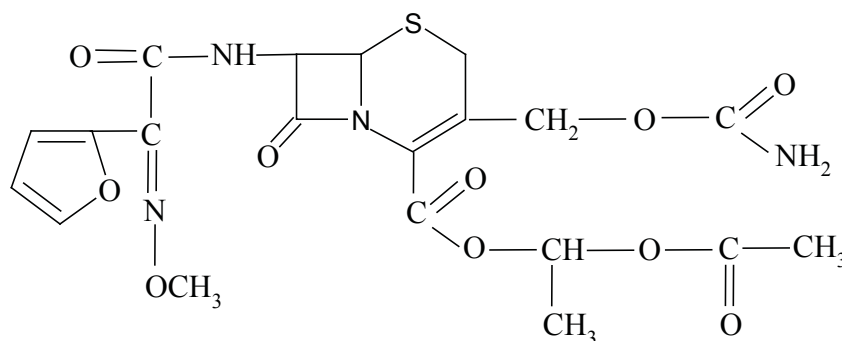
Экспериментальная часть

В работе использовались цефуроксим в виде натриевой соли – порошок для инъекционных растворов – цефурабол (производитель

ООО «АБОЛмед», г. Новосибирск) и цефуроксим ацетил (фирма производитель Glaxo Operation UK Limited, UK) фармакопейной чистоты:



Цефуроксим (Cefur1)



Цефуроксим ацетил (Cefur2)

Цефуроксим – антибиотик кислотного типа, полностью диссоциирует при pH = 5 и выше. В водных растворах (pH~6,0), крови человека (pH~7), жидкости ротовой полости (pH ~ 6,8–7,4) антибиотики присутствуют в виде однозарядных ионов [8].

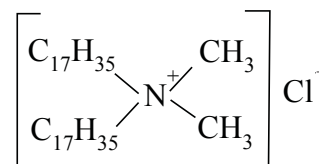
Исходные $1 \cdot 10^{-1}$ М водные растворы антибиотиков готовили по точным навескам пре-

паратов в дистиллированной воде; учитывалось содержание основного вещества для цефуроксим ацетил. Рабочие растворы (свежеприготовленные) концентраций $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ М получали последовательным разбавлением исходных.

В качестве электродноактивных веществ (ЭАВ) применяли ионные ассоциаты цефуроксима с катионами тетраалкиламмония:

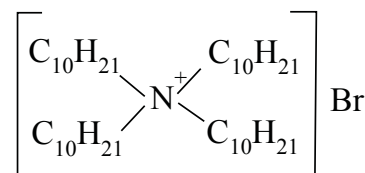
Диметилдистеариламмония
хлорид

ДМДСА



Тетрадециламмония
бромид

ТДА



Образование ионных ассоциатов цефуроксима с катионами тетраалкиламмония происходит по карбоксильной группе исследуемых лекарственных веществ:



В делительную воронку помещали раствор ТДА или ДМДСА в хлороформе ($C=1 \cdot 10^{-2}$ М) и водные растворы антибиотика ($C=1,5 \cdot 10^{-2}$ М) при соотношении объемов растворов антибиотик: соль тетраалкиламмония = 1:2. Смесь встряхивали в



течение двух часов, хлороформный слой отделяли от водной фазы в предварительно взвешенный бюкс, и испаряли хлороформ на водяной бане при температуре 50–60 °С с целью избежания разложения электродно-активных веществ.

В качестве инертной матрицы для изготовления мембран использовали поливинилхлорид (ПВХ) марки С-70, «ч.д.а», растворитель-пластификатор – дибутилфталат (ДБФ).

Для приготовления пластифицированных мембран навески электродно-активных веществ растворяли в дибутилфталате при непрерывном перемешивании, затем добавляли циклогексанон и поливинилхлорид, смесь тщательно перемешивали до полной гомогенизации. После чего смесь выливали в чашку Петри и оставляли на воздухе до полного удаления циклогексанона. Получали эластичные и прозрачные мембраны толщиной порядка 0,5 мм. Соотношение поливинилхлорид:дибутилфталат = 1:3; $C_{ЭАВ}$ варьировали в интервале 2,75–5,35%.

