

Экспрессное определение цефалексина в биосредах

О. И. КУЛАПИНА¹, А. М. ВОСТРИКОВА²

¹ Кафедра детских болезней Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского, Саратов

² Кафедра аналитической химии и химической экологии Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

Rapid Determination of Cephalexin in Biological Media

O. I. KULAPINA, A. M. VOSTRIKOVA

Department of Children Diseases, V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov

Department of Analytical Chemistry and Chemical Ecology, N. G. Chernyshevsky Saratov State University, Saratov

Спектрофотометрическим методом изучена фармакокинетика цефалексина в лекарственных и биологических средах. Определены диапазоны линейности показателей содержания и пределы обнаружения цефалексина. Показаны возможности спектрофотометрического определения цефалексина в смешанной слюне и сыворотке крови. Выявлены оптимальные условия осаждения белков при анализе. Проведено определение цефалексина в жидкости ротовой полости больных с инфекцией верхних дыхательных путей.

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

The behavior of cephalexin in pharmaceutical and biological media was studied by spectrophotometric method. The ranges of linearity and the limits of cephalexin detection were determined. The possibilities of spectrophotometric cephalexin determination in mixed saliva and in blood serum were shown. Optimal conditions of proteins precipitation were revealed. Pharmacokinetic parameters of cephalexin in oral fluid of patients with sinusitis were determined.

Key words: cephalexin, aqueous media, oral fluid, saliva, blood serum, spectrophotometry.

Введение

Беталактамы (β-лактамы) — группа препаратов, которую объединяет наличие в структуре β-лактамного кольца. Механизм антибактериального действия этих антибиотиков заключается в блокировании конечной стадии синтеза стенки бактерий, в результате чего происходит лизис клетки, а также может возникнуть перекрестная аллергия у некоторых пациентов [1, 2]. Пенициллины, цефалоспорины и монобактамы чувствительны к гидролизующему действию особых ферментов — β-лактамаз, вырабатываемых рядом бактерий. С учётом высокой клинической эффективности и низкой токсичности β-лактамы антибиотиков составляют основу антимикробной химиотерапии на современном этапе, занимая ведущее место при лечении большинства инфекций [3, 4].

Цефалексин — цефалоспориновый антибиотик I поколения, обладает бактерицидным эффектом и широким спектром антибактериального действия. Цефалексин почти полностью всасывается в желудочно-кишечном тракте [1]. Для определения цефалексина в лекарственных

препаратах предложены спектрофотометрия [5–7], кинетическая спектрофотометрия [8–9], единичные работы посвящены спектрофлуориметрическому определению цефалексина в плазме крови, моче [10].

Слюнные железы и полость рта являются одной из зон возможного распределения лекарственных веществ. Ротовая жидкость стабилизирует значения отношения концентраций веществ к таковой в плазме крови [11].

Цель настоящего исследования заключалась в разработке экспрессных спектрофотометрических методик определения цефалексина в биологических средах практически здоровых лиц и больных с инфекцией верхних дыхательных путей.

Материал и методы

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

В работе использовали капсулы цефалексина (Немфарм, Сербия), активное вещество — [6R-[6-альфа, 7-бета(R*)]]-7-[(аминофенилацетил)амино]-3-метил-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-карбоновая кислота, (C₁₆H₁₇N₃SO₄) (рис. 1).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, совмещённым с IBM PC, с использованием кювет из кварцевого стекла. Для измерения pH применяли pH — метр рХ-150Мп, погрешность измерения ± 0,01 pH. Для отделения белковых компонентов из биосред использовали центрифугу Wirowka MPW-6.

© О. И. Кулапина, А. М. Вострикова, 2014

Адрес для корреспонденции: 410012 г.Саратов, ул. Б.Казачья, 112. Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского

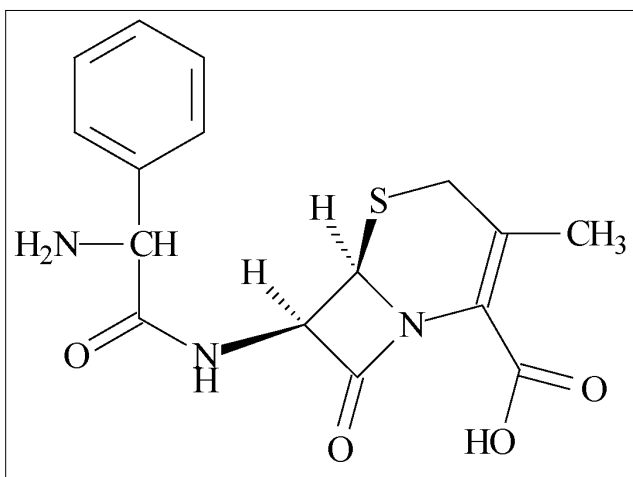


Рис. 1. Структурная формула цефалексина.

