



УДК 543.554.6:615.33

ТВЕРДОКОНТАКТНЫЕ И ПЛАНАРНЫЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕФОТАКСИМА В ВОДНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Е. Г. Кулапина, М. С. Тютликова

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
E-mail: kulapinaeg@mail.ru

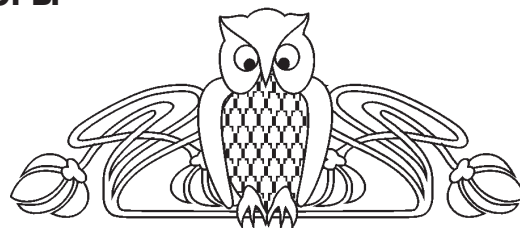
Цефотаксим – цефалоспориновый антибиотик, обладающий высокой эффективностью при лечении тяжелых бактериальных инфекций. Для определения цефалоспориновых антибиотиков в различных объектах применяются спектроскопические, хроматографические, электрохимические, иммуноферментные и др. методы, которые требуют дорогостоящей аппаратуры и органических растворителей. Потенциометрические сенсоры позволяют экспрессно детектировать цефалоспориновые антибиотики в малых пробах, без предварительной подготовки. Целью работы является создание твердоконтактных и планарных потенциометрических сенсоров для определения цефотаксима в водных и биологических средах. Задачи исследования: определение оптимального состава мембран и углеродсодержащих чернил сенсоров; оценка их электроаналитических характеристик в водных и биологических средах. В качестве активных компонентов мембран использовали соединение тетрадециламмония (TDA) с комплексом серебро (I) – цефотаксим ($\text{Ag}(\text{Ceftx})_2$). Определены основные электроаналитические и операционные характеристики исследуемых сенсоров в водных растворах цефотаксима и на фоне жидкости ротовой полости: интервал линейности электродной функции, угловые коэффициенты, время отклика, дрейф потенциала, предел обнаружения и срок службы. Проведена сравнительная оценка электроаналитических свойств твердоконтактных и планарных сенсоров и показана возможность их применения для определения цефотаксима в водных и биологических средах, в микрообъемах проб, что важно при исследовании фармакокинетики антибиотиков, определения максимальной терапевтической дозы, корректировки процесса лечения.

Ключевые слова: твердоконтактные потенциометрические сенсоры, цефотаксим, водные и биологические среды.

The Solid-state and Planar Sensors for the Determination of Cefotaxime in Aqueous and Biological Fluids

E. G. Kulapina, M. S. Tyutlikova

Cefotaxime is a cephalosporin antibiotic possessing a high efficiency at curing severe bacterial infections. For the determination of cephalosporin antibiotics in different objects, spectroscopic, chromatographic, electrochemical methods, immunoassay, etc. are used, which demand for expensive devices and organic solvents. Potentiometric sensors let one expressively detect cephalosporin antibiotics in small samples without previous sample preparation. The work was aimed at the creation of solid-state and planar potentiometric sensors for the determination of cefotaxime in aqueous and biological media. The tasks of investigation: determination of optimal composition of membranes and carbon-containing ink of the sensors; evaluation of their electroanalytical characteristics in aqueous and biological media.



As the membranes active component, the compound of tetradecylammonium (TDA) with the silver (I) – cefotaxime complex were applied. The main electroanalytical and operational characteristics (linearity interval of electrode function, angular coefficient, response time, drift potential detection limit and lifetime) of the sensors under study in cefotaxime aqueous solutions and mixed saliva have been determined. A comparative evaluation of the electroanalytical properties of solid-state and planar sensors has been carried out, and the possibility of their application for the determination of cefotaxime in aqueous and biological media, in microvolumes of samples has been shown, which is of importance at the investigation of antibiotics pharmacokinetics, determination of the maximal therapeutic dose, and correction of the therapy process.

