

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Безъязычная Антонина Александровна

**Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и
иммобилизованных формах и биологических объектах**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Шорманов Владимир Камбулатович

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Сипливая Любовь Евгеньевна

Курск - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Классификация антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов	15
1.2. Получение и применение некоторых цефалоспоринов	16
1.3. Основная химическая структура цефалоспоринов и их физические свойства	20
1.4. Метаболизм, распределение, сохраняемость и токсическая характеристика .	23
1.5. Идентификация исследуемых соединений.....	26
1.6. Количественное определение	27
1.7. Направленный транспорт антибактериальных средств в организм	36
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Объекты исследования	41
2.2. Приборы и оборудование	41
2.2.1. Оборудование, относящееся к средствам измерения.....	41
2.2.3. Вспомогательное оборудование	42
2.3. Реактивы.....	42
2.4. Материалы.....	43
2.5. Посуда.....	43
2.6. Методы исследования.....	43
ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
3.1. Фотометрические методы определения.....	45
3.1.1. ИК-спектрофотометрия	45
3.1.2. Электронная ультрафиолетовая спектрофотометрии	49
3.2. Хроматографические методы определения.....	50
3.2.1. Нормальнофазовая ТСХ	50
3.2.2. Обращеннофазовая ТСХ.....	52
3.2.3. Обращеннофазовая ВЭЖХ.....	52
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	56

ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ	57
4.1. Определение спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области	57
4.1.1. Анализ цефтриаксона, цефпирома и цефепима в смеси диметилсульфоксида (5:5)	57
4.1.2. Анализ цефтриаксона, цефпирома и цефепима в смеси ацетонитрил-вода (8:2)	61
4.2. Определение обращеннофазовой ВЭЖХ	65
4.2.1. Анализ цефтриаксона, цефпирома и цефепима	65
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	70
ГЛАВА 5. ОЧИЩЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ	71
5.1. Методы хроматографического анализа	71
5.1.1. Хроматография в тонком слое нормальнофазового сорбента	71
5.1.2. Хроматография в тонком слое обращеннофазового сорбента	72
5.1.3. Макроколоночная жидкостная хроматография с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления	74
5.2. Имитирование процесса очищения изучаемых лекарственных препаратов, извлеченных из биологического материала в проверочных образцах	78
5.2.1. Схема очистки извлечений с применением нормальнофазовой тонкослойной хроматографии	78
5.2.2. Схема очистки извлечений с применением обращеннофазовой тонкослойной хроматографии	78
5.2.3. Схема очистки извлечений с применением обращеннофазовой макроколоночной хроматографии	79
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	81
ГЛАВА 6. ИЗОЛИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ	

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННОФАЗОВОЙ ВЭЖХ	82
6.1. Подбор приемлемых условий изолирования.....	82
6.1.1. Практическое определение изолирующего компонента.....	82
6.1.2. Подбор времени настаивания с приемлемым изолирующим компонентом.	88
6.1.3. Подбор кратности настаивания и количества изолирующего компонента при оптимальном времени изолирования	90
6.2. Технологии извлечения из трупных органов и биологических жидкостей.....	95
6.2.1. Технология извлечения из ткани трупного органа (печени)	95
6.2.2. Технология извлечения из крови.....	95
6.2.3. Технология извлечения из плазмы крови	96
6.2.4. Технология извлечения из мочи	96
6.3. Количественное определение с применением разработанной системы очистки извлечения.....	96
6.3.1. Очистка извлечений методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления.....	97
6.3.2. Идентификация и количественное определение методом УФ-спектроскопии	97
6.3.3. Идентификация и количественное определение методом обращеннофазовой ВЭЖХ	101
6.4. Валидация методики определения количественного содержания анализируемых препаратов, изолированных из биологических объектов, методом обращеннофазовой ВЭЖХ	102
6.4.1. Проверка пригодности хроматографической системы	102
6.4.2. Специфичность аналитической методики	104
6.4.3. Линейность аналитической методики.....	105
6.4.4. Точность и прецизионность аналитической методики	108
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	110

ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И СОХРАНЯЕМОСТИ ЦЕФТРИАКСОНА, ЦЕФЕПИМА И ЦЕФПИРОМА.....	112
7.1. Получение эритроцитарных носителей с включенным антибиотиком.....	112
7.2. Определение содержания исследуемых веществ в инкубационной жидкости и в клеточных носителях.	113
7.3. Изучение особенностей распределения исследуемых соединений в организме здоровых теплокровных животных и в организме животных с моделированным токсическим поражением почек	117
7.4. Изучение особенностей распределения исследуемых соединений, включенных в эритроцитарные носители, в организме здоровых теплокровных животных и в организме животных с моделированным токсическим поражением почек.....	119
7.5. Создание условия сохраняемости и получение результатов.....	121
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7.	126
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ:	128
Список использованной литературы:.....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ	150

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТХ - анатомо-терапевтическо-химическая классификация лекарственных средств;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ИК – инфракрасная;

МЕКС – мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография;

СО – стандартный образец;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ – ультрафиолетовая;

ЭКАБТ – экстракорпоральная антибиотикотерапия;

ЭН – эритроцитарные носители;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

6-АРА – 6-аминопенициллановая кислота;

7-АСА – 7-аминоцефалоспоровановая кислота;

LC – жидкостная хроматография;

LD₅₀ – полумлетальная доза;

LOD – наименьшее обнаруживаемое количество;

LOQ – наименьшее измеряемое количество.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Антибиотики из класса цефалоспоринов III и IV поколений находят распространенное использование в современной медицинской практике для лечения широкого спектра заболеваний. Среди них представляет интерес: цефтриаксон – [6R-6-альфа, 7бета(Z)-7-2-амино-4-тиазолил (метоксиимино) ацетил амино-8-оксо-3-(1,2,5,6-тетрагидро-2-метил-5,6-диоксо-1,2,4-триазин-3-ил)тио метил-5-тиа-1-азабицикло 4.2.0 окт-2-ен-2-карбоновая кислота (в виде динатриевой соли)], цефпиром – [6R-6-альфа, 7бета(Z)-1-7-2-амино-4-тиазолил (метоксиимино) ацетил амино-2-карбоксо-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0]окт-2-ен-3-ил]метил]-6,7-дигидро-5H-1-пиридиния гидроксид (внутренняя соль), цефепим – 1-[[7-[[2-Амино-4-тиазолил (метоксиимино) ацетил амино -2-карбоксо-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло 4.2.0 окт-2-ен-3-ил]метил]-1-метилпирролидиния гидроксид (внутренняя соль), которые являются антибиотиками широкого спектра действия.

Однако известны данные о летальных исходах при лечении вышеперечисленными лекарственными препаратами при повышенной чувствительности к ним, а также на фоне ряда заболеваний печени и почек.

Цефтриаксон, цефпиром и цефепим проявляют токсическое действие в отношении теплокровных организмов. При введении в виде внутривенных инъекций LD₅₀ для крыс при применении цефтриаксона составляет 2 г/кг, цефпиромы 1,9 г/кг и цефепима 1,2 г/кг. Известны случаи летального исхода при поступлении в организм человека цефтриаксона.

На сегодня актуально создание новых, менее токсичных и более эффективных систем доставки, в состав которых входят вещества из данной группы. Для снижения токсического воздействия и улучшения терапевтического эффекта цефалоспоринов возможно использование новых систем доставки данных антибиотиков к органам-мишеням. Для этой цели могут служить клеточные носители, в частности, эритроциты.

Использование новых систем доставки обуславливает необходимость разработки и валидации методик определения цефтриаксона, цефепима и

цефпиромы в традиционных и иммобилизованных формах, а также в биологических объектах.

Вышеуказанные данные позволяют сделать вывод о том, что разработка и валидация методик анализа исследуемых лекарственных препаратов, а также создание иммобилизованных форм с применением клеточных носителей является современной и актуальной темой.

Степень разработанности темы исследования. На сегодня нераскрытыми в нужном объеме остаются моменты извлечения выбранных препаратов из биообъектов, их идентификация и количественная оценка. Описанные методики экспертизы изучаемых препаратов недостаточно избирательны и чувствительны. В современных литературных источниках нет информации о сохранности анализируемых антибактериальных препаратов в материале биологического происхождения, а также информации о целесообразности применения направленного транспорта антибиотиков цефалоспоринового ряда с использованием эритроцитов в качестве клеточных носителей.