Исследовали жидкоконтактные электроды с пластифицированными мембранами собственного изготовления. К тщательно отшлифованному торцу поливинилхлоридной трубки приклеивали мембранные диски, диаметр которых соответствовал диаметру трубки. Клей получали растворением 0,5 г поливинилхлорида и 0,25 г дибутилфталата в 5 мл циклогексанона. В качестве внутренних растворов сенсоров применяли смесь хлорида натрия $1 \cdot 10^{-1}$ М и антибиотика $1 \cdot 10^{-3}$ М в соотношении по объему 1:1. ЭДС цепи измеряли на иономере универсальном И-160 (погрешность измерения ± 1 мВ), электрод сравнения – хлорид-серебряный.

Контроль рН растворов проводили на иономере рХ-150 М со стеклянным и хлоридсеребряным электродами. Коэффициенты потенциометрической селективности ($K_{сел}$) сенсоров определяли методом бионных потенциалов и смешанных растворов [9].

Для спектрофотометрического исследования состояния антибиотиков в водных и биологических средах готовили исходные растворы (1 мг/мл), из которых получали растворы 100 мкг/мл. Спектры поглощения снимали для водных растворов и на фоне ротовой жидкости при концентрациях цефуроксима и цефуроксим ацетила 1–50 мкг/мл.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, совмещенным с IBM PC; использовались кюветы из кварцевого стекла $l=1$ см.

Для спектрофотометрического исследования поведения антибиотиков в ротовой жидкости пробы ЖРП центрифугировали 10–20 мин при

3500 об/мин, затем проводили осаждение белков сульфатом цинка в среде гидроксида натрия, снова центрифугировали 10–20 мин при 3500 об/мин. В подготовленные пробы ротовой жидкости вносили различные добавки антибиотиков; снимали их спектры поглощения относительно ЖРП без антибиотиков.

Исследования проводили для групп практически здоровых лиц ($n = 10$, средний возраст 20 ± 2 года) и больных с инфекцией верхних дыхательных путей, принимающих цефуроксим ацетил (препарат «Зиннат») 250 мг 2 раза в сутки.

Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрически были исследованы водные растворы антибиотиков. Спектры поглощения цефуроксима и цефуроксим ацетила идентичны ($\lambda_{max} = 281$ нм), молярные коэффициенты светопоглощения (ϵ_m) составляют $1,76 \cdot 10^4$ и $1,55 \cdot 10^4$ соответственно. Кислотность свежеприготовленных водных растворов антибиотиков с изменением их концентрации не меняется. Молярные коэффициенты светопоглощения цефуроксима и цефуроксим ацетила в ротовой жидкости равны и составляют $1,25 \cdot 10^4$ ($\lambda_{max} = 275$ нм) (рис. 1).

Известно [10], что λ_{max} и ϵ_m характеризуют природу вещества (длину связи, подвижность π -электронов и вероятность их перехода в возбужденное состояние). Чем больше длина π -системы и выше вероятность, тем больше ϵ_m . Величина ϵ_m исследуемых нами антибиотиков ($n \cdot 10^4$) показывает, что их спектры поглощения обусловлены $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в заместителе β -лактамного кольца как цефуроксима, так и цефуроксим ацетила. Возможные $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ электронные переходы остальных фрагментов молекул антибиотиков, по-видимому, находятся в той же области длин волн и включены в спектры заместителя β -лактамного кольца, поскольку интенсивности их поглощения в 10–100 раз меньше.

Диапазон линейной зависимости оптической плотности от концентрации антибиотиков составляет 1–50 мкг/мл как в водных средах, так и в ротовой жидкости (при осаждении белков).