Key words: solid-state potentiometric sensors, cefotaxime, aqueous and biological fluids.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-14-18

Введение

Цефалоспориновые антибиотики – обширная группа антибиотиков, относящаяся к классу β -лактамов. Цефалоспорины состоят из соединенных β -лактамного и дигидротиазинового циклов и имеют две боковые цепи радикалов, которые могут иметь различную химическую природу. От их структуры в значительной степени зависят антимикробная активность, химическая устойчивость, растворимость и кислотно-основные свойства антибиотиков. Входящий в группу цефалоспоринов цефотаксим эффективен по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным бактериям. По химической природе он близок к цефалоспорином первого и второго поколения, однако особенности его структуры обеспечивают устойчивость к действию продуцируемых ими β -лактамаз [1]. Цефотаксим – антибиотик III поколения, имеющий в своей структуре карбоксильную и аминотиазольную группы [2, 3]. Его применяют при лечении тяжелых бактериальных инфекций, вызванных чувствительными микроорганизмами: инфекции дыхательных путей и лор-органов (за исключением энтерококковых), кожи и мягких тканей (включая инфицированные раны и ожоги), костей и суставов, мочевыводящих путей, бактериемия,



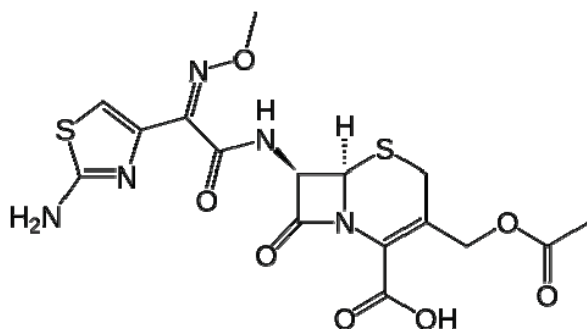
септицемия, перитонит, интраабдоминальные инфекции, бактериальный менингит (за исключением листериозного), эндокардит, болезнь Лайма и др. [1, 4, 5].

Для определения цефалоспориновых антибиотиков в различных объектах применяются спектроскопические, хроматографические, электрохимические, иммуноферментные и др. методы. Потенциометрические сенсоры позволяют экспрессно детектировать различные антибиотики [6].

В настоящей работе предложены твердоконтактные и планарные сенсоры на основе комплексных соединений серебра (I) с цефотаксимом и катионом тетрадециламмония ($\text{Ag}(\text{Ceftx})_2\text{TDA}$). Проведена сравнительная характеристика электроаналитических свойств твердоконтактных и планарных сенсоров в растворах цефотаксима, показана возможность их применения для определения антибиотика в биологических средах (ротовой жидкости).

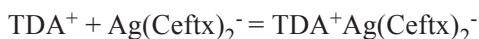
Экспериментальная часть

Цефотаксим ([6R - [бальфа,7бета(Z)]] - 3 - [(Ацетилокси)метил] - 7 - [[(2-амино - 4-тиазолил) (метоксиимино) ацетил] амино] - 8 - оксо - 5 - тиа - 1 - азабицикло [4.2.0] окт - 2 - ен - 2 - карбоновая кислота) представляет собой порошок белого со слегка желтоватым оттенком цвета. Физико-химические характеристики: $t_{\text{пл}} = 175$ °С; молекулярная масса 477.4 г/моль; растворимость образцов в воде при температуре 298 К – 95 г на 100 мл растворителя [7].



Исходные $1 \cdot 10^{-1}$ М водные растворы готовили растворением точной навески цефотаксима ($m = 1,3394$ г) в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 25 мл. Рабочие растворы концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ М получали последовательным разбавлением исходных.

Синтез электродноактивных соединений осуществляли по реакции обмена, представленной на следующей схеме:



Синтез ЭАК осуществляли в два этапа:

- 5 мл водного раствора цефотаксима ($C = 2 \cdot 10^{-2}$ М) помещали в химический стакан, добавляли к нему 5 мл раствора нитрата серебра ($C = 1 \cdot 10^{-2}$ М) и несколько капель раствора NaOH для создания щелочной среды $\text{pH} \approx 8$. Смесь тщательно перемешивали.