Цель исследования. Целью данного диссертационного труда является разработка методик анализа цефтриаксона, цефепима и цефпиромы при различных системах доставки в организм и биологических объектах.

Задачи исследования. Были обозначены задачи данного исследования, необходимые для достижения цели:

- провести оценку спектральных характеристик цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в различных хроматографических системах с использованием тонкослойной и макроколоночной хроматографии;
- изучить подвижность анализируемых лекарственных препаратов с применением хроматографических методов с использованием сорбента в тонких слоях и хроматографических макроколонках;
- предложить актуализированную методику идентификации и количественного определения анализируемых лекарственных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и провести процедуру валидации;

- проанализировать специфику изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпиромы изолирующими агентами различной элюентной активности из объектов биологического происхождения, разработать процедуру очищения вытяжек;

- проработать особенности включения выбранных цефалоспоринов в матрицы биологической природы и создать процедуру определения количественного содержания антибиотиков, иммобилизованных в эритроцитарные носители;

- выявить особенности распределения антибиотиков цефалоспоринового ряда в организмах как у здоровых лабораторных животных, так и с токсическим поражением мочевыделительной системы, при условии использования разнообразных систем доставки;

- определить временную продолжительность сохранения цефалоспориновых антибиотиков в материале биологического происхождения в условиях гнилостного разложения.

Научная новизна. Впервые рассмотрены и выявлены особенности в электронных и колебательных спектрах цефтриаксона, цефепима и цефпиромы и разработаны методики по их идентификации.

Впервые изучена подвижность анализируемых лекарственных препаратов в различных системах растворения в тонкослойной с гидроксильной и привитой поверхностями и в макроколоночной хроматографии при применении разнообразных мобильных фаз.

Подобраны оптимальные условия для проведения процедуры включения цефалоспориновых антибиотиков в эритроцитарные носители.

Впервые была разработана и апробирована схема химико-токсикологического анализа для отдельных представителей из группы цефалоспориновых антибиотиков при различных технологиях их введения (свободные или клеточные формы препаратов).

Впервые проанализировано и практически проведено изучение распределения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в организме теплокровных

животных при традиционных и иммобилизованных формах введения как здоровым, так и мышам с моделированным токсическим поражением почек.

Изучен способ изолирования и очищения получаемых вытяжек из материала биологической природы.

Изучена продолжительность сохраняемости исследуемых веществ в разлагающихся объектах биологического происхождения при разном температурном и временном интервале сохраняемости.

Теоретическая значимость работы. Результаты разработанных методик анализа лекарственных препаратов из группы цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах позволяют улучшить понимание о важности химических и физико-химических свойствах исследуемых лекарственных препаратов.

Практическая значимость. Возможность введения выбранных цефалоспориновых препаратов, иммобилизованных в клеточные носители, позволит снизить риск развития нежелательных аллергических реакций и повысить терапевтическую эффективность. Разработанные методики идентификации и количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпирома позволяют внедрить и использовать их в работе судебно-химических и аналитических лабораторий.

Основные положения, выносимые на защиту:

- специфика спектров поглощения выбранных для анализа веществ в УФ- и ИК-областях спектров;
- особенности поведения хроматографической активности исследуемых лекарственных препаратов при изучении в тонких слоях и в макроколонке;
- аналитические методы подтверждения и определения процентного содержания действующих веществ с использованием спектрофотометрических, хроматографических методик анализа;
- специфика проведения процедуры очищения анализируемых веществ из объектов биологического происхождения;

- проведение процедуры валидации предложенной методики анализа процентного содержания определяемых препаратов, извлеченных из материала биологической структуры;
- распределение выбранных лекарственных препаратов по организму здоровых и с моделированным токсическим поражением почек теплокровных животных в свободном и в виде включения в эритроцитарные носители;
- продолжительность сохранности некоторых антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов в разных температурных режимах хранения.

Методология и методы исследования. Методологической основой данного труда явились фармакопейные статьи предприятий-производителей и научные исследования современных ученых нашей страны [В.К. Шорманова, Л.Е. Сипливой, А.В. Кукуреки, Г.В. Сипливого].

В настоящем научном труде были применимы различные методы анализа. В частности, методы анализа из группы физико-химических (спектроскопия в УФ и ИК-областях спектра, ВЭЖХ, обращеннофазовая макроколоночная жидкостная хроматография под воздействием низкого давления, ТСХ с применением нормальнофазового и обращеннофазового сорбентов).

Достоверность научных положений и выводов. Подлинность обретенных результатов диссертационного труда определена применением актуальных и высокоэффективных методик исследования. Большая часть обретенных результатов представлена в виде табличных и графических данных. Для доказательства подлинности предложенных методик процентного определения антибактериальных препаратов цефалоспоринового ряда проводилась процедура валидации, полученные результаты исследования статистически обрабатывались в соответствии с требованием ГФ XIII и XIV издания, процесс обработки данных производили с применением прикладных программ «Microsoft Excel 2013».

Апробация работы. Значимые результаты диссертационного исследования освещены на X юбилейной международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков, Курск (февраль 2016 г.), на IX Всероссийской научно-

практической конференции с международным участием «Биотехнология и биомедицинская инженерия», Курск (2016 г.), на X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 25-летию биотехнологического факультета и 20-летию кафедры биологической и химической технологии «Биотехнология и биомедицинская инженерия», Курск (ноябрь 2017 г.), на 82-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность», Курск (апрель 2017 г.), на международной научно-практической конференции «Новшества в медицине и фармакологии», Тюмень (декабрь 2017 г.), на 7-ой Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018», Воронеж (март 2018 г.), на 83-ей Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», Курск (апрель 2018 г.).

Личный вклад автора. Научные данные, представленные в данной диссертационной работе Безъязычной А.А., были получены лично автором на базе Курского филиала ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора. Автором было выбрано научное направления, выполнена основная часть практических исследований. Во всех работах, опубликованных с соавторами, автор производил постановку целей и задач, доказательство выбора оптимальных путей их решения, планирование и ход проведения эксперимента, обработку полученных результатов, формулировку общих выводов, апробацию и внедрение полученных экспериментальных данных настоящего диссертационного труда.

Внедрение результатов исследования. Были внедрены и апробированы итоги этого диссертационного труда:

- Методика идентификации цефтриаксона сочетанием методов хроматографии в тонком слое гидроксильированного сорбента и электронной спектрофотометрии и методика определения цефтриаксона, цефепима и цефпирома в лекарственных формах методом обращеннофазовой ВЭЖХ внедрены и апробированы в работе Курского филиала ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (акты внедрения № 1, 2 от 25.09.2019 г.).

- Методика химико-токсикологического определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в тканях органов и биологических жидкостях при проведении судебно-химического исследования внедрена и апробирована в работе ОБУЗ «Бюро СМЭ» Курской области (акт внедрения № 44 от 27.09.2019 г.).

- Валидация методики количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы, извлеченного из биологического материала, методом обращеннофазовой ВЭЖХ и методика количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы, извлеченного из биологического материала, методом обращеннофазовой ВЭЖХ внедрены и апробированы в работе ООО Испытательного центра «ФАРМОБОРОНА» (акты внедрения № 10, 11 от 03.10.2019 г.).

- Методика количественного определения цефепима и цефпиромы в лекарственных формах методом электронной спектрофотометрии и методика идентификации цефтриаксона в лекарственных формах методами ТСХ и электронной спектрофотометрии и внедрены и апробированы в научной работе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ВГМУ имени Н.Н. Бурденко Минздрава России (акты внедрения № 4, 5 от 01.10.2019 г.).

- Методика изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпиромы из биожидкостей и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии и методика изучения сохраняемости некоторых цефалоспориновых антибиотиков в биологическом материале при различных температурных режимах внедрены и апробированы в учебной (практические занятия) и научной работе на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБУ ВО КГМУ Минздрава России (акты внедрения № 14, 15 от 02.10.2019 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа является прикладным исследованием для решения задач судебно-химического анализа. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

(фармацевтические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3 и 4 из паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научной работы федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и является фрагментом выполняемых в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации исследований по теме: «Исследование возможности разработки методик анализа цефалоспориновых антибиотиков в судебно-химическом отношении» (номер государственной регистрации 4А-А17-117013060070-4).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 8 статей, из которых 3 в журналах, входящих в список ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 7 глав собственного исследования, общих выводов, списка литературы из 179 источников, (137 из которых зарубежные), списка используемых сокращений и приложения. Работа иллюстрирована 31 рисунками и включает 23 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В современном мире распространенное использование для лечения широко спектра заболеваний получили антибактериальные препараты из разных фармакологических групп. Особую значимость получили бета-лактамы антибактериальные препараты. Исходя из анатомо-терапевтической-химической классификации лекарственных средств (АТХ) изучаемые лекарственные препараты имеют код: J01DD – цефтриаксон, J01DE – цефепим и цефпиром[16].

