

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2008

О. И. Кулапина¹, В. В. Барагузина², Н. В. Скобликова²

ИОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФОТАКСИМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

¹ Саратовский государственный медицинский университет;

² Саратовский государственный университет

Разработаны ионоселективные электроды на основе ионных ассоциатов тетрадециламмония с анионами цефотаксима (клафорана). Определены основные характеристики ИСЭ: электроды проявляют чувствительность к цефалоспорином в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$ М. Время установления стационарного потенциала — 1–2 мин, дрейф потенциала ± 2 мВ/сут. Предел обнаружения для цефотаксима составляет $3,6 \cdot 10^{-5}$ М, оптимальный интервал рН 4,3–6,5. Сравнение основных электрохимических характеристик ИСЭ на основе ионных ассоциатов тетрадециламмония с цефалоспорином показало, что лучшими эксплуатационными параметрами обладают электроды, в состав мембран которых входит клафоран.

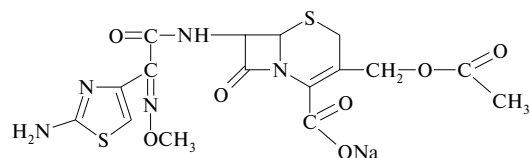
Цефалоспорины, подобно пенициллинам, относятся к β -лактамам антибиотикам, но в основе их химического строения лежит 7-аминоцефалоспориновая кислота. Основными особенностями цефалоспоринов по сравнению с пенициллинами является их большая резистентность по отношению к пенициллиназам — ферментам, вырабатываемым микроорганизмами и относительно быстро разрушающим пенициллины, а также более широкий спектр действия, включая влияние на грамотрицательные микроорганизмы [1].

Исходя из структуры, спектра действия и устойчивости к β -лактамазам, цефалоспорины делят в настоящее время на 4 группы [2]. Все цефалоспорины обладают высокой химиотерапевтической активностью. Цефотаксим (клафоран) относится к цефалоспорином третьего поколения и обладает широким спектром действия и высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий [2]. Цефалоспорины различаются по фармакокинетическим параметрам, по степени всасывания при разных путях введения, скорости наступления эффекта и длительности действия, а, следовательно, и необходимой частотой введения препарата, метаболизму и элиминации. Поэтому необходимо учитывать эти параметры при применении конкретного препарата.

В настоящее время для определения цефотаксима используются спектроскопические [3], хроматографические [4] и электрохимические [5, 6], методы. Для экспрессного определения цефотаксима в биосредах нами разработаны ионоселективные электроды на основе органических ионообменников тетрадециламмония с противоионом цефотаксима.

Экспериментальная часть

В работе использовались натриевые соли цефотаксима (Стох) фармакопейной чистоты.



Исходные $1 \cdot 10^{-1}$ М водные растворы готовили по точным навескам препарата в дистиллированной воде, рабочие $1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-6}$ М растворы получали последовательным разбавлением.

В работе использовались жидкоконтактные электроды с пластифицированными мембранами на основе ионных ассоциатов цефотаксима (клафорана) с тетрадециламмонием, которые получали согласно [7], соотношение поливинилхлорид — дибутилфталат = 1:3, $C_{ЭАК} = 0,01$ моль/кг ДБФ.

Корпусом пленочных электродов с жидкостным заполнением являлись поливинилхлоридные трубки, к тщательно отшлифованному торцу которых приклеивали мембранные диски. Клей получали растворением 0,5 г поливинилхлорида в 1 г дибутилфталата и 5 мл циклогексанона или тетрагидрофурана. После высыхания клея внутрь трубки заливали $1 \cdot 10^{-3}$ М растворы хлорида калия и цефотаксима в соотношении 1:1. Перед работой электроды выдерживали в $1 \cdot 10^{-3}$ М растворе цефотаксима в течение 1 сут.

Потенциометрические измерения проводили на ионном универсальном И-130М, погрешность измерения э.д.с. ± 1 мВ; электрод сравнения — хлоридсеребряный ЭВЛ-1МЗ. Кислотность растворов контролировали с помощью иономера рХ-150М со стеклянным и хлоридсеребряным электродами. Спектрофотометрические исследования проводили в автоматическом режиме на спектрофотометре СФ-201.