Рассмотрим основные электрохимические характеристики исследуемых в настоящей работе сенсоров. Зависимости ЭДС от концентрации антибиотиков идентичны и выполняются в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-4}$ ($8 \cdot 10^{-5}$) – $1 \cdot 10^{-2}$ М для различных ЭАВ; угловые коэффициенты электродных функций составляют 52–56 мВ/рС. Для сенсоров на основе Cefur-ДМДСА характерен более широкий интервал линейности, угловой коэффициент практически приближен к теоретическому значению.

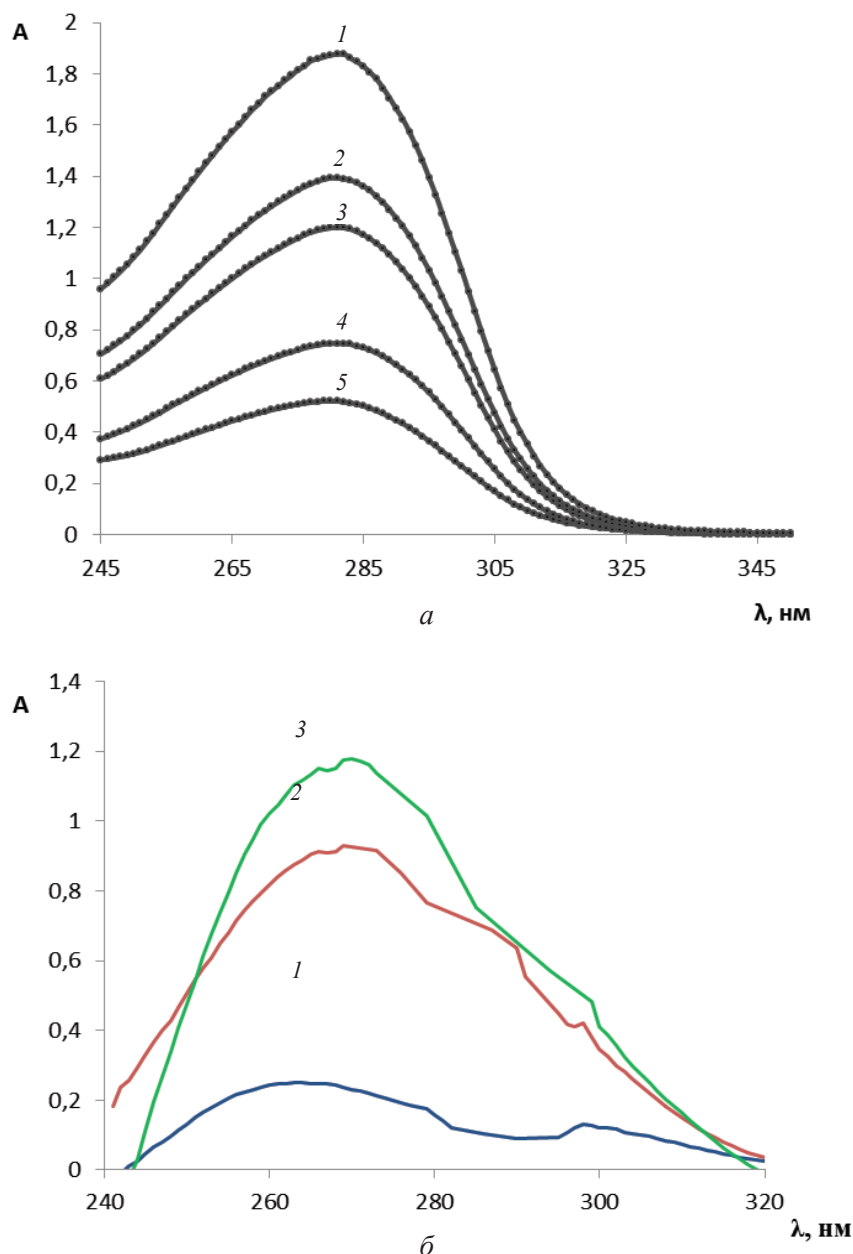
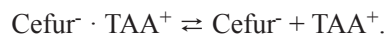