Раствор цефалексина 1 мг/мл готовили путём растворения навески 0,0276 г, содержащей 0,0250 г антибиотика (с учётом содержания основного вещества) в небольшом количестве дистиллированной воды с последующим фильтрованием. 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. Объём промывных вод вместе с объёмом исходной пробы ~ 25 мл. В дополнительных порциях промывных вод (на фильтре и при центрифугировании) полосы поглощения цефалексина отсутствуют. Раствор в концентрации 100 мкг/мл готовили разбавлением исходного.

В работе использовали ацетатные буферные растворы (рН 3-6), стандартный 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, 0,1 М раствор гидроксида натрия, 0,5% раствор сульфата цинка.

Методика спектрофотометрического определения цефалексина в ротовой жидкости и сыворотке крови.

Пробоподготовка ЖРП: отбор проб смешанной слюны практически здоровых лиц осуществляли путём сплевывания ротовой жидкости в чистые сухие полиэтиленовые пробирки. Пробы отбирали спустя 1–2 ч после приёма пищи, перед сбором ротовую полость ополаскивали водой.

Пробоподготовку проводили двумя способами:

I способ (механический): пробу ЖРП центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин; отбирали надосадочную жидкость, вносили добавки стандартных растворов антибиотика и помещали в кювету для измерения;

II способ (с осаждением белков): пробу ЖРП центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин. Затем к 7,5 мл пробы добавляли 0,5 мл гидроксида натрия ($c=0,12$ моль/л) и 2,5 мл сульфата цинка ($c=5,4$ г/л), нагревали на водяной бане в течение 10 мин. После осаждения белков отбирали надосадочную жидкость и снова центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин.

Аналогичным образом отбирали и готовили пробы ротовой жидкости больных с инфекцией верхних дыхательных путей, принимающих цефалексин (использовали I способ).

Пробоподготовка сыворотки крови: пробу сыворотки крови центрифугировали в течение 15 мин при 3500 об/мин. Затем к 5 мл пробы добавляли 0,5 мл гидроксида натрия ($c=0,12$ моль/л) и 2,5 мл сульфата цинка ($c=5,4$ г/л). Нагревали на водяной бане в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и снова центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин.

Для приготовления серии растворов цефалексина (1–50 мкг/мл) на фоне ЖРП и сыворотки крови (после предвари-

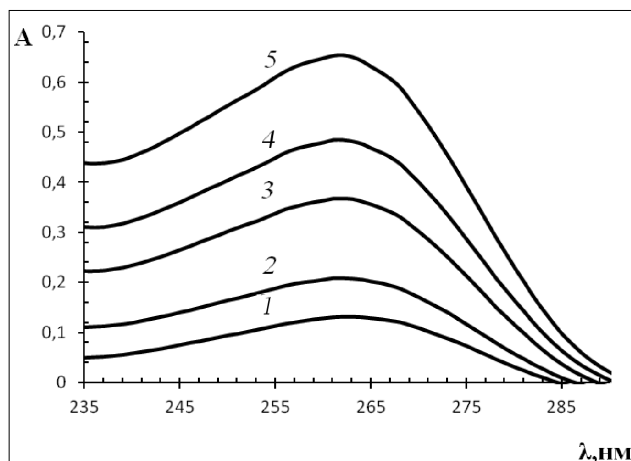


Рис. 2. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов цефалексина при различных концентрациях: 1 – 10,0 мкг/мл; 2 – 16,7 мкг/мл; 3 – 26,7 мкг/мл; 4 – 33,3 мкг/мл; 5 – 43,3 мкг/мл; $\lambda_{\max}=262$ нм.

тельного осаждения белков), дозатором отбирали 0,03–0,5 мл раствора антибиотика ($c=100$ мкг/мл) и до 3 мл добавляли надосадочной жидкости биосред, растворы перемешивали и снимали спектры поглощения цефалексина относительно биосред без добавки антибиотика. Строили градуировочные графики в координатах оптическая плотность – концентрация цефалексина.