1.1. Классификация антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов

Цефалоспорины традиционно классифицируются на пять поколений, в зависимости от временного интервала их открытия и специфики антимикробных свойств. Цефалоспориновые антибиотики из первого поколения воздействуют на стафилококки. Они также проявляют активность против *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Цефалоспорины второго поколения воздействуют на три дополнительных грамотрицательных организма: *Haemophilus influenzae*, некоторые *Enterobacter aerogenes* и некоторые виды *Neisseria*, тогда как влияние на грамположительные организмы слабее. Третье поколение цефалоспоринов играет важную роль в лечении инфекционных заболеваний, хотя сильно уступает первому поколению в отношении их воздействия на грамположительные кокки. Они имеют повышенную активность против грамотрицательных бацилл, а также на большинство других кишечных микроорганизмов и *Serratia marcescens*. Цефалоспорины четвертого поколения имеют широкий антибактериальный спектр активен в отношении стрептококки и стафилококки. Они также эффективны против аэробных грамотрицательных организмов, таких как *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa* [11, 57, 90, 117].

Согласно существующим классификациям β -лактамы антибиотики делятся на группы:

- пенициллины;
- цефалоспорины и цефамицины;

- монобактамы;
- карабапенемы.

Однако, группа цефалоспорины в настоящее время имеет разделение на пять поколений:

- 1 поколения (цефазолин, цефалексин и др.);
- 2 поколения (цефуроксим, цефокситин и др.);
- 3 поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим и др.);
- 4 поколения (цефпиром, цефепим);
- 5 поколения (цефтобипрол, цефтаролин, цефтолозан) [4, 24, 26, 65].

1.2. Получение и применение некоторых цефалоспоринов

Цефалоспорины представляют собой широкий класс бактерицидных антибиотиков, которые по химической структуре имеют в своем строении β -лактамное кольцо и можно выявить сходство в строении и механизме действия с другими β -лактамными антибиотиками, например, пенициллинами, карбапенемами и монобактамами) [39, 172, 174].

Цефалоспорины (и другие β -лактамы) губительно воздействуют на бактерии, ингибируя основные стадии синтеза бактериальной клеточной стенки, что в конечном итоге приводит к осмотическому лизису и к немедленной гибели бактериальной клетки [25]. Антибактериальные препараты из группы цефалоспоринов находят широкий ареал использования в современной терапии из-за их достаточно высокой клинической эффективности и желаемого профиля безопасности [33, 124].

Класс цефалоспориновых антибактериальных препаратов обладает отличительными свойствами в зависимости от бактериального спектра, способности к растворению в воде, переносимости кислот, биодоступности, биологическому периоду полураспада и другими существенным свойствам.

Ядро антибиотиков цефалоспоринового ряда основывается на двух кольцевых системах, состоящих из β -лактамного кольца, которое конденсировано с дигидротиазинным кольцом. Основным скелетом является 7-аминоцефалоспорановой кислотой, которая проходит процесс гидролитического

получения из природного соединения цефалоспориноса С. Соединения, имеющие в своей структуре данное ядро, проявляют устойчивость к кислотному гидролизу и к β -лактамазам. В структуре цефалоспориноса С содержится боковая цепь, полученная из D-аминоадипиновой кислоты. Для создания нового класса цефалоспориновых антибиотиков использовалась процедура модификации соответствующих позиций боковых цепей. Влияющая на антибактериальную активность модификация боковой цепи была определена в положении 7 лактамного кольца, а модификация в положение 3 дигидротиазинового кольца вносит существенные изменения в фармакокинетические свойства и аффинность связывания рецептора. [151, 170].

По историческим данным первые химические соединения из группы цефалоспоринов выделялись из *Cephalosporium acremonium*, гриба, производящего цефалоспорины, который был обнаружен в сточных водах побережья Сардинии и использован Джузеппе Бротцу в 1948 году. [17, 26, 63, 104]. Для получения новой антибактериальной активности использовались сырые фильтраты культуры *Cephalosporium acremonium*. Было выявлено, что сырой фильтрат культуры *Cephalosporium acremonium* способен увеличивать рост *Staphylococcus aureus* [177].

При проведении исследований в Англии Эдвардом Абрахамом и Гая Ньютоном определено, что при выделении культуральных жидкостей из сардинского гриба получали цефалоспорины Р, N и С.

Эффективность данных соединений была недостаточна для использования их в качестве противомикробных препаратов, но при использовании химического воздействия и удаления боковой цепи была получена 7-аминоцефалоспориновая кислота (7-АСА). 7-АСА аналогичен 6-аминопенициллановой кислоте (6-АРА), исходному блоку, который применяется в качестве исходного агента для получения некоторых пенициллиновых производных [75, 38].

На основании информации, предоставленной Авраамом, было сделано заключение о том, что разработанное им N-фенилацетильное производное цефалоспориноса С обладает значительно лучшим эффектом по отношению к

штаммам *Staphylococcus aureus*, чем исходное соединение. Разработанное производное соединение получило название цефалорам [103].

Цефалотин – парентеральный цефалоспориновый антибиотик первого поколения, находящий широко применение в США в 1964 году. Данный препарат являлся моделью для проведения клинических испытаний из серий 7-АСА-производных [140]. Цефалоридин являлся следующим антибактериальным препаратом, широко продаваемым в США, однако он появился существенно позже. Положительные результаты клинических испытаний позволили ученым улучшить имеющиеся фармакологические свойства. Эти данные легли в основу современных учений о полусинтетических аналогах природных цефалоспориновых соединений, которые были получены в ходе высокотехнологических разработок двух исходных препаратов [110].

В настоящее время цефалоспорины подразделяют на 5 поколений в зависимости от структуры химической формулы, спектра действия антибиотика и проявления устойчивости к β -лактамазам. Цефтриаксон является антибиотиком III поколения, а цефпиром и цефепим антибиотиками IV поколения.

Цефтриаксон – антибактериальный препарат из класса цефалоспоринов третьего поколения, в настоящее время находит распространенное применение в лечении бактериальных инфекций [88, 94]. Так он применяется для лечения отоларингологических, инфекционных заболеваний опорно-двигательной системы, эндокардита, менингита, внутрибрюшной инфекции, инфекции мочевыделительной системы и кожи, гонореи и воспалительных заболеваний органов малого таза. Он также иногда используется до операции и после, для предотвращения развития инфекции. Цефтриаксон назначается в виде внутривенных или внутримышечных инъекции [32, 147]. Цефтриаксон и другие антибиотики третьего поколения используются при лечении против микроорганизмов, которые, как правило, устойчивы ко многим другим антибиотикам [13, 14]. Из-за возникающей резистентности цефтриаксон не должен использоваться для лечения инфекций *Enterobacter* [40]. Перед назначением лечения цефтриаксоном важно определить чувствительность

бактерий к данному антибактериальному препарату [44]. В случае сепсиса, эмпирическая терапия может быть начата до тестирования чувствительности бактерий к данному лекарственному препарату [46, 112].

Данное лекарственное средство также является препаратом выбора для лечения бактериального менингита, вызванного пневмококками, менингококками, гемофильной палочкой и «восприимчивыми кишечными грамотрицательными палочками, но в их число не входит *Listeria monocytogenes* [84, 113].

Применение цефтриаксона в комбинированной терапии с доксициклином или азитромицином рекомендуется центрами Соединенных Штатов по борьбе с болезнями для лечения гонореи [96].

Цефепим – цефалоспориновый антибактериальный препарат четвертого поколения, механизм действия которого основан на ингибировании синтеза клеточной стенки бактерий. Цефепим обладает широким спектром активности *in vitro*, который охватывает большое количество грамположительных и грамотрицательных бактерий. В бактериальных клетках молекулярные мишени цефепима представляют собой белки, связывающие пенициллин [37, 62]. Цефепим имеет много сходностей с цефалоспориновыми антибиотиками III поколения, но особенности химической структуры позволяют обуславливать возможность повышенной способности прохождения через мембрану бактерий, относящихся к грамотрицательным. В отличие от основных цефалоспоринов, относящихся к третьему поколению, цефепиму характерны отличительные черты:

- проявление наибольшей активности к неферментирующим микроорганизмам и к *P. aeruginosa*;
- повышенная устойчивость к гидролитическому воздействию β -лактамазами.