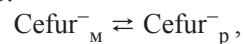
Рис. 1. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов цефуроксим ацетила (а) и на фоне ротовой жидкости (б) при различных концентрациях, мкг/мл: а – 42,4 (1); 33,9 (2); 27,1 (3); 16,9 (4); 10(5); б – 10,2 (1); 17 (2); 42,4 (3)

Исследовано влияние содержания электро-одно-активных веществ (2,75–5,35%) на электрохимические характеристики сенсоров. Результаты показали, что во всех случаях электродные функции выполняются в интервале концентраций антибиотиков $1 \cdot 10^{-4}$ ($5 \cdot 10^{-5}$) – $1 \cdot 10^{-2}$ М; угловые коэффициенты составляют 52–56 мВ/рС; предел обнаружения – $n \cdot 10^{-5}$ (10^{-6}) М.

Потенциалоопределяющей является реакция ионного обмена на границе мембрана/раствор, с предварительно происходящей диссоциацией ионообменников в фазе мембраны:



Затем происходят ионообменные реакции анионов антибиотиков на границе раздела мембрана-раствор:



$$E = E_0 - 0,059 \cdot \lg C_{\text{Cefur}}$$

По зависимости $E=f(-\lg C_{\text{Cefur}})$ определены пределы обнаружения антибиотиков ($5 \cdot 10^{-5}$ М).

Дрейф потенциала составил 2–4 мВ/сут. Как правило, дрейф потенциала сенсоров обусловлен изменением в структуре поверхности



мембраны и растворением ионообменника в исследуемом растворе. Электроды на основе различных ЭАВ обладают стабильными электрохимическими и операционными характеристиками в течение 3 месяцев.

Коэффициенты потенциометрической селективности сенсоров к другим цефалоспориновым антибиотикам – цефазолину (Cef), цефалексину (Cefl), цефтриаксону (Ceftr) определяли методом бионных потенциалов, к неорганическим ионам

– методом смешанных растворов (рис. 2, таблица). Выбор мешающих неорганических ионов обусловлен составом ротовой жидкости.

Полученные коэффициенты потенциометрической селективности свидетельствуют о возможности определения индивидуальных цефалоспориновых антибиотиков или их суммарного содержания в присутствии значительных избытков неорганических ионов, что делает возможным применение сенсоров в анализе биологических сред.