Исследования проведены для группы практически здоровых лиц ($n=6$, средний возраст 21 ± 2 года) и больных с инфекцией верхних дыхательных путей, принимающих два раза в сутки по 500 мг цефалексина. Фармакокинетические исследования проводили по пробам ЖРП, полученным через 2, 3, 4, 5, 6 и т. д. ч после перорального приёма больными 0,5 г цефалексина. Концентрацию цефалексина в жидкости ротовой полости определяли способом градуировочного графика. Статистическую обработку проводили согласно [12].

Результаты и обсуждение

Спектры поглощения водных растворов цефалексина при различных концентрациях приведены на рис. 2.

Показано, что $\lambda_{\max}$ не различается для исследуемых растворов и соответствует 262 нм. Кислотность при всех концентрациях антибиотика не меняется и составляет рН $5,20 \pm 0,12$.

Для построения градуировочного графика снимали спектры поглощения водных растворов цефалексина различных концентраций; строили зависимость оптической плотности ($\lambda_{\max}=262$ нм) от концентрации водных растворов цефалексина.

Наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации цефалексина в водных и биологических средах. Градуировочные графики обрабатывали по методу наименьших квадратов (МНК) и оценивали при этом коэффициенты корреляции, которые показывают, что зависимость оптической плотности от концентрации цефалексина линейная (рис. 3 а, б). Коэффициент корреляции практически равен 1 ($y=0,0151x-0,0151$; $R^2=0,9976$), что свидетельству-

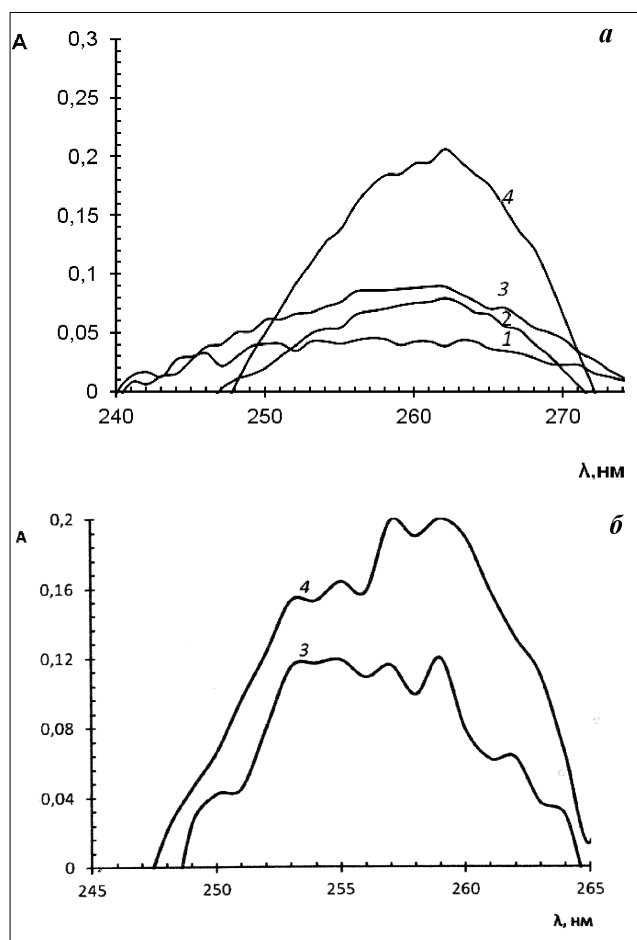


Рис. 3. Спектры поглощения цефалексина на фоне ротовой жидкости (а) и сыворотки крови (б) практически здоровых лиц: 1— 3,3 мкг/мл; 2— 10,0 мкг/мл; 3— 16,9 мкг/мл; 4— 42,4 мкг/мл.

ет о незначительном разбросе точек от усреднённой зависимости. Предел обнаружения антибиотика данным методом составляет 3 мкг/мл.

Водные растворы цефалексина устойчивы в течение суток, затем происходит деградация антибиотика — оптическая плотность резко падает. Поскольку цефалексин — амфотерный антибиотик, содержащий карбоксильную и аминогруппу, его состояние зависит от кислотности среды: цефалексин существует в виде аниона- L^- (в щелочной среде), цвиттер-иона- $HL^\pm$ (в нейтральной среде) или катиона- H_2L^+ (в кислой среде), которые находятся в равновесии [13]. Для цефалексина характерны две константы кислотной диссоциации: K_1 соответствуют диссоциации катиона с отщеплением протона от карбоксильной группы и образовании цвиттер-иона $H_2L^+ \leftrightarrow HL^\pm + H^+$. K_2 соответствуют диссоциации цвиттер-иона с отщеплением протона координированного аминогруппой и образованием аниона: $HL^\pm \leftrightarrow L^- + H^+$.

