



Как следует из вышеприведенных данных, при добавлении аргинина в водные растворы моноаминокарбоновых α -аминокислот, протонированных только по α -аминогруппе, имеющих $pH = 6,64$, наблюдается увеличение щелочности среды до $pH=10,76$. Следовательно, возможно титриметрически, по количеству оттитрованных OH^- ионов, определить содержание аргинина на фоне моноаминокарбоновых α -аминокислот. Эта цель и была реализована в данной работе. При этом достигается переход формы R^+ в форму R^{++} аргинина на фоне не протонируемых в этих условиях форм R^+ моноаминокарбоновых α -аминокислот (см. рис. 2, 4).

Для оценки правильности определения аргинина в смеси с Ala, Val, Gly, Leu был применен метод «введено–найдено». Для этого в смесь аминокислот вводилось разное количество аргинина (табл. 2). Проведенные pH-потенциометрические определения показали, что в интервале концентраций, указанных на градуировочных графиках, возможно определение аргинина с относительной погрешностью, варьирующей от 3,0 до 5,5%.

Таблица 2

Пример определения аргинина в смешанном растворе (I) методом «введено–найдено»

Введено Arg, мг	Найдено Arg, мг	Sr	$\delta, \%$
65,33	61,71 \pm 2,64	0,017	5,5
108,88	103,99 \pm 3,49	0,014	4,5
195,98	190,07 \pm 2,28	0,005	3,0

Проведенные исследования показали, что в интервале концентраций 43,6–217,8 мг возможно прямое избирательное pH-потенциометрическое определение аргинина в различных смешанных растворах моноаминокарбоновых α -аминокислот с погрешностью, не превышающей 5,5%.

Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности (базовая часть) по заданию № 2014/203, код проекта 1255, шифр «ПАВ» Метрология создания и анализа новых практически ценных многокомпонентных систем и материалов.

Список литературы

1. Kiss T., Sóvágó I., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of glycine // Pure and Appl. Chem. 1991. Vol. 63, № 4. P. 597–638.
2. Berthon G. The stability constants of metal complexes of amino acids with polar side chains // Pure and Appl. Chem. 1995. Vol. 67, № 7. P. 1117–1240.
3. Sóvágó J., Kiss T., Gergely A. Critical survey of the stability constants of complexes of aliphatic amino acids // Pure and Appl. Chem. 1993. Vol. 65, № 5. P. 1029–1080.
4. Pettit L. D. Critical survey of formation constants of complexes of histidine, phenylalanine, tyrosine, L-Dopa and tryptophan // Pure and Appl. Chem. 2009. Vol. 56, № 2. P. 247–292.
5. Yamauchi O., Odani A. Stability constants of metal complexes of amino acids with charged side chains-Part I: Positively charged side chains // Pure and Appl. Chem. 1996. Vol. 68, № 2. P. 469–496.
6. Химическая энциклопедия : в 5 т. Т. 1. М. : Сов. энцикл., 1988.

УДК 543:615.33

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ВОДНЫХ СРЕДАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

О. И. Кулапина¹, В. А. Каренко², Е. Г. Кулапина²

¹Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

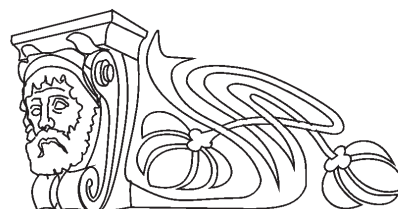
²Саратовский национальный исследовательский государственный университет

имени Н. Г. Чернышевского

E-mail: kulapinaeg@mail.ru

Разработаны экспрессные спектрофотометрические методики оценки подлинности некоторых цефалоспориновых антибиотиков II и III поколений. Показана идентичность препаратов цефотаксима (Россия) и клафорана (Франция), цефуроксима (Россия) и цефуроксим аксетила (Англия).

Ключевые слова: цефотаксим, клафоран, цефуроксим, цефуроксим аксетил, лекарственные препараты, водная среда.