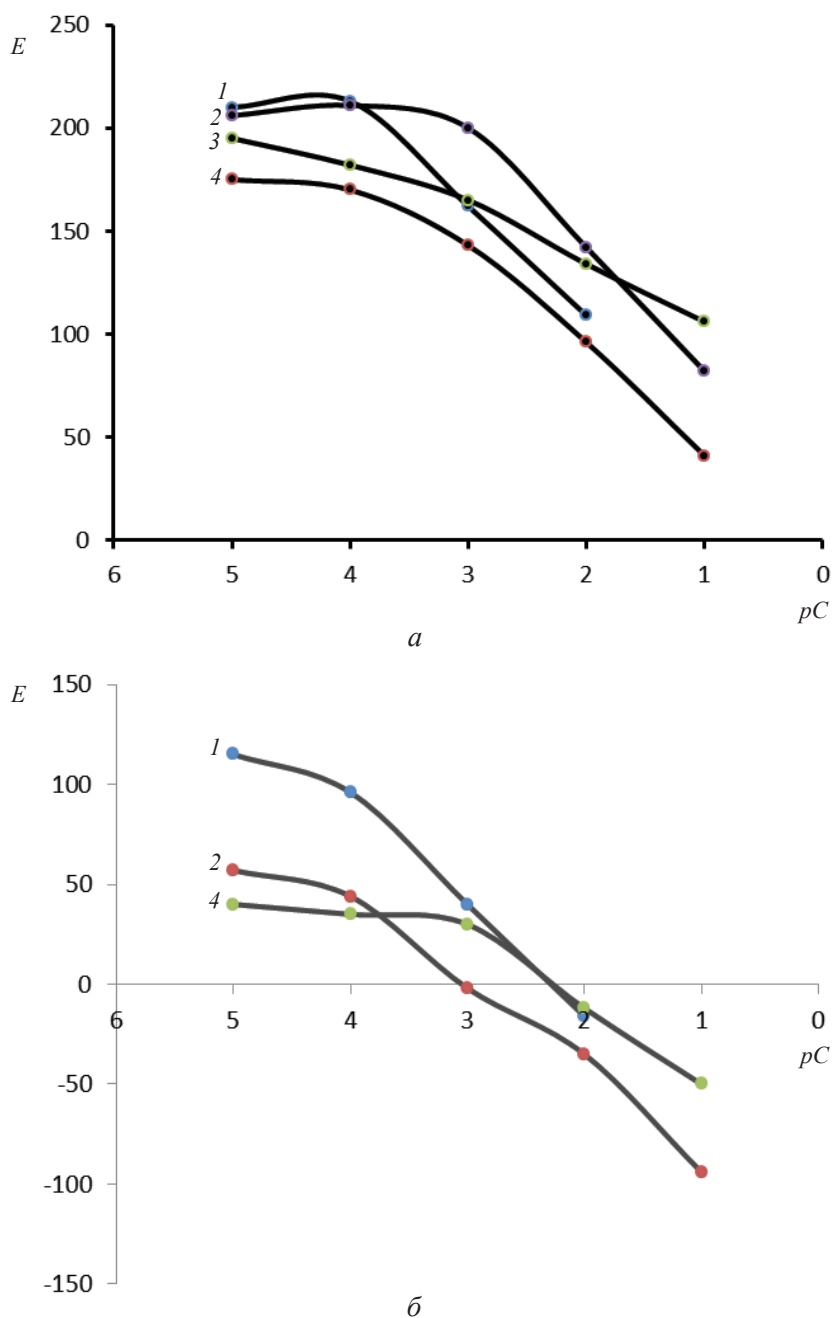


Рис. 2. Зависимость электродных потенциалов сенсоров в растворах некоторых цефалоспоринов от их концентрации: цефуроксим аксетил (1), цефазолин (2), цефтриаксон (3), цефалексин (4). ЭАВ: Cefur-ТДА (а), Cefur-ДМДСА (б)



**Коэффициенты потенциометрической селективности
цефуроксим аксетила к ряду мешающих ионов
($n = 3, p = 0,95$)**

| ЭАВ | Мешающий ион | $K_{сел}$ |
|-------------|--------------|---------------------------------|
| Cefur-ДМДСА | Cl^- | $(6,61 \pm 0,25) \cdot 10^{-2}$ |
| | Br^- | $(8,91 \pm 0,10) \cdot 10^{-2}$ |
| | HCO_3^- | $(6,31 \pm 0,15) \cdot 10^{-2}$ |
| | $H_2PO_4^-$ | $(7,94 \pm 0,21) \cdot 10^{-2}$ |
| | HPO_4^{2-} | $(6,31 \pm 0,20) \cdot 10^{-2}$ |
| | J^- | $(8,32 \pm 0,15) \cdot 10^{-2}$ |
| | Cef | $(1,78 \pm 0,10) \cdot 10^{-1}$ |
| Cefur-TDA | Cefl | $(6,63 \pm 0,20) \cdot 10^{-1}$ |
| | Cef | $(4,31 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$ |
| | Cefl | $5,38 \pm 0,15$ |

Электроаналитические характеристики сенсоров на фоне ротовой жидкости

В качестве объекта исследования нами была выбрана ротовая жидкость. Из литературных данных известно, что в каждый данный момент времени плазма крови превращается в некоторое количество ЖРП, поэтому можно считать, что концентрация лекарственного препарата в ЖРП соответствует концентрации его в плазме крови [11–13].