Были сняты спектры поглощения цефалексина при различных значениях pH от 3,22 до 10,86. Показано, что в связи с существованием цефа-

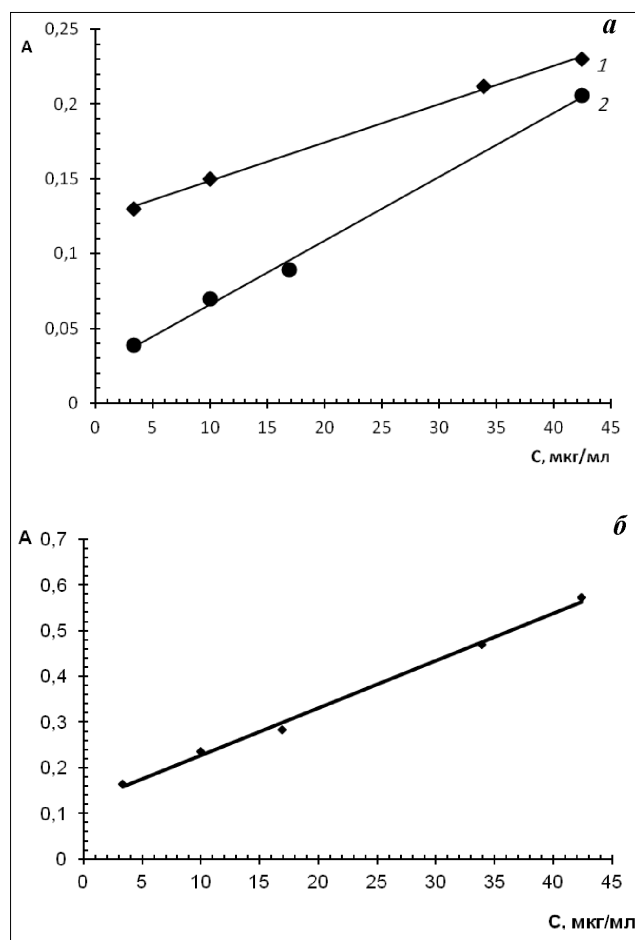


Рис. 4. Зависимость оптической плотности от концентрации цефалексина в сыворотке крови (1) и ротовой жидкости: с предварительным осаждением белков (2), после центрифугирования (3).

лексина в различных формах, его определение необходимо проверить при фиксированной кислотности среды (pH 5—7).

Для оценки возможности спектроскопического определения цефалексина была проведена апробация метода на смешанной слюне и сыворотке крови практически здоровых лиц с внесённым антибиотиком.

Для спектров поглощения цефалексина на фоне ЖРП установлено, что $\lambda_{\max} = 259$ нм, при осаждении белков $\lambda_{\max} = 262$ нм (рис. 3 а).

Зависимость оптической плотности от концентрации растворов цефалексина на фоне ЖРП была линейна, $y = 0,0104x + 0,1242$; $R^2 = 0,9961$ — после центрифугирования (рис. 4 б); $y = 0,0043x + 0,0237$; $R^2 = 0,9961$ — после осаждения белков (рис. 4 а, кривая 2). Диапазон определяемых содержаний цефалексина в ЖРП составляет 3,3—42,4 мкг/мл, предел обнаружения антибиотика 3,3 мкг/мл.

Исследовано поведение цефалексина на фоне ЖРП во времени. Показано, что антибиотик устойчив в течение суток, затем происходит его деградация.

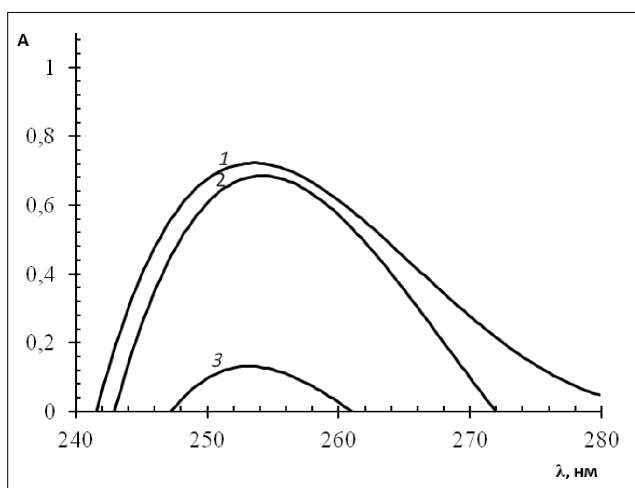


Рис. 5. Спектры поглощения цефалексина на фоне жидкости ротовой полости больной В. для проб, отобранных в различные промежутки времени после приема антибиотика: 1— 2 ч; 2— 4 ч; 3— 6 ч.