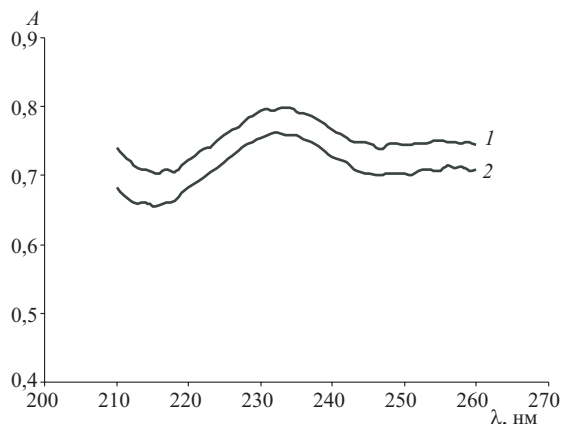


Рис. 1. Спектры светопоглощения цефотаксима (1) и клафлорана (2) ($C_{\text{ант}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)

Результаты и их обсуждение

Цефалоспорины в растворенном состоянии, также как и пенициллины, неустойчивы. Стабильность растворов цефалоспоринов зависит от таких факторов, как температура, pH раствора и пр. При хранении образцов биологической жидкости (сыворотки) в обычных условиях, например, цефотаксим переходит в дезацетилцефотаксим. При температуре $\sim -20^\circ\text{C}$ антибиотик устойчив в течение трех недель [8].

Перед нами стояла задача выбора оптимальной кислотности среды, при которой растворы антибиотиков устойчивы и величина угла наклона электродной функции была бы максимально приближена к теоретическому значению.

Нами проведено спектрофотометрическое исследование растворов цефотаксима различных производителей: “Клафоран” “laboratories Roussel Diamant”, (Франция); “Цефотаксим” “Грин Парк”, Нью Дели, (Индия). Из рис. 1 следует, что $\lambda_{\text{max}} = 236 \text{ nm}$ характерна как для цефотаксима, так и для клафлорана. При изменении кислотности среды свежеприготовленных растворов цефотаксима происходит как смещение λ_{max} , так и изменение оптической плотности (рис. 2). Увеличение величин оптической плотности и λ_{max} при изменении кислотности среды можно объяснить тем, что в кислой среде цефалоспорины быстро гидролизуются, β -лактамное кольцо раскрывается, образуя производное 7 аминоцефалоспориновой кислоты, а в случае цефотаксима происходит дальнейшая гетероциклизация (лактонизация), образуется дезацетилцефотаксим. Дезацетилцефотаксим — производное цефотаксима, метаболит, который в больших количествах может быть обнаружен в биологических жидкостях. Метаболит также проявляет микробиологическую активность и известно, что соединение максимально стабильно в интервале pH 4,3 – 6,5 [8]. Все дальнейшие исследования были проведены со свежеприготовленными растворами антибиотиков.

Методом осадительного потенциометрического титрования было установлено, что тетрадециламмоний реагирует с цефалоспоридами в стехиометрическом соотношении 1:1, величина произведения растворимости $K_s = (2,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$. Ионные ассоциаты тетрадециламмония с цефотаксимом и клафлораном использованы в качестве электродноактивных компонентов ИСЭ.

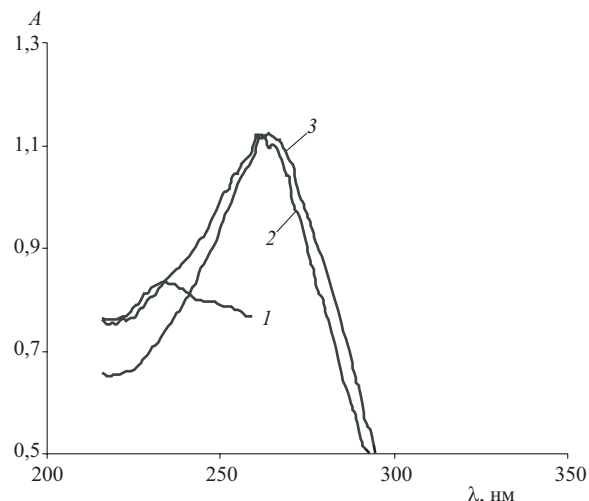


Рис. 2. Спектры поглощения $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ раствора цефотаксима (производитель “Грин Парк”, Нью Дели, Индия) при различной кислотности среды: pH = 2,0 (1), pH = 4,0 (2), pH = 6,0 (3)

Проведенное термоаналитическое исследование активных компонентов мембран выявило температурный интервал существования фазы ионных ассоциатов — высушивание образцов следует проводить при $60 - 70^\circ\text{C}$.