Установлено уменьшение интервала линейности и углового коэффициента электродной функции в ЖРП вследствие высокой ионной силы раствора и «белкового отравления» поверхности мембран. Интервал линейности электродной функции составляет $1 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-5}$ М, предел обнаружения цефуроксима и цефуроксим аксетила $5 \cdot 10^{-5}$ М. Полученные градуировочные характеристики являются воспроизводимыми и увеличение времени кондиционирования не влияет на них. Для ионметрических определений антибиотиков нет необходимости проводить осаждение белков.

**Методика ионметрического определения
цефуроксима и цефуроксим аксетила
в ротовой жидкости**

• Пробоподготовка ЖРП. Отбор проб смешанной слюны осуществляли путем сплевывания ротовой жидкости в чистые сухие полиэтиленовые пробирки. Пробу 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. Перед измерениями индикаторный электрод кондиционировали в ЖРП практически здорового человека в течение 20–30 мин.

• Для приготовления 10^{-1} М растворов цефуроксима и цефуроксим аксетила соответствующие навески антибиотиков растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе на 25 мл. Последовательным разбавлением готовили растворы $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ М.

• Для приготовления серии растворов цефуроксима и цефуроксим аксетила на фоне ЖРП с внесенными добавками антибиотиков, отбирали 0,3 мл водных растворов антибиотиков соответствующей концентрации (внесенные добавки) и до 3 мл добавляли надосадочной жидкости ЖРП, перемешивали и проводили измерения ЭДС. Строили зависимость ЭДС, мВ – $-\lg C_{сфур}$. Измеряли ЭДС в пробах ротовой жидкости больных и по градуировочному графику определяли содержание цефуроксима и цефуроксим аксетила. Для исследуемой группы больных показано, что максимальное содержание цефуроксим аксетила составляет 77 мкг/3 мл при индивидуальных колебаниях от 30 до 60 мкг/3 мл ротовой жидкости.

С учетом сложности анализируемых объектов и самого определяемого вещества достоверность полученных результатов оценивалась следующим образом. В пробы ЖРП здорового человека вводили определенные добавки стандартных растворов цефуроксима и цефуроксим аксетила, далее пробы проводили через все операции пробоподготовки, измеряли величины ЭДС и по градуировочному графику определяли содержание антибиотиков. Погрешность определения не превышала 10%.

Таким образом, разработанные сенсоры позволяют проводить определение цефуроксима и цефуроксим аксетила в водных и биологических средах и могут быть использованы для определения основного вещества в лекарственных препаратах и контроля за содержанием антибиотиков в ротовой жидкости для корректировки и оптимизации курса лечения.

Список литературы

1. Яковлев В. П., Яковлев С. В. Антибактериальные препараты : современное состояние и перспективы // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46, № 11. С. 19–22.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М. : Нов. волна, 2006. 1206 с.
3. Сорочкина Е. В. Рациональное использование антибиотиков на основе их фармакокинетики при пневмонии у детей раннего возраста // Пульмонология. 2002. № 1. С. 42–47.
4. Яковлев С. В., Суворова М. П., Дворецкий Л. И., Власенко Н. А., Шахова Т. В. Ступенчатая терапия внебольничной пневмонии. Результаты исследования цефуроксима и цефуроксим аксетила // Антибиотики и химиотерапия. 1998. № 6. С. 7–11.



