

Оптимизация процедуры изолирования цефепима из биологического материала

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

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. К. Маркса, д. 3, Курск, 305041, Российская Федерация

Резюме. Цефепим (активное вещество цефепима дигидрохлорид моногидрат) — антибиотик четвертого поколения, обладающий широким спектром действия. Изучение химико-токсикологических свойств цефепима является актуальным из-за случаев отравления данным антибиотиком с летальным исходом, а также отсутствия простых и современных методик его определения. **Цель работы:** выбор условий изолирования цефепима из биологического материала для последующего применения в практике судебно-медицинской экспертизы. **Материалы и методы:** определение условий изолирования цефепима из биологического материала проводили на модельных смесях в несколько этапов: подбор приемлемого изолирующего агента и его количества, времени и кратности настаивания. Для идентификации, очистки и количественного определения цефепима применяли методы тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. **Результаты:** приемлемым изолирующим агентом для извлечения цефепима из биологического материала является смесь состава ацетон-вода (1:1), масса изолирующего компонента должна превышать массу биологического материала в два раза, продолжительность контакта изолирующего агента с биологическим материалом должна быть не менее 30 минут. **Выводы:** результаты проведенных исследований позволили выявить приемлемый изолирующий агент и условия изолирования цефепима из биологического материала для идентификации и количественного определения антибиотика при судебно-медицинской экспертизе.

Ключевые слова: цефепим; изолирование; изолирующий агент; идентификация; количественное определение

Для цитирования: Безъязычная АА, Шорманов ВК, Сипливая ЛЕ. Оптимизация процедуры изолирования цефепима из биологического материала. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):173–176. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-173-176>

***Контактное лицо:** Безъязычная Антонина Александровна; baa02061993@rambler.ru

Optimisation of the Procedure of Cefepime Extraction from Biological Material

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

Kursk State Medical University,
3 K. Marx St., Kursk 305041, Russian Federation

Abstract. Cefepime (active substance — cefepime dihydrochloride monohydrate) is a fourth-generation antibiotic with a broad spectrum of action. The study of the chemical and toxicological properties of cefepime is especially relevant because there have been some cases of poisoning with this antibiotic which resulted in a fatal outcome, and because there is a lack of simple and up-to-date methods of its determination. **The study objective** was to select conditions for cefepime extraction from biological material for subsequent use in forensic examination. **Materials and methods:** the determination of conditions for cefepime extraction from biological material was performed using model mixtures and included selection of an adequate extracting agent and the required amount of the agent, as well as selection of the duration and number of digestion steps. Identification, purification and quantification of cefepime were performed using thin-layer chromatography and spectrophotometry methods. **Results:** an acceptable agent that could be used for cefepime extraction from biological material is an acetone-water mixture (1:1), the amount of the extracting component should be twice the amount of the biological material, the time of contact between the extracting agent and the biological material should be at least 30 min. **Conclusions:** the results of the study allowed us to identify an acceptable extracting agent and the conditions for cefepime extraction from biological material for identification and quantification of the antibiotic during forensic examination.

Key words: cefepime; extraction; extracting agent; identification; quantification

For citation: Bezyazychnaya AA, Shormanov VK, Siplivaya LE. Optimisation of the procedure of cefepime extraction from biological material. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):173–176. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-173-176>

***Corresponding author:** Antonina A. Bezyazychnaya; baa02061993@rambler.ru

Цефепим — 1-[[[(6R, 7R)-7-[2-(2-амино-4-тиазолил)-глиоксиламино]-2-карбокси-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-3-ил]метил]-1-метилпирролидиния дигидрохлорид моногидрат — порошок, имеющий цвет от белого до светло-желтого. Структурное строение соответствует формуле, изображенной на рисунке 1.

Цефепимагидрохлорид ($C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$) содержит не менее 825 и не более 911 мкг/мг активного вещества в пересчете на безводное вещество. Легко растворим в воде, в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида и 5 % растворе глюкозы. Молекулярная масса — 571,5 а.е.м. [1–3].