Research of a State of Some the Cephalosporin Antibiotics in Water Environments by Spectrophotometry

O. I. Kulapina, V. A. Karenko, E. G. Kulapina

An express authenticity estimation of some cephalosporin antibiotics of II and III generations are developed by spectrophotometry. An



identity of drugs such as cefotaxime (Russia) and claforan (France), cefuroxime (Russia) and cefuroxime axetil (England) is shown.

Key words: cefotaxime, claforan, cefuroxime, cefuroxime axetil, drugs, water environments.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-130-135

Введение

Бета-лактамы антибиотики применяются для моно- или комбинированной терапии большинства инфекций и лежат в основе современной антибактериальной терапии. К ним относятся пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы [1–3].

Основа всех цефалоспоринов представлена дигидротиазолидиновым кольцом, соединенным с β -лактамым кольцом. Антимикробная активность природных цефалоспоринов (цефалоспорин-С) низкая, однако присоединение различных радикалов в положение 7 и в положение 3 резко усиливает их биологическую активность и устойчивость к β -лактамазам [4]. Синтезировано более 50 лекарственных средств этой группы. В настоящее время цефалоспорины занимают ведущее место при лечении различных инфекций в стационаре [5, 6]. В схемах начальной эмпирической терапии инфекций различной локализации в большинстве случаев отдается предпочтение лекарственным средствам цефалоспоринового ряда, поскольку они имеют широкий спектр антимикробной активности, хорошие фармакокинетические характеристики, низкую токсичность и хорошую переносимость; хорошо сочетаются с другими антибактериальными лекарственными средствами; удобны в применении и дозировании (для большинства возможно внутримышечное или внутривенное введение с интервалом 8–12 ч). В зависимости от спектра антимикробной активности цефалоспорины разделяют на 4 поколения (I–IV) [6–9].

В настоящей работе рассматриваются представители цефалоспорины II и III поколений. *Цефалоспорины II поколения* – парентеральные (цефуросим, цефатакситин) и пероральные (цефуросим аксетил, цефаклор), активны в отношении грамотрицательных бактерий.

Цефалоспорины III поколения – парентеральные (цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон) и пероральные (цефиксим, цефтибутен). Они преимущественно активны в отношении грамотрицательных микроорганизмов и стрептококков/пневмококков. Антипсевдомонадные цефалоспорины III поколения (цефтазидим, цефоперазон) активны в отношении неферментирующих микроорганизмов [7, 8].

В связи с тем что на фармацевтическом рынке появляются фальсифицированные препараты, а также в связи с заменой дорогостоящих импортных лекарств на российские необходимо иметь способ экспрессной идентификации лекарственных препаратов различных фирм-производителей.

В настоящем исследовании разработаны экспрессные спектрофотометрические методики оценки подлинности препаратов цефотаксима (ОАО «Биосинтез» г. Пенза) и его аналога клафорана («Роуссел Лаборатори», Франция), цефуросима (ОАО «АБОЛмед», Россия) и цефуросим аксетила («Зиннат», Glaxo Operations UK Limited, Англия).

Экспериментальная часть

В работе использовались цефуросим (цефуробол), цефотаксим, клафоран – порошки для приготовления инъекционных растворов, цефуросим аксетил («Зиннат») – таблетки.

Формулы используемых в работе антибиотиков представлены в табл. 1.

Растворы цефурабола, клафорана, цефотаксима, цефуросим аксетила 0,5 мг/мл готовили путем растворения навесок массой 0,0125 г в небольшом количестве дистиллированной воды, полученные растворы переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Рабочие растворы концентраций 50–10 мкг/мл готовили разбавлением исходных.

Раствор цефуросим аксетила 0,5 мг/мл (с учетом содержание основного вещества [10]) готовили путем растворения навески (0,0193 г, содержащей 0,0125 г антибиотика) в небольшом количестве дистиллированной воды, фильтровали, полученный раствор переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Растворы концентраций 50 мкг/мл; 40; 30; 20; 10 мкг/мл готовили разбавлением исходного.

