

СОХРАНЯЕМОСТЬ НЕКОТОРЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ГРУППЫ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

А. А. Безъязычная, В. К. Шорманов, Л. Е. Сипливая

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Поступила в редакцию 13.12.2017 г.

Аннотация. Цефалоспорины – класс антибактериальных препаратов, которые находят широкое применение в современной медицинской практике для лечения целого ряда заболеваний. Сохраняемость некоторых цефалоспоринов (цефтриаксон, цефепим, цефпиром) была изучена в течении 190 дней при четырех температурных режимах. В качестве модельной смеси использовали мелкоизмельченную ткань трупной печени и добавляли анализируемое вещество, также для каждого анализируемого соединения ставили контрольный опыт. Очистку извлеченного соединения осуществляли методом ТСХ. Для идентификации и количественного определения применяли метод УФ-спектроскопии. Элюат, полученный после элюирования антибиотиков из хроматографической пластины, анализировали на УФ-спектрофотометре при длинах волн, соответствующих данным веществам. По уравнениям калибровочных графиков вычисляли количественное содержание анализируемых веществ в исследуемых пробах. В ходе проведенного исследования было выявлено, что наименьшей устойчивостью при сохраняемости в трупном материале, обладает цефтриаксон. Так его можно обнаружить при -12°C только до 160 дней, а при увеличении температуры до 22°C , анализируемое соединение имеет возможность обнаружить до 113 дней. При сравнении сроков сохраняемости антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов IV поколения, а именно цефепима и цефпинома, нами было обнаружено, что сроки сохраняемости цефепима меньше, чем цефпинома. Так при сохраняемости трупной печени при -12°C цефепим можно обнаружить в течение 180 дней, в то время как цефпиром можно обнаружить и количественно определить до 190 дней. При увеличении температуры, при которой производился эксперимент, сохраняемость цефепима и цефпинома заметно снижается. Так при 22°C анализируемые соединения обнаруживаются в течение 150 дней – для цефепима и 170 дней – для цефпинома. При сравнении сроков сохраняемости антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов III и IV из гнилостно-разлагающегося биологического (трупного) материала, наблюдается зависимость от наибольшей к наименьшей степени устойчивости: цефпиром–цефепим–цефтриаксон.

Ключевые слова: цефтриаксон, цефепим, цефпиром, сохраняемость, биологический материал, идентификация и количественное определение.

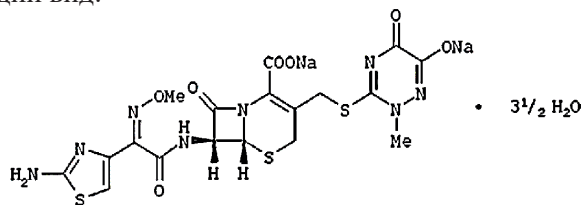
Одним из самых широко используемых классов бактерицидных антибиотиков является класс цефалоспоринов. В свою структуру они включают β -лактамное кольцо и имеют структурное сходство и механизм действия с другими β -лактамами антибиотиками [1].

Широко используемыми в настоящее время являются цефалоспорины III и IV поколений. Так из III поколения в медицинской практике часто применяется цефтриаксон. К цефалоспорином IV поколения, нашедшим широкое применения в медицинской практике относятся цефепим и цефпиром.

Цефтриаксон – антибиотик, широко используемый для лечения ряда бактериальных инфекций [2]. Его назначают путем внутривенной инъекции или внутримышечно [3, 4].

Цефтриаксон – (6R,7R)-7-[[[2Z)-(2-минотиазол-4-ил(метокси-имино)ацетил]амино]-3-[[2-метил-6-оксидо-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-триазин-3-ил)сульфанил]метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат 3.5 гидрат динатриевая соль – кристаллический порошок от белого до желтовато-оранжевого цвета, гигроскопичный, легко растворимый в воде, умеренно — в метаноле, очень слабо — в этаноле. рН 1% водного раствора около 6.7. Брутто формула $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_3 \cdot 3 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$. Молекулярная масса

661.61 [3]. Структурная формула имеет следующий вид:

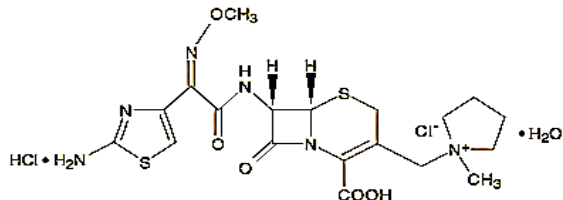


Цефепим – антибактериальный лекарственный препарат, который действует путем ингибирования синтеза клеточной стенки бактерий [5].