- В делительную воронку помещали 5 мл водного раствора комплексного соединения серебра (I) – цефотаксим и 5 мл раствора TDA ($C = 1 \cdot 10^{-2}$ М) в хлороформе. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение двух часов. Затем хлороформный слой отделяли от водной фазы в предварительно взвешенный бюкс и оставляли под тягой до полного испарения хлороформа.

Приготовление пластифицированных мембран. Для приготовления пластифицированных мембран в бюкс помещали навески электродноактивного компонента, растворителя-пластификатора дибутилфталата (ДБФ). Затем при перемешивании на магнитной мешалке добавляли 3 мл растворителя (циклогексанона) и постепенно навеску поливинилхлорида (соотношение ПВХ:ДБФ по массе равно 1:3). Перемешивание продолжали до образования гомогенной системы. Полученную мембранную композицию выливали в чашку Петри и оставляли под тягой до полного испарения растворителя. Высушивание проводили на строго горизонтальной поверхности для получения мембраны одинаковой толщины. Приготовленная мембрана имеет вид эластичной и прозрачной пленки толщиной около 0,5 мм. К тщательно отшлифованному графитовому стержню твердоконтактного сенсора приклеивали ионоселективные мембранные диски диаметром 5–7 мм. Перед работой сенсоры кондиционировали в течение суток в 10^{-3} М растворе цефотаксима.

Для изготовления углеродсодержащих чернил планарных сенсоров в стеклянный бюкс помещали 0,3627 г пластификатора – дибутилфталата, 0,6166 г порошка углерода, 0,0399 г электродноактивного соединения. Бюкс помещали на магнитную мешалку и при небольшом нагревании добавляли 2 мл растворителя (смесь ацетона и циклогексанона в соотношении 1:1) и постепенно 1,0156 г ПВХ. Смесь перемешивали до состояния однородной гомогенизации. Оптимальное соотношение компонентов углеродсодержащих чернил: 30–32% порошка углерода, 16–18% ПВХ, 48–50% пластификатора, 2–5% ЭАС [8]. Перед началом работы рабочую поверхность подложки смазывали изолятором, в качестве которого выступал клей, изготовленный из ПВХ, дибутилфталата и циклогексанона. После



высыхания с помощью трафарета на подложку кисточкой наносили слой углеродсодержащих чернил, на котором закрепляли металлический токоотвод и изолировали его тремя слоями чернил. Вся поверхность полимерной подложки, кроме рабочей поверхности, диаметром 5 мм, изолировалась полимерным составом на основе ПВХ.

Измерения ЭДС проводили с использованием элемента с переносом типа: $\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{насыщ.}}/\text{исследуемый раствор}/\text{мембрана}/\text{графит}$.

Контакт между полуэлементами был осуществлен через солевой мостик, заполненный насыщенным раствором хлористого калия.

ЭДС цепи измеряли с помощью иономера И-160 МП при температуре $20 \pm 3^\circ\text{C}$ (погрешность измерения ЭДС ± 1 мВ). В качестве электрода сравнения использовали стандартный хлоридсеребряный электрод ЭВЛ-1М. Измерения ЭДС в анализируемых растворах проводили от меньшей концентрации к большей. Для ускорения достижения постоянного потенциала внешний раствор перемешивали на магнитной мешалке.

Время установления стационарного потенциала сенсоров определяли при скачкообразном изменении концентраций антибиотиков на порядок. Измерения проводили в растворах с концентрацией $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$ М.

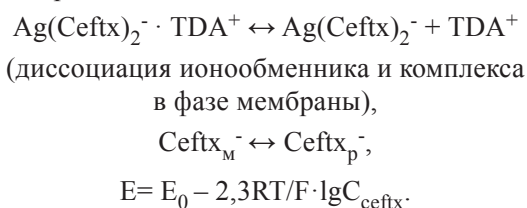
Контроль pH растворов проведен на pH метре рХ 150 мП с использованием стеклянного (ЭСЛ-63-07) и хлоридсеребряных ЭВМ-1МЗ электродов.

Для отделения белковых компонентов из смешанной слюны использовали центрифугу ТУ5.375-4262-76, ОПн-8УХЛ4.2.