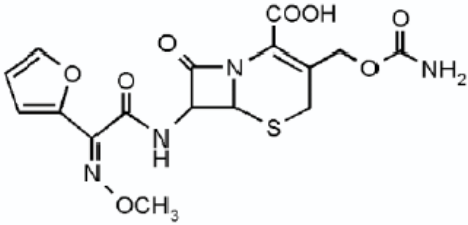
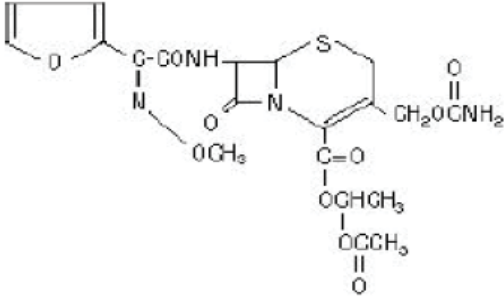
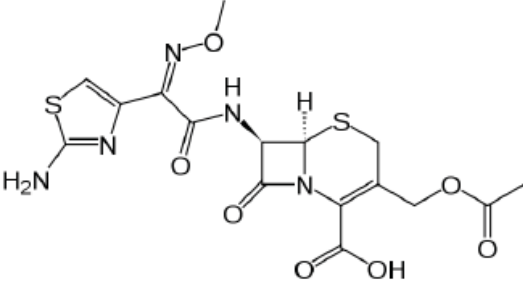
Спектроскопические измерения проводили на спектрофотометре Shadzu UV-1800, совмещенном с IBM PC, использовали кюветы из кварцевого стекла. Кислотность растворов антибиотиков контролировали на pH-метре рХ-150МП со стеклянным и хлоридсеребряным электродами.

Для изучения влияния кислотности на состояние антибиотиков к рабочим растворам ($C = 50$ мкг/мл) добавляли по каплям 0,1 М раствор гидроксида натрия, создавали pH 7, 8, 9, 10 или 0,1 М раствор HCl – pH 1–6.



Таблица 1

Формулы используемых в работе антибиотиков

Антибиотик	Формула	М, г/моль	Производитель
Цефурабол Cefur1 (цефуросим)		424	ОАО «АБОЛмед» Россия
Цефуросим ацетил Cefur2		510	Glaxo Operations UK Limited, UK
Цефотаксим Клафоран Ctox		455	ОАО «Биосинтез», г. Пенза; «Роусселл Лаборатори», Франция

Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрическое исследование состояния антибиотиков в водных средах. Исследуемые в работе антибиотики относятся к разным поколениям, имеют сложную химическую структуру. Цефуросим относится к антибиотикам кислотного типа, представляет собой кислоту, а цефуросим ацетил-эфир в водных растворах гидролизует и превращается в цефуросим. На рис. 1 представлены спектры поглощения водных растворов цефуросима и цефуросим ацетила при различной концентрации.

Интервал линейной зависимости оптическая плотность – концентрация антибиотиков – 10–50 мкг/мл. Сравнение спектров поглощения антибиотиков показало идентичность цефуросима ($\lambda_{\max} = 279$ нм, $\epsilon = 1,5 \cdot 10^{-4}$ л/моль·см) и цефуросим ацетила.

Обычно антибиотики кислотного типа содержат одну карбоксильную, реже – две карбоксильных группы, либо карбоксильную и сульфоновую группы. В водных растворах эти антибиотики ведут себя как органические кис-