Цефпиром – обладает бактерицидным действием за счет угнетения синтеза клеточных стенок бактерий [6].

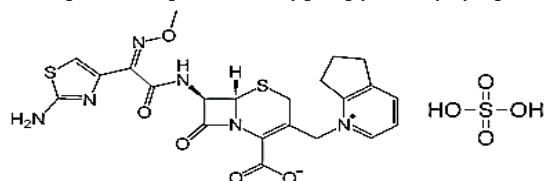
Антибиотики IV поколения обладают широким спектром действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, штаммов, резистентных к цефалоспориновым антибиотикам III поколения и аминогликозидам [7, 8].

Цефепим – 1 - [[(6R, 7R) -7- [2- (2-амино-4-тиазолил) -глиоксиламидо] -2-карбокси-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] окт-2-ен-3-ил] метил] -1-метилпирролидиния хлорид, дигидрохлорид моногидрата, что соответствует следующей структурной формуле:



Цефепим гидрохлорид - от белого до бледно-желтого порошка. Цефепим гидрохлорид содержит эквивалент не менее 825 мкг и не более 911 мкг цефепима ($C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) на мг, рассчитанный на безводной основе. Легко растворим в воде, в 0.9% изотоническом растворе натрия хлорида и 5% растворе глюкозы. Молекулярная масса – 571.5 а.е.м. [9].

Цефпиром – 1-[[[(6R,7R)-7-[[[(2Z)-(2-Амино-4-тиазолил) (метоксиимино) ацетил] амино]-2-карбокси-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] окт-2-ен-3-ил]метил]-6,7-дигидро-5Н-циклопента-[b]-пиридиния сульфат, что соответствует следующей структурной формуле:



Цефпиром – от белого до светло-желтого цвета кристаллический порошок, гигроскопичен. Растворим в воде, практически не растворим в этаноле (96%), ацетоне. Молекулярная масса – 612.66 а.е.м. Молекулярная формула – $C_{22}H_{22}N_6O_5S_2 \cdot H_2SO_4$ [10].

LD_{50} для цефтриаксона при пероральном введении мышам и крысам составляет больше 10000 мг/кг. При внутривенном введении крысам LD_{50} для цефтриаксона составляет 1900 мг/кг [11, 12].

LD_{50} для цефепима при внутривенном введении мышам составляет от 1500 до 2000 мг/кг. При внутривенном введении крысам LD_{50} для цефепима составляет 1067 мг/кг [13, 14].

LD_{50} для цефпирома при внутрибрюшинном введении мышам составляет 3850 мг/ кг, при внутривенном введении – 2400 мг/кг, при пероральном введении – 16200 мг/кг. LD_{50} для цефпирома при внутрибрюшинном введении крысам составляет 5800 мг/ кг, при внутривенном введении – 1900 мг/кг, при пероральном введении – 8000 мг/кг, а при подкожном введении – 10000 мг/кг [15-17].

Актуальность исследования заключается в том, что, несмотря на широкое применение данных антибиотиков в медицинской практике, в судебно-химическом отношении рассматриваемые соединения остаются мало изученными. Большой интерес вызывает вопрос устойчивости данных цефалоспоринов в гнилостно-разлагающемся биологическом (трупном) материале.

Целью настоящей работы является изучение сохраняемости цефтриаксона, цефепима и цефпирома в гнилостно-разлагающемся биологическом (трупном) материале.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились рабочие образцы цефтриаксона (производитель: РУП «Белмедпрепараты»), цефепима (производитель: ЗАО «МАКИЗ-ФАРМА») и цефпирома (производитель: ООО «Тривиум XXI»).

Сохраняемость цефалоспоринов изучали при четырех температурных режимах: $-12^{\circ}C$, $-2^{\circ}C$, $8^{\circ}C$ и $22^{\circ}C$ в течение 190 дней.

Модельные смеси готовили в склянках из темного стекла (емкостью 500 мл каждая). Вносили по 500 г мелкоизмельченной ткани печени и прибавляли антибиотик из расчета 100 мг на 50 г биологического материала. Содержимое склянок тщательно перемешивали, склянки укупировали полиэтиленовой пленкой под обвязку, в пленке иглой прокалывали по два-три отверстия для ис-

ключения анаэробных условий сохранения биологического материала. Параллельно готовили группу контрольных образцов мелкоизмельченной трупной печени, не содержащих анализируемые вещества, для каждого антибиотика. По одному исследуемому и контрольному образцу выдерживали при каждом температурном режиме сохранения. В процессе сохранения образцы перемешивали каждые 24 часа [18, 19].