Цефепим используется в современной терапии различных тяжелых бактериальных инфекций, для лечения заболеваний нижних дыхательных путей (абсцесс легкого, пневмония и др.); инфекций кожных покровов, мягких тканей, опорно-двигательной системы; сепсиса. Инъекционная форма цефепима широко применяется при лечении инфекций мочевых путей (неосложненных и

осложненных), таких, как пиелонефрит, вызванных чувствительными микроорганизмами *Escherichia coli* или *Klebsiella pneumoniae*, когда инфекция тяжелая или вызвана *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* или *Proteus mirabilis*, когда инфекция условно-патогенная, включая случаи, связанные с одновременной бактериемией с этими бактериями [12, 89, 91, 165].

Цефпиром – антибиотик, относящийся к классу цефалоспоринов четвертого поколения, проявляющий бактерицидные свойства, способен подавлять клеточный синтез бактериальных стенок. Отрицательно воздействует на процесс синтеза главного компонента, участвующего в образовании клеточной стенки бактерий – биополимера пептидогликана. Ингибирует транспептидазу пептидогликана, подавляет активность эндогенного ингибитора, что приводит к активации муреингидролазы, которая расщепляет пептидогликан. Эффективен в отношении делящихся бактерий, в стенках которых происходит синтез пептидогликана [18, 136].

Цефпиром проявляет широкий спектр активности при воздействии на грамположительные и грамотрицательные бактерии, резистентные к антибиотикам из группы цефалоспоринов III поколения и аминогликозидам. Проявляет умеренную активность в отношении *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, *Morganella morganii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Ps. aeruginosa* [114].

1.3. Основная химическая структура цефалоспоринов и их физические свойства

Молекула цефалоспориона состоит из ядра и двух боковых цепей. Ядро 7-аминоцефалоспориновая кислота состоит из β -лактамного кольца из четырех элементов, слитого с шестичленным дигидротиазининовым кольцом. Общая структурная формула цефалоспоринов изображена в соответствии с рисунком 1.

Для сравнения, ядро пенициллина, 7-аминопенициллановая кислота имеет β -лактамное кольцо, слитое с тиазолидиновым кольцом с пятью членами [3, 36].

Ядро цефалоспоринона имеет два преимущества по сравнению с ядром пенициллина. Во-первых, оно по своей природе более устойчиво к β -лактамазам. Бактерии, которые производят пенициллиназу, обычно восприимчивы к цефалоспоринону. Второе преимущество заключается в присутствии заместителя R_2 . Молекулу пенициллина можно модифицировать только в одном месте (R_1), а молекула цефалоспоринона имеет два участка (R_1 и R_2). Таким образом, по сравнению с пенициллинами потенциальное число цефалоспоринонов значительно больше [107, 122].

Наличие интактного β -лактамного кольца является существенным для антимикробной активности цефалоспоринона. Модификации заместителя R_1 , который находится в непосредственной близости от β -лактамного кольца, влияют на антибактериальную активность, изменяя стабильность β -лактамазы и связывающую аффинность к пенициллинсвязывающим белкам [179, 160].

Изменения в R_2 , который присоединен к дигидротиазиноновому кольцу, влияют на фармакокинетическое свойство препарата. Замещение ацетоксигруппы ($[-CH_2] -O-CO [-CH_3]$) для R_2 связано со значительным метаболизмом с производными десацетила. Введение метоксигруппы ($-O [-CH_3]$) на β -лактамном кольце в положении 7 связано с заметным увеличением как стабильности β -лактамазы, так и активности против анаэробов [135].

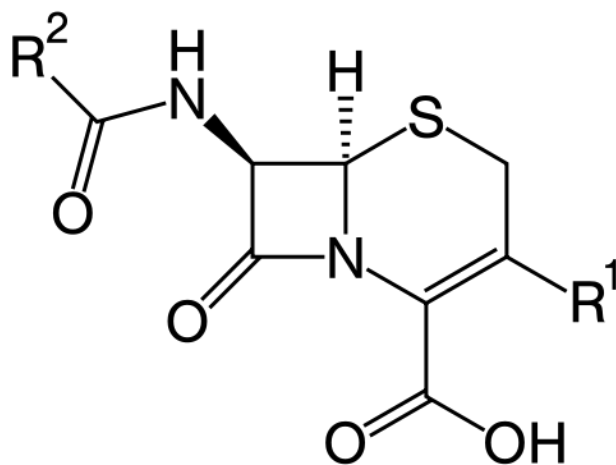


Рисунок 1 – Структурная формула цефалоспоринонов

Цефтриаксон – (6R,7R)-7-[[2Z)-(2-мино-тиазол-4-ил(метоксиимино)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 – белый или желтоватый кристаллический порошок, обладающий свойствами гигроскопичности, легко растворимый в воде, умеренно растворим в метаноле и очень слабо растворим в этаноле. pH 1% водного раствора составляет 6,7. Брутто формула имеет следующий вид: $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3 \cdot 3 \frac{1}{2} H_2O$. Молекулярная масса 661,61. Структурная формула изображена в соответствии с рисунком 2.

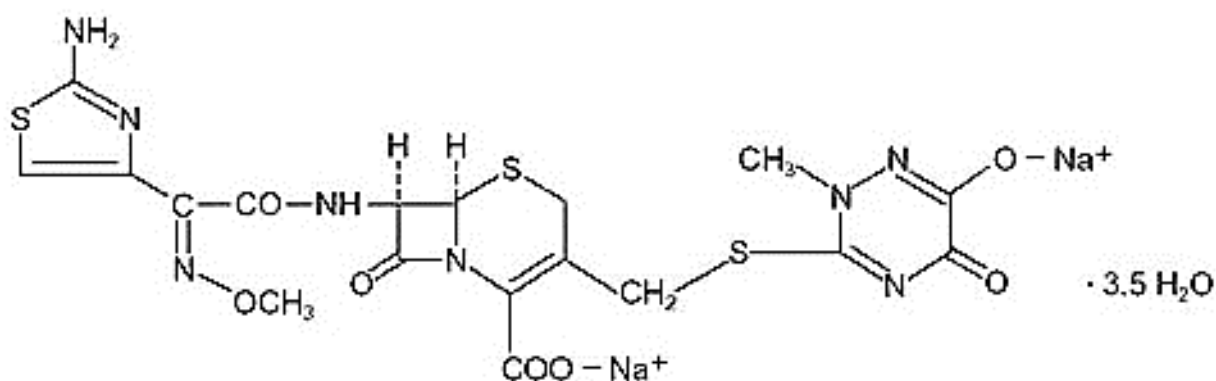


Рисунок 2 – Цефтриаксон

Цефепим – 1 - [[[(6R, 7R) -7- [2- (2-амино-4-тиазолил) -глиоксиламиноо] -2-карбоксо-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2. 0] окт-2-ен-3-ил] метил] -1-метилпирролидиния хлорид, дигидрохлорид моногидрата имеет структурное строение соответствующие следующей формуле:

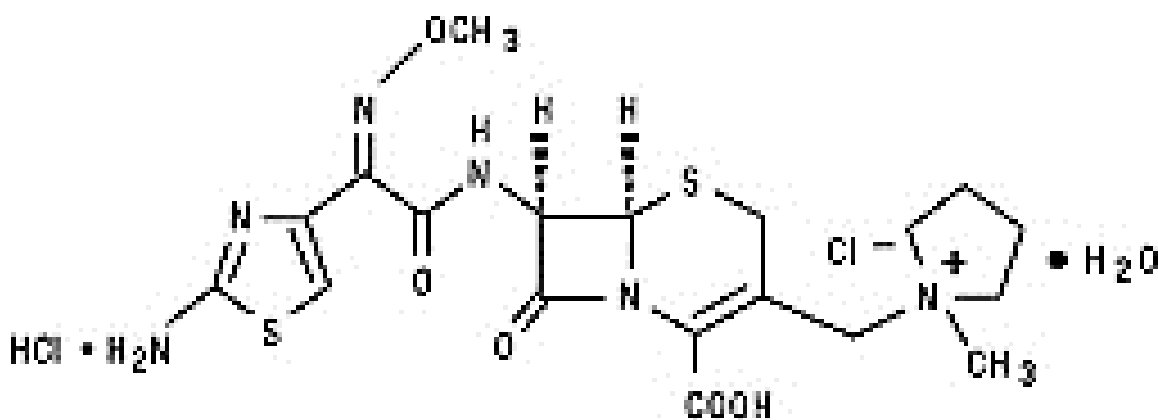
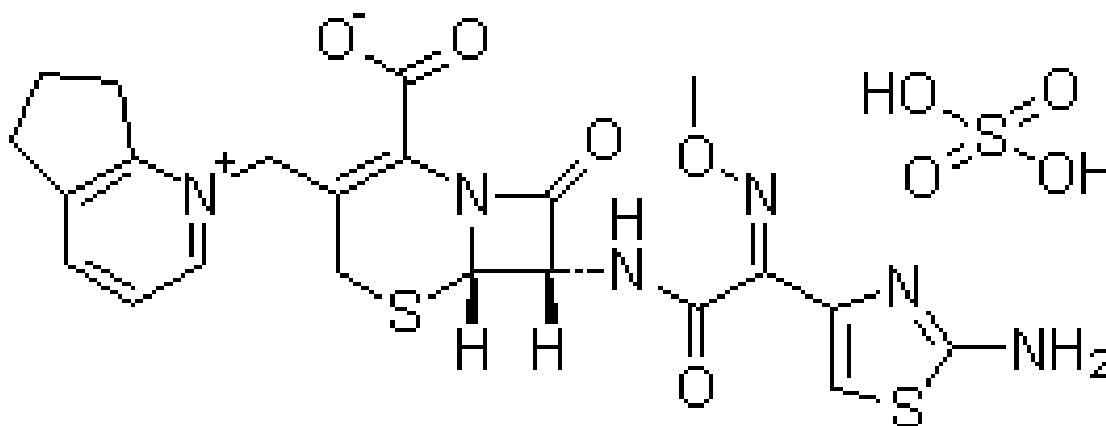


Рисунок 3 – Цефепим

Цефепим гидрохлорид – по своим физическим свойствам представляет белый или бледно-желтый порошок. Исходя из безводной основы цефепим

гидрохлорид содержит эквивалент от 825 мкг до 911 мкг цефепима ($C_{19}H_{24}N_6O_5S_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) на мг. Легко растворим в воде, в 0,9% изотоническом растворе натрия хлорида и 5% растворе глюкозы. Масса молекулярная равна 571,5 а.е.м.

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]-пипиридиния сульфат. Формула данного лекарственного препарата представлена в соответствии с приведенным ниже рисунком:



до 2 г в день. [54] Остальной процент выделяется с желчью, как неактивные соединения из метаболизма печени и кишечника. [175].

При пероральном введении цефтриаксона мышам и крысам LD_{50} более 10000 мг/кг. При введении цефтриаксона внутривенно крысе LD_{50} составляет 1900 мг/кг [55].

При введении внутримышечно цефепим хорошо всасывается и распределяется по всем органам (исключение составляет предстательная железа), а также тканям и биожидкостям. Известно, что из плазмы крови период полувыведения – 2 ч, процент связывания с белками составляет 20 %. Цефепим имеет лучшую способность к проникновению через гематоэнцефалический барьер по сравнению с другими цефалоспориновыми антибиотиками данного класса. Уровень концентрации антибиотика в цереброспинальной жидкости составляет 10 % от аналогичного показателя в плазме крови. Цефепим практически не подвергается метаболизму в организме, выделяется почками, в моче наблюдаются наибольшие концентрации данного лекарственного препарата. Цефепим метаболизируется до N-метилпирролидина, который быстро превращается в N-оксид. Мочевое восстановление неизменной цефепима составляет приблизительно 85% от вводимой дозы. Менее 1% вводимой дозы извлекается из мочи в виде N-метилпирролидина, 6,8% в виде N-оксида и 2,5% в качестве эписмера цефепима. Поскольку почечная экскреция является значительным путем элиминации, пациенты с почечной дисфункцией и пациенты, подвергающиеся гемодиализу, нуждаются в корректировке дозы.

При введении цефепима мышам внутривенно, LD_{50} составляет от 1500 до 2000 мг/кг. При введении цефепима внутривенно крысам LD_{50} для составляет 1067 мг/кг [173].

Цефпиром имеет парентеральный способ введения (внутривенно или внутримышечно) так, как имеет плохую абсорбцию из ЖКТ, как и большая часть антибактериальных препаратов из этой группы. Внутримышечный путь введения часто применяется для увеличения биодоступности. Период полувыведения составляет примерно 2 часа, не имеет зависимости от дозы лекарственного

препарата и длительности его применения (при отсутствии патологии почек составляет 1,8-2,2 часа). Так как терапевтическая концентрация исследуемого антибактериального препарата в крови поддерживается в течение 12 часов, то рационально применять данный препарат 2 раза в сутки. При введении 1 г цефепима в течение 5 минут, его средняя концентрация в плазме крови равна 81 мг/л, а процент связывания с белками крови составляет около 10. При повторном введении кумуляция не происходит. Основной путь выведения данного лекарственного препарата происходит почками в процессе клубочковой фильтрации. В первые 24 часа в моче содержание данного препарата составляет около 80-90%. После внутривенной инъекции в дозе 1 г у пациентов, возраст которых старше 65 лет, в течение первых пяти минут средняя концентрация в плазме крови составляет 127,1 мг/л и происходит заметное увеличение периода полувыведения до 4,5 часа. Как и у пациентов среднего возраста, при повторном введении кумуляция не происходит. Для изучения фармакокинетики данного препарата, был проведен сравнительный анализ с применением цефпиром у 12 пациентов, которые имели септический шок и 6 здоровых добровольцев. Изучалась проницаемость для интерстициальной жидкости скелетной мышцы дозы препарата равной 2 г [146]. Результаты, полученные в ходе исследования, были сопоставимыми: $16,0 \pm 1,1$ и $18,8 \pm 1,1$ мг/мл в минуту для пациентов и здоровых добровольцев, соответственно ($p > 0,05$). Уровень концентрации препарата, в течение 240 минут наблюдения, находился выше 28 мкг / мл и происходила блокировка MIC для большего количества клинически значимых патогенов. На основании проведенных экспериментальных исследований, авторы пришли к выводу о рациональности применения цефпиром для эмпирической терапии сепсиса. Исходя из работ других авторов, можно сделать заключение о том, что в тканях легких и плазме крови здоровых пациентов и пациентов с сепсисом, при определении внеклеточной концентрации, уровень концентрации цефпиром был одинаковым, а превышение концентрации исследуемого препарата превышала MIC для большинства микроорганизмов за 12 часов после дозы 30 мг / кг [27, 179].

При введении цефпирона мыши внутрибрюшино полуметальная доза составляет 3850 мг/ кг, при введении внутривенно 2400 мг/кг, при введении перорально 16200 мг/кг. При введении внутрибрюшинно данного препарата крысе LD₅₀ составляет 5800 мг/ кг, при введении внутривенно 1900 мг/кг, при введении перорально 8000 мг/кг, а при введении подкожно 10000 мг/кг [28].

1.5. Идентификация исследуемых соединений

Для доказательства подлинности исследуемых соединений возможно применение химических и физико-химическим методов анализа.

Для идентификации цефалоспоринов используется метод УФ-спектроскопии из-за наличия в структуре молекулы системы сопряженных двойных связей, которые обуславливают наличие характерной полосы поглощения [50, 118, 119].

Так же для установления подлинности структуры цефалоспориновых антибиотиков широко применяется метод ИК-спектроскопии в области 4000-400 см⁻¹ [116, 133].

Современными производителями цефалоспориновых антибиотиков в России предложен метод установления подлинности – высокоэффективная жидкостная хроматография. Так для установления подлинности время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора стандартного образца исследуемого соединения. Необходимо использования высокоэффективного жидкостного хроматографа с УФ-детектором [49, 56].

Для доказательства подлинности цефпирона, кроме метода ВЭЖХ, в современной практике используются фармакопейные реакции на сульфаты, карбонаты и натрия [93, 149].

Цефипим должен выдерживать испытание качественные реакции на хлориды, а цефтриаксон – на натрий.

Наличие β-лактамного кольца и сложно эфирной группы в химической структуре многих цефалоспоринов обуславливает возможность протекания гидроксамовой реакции.