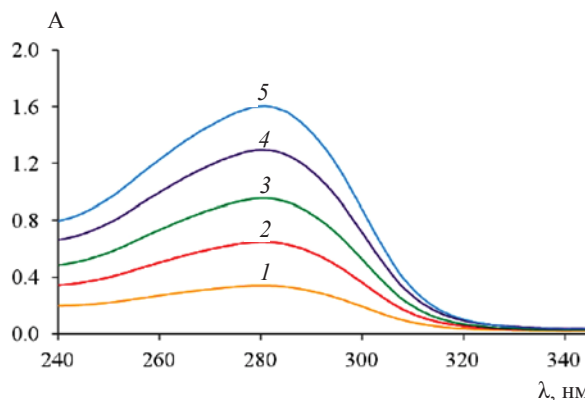


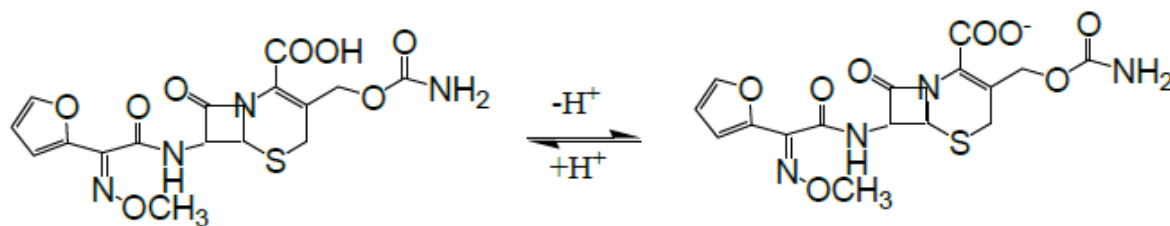
Рис. 1. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов цефуросим ацетила, цефурабола при различных концентрациях, мкг/мл: 10 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4), 50 (5)

лоты, диссоциирующие в одну или две стадии (pK_1 и pK_2 близки [11]).

Все антибиотики этой группы полностью диссоциируют по кислотному типу при pH 5 и выше. В крови человека (т.е. при pH около 7) присутствуют в виде одно- или двухзарядных анионов.



Схема равновесий в растворе цефуроксима:



Цефотаксим и клафоран относятся к антибиотикам амфотерного типа с карбоксильными и аминотиазольными группами, имеют одинаковую химическую структуру, выпускаются

разными производителями. На рис. 2 представлены спектры поглощения водных растворов цефотаксима и клафорана при различной концентрации.

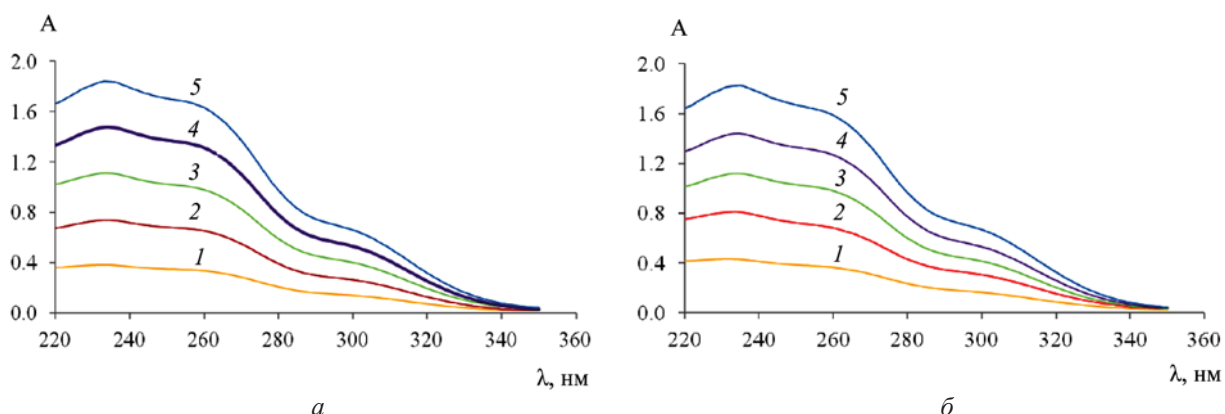


Рис. 2. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов: а – цефотаксима, б – клафорана при различных концентрациях, мкг/мл: 10 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4), 50 (5)

Сравнение спектров поглощения исследованных антибиотиков показало идентичность цефотаксима ($\lambda_1 = 232$ нм, $\epsilon_1 = 1,6 \cdot 10^{-4}$, л/моль·см; $\lambda_2 = 262$ нм, $\epsilon_2 = 1,5 \cdot 10^{-4}$, л/моль·см) и клафорана

($\lambda_1 = 232$ нм, $\epsilon_1 = 1,6 \cdot 10^{-4}$, л/моль·см; $\lambda_2 = 262$ нм, $\epsilon_2 = 1,4 \cdot 10^{-4}$, л/моль·см).