Анализ сохраняемых модельных смесей проводили через 1,5 часа после их приготовления, на третьи сутки после начала эксперимента, и далее, увеличивали или уменьшали интервал времени в зависимости от предшествующих результатов анализа. При каждом анализе параллельно производили анализ контрольной пробы [20, 21].

В каждом опыте из склянок с исследуемыми и контрольными образцами производили отбор по 25 г трупной печени. Образцы полученного биоматериала настаивали двукратно по 30 минут с 50 мл смеси ацетон-вода (5:5), периодически производя перемешивание. Извлечения, полученные после первого и второго настаивания, объединяли и перемешивали. Далее проводили очистку методом ТСХ. Для этого из объединённого извлечения отбирали 1.5 мл, вносили в выпарительную чашку вместимостью 25 мл и испаряли раствор в токе воздуха при комнатной температуре. Остаток растворяли в 0.3–0.5 мл воды и количественно переносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» с УФ-индикатором ПТСХ-АФ-А-УФ (неподвижная фаза – силикагель марки СТХ-1 ВЭ, размер частиц 8–10 мкм, связующее вещество – силиказоль), размером 10×10 см. Для цефтриаксона: первый раз хроматографировали, используя подвижную фазу ацетон, высушивали пластину в токе воздуха и повторно хроматографировали при использовании подвижной фазы ацетон-вода (8:2). Для цефепима и цефпиромы первый раз хроматографирование также проводили с использованием ацетона в качестве подвижной фазы, а второй раз – применяя подвижную фазу ацетон-вода (6:4). Процесс осуществляли в камерах с внутренним объемом около 600 см³ в присутствии веществ свидетелей.

Пластины по окончании хроматографии высушивали в токе воздуха при комнатной температуре и проявляли в УФ-свете (254 нм).

После хроматографирования методом ТСХ по вышеописанной схеме участок с пятном анализируемого вещества, соответствующего стандарту, вырезали, помещали в пробирку и элюировали смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) в течение

15 минут. Исследовали особенности поглощения элюата на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне диметилсульфоксид-вода (5:5) в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при 275.0 нм (для цефтриаксона), 270.2 нм (для цефпиромы) и 263.8 нм (для цефепима).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты сохраняемости цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в биологическом материале представлены на рис. 1–3.

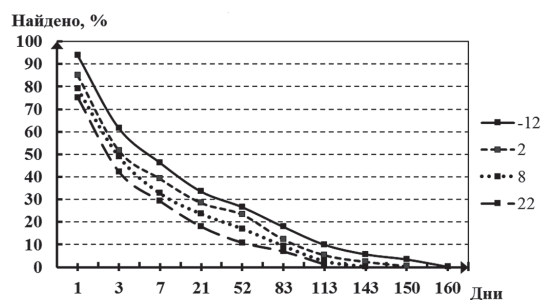


Рис. 1. Зависимость количества найденного цефтриаксона (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

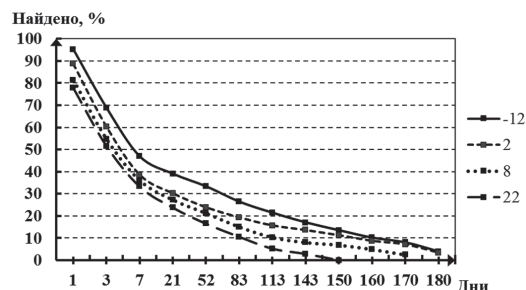


Рис. 2. Зависимость количества найденного цефепима (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

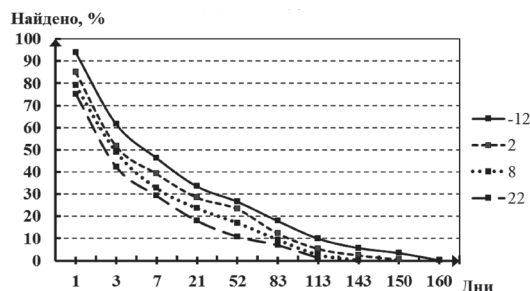


Рис. 3. Зависимость количества найденного цефпиромы (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