Результаты и их обсуждение

Изучены электроаналитические свойства новых потенциометрических сенсоров, чувствительных к цефотаксиму. Для построения электродных функций использовали свежеприготовленные растворы цефотаксима ($C = 1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$ М) (рис. 1, 2).

Потенциалоопределяющей является реакция ионного обмена на границе раздела мембрана/раствор:



Как видно из рис. 1, 2, линейность электродных функций наблюдается в пределах концентра-

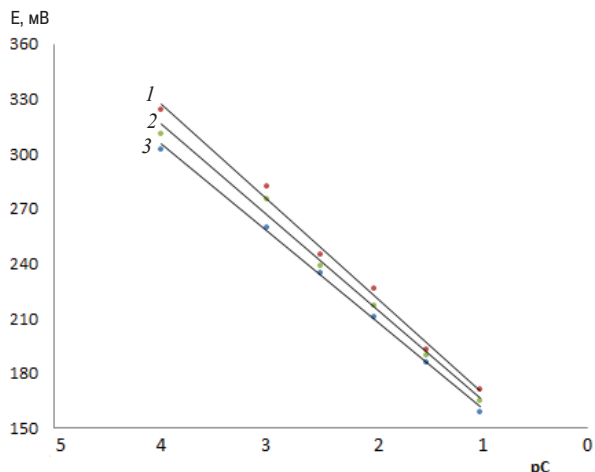


Рис. 1. Электродные функции твердоконтактного сенсора в растворах цефотаксима во времени, сут: 1 – 1; 2 – 3; 3 – 5

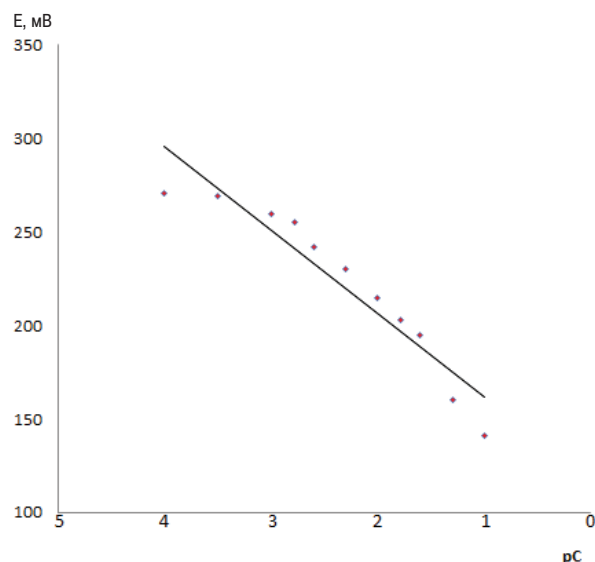


Рис. 2. Электродная функция планарного сенсора ($C_{\text{ЭАК}} = 2\%$)

ций $5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$. Отклонение от линейности в более разбавленных растворах может быть связано с растворением ионообменника в фазе мембраны. Угловые коэффициенты электродных функций находятся в пределах 49–56 мВ/рС и соответствуют значениям нернстовской величины для однозарядных ионов. В табл. 1 приведена сравнительная характеристика электроаналитических свойств твердоконтактных и планарных сенсоров.

По электроаналитическим характеристикам твердоконтактный сенсор превосходит планарный. Основное преимущество планарного сенсора заключается в возможности проведения исследования в малых объемах проб. По истечении 2 месяцев твердоконтактные сенсоры не проявляют чувствительности к цефотаксиму:



Таблица 1

Электроаналитические свойства сенсоров на основе $\text{Ag}(\text{Ceftx})_2\text{TDA}$

Электроаналитические характеристики	Сенсор	
	твердоконтактный	планарный
$E=f(C)$, М	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$
S , мВ/рС	55 ± 5	45 ± 4
$C_{p, \text{min}}$, М	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
$t_{\text{стаб.}}$, с (10^{-2} М)	130	50
V_{min} , мл	0,02	0,02

угловой коэффициент электродной функции уменьшается с 56 до 32 мВ/рС. Срок службы планарных сенсоров около 1 месяца.