Основные оптические характеристики антибиотиков представлены в табл. 2.

Таблица 2

Основные оптические характеристики водных растворов антибиотиков

Антибиотик	λ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$, л/моль·см	$y = a + bx$	Коэффициент корреляции, R_2
Цефурабол	274	1,5	$y = 0.0371x - 0.0149$	0,9998
Цефуроксим аксетил	279	1,4	$y = 0.0318x + 0.0152$	0,9997
Цефотаксим	232	1,6	$y = 0.0367x + 0.0105$	1
	262	1,5	$y = 0.0326x + 0.0024$	1
Клафоран	232	1,6	$y = 0.0339x + 0.0106$	0,9983
	262	1,4	$y = 0.0296x + 0.0068$	0,9958

Исследовано влияние кислотности среды на состояние антибиотиков в водных средах. В течение 7 суток измеряли pH серии растворов антибиотиков ($C = 10; 20; 30; 40; 50$ мкг/мл) с помощью универсальной индикаторной бумаги. Для

раствора с наибольшей концентрацией (50 мкг/мл) pH контролировали на pH-метре со стеклянным и хлоридсеребряным электродами. Показано, что кислотность растворов ($C = 50$ мкг/мл) незначительно изменяется во времени (табл. 3).



Таблица 3

Изменение кислотности (рН) водных растворов антибиотиков во времени, $C = 50$ мкг/мл

Препарат	Сутки						
	1	2	3	4	5	6	7
Цефурабол	6,16	6,20	6,24	6,27	6,28	6,30	6,31
Цефуроксим ацетил	6,36	6,45	6,58	6,67	6,75	6,81	6,89
Цефотаксим	6,00	6,12	6,16	6,18	6,24	6,26	6,29
Клафоран	6,15	6,18	6,21	6,24	6,26	6,30	6,33

Спектры поглощения цефуроксим ацетила и цефуроксима идентичны представлены на рис. 3, спектры поглощения цефотаксима и клафорана

при различной кислотности среды – на рис. 4. Спектры антибиотиков идентичны при различной кислотности среды (рН 7,00–10,00).