Как свидетельствуют полученные данные, при сохранении модельных смесей в выбранных температурных режимах рассматриваемые соединения могут быть определены в трупном материале по крайней мере в течение 113 дней с момента начала эксперимента. Наиболее устойчивым соединением в трупном материале является цефпиром. Его можно обнаружить до 170-190 дней после начала эксперимента в зависимости от температурного режима. Наименьшая стабильность наблюдается у цефтриаксона, так его можно обнаружить на 113-160 день после начала эксперимента в зависимости от выбранного режима проведения анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере модельных смесей с тканью трупной печени изучена сохраняемость цефтриаксона, цефепима и цефпинома в гнилостно разлагающемся биологическом материале при четырех температурных режимах.

Установлено, что при увеличении температуры рассматриваемые соединения быстрее подвергаются процессу разложения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simonian M. // Beckman Instruments Inc., 1992, Vol. 9, P. 13-19.
2. Joukhardar C.I., Klein N., Mayer B.X. // Crit Care Med, 2002, Vol. 30, N 7. P. 47-55.
3. Crabe M., Bjerklund-Johansen T.E., Botto H. // European Association of Urology, 2013. 106 p.
4. Lindenmann J.I., Kugler S.A., Matzi V. // Antimicrob Chemother, 2011, Vol. 66, N 1. P. 175-183.
5. Rathinavel G., Mukherjee P.B., Valarmathy J. // Chemistry, 2008, Vol. 5. P. 648-651.
6. Nishino I., Fujitomo H., Umeda T. // Journal of Chromatography B, 2000, Vol. 749. P. 101-110.
7. Steven A. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, Vol. 26, N 5. P. 652-655.
8. Ye G., Cai X., Wang B. // Biomed. Anal, 2009, Vol. 48. P. 860-865.
9. Hancu G., Sasebeşi A., Rusu A., et al. // Journal List. Adv. Pharm. Bull, 2015, Vol. 5, N 2. P. 223-229.
10. Campins F. P. // Mikrochimica acta, 1997, N 126. P. 207-215.
11. Solangi A.R., Memon S.Q., Khuhawar M.Y. // Acta Chromatographica, 2007, Vol. 19. P. 25-33.
12. Zendelovska D. // Acta Pharm, 2002, Vol. 52. P. 243-250.
13. Hiremath B. // Acta Pharm, 2008, Vol. 58. P. 275-85.
14. Salwa R., El-Shaboury S.R., Gamal A. // Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, Vol. 45. P. 1-19.
15. Shazalia M. A., Elbashir A., Hassan Y. // World Journal of Analytical Chemistry, 2015, Vol. 3 (1A). P. 21-32.
16. Virginia M. // Journal of Chromatography B, 2000, № 740. P. 71-80.
17. Wold J.S. // Antimicrob. Agents Chemother, 1977, Vol. 136. P. 170-173.
18. Асташкина А.П., Шорманов В.К., Киричек А.В. и др. // Судебно-медицинская экспертиза, 2012, Т. 55, № 6. С. 42-45.
19. Шорманов В.К., Останин М.А., Асташкина А.П. и др. // Судебно-медицинская экспертиза, 2016, Т. 59, № 4. С. 48-53.
20. Асташкина А.П., Пугачёва О.И., Шорманов В.К. и др. // Фармация, 2016, Т. 65, № 1. С. 35-38.
21. Шорманов В.К., Правдюк М.Ф. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2016, № 4. С. 100-106.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Безъязычная А. А., аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии

Тел.: +7(4712) 58-13-23

E-mail: baa02061993@rambler.ru

Шорманов В. К., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии,

Тел.: +7 (4712)58-13-23

E-mail: r-wladimir@yandex.ru.

FSEI HE «Kursk State Medical University»

Bezyazychnaya A. A., post-graduate student of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry

Тел.: +7(4712) 58-13-23

E-mail: baa02061993@rambler.ru

Shormanov V. K., Doctor of Pharmacy, professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry,

Тел.: +7 (4712)58-13-23

E-mail: r-wladimir@yandex.ru.

Сипливая Любовь Евгеньевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии.

Siplivaya L. E., Doctor of Biology, Head of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry.