Данное лекарственное средство токсично для теплокровных. Его LD_{50} при внутривенном введении мышам — от 1500 до 2000 мг/кг. Описаны случаи летального исхода в результате отравлений людей, принимавших цефалоспориновые антибиотики [4–6].

Широкое применение цефепима, наличие случаев отравления с летальным исходом, отсутствие современных методик изолирования цефепима из биологического материала с последующим количественным определением делают актуальным изучение цефепима в химико-токсикологическом отношении.

Вместе с тем решение вопросов химико-токсикологического анализа цефепима в условиях проведения судебно-медицинской экспертизы требует оптимизации существующих методик определения данного антибиотика [7–9]. Разработка методики, позволяющей выделить и количественно определить цефепим из биологического материала в лабораториях различного уровня, вне зависимости от оснащённости современным химическим оборудованием и наличия микробиологического отдела, является актуальной задачей.

Цель работы — выбор условий изолирования цефепима из биологического материала, применимых в практике судебно-медицинской экспертизы.

Задачами данной работы являлись:

- выявление оптимального изолирующего агента;
- определение кратности и продолжительности настаивания с оптимальным изолирующим агентом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили модельные смеси рабочего образца цефепима (ЗАО «МАКИЗ-

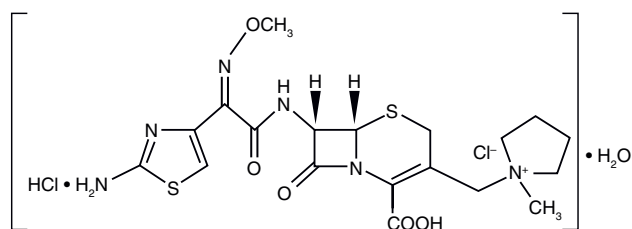


Рис. 1. Структурная формула цефепима

Fig. 1. Cefepime structural formula

ФАРМА», Россия) с мелкоизмельченной трупной печени крупного рогатого скота (0,025 г анализируемого препарата в 50 г биологического образца).

Изучали особенности извлечения цефепима из биологического материала 17 изолирующими агентами различной химической природы, учитывая растворяющую способность вещества в данных растворителях и их смесях [10–12]. Модельные смеси выдерживали при 18–20 °С 1,5 ч и осуществляли двукратное изолирование аналита каждым агентом при соотношении его массы к массе биоматериала 2:1 (порциями по 100 г изолирующего агента). Продолжительность каждого настаивания — 30 мин. Первое и второе извлечения объединяли. 15 % объединенного извлечения упаривали до сухого остатка, остаток растворяли в 0,3–0,5 мл воды и количественно переносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» с УФ-индикатором. В качестве вещества-свидетеля использовали 5–10 мкл 0,04 % водного раствора стандартного образца Цефепима дигидрохлорида моногидрата (CAS No. 123171-59-5). Хроматографировали двукратно, используя последовательно в качестве подвижных фаз ацетон и систему растворителей ацетон–вода (3:2). Хроматограммы проявляли в УФ-свете (254 нм). R_f определяемого вещества соответствовало R_f вещества-свидетеля и составляло 0,62.

Анализируемое вещество элюировали из сорбента смесью диметилсульфоксид–вода (1:1) 15 минут. Измеряли оптическую плотность элюата на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при 263,8 нм [13] относительно смеси диметилсульфоксид–вода (1:1). Расчет количественного содержания проводили по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика измеряли оптические плотности растворов с концентрациями 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 и 30 мкг/мл цефепима в смеси диметилсульфоксид–вода (1:1). График имеет линейный вид и описывается уравнением $D = 0,0483 \times C - 0,0234$, где D — оптическая плотность, C — концентрация цефепима в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Результаты, полученные на модельных смесях с известным содержанием определяемого вещества, обрабатывались статистически с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изолирования цефепима из трупной печени различными растворителями представлены в таблице 1.