Для данной группы веществ характерна реакция окисления смесью 80 % раствором серной кислоты и 1 % раствором азотной кислоты, в ходе данной реакции получают продукты различной окраски от светло-желтого до коричнево-красного окрашивания [152, 169].

1.6. Количественное определение

Существуют различные методы, используемые для анализа цефалоспоринов в различных формах, такие как хроматография, УФ, электрофорез и т. д. Применение ВЭЖХ для анализа антибиотиков представляет собой мощный инструмент для терапевтического мониторинга лекарственных средств, а также клинических исследований [176].

Методы газовой хроматографии бывают быстрыми, но для этого требуется повышенная температура, что может вызвать термическое разложение лекарств. Чтобы избежать этого, требуется дериватизация для улучшения летучести и улучшения хроматографического поведения. Поэтому эти методы неприменимы для антибиотиков.

В то время как другие хроматографические методы имеют высокий предел обнаружения, поэтому они также не являются предпочтительными. Технология ВЭЖХ может обеспечить ценный инструмент, который генерирует высокочистые соединения, и ВЭЖХ обладает способностью анализировать как летучие, так и нелетучие соединения с ультра-следовым уровнем, что может быть использовано в клинических исследованиях. Многие антибиотики, содержащие ионизируемую группу, могут быть проанализированы с помощью ионообменных хроматографических методов. Высокая разрешающая способность ВЭЖХ является особенно важным методом выделения и очистки антибиотиков [155].

Официальные методы анализа: Фармакопея США предписывает полярографический метод для анализа цефамандола нафтата и ВЭЖХ-методов для анализа других цитированных цефалоспоринов, в то время как Европейская Фармакопея 2002 предписывает методы ВЭЖХ для их анализа. Анализ цефалоспоринов в биологических материалах человеческого происхождения и пищевых животных 8 пищевых продуктов, вод и фармацевтических препаратов

проводили с помощью жидкостной хроматографии, капиллярного электрофоретического, спектроскопического и электрохимического методов. Однако ни один из них не анализировал семь цефалоспоринов одновременно [70, 99, 105, 106, 115, 125].

Некоторые методы, найденные в обзоре литературы, предназначены для одного цефалоспориона, тогда как некоторые методы доступны в разной комбинации.

Наиболее распространенными методами анализа цефалоспоринов в препаратах и биологических жидкостях являются метод ВЭЖХ для анализа. Как сообщается в литературе, было описано несколько аналитических процедур для анализа цефотаксима, цефтазидима и цефтриаксона в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях. К ним относятся высокоэффективная тонкослойная хроматография [59, 143], высокоэффективная жидкостная хроматография [73, 77, 108], дифференциальная импульсная адсорбционная вспучивающая вольтамперометрия [109], ЯМР-спектроскопия, полярография и спектрофотометрия ультрафиолетового производного [111].

Сообщается о различных методах ВЭЖХ для анализа одного цефалоспориона в биологической жидкости [127, 128, 137, 156, 157, 158, 159]. Все эти методы представляют собой уникальный подготовительный и хроматографический протокол для одного цефалоспориона или его метаболита, или обоих из них. Для анализа цефтазидима третьего поколения цефалоспоринов было использовано несколько методов для оценки только цефтазидима, который включает высокоэффективную жидкостную хроматографию и в сочетании с пиридином, ванкомицином и цефепимом [139].

Впечатляющий рост использования высокоэффективной жидкостной хроматографии за последние тридцать лет не прошел антибиотики β -лактама. ВЭЖХ часто используется во всех областях исследований β -лактама не только как метод анализа, но также как инструмент для очистки антибиотиков. Из-за нерастворимости этих соединений в органических растворителях обычная фаза LC была экономно использована. Большинство методов используют обратные

фазы или ионно-парные обращенные фазы LC и химически связанные упаковочные материалы [145, 154, 164, 168].

Сообщалось об обзоре характеристик химической структуры и стабильности цефтазида [72] и цефотаксима [45]. В последнее время для быстрого многокомпонентного анализа сложных биологических и фармацевтических смесей использовалось полное количественное определение спектра. Эта методика была успешно применена для одновременного анализа бинарных смесей кортизонсортизола, цефалексинкфедраина, фенобарбитон-эфенитоина натрия и тройной смеси аспирина-салициловой кислоты [130].

Ультрафиолетовые спектрофотометрические методы: цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим определяли в присутствии их продуктов деградации, вызванных щелочью, с помощью спектрофотометрического полного спектра в диапазоне 265-230 нм [121]. При анализе цефтазида в присутствии других препаратов 38-42 сообщается о различных УФ-спектрофотометрических методах.

Смеси цефтазида, цефуросима натрия, цефотаксима натрия и их продуктов разложения анализировали с помощью спектрофотометрии первой производной при 268,6, 306, 228,6 нм, соответственно. Цефотаксим и цефуросим определяли по реакции с 1 хлорбензотриазолом и измеряли оптическую плотность при 298 нм.

Для определения цефалексина в фармацевтических препаратах применяли стандартные методы добавления УФ, первого производного, второго производного и N-точечного стандарта. Производная спектрофотометрия также применялась для определения некоторых цефалоспоринов в бинарных смесях. Сообщалось о спектрофотометрическом методе определения массы цефалексина и его продуктов разложения, вызванных кислотой [64, 129]. УФ-спектрофотометрия и разностная УФ-спектрофотометрия применялись для определения цефалексина в таблетках. Кроме того, для определения триэтиламмониевой соли цефотаксима в присутствии родственных соединений, полученных в результате синтеза, использовали производную спектрофотометрию.

Константы диссоциации цефепима и цефпирона определяли с помощью УФ-спектрометрии. Цефуроксимаксетил и пробенецид одновременно определяли в твердых дозированных формах методом УФ-спектрофотометрии. Сообщалось о производной спектрофотометрии для определения цефпрозила в фармацевтических лекарственных формах в присутствии его продуктов деградации, вызванных щелочью. Бинарные смеси цефалотина и цефокситина определяли с помощью спектрофотометрии первой производной. Был разработан спектрофотометрический метод определения цефадроксила в объемном порошке и его фармацевтических лекарственных формах на основе реакции первичной аминогруппы с реагентом ацетилацетон-формальдегид, который дает хромоген желтого цвета. Сообщалось о другом методе определения цефадроксила в фармацевтических лекарственных формах путем смешивания с сульфаниловой кислотой; поглощение измеряли при 440 нм.

Ампициллин, амоксициллин, цефалексин, цефадроксил и цефаклор могут быть определены в фармацевтических препаратах с использованием колориметрического метода, основанном на измерении цвета полученного при щелочном продукте разложения [98].

Известны три спектрофотометрических процедуры анализа цефепирона натрия, цефазолин натрия, цефалексин моногидрат, цефадроксил моногидрат, цефотаксим натрия, цефоперазон и цефтазидим пентагидрат в чистом виде. Методы были основаны на реакции этих препаратов в качестве доноров n -электронов с сигма-акцептор йода и π -акцепторы: 2,3-дихлор- 5,6-дициано-п-бензохинон и 7,7,8,8- тетрацианохинодиметан.

Был разработан спектрофотометрический метод анализа цефазолина натрия в форме порошка для инъекций. Данный метод используется для идентификации и количественного определения исследуемого препарата. Были получены положительные результаты при проведении валидации по показателям специфичность, точность, аккуратность и надежность. Линейность наблюдалась при концентрациях 8-28 мкг/мл⁻¹, коэффициент корреляции 0,9999 был также получен при анализе при длине волны $\lambda=270$ нм [60].

Saleh и его коллеги разработали кинетический спектрофотометрический метод определения цефоперазон натрия, цефазолина натрия и цефтриаксона натрия в массе и в фармацевтических составах. Метод был основан на кинетическом исследовании реакция препарата с окисленным кверцетином при комнатной температуре в течение фиксированного времени 30 мин. Уменьшение оптической плотности после добавления препарата измеряли при 510 нм. График концентрации поглощения был прямолинейный в диапазоне 80-400 мкг/ мл⁻¹ для всех препаратов [51, 61, 69, 74, 76].