Для спектров поглощения цефалексина на фоне сыворотки крови установлено, что $\lambda_{\max}=259$ нм (рис. 3 б).

Показано, что зависимость оптической плотности от концентраций цефалексина на фоне сыворотки крови линейна, $y=0,0023x+0,1335$; $R^2=0,9834$. Диапазон определяемых содержаний цефалексина в сыворотке крови составляет 3,3—42,4 мкг/мл, минимально определяемое содержание антибиотика составляет 3,3 мкг/мл (рис. 4 а, кривая 1).

Спектроскопическим методом исследования поведения цефалексина на фоне сыворотки крови во времени (1—14 сут) показано, что антибиотик устойчив в течение суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев В.П., Яковлев С.В. Рациональная антимикробная фармакотерапия. М.: 2007; 784.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: 2004; 528.
3. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р. Антибактериальная терапия абдоминальной хирургической инфекции. М.: 2006; 168.
4. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М.: 2002; 350.
5. Fernández-González A., Badía R., Díaz-García M.E. Comparative study of the micellar enhanced spectrophotometric determination of β -lactamic antibiotics by batch and flow injection analysis using a multisimplex design. J Pharm Biomed Anal 2002; 29: 669—679.
6. Ahmed A.S.M., Elbashir A.A., Aboul-Enein H.Y. New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations. Arab J Chem 2011; 76: 332—346.
7. Alwarthan A., Abdel Fattah S., Zahran N.M. Spectrophotometric determination of cephalixin in dosage forms with imidazole reagent. Talanta 1992; 39: 6: 703—710.
8. Omar M.A., Abdelmageed O.H., Attia T.Z. Kinetic spectrophotometric determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations. Int J Anal Chem 2009; 209: 7: 645—656.
9. El-Shaboury S.R., Mohamed F.A., Saleh G.A. et al. Analysis of cephalosporin antibiotics. J Pharm Biomed Analysis 2007; 45: 1: 1—19.
10. Hefnawy M., El-Shabrawy Y., Belal F. Spectrofluorometric determination of alpha-aminoccephalosporins in biological fluids and pharmaceutical preparations. J Pharm Biomed Analysis 1999; 21: 4: 703—707.
11. Гончаров И.Б., Ковачевич И.В., Репенкова Л.Г. и др. Влияние антиортоstaticкой гипокинезии на фармакокинетику ацетаминофена и распределение его в слюне здоровых добровольцев. Хим-фарм журн 2009; 43: 5: 3—6.
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: 2002; 312.
13. Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь: 2009; 104.

Спектры поглощения цефалексина на фоне ротовой жидкости и сыворотки крови были идентичны (см. рис. 3 а, б). Наличие линейной зависимости оптической плотности от концентрации цефалексина в исследуемых биосредах (см. рис. 4 а) свидетельствует о возможности использования для определения антибиотика ротовой жидкости вместо сыворотки крови больных.

Проведено определение цефалексина в смешанной слюне больных с инфекцией верхних дыхательных путей, принимающих перорально препарат по 500 мг 2 раза в сут (8:00—20:00) в течение 5 сут. Отбор проб смешанной слюны проводили через каждый час. Пробы центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин, помещали в кварцевые кюветы по 3 мл проб смешанной слюны больных, снимали спектры поглощения относительно жидкости ротовой полости доноров (без содержания антибиотика). По градуировочному графику (см. рис. 4 б) определили содержание цефалексина в ЖРП.

На рис. 5 в качестве примера представлены спектры поглощения цефалексина в жидкости ротовой полости больной В. для проб, отобранных в различные промежутки времени в первый день приёма антибиотика.

При пероральном приёме в 8:00 утра 500 мг препарата среднее значение концентрации в ЖРП через час составляет 60 ± 4 мкг/мл, через 4 часа снижается до 50 мкг/мл, к 14:00 часам (через 8 ч) цефалексин практически отсутствует в анализируемых пробах.

Таким образом, показана возможность использования для определения концентрации цефалексина вместо сыворотки крови ротовой жидкости больных.