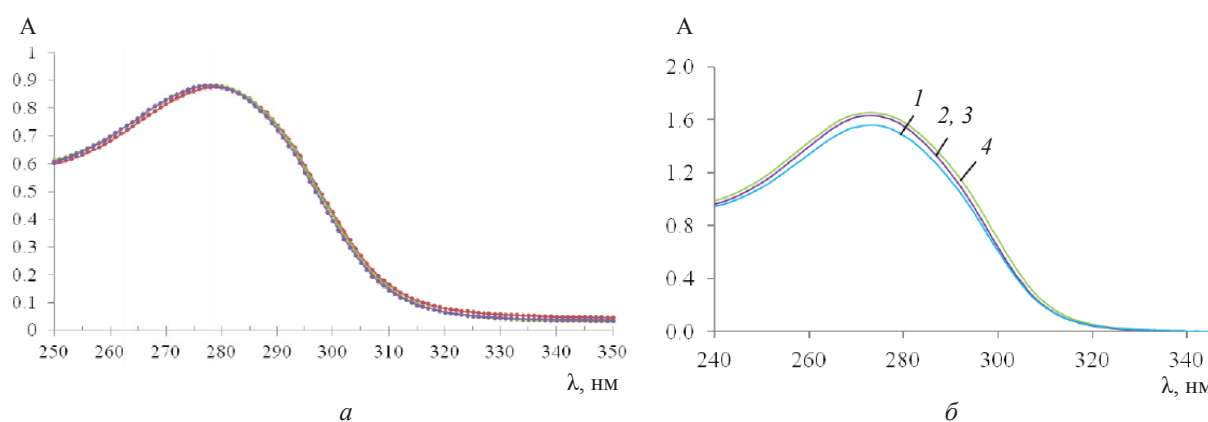


Рис. 3. Спектры поглощения свежеприготовленных растворов: *a* – цефуроксим ацетила, *б* – цефурабола при различных рН: 7,00 (1), 8,00 (2), 9,00 (3), 10,00 (4)

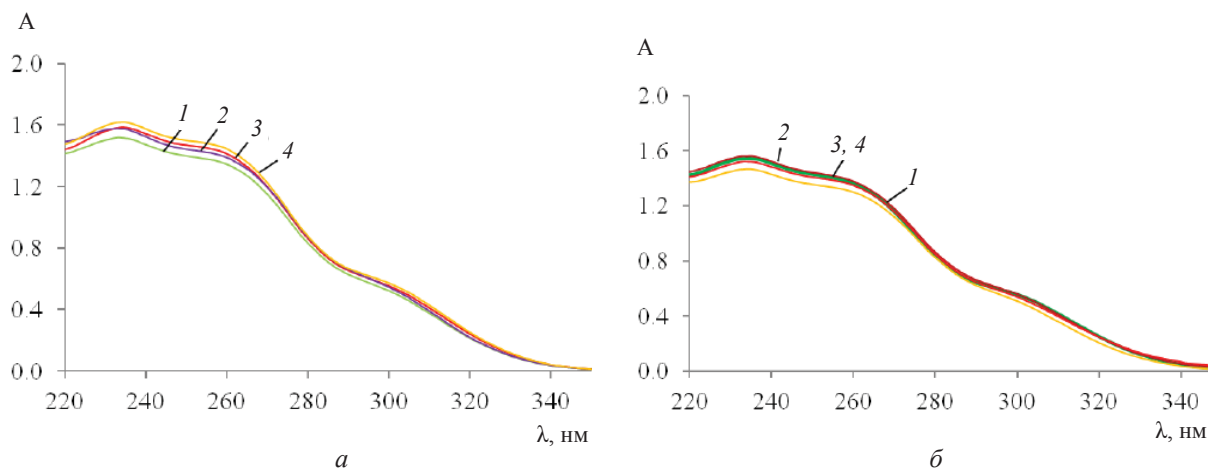


Рис. 4. Спектры поглощения свежеприготовленных растворов: *a* – цефотаксима, *б* – клафорана при различных рН: 7,00 (1), 8,00 (2), 9,00 (3), 10,00 (4)

Цефотаксим содержит в боковой цепи аминотиазольную группу [11]. Слабоосновный атом азота тиазольного цикла способен присоединять протон. Если молекула не содержит других активных в кислотно-основных взаимодействиях