Электродноаналитические свойства ионоселективных электродов в растворах цефотаксима. Электродные функции ИСЭ в растворах цефалоспоринов выполняются в интервале $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Угловые коэффициенты электродных функций близки к теоретическим для однозарядных ионов (рис. 3). Стабильность электроаналитических характеристик сохраняется в течение 6 месяцев. Время установления стационарного потенциала — 1 – 2 мин, дрейф потенциала $\pm 2 \text{ мВ/сут}$. Предел обнаружения для цефотаксима составляет $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, оптимальный интервал pH 4,3 – 6,5. Сравнение основных электрохимических характеристик ИСЭ на основе ионных ассоциатов тетрадециламмония с цефалоспоридами показало, что лучшими эксплуатационными параметрами обладают электроды, в состав мембран которых входит клафоран.

Ксел к цефотаксиму при совместном присутствии с цефозолином близок к единице, что свидетельствует о возможности использования ИСЭ для определения индивидуальных антибиотиков или их суммарного содержания. Значения $K_{\text{сел}}$ к ряду неорганических ионов — Cl^- , Br^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} находится в пределах $n \cdot 10^{-2} - n \cdot 10^{-3}$, что позволяет использовать данные электроды для определения цефотаксима в биологических жидкостях.

Результаты определения цефотаксима в смешанной слюне больных ($n = 3, p = 0,95$)

Пациент	Найдено, мкг/мл	Относительное стандартное отклонение, S_2
1	$0,10 \pm 0,02$	0,08
2	$0,12 \pm 0,02$	0,07
3	$0,31 \pm 0,20$	0,03
4	$0,23 \pm 0,01$	0,02
5	$0,40 \pm 0,05$	0,05

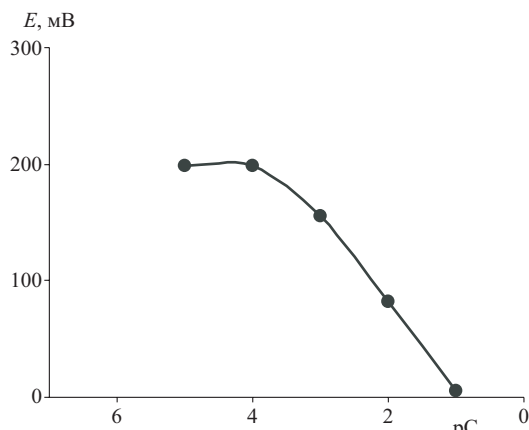


Рис. 3. Зависимость $E = f(-\lg C_{\text{ант}})$ в растворе цефотаксима

Ранее нами были разработаны методики экспрессного определения антибиотиков пенициллинового ряда в сыворотке крови больных с тонзиллярной патологией [5]. В настоящей работе в качестве объекта исследования была выбрана смешанная слюна (жидкость ротовой полости). Жидкость полости рта реализует ионообменные реакции между различными зонами, тканями и органами. Сопоставление данных о концентрации лекарственных веществ в слюне и их свободной несвязанной фракции в плазме крови может позволить использовать в клинических и экспериментальных исследованиях фармакокинетики вместо проб крови более доступные пробы слюны [9]. Преимущества анализа слюны по сравнению с анализом крови заключаются в следующем: безболезненность взятия пробы, простота, удобство, отсутствие риска внесения инфекции, невозможность травмы кожи и стенки сосуда, адекватность концентрации вещества фармакотерапевтическому эффекту в полости рта. Концентрации антибиотиков в слюне в большинстве случаев в десятки раз ниже соответствующих концентраций в крови [9], вследствие чего для их определения необходим высокочувствительный количественный метод.