Лучшие результаты изолирования цефепима из биологического материала получены при использовании таких растворителей, как смесь ацетон–вода (1:1), ацетонитрил–вода (1:1), метанол–вода (4:1) и ДМСО–вода (4:1). При этом большая степень извлечения антибиотика (73,3 %) достигается

Таблица 1. Степень извлечения (*R*, %) цефепима из биологического материала при использовании различных изолирующих агентов

Table 1. Extraction ratio (*R*, %) of cefepime from biological material using different extracting agents

Изолирующий агент Extracting agent	Метрологические характеристики (<i>n</i> = 5, <i>p</i> = 0,95) Metrological characteristics (<i>n</i> = 5, <i>p</i> = 0.95)				
	$\bar{x}$	<i>S</i>	<i>S_x</i>	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Ацетон Acetone	70,31	2,75	1,23	3,42	4,87
Метанол Methanol	68,87	2,58	1,16	3,21	4,66
Этанол Ethanol	63,93	3,33	1,49	4,13	6,47
Ацетонитрил Acetonitrile	20,04	0,98	0,44	1,22	6,09
1,4-Диоксан 1,4-dioxane	64,82	3,08	1,38	3,83	5,19
Вода дистиллированная Distilled water	34,84	2,47	1,10	3,07	8,81
8 % раствор уксусной кислоты 8 % acetic acid solution	37,63	3,27	1,46	4,06	10,80
Уксусная кислота Acetic acid	53,82	3,77	1,68	4,68	8,70
Ангидрид уксусной кислоты Acetic anhydride	65,09	6,97	3,12	8,67	13,32
0,1 М раствор натрия гидроксида 0,1 M sodium hydroxide solution	28,23	1,51	0,68	1,88	6,65
Диметилсульфоксид Dimethylsulfoxide	45,78	2,36	1,05	2,93	6,40
Диметилформамид Dimethylformamide	50,84	1,72	0,77	2,14	4,21
Диметилсульфоксид—вода (1:1) Dimethylsulfoxide—water (1:1)	62,43	2,78	1,24	3,45	5,53
Диметилсульфоксид—вода (4:1) Dimethylsulfoxide—water (4:1)	71,16	3,53	1,58	4,39	5,92
Метанол—вода (4:1) Methanol—water (4:1)	72,32	3,52	1,57	4,38	6,05
Ацетонитрил—вода (1:1) Acetonitrile—water (1:1)	72,05	3,14	1,41	3,91	5,43
Ацетон—вода (1:1) Acetone—water (1:1)	73,30	1,84	0,82	1,19	3,12

Примечание. *n* — число определений; *p* — уровень значимости; $\bar{x}$ — среднее значение из пяти определений, %; *S* — стандартное отклонение; *S_x* — стандартное отклонение среднего; $\Delta\bar{x}$ — полуширина доверительного интервала среднего значения; $\bar{\varepsilon}$ — относительная ошибка среднего результата.
Note. *n* — number of determinations; *p* — significance level; $\bar{x}$ — the mean of five determinations, %; *S* — standard deviation; *S_x* — standard deviation of the mean; $\Delta\bar{x}$ — half-width of the confidence interval of the mean; $\bar{\varepsilon}$ — mean percentage error.

при использовании в качестве изолирующего агента смеси ацетон—вода (1:1).
С помощью описанной выше схемы изолирования, очистки и определения цефепима исследовали зависимость степени извлечения рассматриваемого соединения из биологического материала оптимальным изолирующим агентом от кратности настаивания, продолжительности контакта изолирующей

жидкости и биологического объекта, массового соотношения «изолирующий агент — биоматрица» и уровня содержания аналита в биоматериале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что достаточно полное извлечение цефепима смесью ацетон—вода (1:1) достигается уже при двукратном настаивании в условиях, когда

при каждом настаивании масса изолирующего агента как минимум в два раза превышает массу биологической ткани, а продолжительность отдельного настаивания составляет не менее 30 мин.

Методика отличается простотой выполнения, не требует применения сложной аппаратуры и значительных затрат времени на ее воспроизведение.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки. Авторы выражают благодарность директору Курского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Информационно-ме-

тодический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора М.Ю. Маркелову за техническую помощь.