Поведение сенсоров на фоне жидкости ротовой полости

Объектом исследования была выбрана жидкость ротовой полости. Жидкость ротовой полости (ЖРП), или смешанная слюна, – биологическая жидкость человека, легкодоступная для определения самых разнообразных соединений. Она представляет собой огромный интерес для изучения фармакокинетики антибиотиков в связи с простотой и неинвазивностью отбора проб.

Жидкость ротовой полости содержит 98–99% воды, около 0,5 % неорганических солей (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , F^- , Cl^- ,

HCO_3^- , SO_4^{2-} и др.) и до 1 % органических веществ (белки, мочевины, аммиак, креатин, остатки пищи и др.) [9].

Сбор ЖРП проводили через полчаса после еды. Перед сбором смешанной слюны ротовую полость ополаскивали водой. В чистые полиэтиленовые пробирки собирали слюну, центрифугировали ее в течение 10 мин при 3500 об/мин для осаждения белков и твердых остатков пищи. Аликвотную часть надосадочной жидкости отбирали в ячейку, вносили добавку цефотаксима, погружали электрод и измеряли ЭДС при постоянном перемешивании. Предварительно электроды кондиционировали в ЖРП без антибиотика в течение 20 мин.

На рис. 3 представлены электродные функции твердоконтактного и планарного сенсоров в растворах цефотаксима на фоне ЖРП.

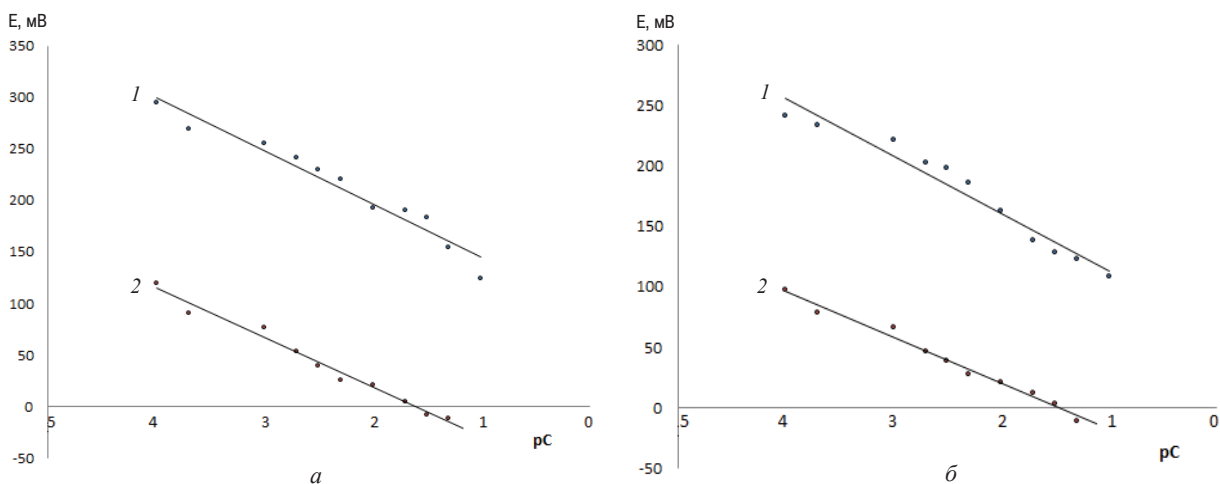


Рис. 3. Электродные функции сенсора в водном растворе (1) и на фоне ЖРП (2): а – твердоконтактного; б – планарного

Как видно по рис. 3, сенсоры проявляют чувствительность к цефотаксиму на фоне ЖРП. Наблюдается отклонение значений электродных потенциалов в сторону отрицательных значений. Это может быть связано с сильным фоновым влиянием неорганических и органических ионов, входящих в состав ЖРП. Сенсоры имеют достаточно большую область

линейности, поэтому возможно их применение при определении цефотаксима в биологических жидкостях.

Нами проведено определение цефотаксима в модельных водных растворах и на фоне ЖРП с внесенными добавками цефотаксима. При этом относительная погрешность определения составляет 2–14% (табл. 2).