CONSERVATION OF SOME ANTIBACTERIAL PREPARATIONS FROM THE GROUP OF CEPHALOSPORINES IN BIOLOGICAL MATERIAL

A. A. Bezyazychnaya, V. K. Shormanov, L. E. Siplivaya

FGBOU VO "Kursk State Medical University"

Abstract. Cephalosporins are a class of antibacterial drugs that are widely used in modern medical practice for the treatment of a variety of diseases. The retention of some cephalosporins (ceftriaxone, cefepime, ceftirom) has been studied for 190 days under four temperature regimes. As a model mixture, the finely divided tissue of the cadaveric liver was used and the analyses was added, and for each test compound, a control experiment was performed. Purification of the recovered compound was carried out by TLC. To identify and quantify, UV spectroscopy was used. The eluate obtained after elution of antibiotics from the chromatographic plate was analyzed on a UV spectrophotometer at wavelengths corresponding to these materials. By the equations of the calibration graphs, the quantitative content of the analyses in the samples was calculated. In the course of the study, it was found that ceftriaxone possesses the lowest resistance when stored in a cadaveric material. So it can be detected at -12 °C only up to 160 days, and with an increase in temperature to 22 °C, the analyses can be detected up to 113 days. When comparing the shelf life of antibacterial drugs from the group of cephalosporins of the IV generation, namely cefepime and ceftirom, we found that the shelf life of cefepime is less than that of ceftirom. So, with the preservation of the cadaveric liver at -12°C, cefepime can be detected within 180 days, while ceftirom can be detected and quantified up to 190 days. With increasing temperature at which the experiment was carried out, the storage of cefepime and ceftiroma is markedly reduced. Thus, at 22 OC, the compounds to be tested are detected within 150 days - for cefepime and 170 days - for ceftirom. When comparing the shelf life of antibacterial drugs from the group of cephalosporins III and IV from putrefactive biological (cadaveric) material, the dependence on the highest to the smallest degree of stability is observed: ceftirom-cefepime-ceftiaxone.

Keywords: ceftriaxone, cefepime, ceftirom, preservation, biological material, identification and quantitative determination.

REFERENCES

1. Simonian M. Beckman Instruments Inc., 1992, Vol. 9, P. 13-19.
2. Joukhadar C.I., Klein N., Mayer B.X. Crit Care Med, 2002, Vol. 30, N 7. P. 47-55.
3. Crabe M., Bjerklund-Johansen T.E., Botto H. European Association of Urology, 2013. 106 p.
4. Lindenmann J.I., Kugler S.A., Matzi V. Antimicrob Chemother, 2011, Vol. 66, N 1. P. 175-183.
5. Rathinavel G., Mukherjee P.B., Valarmathy J. Chemistry, 2008, Vol. 5. P. 648-651.
6. Nishino I., Fujitomo H., Umeda T. Journal of Chromatography B, 2000, Vol. 749. P. 101-110.
7. Steven A. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, Vol. 26, N 5. P. 652-655.
8. Ye G., Cai X., Wang B. Biomed. Anal, 2009, Vol. 48. P. 860-865.
9. Hancu G., Sasebeşi A., Rusu A., et al. Journal List. Adv. Pharm. Bull, 2015, Vol. 5, N 2. P. 223-229.
10. Campins F. P. Mikrochimica acta, 1997, N 126. P. 207- 215.
11. Solangi A.R., Memon S.Q., Khuhawar M.Y. Acta Chromatographica, 2007, Vol. 19. P. 25-33.
12. Zendelovska D. Acta Pharm, 2002, Vol. 52. P. 243-250.
13. Hiremath B. Acta Pharm, 2008, Vol. 58. P. 275-85.
14. Salwa R., El-Shaboury S.R., Gamal A. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, Vol. 45. P. 1-19.

15. Shazalia M. A., Elbashir A., Hassan Y. World Journal of Analytical Chemistry, 2015, Vol. 3 (1A). P. 21-32.
16. Virginia M. Journal of Chromatography B, 2000, № 740. P. 71–80.
17. Wold J.S. Antimicrob. Agents Chemother, 1977, Vol. 136. P. 170-173.
18. Astashkina A.P., Shormanov V.K., Kirichjok A.V. i dr. Sudebno-medicinskaja jekspertiza, 2012, T. 55, № 6. S. 42-45.
19. Shormanov V.K., Ostanin M.A., Astashkina A.P. i dr. Sudebno-medicinskaja jekspertiza, 2016, T. 59, № 4, S. 48-53.
20. Astashkina A.P., Pugachjova O.I., Shormanov V.K. i dr. Farmacija, 2016, T. 65, № 1. S. 35- 38.
21. Shormanov V.K., Pravdjuk M.F. Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e», 2016, № 4. S. 100-106.