Acknowledgements. The study was not sponsored or funded by any organisation. The authors are grateful to M.Y. Markelov, Director of the Kursk branch of the Federal State Budgetary Institution «Information and Methodological Center for Expertise, Accounting and Analysis of the Circulation of Medical Products» of Roszdravnadzor for technical assistance.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вакуленко СБ. Механизм действия β -лактамов антибиотиков и устойчивость к ним микроорганизмов. *Антибиотики и медицинская биотехнология*. 1987;(4):294–302. [Vakulenko SB. The mechanism of action of β -lactam antibiotics and the resistance of microorganisms to them. *Antibiotiki i meditsinskaya biotekhnologiya = Antibiotics and Medical Biotechnology*. 1987;(4):294–302 (In Russ.)]
2. Квачахия ЛЛ, Шорманов ВК. Идентификация нифедипина в биологических жидкостях. *Фармация*. 2013;62(8):16–9. [Kvachakhia LL, Shormanov VK. Identification of nifedipine in biological fluids. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2013;62(8):16–9 (In Russ.)]
3. Провоторов ВМ, Иванова ГА. Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств. *Клиническая медицина*. 2009;87(9):4–8. [Provotorov VM, Ivanova GA. The role and position of erythrocytes in the directional transport system of various pharmacological agents. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*. 2009;87(9):4–8 (In Russ.)]
4. Cefepime. Reports of death being investigated. *WHO Pharmaceuticals Newsletter*. 2007;(6).
5. Early Communication about an Ongoing Safety Review Cefepime (marketed as Maxipime). *FDA. Information for Healthcare Professionals*. 2007;(14).
6. Yahav D, Paul M, Fraser A, Sarid N, Leibovici L. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(5):338–48. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70109-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70109-3)
7. Кулапина ЕГ, Кулапина ОИ, Каренко ВА. Потенциометрические сенсоры для определения цефепима в водных и биологических средах. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*. 2016;16(2):138–43. [Kulapina EG, Kulapina OI, Karenko VA. Potentiometric sensors for determination of cefepime in water and biological environments. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya = Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2016;16(2):138–43 (In Russ.)]
8. Farghaly OA, Abdel Hameed RS, Abu-Nawwas AAH. Analytical application using modern electrochemical techniques. *Int J Electrochem Sci*. 2014;9:3287–318.
9. Farghaly OA, Hazzazi OA, Rabie EM, Khodari M. Determination of some cephalosporins by adsorptive stripping voltammetry. *Int J Electrochem Sci*. 2008;3:1055–64.
10. Roopa KP, Jayanna BK, Padmarajaian N. Spectrophotometric method for the determination of cefepime, cefazolin sodium and cefalothin sodium in pure and pharmaceutical dosage forms by using ninhydrin. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;7(5):194–9.
11. Malgundkar SS, Mulla S. Validated HPTLC method for simultaneous determination of ceftriaxone sodium and tazobactam sodium in combined dosage form. *IOSR J Pharm Biol Sci*. 2014;9(2):60–5. <https://doi.org/10.9790/3008-09256065>
12. Rind FMA, Laghari MGH, Memon AH, Mughal UR, Almani F, Memon N, et al. Spectrophotometric determination of ceftriaxone using 4-dimethylaminobenzaldehyde. *Pak J Anal Environ Chem*. 2008;9(1):43–8.
13. Безъязычная АА, Шорманов ВК, Сипливая ЛЕ. Сохраняемость некоторых антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов в биологическом материале. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2018;(1):213–8. [Bezzyazhnaya AA, Shormanov VK, Siplivaya LE. Conservation of some antibacterial preparations from the group of cephalosporines in biological material. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2018;(1):213–8 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Безъязычная Антонина Александровна. Antonina A. Bezzyazhnaya. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5838-747X>

Шорманов Владимир Камбулатович, д-р фарм. наук, проф. Vladimir K. Shormanov, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8872-0691>

Сипливая Любовь Евгеньевна, д-р биол. наук, проф. Lyubov E. Siplivaya, Dr. Sci. (Biol.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0195-8950>

Статья поступила 22.03.2019

После доработки 26.06.2019

Принята к печати 16.08.2019

Article was received 22 March 2019

Revised 26 June 2019

Accepted for publication 16 August 2019