Таблица 2

Результаты определения цефотаксима в модельных растворах ($n = 3, p = 0,95$)

Сенсоры	Водный раствор, мг/25мл			ЖРП, мг/10мл		
	Введено	Найдено	D, %	Введено	Найдено	D, %
Твердоконтактные	2,3	$1,9 \pm 0,4$	13	1,0	$1,3 \pm 0,3$	13
	5,7	$5,9 \pm 1,0$	13	2,3	$2,5 \pm 0,4$	10
	22	26 ± 5	13	10	$9,6 \pm 1,7$	7,2
	57	64 ± 7	12	22	23 ± 6	2,3
Планарные	2,3	$2,0 \pm 0,4$	12	1,0	$0,8 \pm 0,3$	14
	5,7	$5,9 \pm 1,0$	3,5	2,3	$2,2 \pm 0,5$	3,6
	22	24 ± 5	4,9	10	10 ± 2	3,7
	57	58 ± 7	3,1	22	22 ± 2	2,8

Данные значения являются приемлемыми, поскольку в методе прямой потенциометрии в связи с существованием логарифмической зависимости потенциала от определяемой концентрации погрешность измерения может достигать 20% [10].

Таким образом, впервые были созданы твердоконтактные и планарные потенциометрические сенсоры на основе соединения тетрадециламмония с комплексом серебро (I) – цефотаксим, определены их основные электрохимические и операционные характеристики: интервал линейности, угол наклона электродных функций, дрейф потенциала, время установления стационарного потенциала, срок службы. Проведена сравнительная оценка электроаналитических свойств твердоконтактных и планарных сенсоров и показана возможность их применения для определения цефотаксима в водных и биологических средах, в микрообъемах проб, что важно при исследовании фармакокинетики антибиотиков, определении максимальной терапевтической дозы, корректировки процесса лечения.

Список литературы

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М.: Нов. волна, 2012. 1216 с.
2. *Кулапина О. И., Кулапина Е. Г.* Антибактериальная терапия. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах. Саратов: Саратовский источник, 2015. 91 с.
3. *Алексеев В. Г.* Кислотно-основные свойства пенициллинов и цефалоспоринов // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44, № 1. С. 16–26.
4. *Жукова О. В., Коньшикина Т. М.* Метод фишберна – метод оценки клинической эффективности лекарственных препаратов (на примере антибиотиков, применяемых в лечении острого и рецидивирующего обструктивного бронхита у детей) // Фармация и фармакология. 2015. Т. 12, № 5. С. 42–46.
5. *Мокия-Сербина С. А., Литвинова Т. В., Гордеева А. А.* Современные аспекты антибиотикотерапии внебольничной пневмонии у детей раннего и дошкольного возраста (обзор литературы) // Здоровье ребенка. 2016. Т. 71, № 3. С. 136–142.
6. *Кулапина Е. Г., Баринаева 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.
7. *Крысанова Т. А., Котова Д. Л., Васильева С. Ю., Слащева Е. А., Рязских Ю. Ю., Ерина О. В.* Спектрофотометрическое определение натриевой соли цефотаксима в водном растворе // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2015. № 2. С. 13–16.
8. *Макарова Н. М., Кулапина Е. Г.* Планарные потенциометрические сенсоры на основе углеродных материалов для определения додецилсульфата натрия // Электрохимия. 2015. Т. 51, № 7. С. 757–764.
9. *Леус П. А., Троцкая О. С., Лобко С. С., Палий Л. И.* Смешанная слюна (состав, свойства, функции): учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2004. 42 с.
10. *Кулапина Е. Г.* Электрохимические методы анализа: учеб. пособие для студ. хим. фак. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2007. 108 с.

Образец для цитирования:

Кулапина Е. Г., Тютликова М. С. Твердоконтактные и планарные сенсоры для определения цефотаксима в водных и биологических средах // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 1. С. 14–18. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-14-18.

Cite this article as:

Kulapina E. G., Tyutlikova M. S. The Solid-state and Planar Sensors for the Determination of Cefotaxime in Aqueous and Biological Fluids. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 1, pp. 14–18 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-14-18.