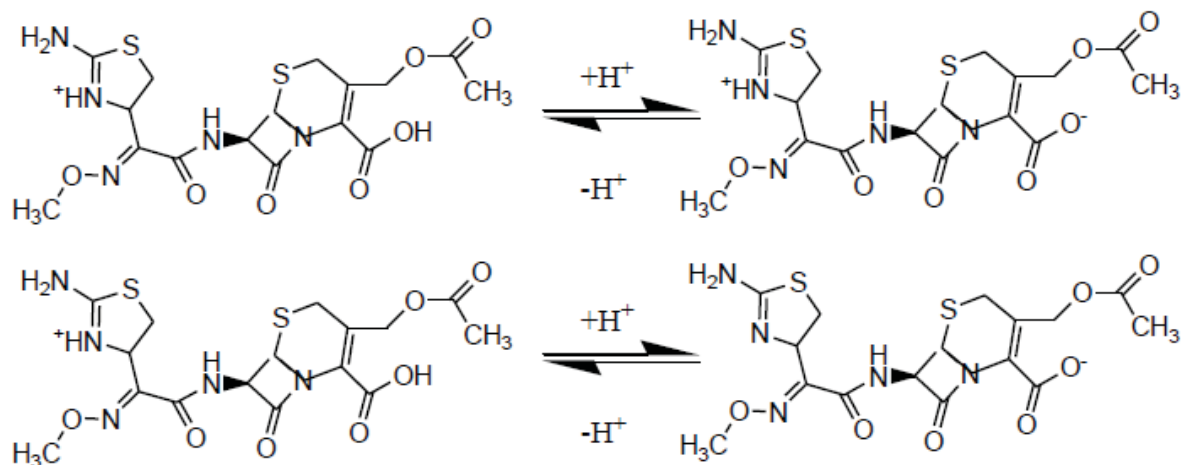
групп, то для таких соединений определяются две константы кислотной диссоциации. При этом K_1 соответствует диссоциации карбоксильной группы катиона с образованием цвиттер-иона $H_2L^{\pm} \leftrightarrow L^- + H^+$, а K_2 – диссоциации протона,



координированного аминотиазольной группой, с образованием аниона $\text{HL}^{\pm} \leftrightarrow \text{L}^- + \text{H}^+$. Эти антибиотики существуют в виде катиона (в сильно-кислой среде), цвиттер-иона (в слабокислой) и аниона (в нейтральной и щелочной). Некоторые цефалоспорины содержат одну аминотиазольную и две карбоксильные группы. Для этих соединений характерны три константы диссоциации. K_1 соответствует диссоциации карбоксильной

группы, связанной с цефем-группой, K_2 – диссоциации карбоксильной группы боковой цепи, K_3 – диссоциации протона, координированного тиазольным циклом. В кислой среде эти антибиотики существуют в виде катиона или цвиттер-иона, в нейтральной и щелочной – в виде аниона или, при наличии четвертичного атома азота, в виде цвиттер-иона.

Схема равновесий в растворе цефотаксима:



Таким образом, проведенные исследования показали идентичность препаратов цефотаксима и клафорана, цефуроксима (цефурабола) и цефуроксим аксетила (Зиннат).

Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки РФ в сфере научной деятельности (базовая часть) по заданию № 4.121.22.2014/к, шифр «Флуорофор».

Список литературы

1. Савельев В. С., Гельфанд Б. Р. Антибактериальная терапия абдоминальной хирургической инфекции. М. : Литтерра, 2006. 168 с.
2. Романцов М. Г., Горячева Л. Г., Коваленко А. Л. Противовирусные и иммуотропные препараты в детской практике. СПб. : МедиКа, 2009. 119 с.
3. Шевола Д., Дмитриева Н. В. Антибиотикопрофилактика в медицинской практике. М. : Принт-Партнер, 2000. 128 с.
4. Солдатенков А. Т., Коледина Н. М., Шидрин И. В. Основы органической химии лекарственных веществ. М. : Мир ; Бином ; Лаборатория знаний, 2007. 191 с.
5. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М. : Наука, 2004. 528 с.
6. Яковлев В. П., Яковлев С. В. Рациональная анти-микробная фармакотерапия. М. : Литтерра, 2007. 784 с.
7. Богомолова Н. С., Орешкина Т. Д., Большаков Л. В. Перспективы использования цефалоспоринового антибиотика четвертого поколения в хирургии // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, № 7. С. 20–22.
8. Яковлев В. П. Настоящее и будущее цефалоспоринов IV поколения цефепима // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, № 7. С. 3–4.
9. Кулапина О. И., Кулапина Е. Г. Антибактериальная терапия. Современные методы определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах. Саратов : Саратовский источник, 2015. 91 с.
10. Кулапина Е. Г., Каренко В. А., Кулапина О. И. Определение основного вещества в препаратах цефалексина и цефуроксим аксетила // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 1. С. 25–28.
11. Алексеев В. Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь : Изд-во Твер. гос. ун-та, 2009. 104 с.