Sayed и другие разработали экстрактивный спектрофотометрический метод оценки гатифлоксацин и цефотаксим натрия в чистом виде и фармацевтической лекарственной форме. Метод был основан на образование окрашенного комплекса препаратами с эриохром черный-Т в кислой среде. Ион образовавшийся связанный комплекс был количественно извлечен в условиях эксперимента с метиленом хлорида и поглощение органического слоя было измерено при 510 нм. Закон Бера был соблюден в диапазоне концентраций 3-18 и 30-120 мкг/мл⁻¹ для гатифлоксацин и цефотаксим натрия соответственно [134].

Существует спектрофотометрический метод определения цефаклора моногидрата, цефадроксил моногидрат, цефалексин безводный, цефрадин безводный, цефотаксим натрия, цефоперазон натрия, цефтриаксон натрия, цефтазидим пентидрат, цефазолин натрий, цефиксим и цефподоксимепроксетил в фармацевтических субстанциях. Метод был на основан на гидролизе исследуемых препаратов с использованием 0,5 М NaOH при 100 °С и последующей реакции, при этом образуется сульфид-ион с 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1, 3-дiazол с образованием измеренного желтого хромогена при 390 нм [148].

А также в настоящее время известен спектрофотометрический метод определения цефалексина. В данном методе применяется процесс гидролиза исследуемого препарата в растворе гидроксида натрия для производства сульфид-ион и превращение сульфида с р-фенилендиамин для образования продукта фиолетового цвета. Поглощение фиолетового красителя измеряли при 595 нм.

Метод был успешно применен для анализа цефалексин в лекарственных препаратах.

Кроме того, Agbaba и его коллеги описали спектрофотометрический метод определения цефалексина, цефиксима, цефтриаксона и цефотаксима в фармацевтических препаратах, использующих ферригидроксамат [86, 153].

Определили цефрадин и цефатолин спектроденситометрическим методом после контакта с парами йода. Цефалоспорины наносят на пластины ТСХ, покрытые смесью (2: 1) слоистого двойного гидроксида алюминия (III) и магния (II) и силикагеля G, и развиваются с использованием диапазона подвижных фаз, пятна детектируются парами йода и определяли содержание цефалоспоринов. Продукты деградации цефтазидима, цефуроксима натрия и цефотаксима натрия были получены кислотным гидролизом, смеси этих лекарств и продукты их разложения были проанализированы с помощью количественного денситометрического ТСХ. Некоторые цефалоспорины в фосфатном буфере с pH 3,6 были замечены на пластинах ТСХ, покрытых силикагелем, с флуоресцентным индикатором или силикагелем RP 18; Пятна были визуализированы на 254 нм или с помощью светообразующего агента [68, 97].

Цефтриаксон, цефотаксим, цефаклор и цефалексин определяли в их фармацевтических лекарственных формах с использованием ВЭЖХ, и измерение каждого пятна проводили на определенных длинах волн с использованием сканера в режиме оптической плотности отражения сообщалось о способе одновременного определения цефадоксила и цефалексина в фармацевтических препаратах с использованием количественного ТСХ. Цефалексин анализировали с помощью ВЭЖХ на пластинках F254 на силикагеле. Пластины сканировались в режиме отражения при 263 нм. Сообщалось о нескольких способах количественного определения однократного применения цефалексина и комбинации при помощи ВЭЖХ [47, 48, 53, 81, 82, 83].

Методы анализа цефалоспориновых антибактериальных препаратов в биологических жидкостях:

1) Метод с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии: данный метод широко применяется для обнаружения антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов в жидкостях биологической природы (кровь, плазма, моча, спинномозговая жидкость), тканях животных, продуктах питания. Суммирует недавние описанные ВЭЖХ методы [126, 131, 132, 138].

2) Капиллярные электрофоретические методы: девять цефалоспоринов определяли с использованием электрофореза в капиллярной зоне после гидродинамической инъекции на капилляр с расплавленным кремнеземом и детектированием проводили при 210 нм Mrestani предложил метод (капиллярной зоны электрофореза) для определения четырех цефалоспоринов после инъекции на капилляре плавленного кварца с детектированием при потенциалах разрыва 270 нм и 30 кВ. Цефиксим и пять его метаболитов определяли в пищеварительных тканях человека высокоэффективным капиллярным электрофорезом на капиллярной трубке из плавленного кварца с детектированием при 280 нм. Метод капиллярной зоны электрофореза использовали для определения β -лактамных антибиотиков, аминогликозидов, хинолонов и тетрациклинов в биологических образцах.

Цефотаксим и его деацетил-метаболит определяли с использованием капиллярного плавленного кварца с боратным буфером с рН 9,2 в качестве электролита. Этот метод использовали для определения четырех цефалоспоринов в клинических образцах.

Мицеллярную электрокинетическую капиллярную хроматографию (МЕКС) цефуроксим определяли в человеческой сыворотке с помощью МЕКС с использованием капилляра плавленного кремнезема с 150 мМ додецилсульфатом натрия в 20 мМ фосфате натрия и борате (рН 9,0) в качестве электролита с приложенным потенциалом 15 кВ и детектированием при 274 нм.

Некоторые ученые разработали метод МЕКС для обнаружения цефтазидима в плазме крови и цереброспинальной жидкости применяя трис-буфер с додецилсульфатом натрия в качестве фонового электролита, детектирование производили при 254 нм. Разработанная методика применялась для определения

цефотаксима и его деацетилметаболита с применением капилляра плавного кварца с фосфатным буфером рН 8,0, содержащего 165 мМ дедecilсульфата натрия в качестве разделительного электролита. Цефпиром оценивали в микродиализе человека и образцах плазмы МЕКС [120].

Для исследуемых препаратов исследовали влияние различных параметров, таких как рН, время предварительной концентрации, потенциал осаждения, поддерживающие электролиты, возможные помехи и другие переменные. Для полученных результатов был проведен статистический анализ. Линейность данного метода – удовлетворительная. Разработанный метод широко применялся при анализе данных лекарственных препаратов, а так же в биологических образцах (сыворотке и моче) [141, 166]. Исследована интерференция некоторых аминокислот мочевины, аскорбиновой кислоты и некоторых ионов металлов.

Разработанный жидкостной хроматографический метод с УФ-видимым детектором предлагает чувствительность и точность. Он создает симметричную пиковую форму, хорошее разрешение и разумное время удерживания для цефтазидима и сульбактама натрия.

Кроме того, предварительная обработка образца не производится, что делает метод простым и легким в использовании. Его можно использовать для одновременного определения цефтазидима и сульбактама натрия в фармацевтических компаниях и исследовательских лабораториях для рутинного анализа и в образцах плазмы.

В этом обзоре содержатся различные методы анализа, включающие некоторые хроматографические методы, особенно ВЭЖХ и некоторые методы капиллярного электрофореза.

Различные методы анализа специально изучены в отношении аналитических параметров, которые включают линейность, дальность, точность, LOD, LOQ и надежность метода наряду с комбинацией более одного антибиотика из состава и биологических жидкостей [161, 163].

Анализ антибиотиков, присутствующих в составных и неформованных образцах, требует очень специфического и быстрого метода, поскольку многие

антибиотики (например, β -лактамы) имеют серьезные проблемы с устойчивостью. Это сделало ВЭЖХ предпочтительнее других традиционных микробиологических методов. Также хроматографические методы обычно достаточно чувствительны для большинства антибиотиков, поскольку они достигают предела количественной оценки (LOQ) 0,3-0,5 мкг / мл. Чувствительность может быть дополнительно усилена путем ее сочетания с флуориметрическими, электрохимическими или масс-спектрометрическими методами обнаружения. Используя различные типы колонок и различные комбинации систем растворителей, объем метода ВЭЖХ может быть дополнительно расширен до широкого диапазона образцов, хотя колонны с обращенной фазой использовались более часто [78, 162].

Целью этого исследования является выяснение методов, которые дают хорошие результаты, такие как точность. Некоторые из этих методов используются в диапазоне очень низкой концентрации линейности. ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрические методы электрофореза в капиллярной зоне обычно применяются для обнаружения лекарственных средств. Некоторые описанные методы подходят для идентификации и количественного определения цефалоспоринов во многих диапазонах анализа [15, 43, 66, 67].

В заключение, различный метод ВЭЖХ был успешно использован на регулярной основе и позволяет количественно определять лекарственное средство в фармацевтических препаратах и жидкостях организма в короткое аналитическое время.

Данные методы характеризуются высокой чувствительностью, простотой и высокой скоростью исполнения, облегчают процесс экстракции, характеризуются высокой линейностью и точностью. Данные методы возможны в применении, как основополагающие методы анализа.