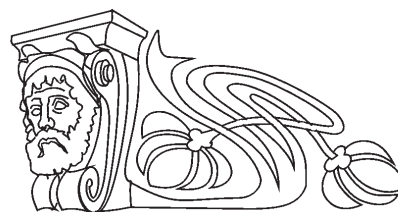
5. Яковлев С. В. Современное значение цефалоспоринов в стационаре // РЖМ. Антибиотики. 2005. Т. 13, № 10. С. 1125–1129.
6. Агаджанян Н. А., Тель Л. З., Циркин В. И., Чеснокова С. А. Физиология человека. СПб.: СОТИС, 1998. 537 с.
7. Кулапина Е. Г., Барина О. В., Кулапина О. И., Утц И. А., Снесарев С. В. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54, № 9–10. С. 53–60.
8. Алексеев В. Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь: Изд-во Тверск. гос. ун-та, 2009. 40 с.
9. Никольский Б. П., Матерова Е. А. Ионоселективные электроды. Л.: Химия, 1980. 240 с.
10. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера, 2007. 368 с.
11. Бегн Э. Клиническая фармакология. М.: Бином, 2004. 104 с.
12. Гончаров И. Б., Ковачевич И. В., Репенкова Л. Г., Кондратенко С. Н., Стародубцев А. К. Влияние антиортостатической гипокинезии на фармакокинетику ацетаминофена и распределение его в слюне здоровых добровольцев // Хим.-фарм. журн. 2009. Т. 43, № 5. С. 3–6.
13. Стародубцев А. К., Золкина И. В., Кондратенко С. Н., Белякова Г. А. Изучение фармакокинетики пентоксифиллина по динамике его распределения в крови и слюне здоровых добровольцев // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42, № 1. С. 3–5.

УДК 543.54:547

О КАТИОННОМ СОСТАВЕ НЕКОТОРЫХ ПИТЬЕВЫХ И ПРИРОДНЫХ ВОД

Е. И. Селифонова, Р. К. Чернова, О. С. Евсеева

Саратовский государственный университет
E-mail: selif-ei@yandex.ru



Методом капиллярного электрофореза исследовано 15 проб бутилированных, питьевых и природных вод на содержание ионов Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ . Из всех исследованных вод лишь в бутилированной воде «НОВОТЕРСКАЯ» отмечено превышение ПДК по всем указанным ионам, за исключением Mg^{2+} ; ионы бария в водах не обнаружены. Очистка воды с помощью фильтра «ГЕЙЗЕР» понижает содержание Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и значительно K^+ .

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, электрофореграмма, катионы металлов, вода, способы очистки.

About Cationic Composition of Some Drinking and Natural Waters

E. I. Selifonova, R. K. Chernova, O. S. Yevseyeva

15 sample of bottled, drinking and natural waters were examined for content of cations Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ by the method of a capillary electrophoresis. Excess of maximum permissible concentration is noted over all specified ions, except for Mg^{2+} only in bottled water «NOVOTERSKAY», Ba^{2+} in waters is not found in any of the test water. Water purification by means of the «GEYSER» filter lowers the content of Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} and K^+ is considerably.

Key words: capillary electrophoresis, electrophoretogram, metal cations, water purification methods.

Природные и питьевые воды обычно содержат набор катионов щелочных и щелочно-земельных элементов. Так, ионы натрия, калия, кальция и магния присутствуют во всех при-

родных водах. Количество ионов натрия может колебаться от нескольких мг/л (ультрапресные воды) до десятков и даже сотен г/л (рассолы). Содержание ионов калия в природных водах обычно значительно меньше, что объясняется повышенной сорбцией калия поглощающим комплексом почв и пород, а также расходом его на питание растений [1]. Ионы кальция и магния обуславливают жесткость воды – показатель крайне важный с точки зрения экологической безопасности. Превышение нормативов по жесткости чревато заболеваниями желудочно-кишечного тракта, почек, провоцирует появление экзем. Поэтому обычно устраняют повышенную жесткость воды [2]. Низкое качество питьевой воды провоцирует также заболевания сердечно-сосудистой и костной систем [3].

Присутствие в поверхностных водах ионов аммония связано, главным образом, с процессами биохимической деградации белковых веществ, дезаминирования аминокислот, разложения мочевины под действием уреазы. Основными источниками поступления ионов аммония в водные объекты являются животноводческие фермы, хозяйственно-бытовые сточные воды, поверхностный сток с сельхозугодий при использовании аммонийных удобрений,