Методика определения цефотаксима в смешанной слюне (жидкости ротовой полости). Отбор проб смешанной слюны осуществляли путем сплевывания ротовой жидкости в чистые сухие полиэтиленовые пробирки. Пробу отбирали спустя 1,5–2 ч после введения антибиотиков, перед сбором ротовую полость ополаскивали водой.

Пробоподготовка смешанной слюны осуществлялась следующим образом. Пробу смешанной слюны больных центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин, добавляли 0,2 мл осадителя (спирт-ректификат C_2H_5OH) и центрифугировали еще 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали в ячейку (3–5 мл), погружали индикаторный и

хлоридсеребряный электроды, при перемешивании измеряли значение э.д.с. (E_1). Затем вводили добавку ($V_d = 0,1$ мл; $C_d = 4,74$ мгк/мл) стандартного раствора цефотаксима и измеряли E_2 .

Для предотвращения белкового отравления поверхности ионоселективных электродов предварительно проводили их кондиционирование в течение 20 мин в смешанной слюне доноров. После проведения измерений в биологической жидкости необходимо электрод кондиционировать в дистиллированной воде.

Расчет содержания цефотаксима проводили по формуле:

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

где C_x — концентрация цефотаксима, моль/л; V_x — объем пробы, мл; C_d — концентрация добавки, М; V_d — объем добавки, мл; E_1, E_2 — потенциал электродов в исследуемом растворе и в растворе с добавкой, соответственно, мВ; S — угол наклона электродной функции.

Результаты определения цефотаксима (клафорана) в смешанной слюне больных представлены в таблице.

Для оценки правильности разработанной методики в пробу смешанной слюны донора вводили добавку стандартного раствора антибиотика и далее пробу проводили через все стадии пробоподготовки. Показано, что найденные значения содержания антибиотиков соответствуют введенным (относительная погрешность определения составляет 1–5 %).

Таким образом, разработанные электроды позволяют детектировать цефотаксим в биологических жидкостях.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Ч. 2, Медицина, Москва (2005).
2. Ю. Б. Белоусов, Е. А. Ушкалова, *Антибиотики и химиотерапия*, **46**(11), 23–35 (2001).
3. A. Alwartham, S. Adbel Fattan and N. Zahran, *Talanta*, **32**(6), 703–707 (1992).
4. C. Hendrix, J. Thomas, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Liquid Chromatogr.*, **16**(2), 421–445, (1993).
5. Е. Г. Кулапина, В. В. Барагузина, О. И. Кулапина, *Журн. аналит. химии*, **59**(9), 971–975 (2004).
6. A. Abulkibash, S. Sultan, A. Al-Olyan, *Talanta*, **61**, 239–244, (2003).
7. Е. Г. Кулапина, В. В. Барагузина, О. И. Кулапина, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(3), 97–99 (2006).
8. Л. И. Соколова, А. П. Черняев, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(5), 39–45 (2002).
9. Е. М. Лакин, М. М. Зорян, М. М. Кац и др, *Фармакол. и токсикол.*, **50**(4), 93–100 (1987).

Поступила 07.11.06

IONOMETRIC DETERMINATION OF CEFOTAXIME IN BIOLOGICAL MEDIA

O. I. Kulagina¹, V. V. Baraguzina², and N. V. Skoblikova²

¹ Saratov State Medical University, Saratov, Russia;

² Saratov State University, Saratov, Russia

Ion-selective electrodes based on ion exchangers of tetradecylammonium (TDA) with cefotaxime (clofaran) anions have been developed. The proposed electrodes are sensitive to cephalosporins in a range of concentrations from 1×10^{-5} to $1 \cdot 10^{-1}$ mole/liter. The time of establishing of a steady-state potential is 1–2 min, the potential drift does not exceed +2 mV/day. The detection threshold for cefotaxime is 3.6×10^{-5} mole/liter in the optimum range of pH 4.3–6.5. A comparison of the main electrochemical characteristics of the ion-selective electrodes based on TDA associates with cephalosporins showed that the best parameters are inherent in the electrodes with membranes containing clofaran.