На основе результатов проведенной валидации делаем вывод, что предлагаемые методы являются избирательными, линейными, точными и точными с низкими значениями LOD, LOQ и достаточными для определения

содержания лекарственного вещества в формулируемых, неформованных продуктах и в биологических жидкостях.

Метод ВЭЖХ применяется для анализа цефалоспоринов в таблетках с уровнем нанограма и высокой точностью. Н. Fujitomo и его соавторы предложили два метода определения цефалоспоринов в пероральной суспензии с небольшим изменением диапазона анализа и вариацией метода [71, 79, 80].

ВЭЖХ является более чувствительным, линейным, точным и высокоточным методом. Lisoni и его соавторы показали, что анализ cefatanet proxetil в лекарственном веществе и порошке с очень низкой точностью и высоким процентом восстановления. Значение LOD и LOQ указанного способа также является низкой концентрацией.

Masoom Raza и Ravi Shankar разработали метод, который может работать с ppm уровнем концентрации с высокой точностью и точностью с низким значением LOD, LOQ. Некоторые методы ВЭЖХ могут использоваться для многокомпонентного анализа с 7-10 цефалоспоринов за один раз [58, 95, 100, 101, 102].

1.7. Направленный транспорт антибактериальных средств в организм

Современной и актуальной проблемой фармакологии является разработка и применение систем целенаправленного транспорта различных лекарственных препаратов [2, 19, 22]. В качестве транспортеров лекарственных препаратов широко используются различные клеточные системы доставки, но в настоящее время предпочтение отдается собственным (аутологичным) клеткам организма, в частности эритроцитам. Как у транспортеров лекарственных препаратов, у аутоэритроцитов есть важное преимущество - абсолютная биологическая совместимость, отсутствие токсических продуктов деградации и высокая способность к выживаемости *in vivo* [34,87, 142, 144].

Эритроциты обладают очень длительным периодом полураспада в циркуляции и могут быть загружены различными химически и биологически активными соединениями с использованием различных химических и физических методов. Применение эритроцитов в качестве перспективных систем медленного

высвобождения лекарств для различных биоактивных агентов из различных областей терапии приобрело значительный интерес в последние годы. Биофармацевтические препараты являются одними из наиболее широко используемых для доставки в организм хозяина с использованием этих клеточных носителей [167].

Для доставки лекарств использовались различные типы эритроцитов млекопитающих, включая эритроциты мышей, крупного рогатого скота, свиней, собак, овец, коз, обезьян, кур, крыс и кроликов. Для выделения эритроцитов кровь собирают в гепаринизированные пробирки с помощью венепункции. Свежая цельная кровь обычно используется для целей загрузки, потому что эффективность инкапсуляции эритроцитов, выделенных из свежей крови, выше, чем у свернувшейся крови. Свежая цельная кровь - это кровь, которая собирается и сразу охлаждается до 40 ° C и хранится менее двух дней. Эритроциты затем собирают и промывают центрифугированием. Промытые клетки суспендируют в буферных растворах при различных значениях гематокрита по желанию и часто хранят в кислотно-цитратно-декстрозном буфере при 40 ° C в течение 48 часов перед использованием. В 1979 году термин «эритроциты-носители» был придуман для описания нагруженных лекарством эритроцитов.

Для загрузки лекарств или других биологически активных соединений в эритроциты можно использовать несколько методов, включая физические (например, электроимпульсный метод) системы на основе осмоса и химические методы (например, химическое возмущение мембраны эритроцитов).

Исследованные эритроциты имеют несколько возможных применений в различных областях человеческой и ветеринарной медицины. Такие клетки можно использовать в качестве циркулирующих носителей для распространения лекарства в течение длительного периода времени в кровотоке или в органах, специфичных для мишени, включая печень, селезенку и лимфатические узлы. Большинство исследований по доставке лекарств с использованием нагруженных лекарствами эритроцитов находятся в доклинической фазе. В нескольких клинических исследованиях были получены успешные результаты [20].

Транспорт антибактериальных лекарственных средств с использованием эритроцитов-носителей в настоящее время находит актуальное применение. Наблюдается снижение токсического воздействия лекарственных препаратов, иммунных и аллергических реакций и пролонгации фармакологического эффекта лекарственных препаратов при применении аутоэритроцитов для транспортировки антибактериальных препаратов различных классов.

Одним из широко используемым классом антибактериальных препаратов в настоящее время являются цефалоспориновые антибиотики. Преимущества данной группы антибиотиков заключается в спектре антимикробного действия, их фармакокинетическим особенностям и безопасности. Несмотря на распространенное использование данной группы лекарственных препаратов, в медицинской практике недостаточно разработаны методики получения и использовании эритроцитарных носителей в качестве транспортеров данных препаратов.

В настоящее время существует множество методик транспорта иммобилизованных антибиотиков.

Применяется методика ЭКАБТ (экстракорпоральной антибиотикотерапии), используемая для лечения гнойно-деструктивных заболеваний легких [150]. Отрицательным моментом вышеуказанной методики является забор большого объема крови, который необходим для ее выполнения.

При комплексном лечении больных с почечной патологией используется методика целенаправленного транспорта антибактериальных лекарственных препаратов [31]. Также у этого метода существует ряд весомых недостатков. Для использования данного метода необходимо применения специализированного оборудования и стерильных одноразовых емкостей для тромболойковзвеси. Значимым недостатком является необходимость гелий-неонового лазера.

Для лечения абсцессов легких, осложненных пиопневмотораксом, была предложена методика, которая позволяла вводить антибактериальные лекарственные препараты в клетки крови при использовании плазмафореза.

Существенным недостатком методики является то, что для ее выполнения необходим забор большого объема крови.

В настоящее время разработана методика позволяющая использовать малые объемы крови для направленного транспорта антибиотиков [41, 42, 85].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературных данных показал активное использование антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов, которые оказывают широкое действие, но в то же время и наличие токсического воздействия и аллергических реакций немедленного типа, приводящих к летальному исходу.

2. В настоящее время, с целью снижения токсического воздействия и повышения терапевтической эффективности различных лекарственных препаратов, в том числе и антибактериальных лекарственных средств из группы цефалоспоринов широко внедряются системы доставки, одними из которых являются клеточные носители.

3. Исходя из проведенного литературного обзора, полученные данные дают возможность понимания, что в современное время отсутствуют методики стандартизации клеточных носителей по действующему веществу, а также методики химико-токсикологического исследования анализируемых препаратов. Поэтому своевременным и востребованным является решение цели исследования данного диссертационного труда.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Цефпиром, полуфабрикат-порошок стерильный для приготовления стерильных лекарственных форм, производитель: ЭнСиПиСи Орхид Фармасаутикал Ко., Лтд., Китай. Цефепим, субстанция-порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения, производитель: ЗАО «МАКИЗ-ФАРМА», Россия. Цефтриаксон, субстанция-порошок для приготовления растворов для внутривенного и внутримышечного введения, производитель: РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь.

2.2. Приборы и оборудование

2.2.1. Оборудование, относящееся к средствам измерения

Дозатор механический одноканальный 10-100 мкл ВЮНІТ («Биохит», Финляндия); дозатор механический одноканальный 1-5 мл ВЮНІТ («Биохит», Финляндия); секундомер механический СОСпр-2б-2-000 (г. Златоуст, Россия); термометр лабораторный ТЛ-5 (Клинское ПО «Термоприбор», Россия); спектрофотометр UV, мод. UV-1800 («Shimadzu Corporation», Япония); фурье-спектрометр инфракрасный VARIAN, мод.670IR приставка к ИК-Фурье спектрометру для однократного НПВО (нарушения полного внутреннего отражения), («VARIAN», Австралия); хроматограф жидкостный Agilent 1260 Infinity («Agilent Technologies» США); анализатор жидкости SevenCompact мод. S220 («Mettler Toledo», Швейцария); измеритель комбинированный Testo 625 (Германия); весы MSE224S-1CE-DU ("Sartorius", Германия); весы электронные прецизионные CBL 2200H (Sungnae-Dong, Gangdong-Gu, Seul, Korea) – имеет действующее свидетельство о поверке, проводится ежегодная квалификация и расчет неопределенности калибровки.

2.2.2. Испытательное оборудование

Лабораторный инкубатор Isoterm IFA-110-8 (The ESCO Group of Companies, Сингапур); хладотермостат воздушный ХТ-3/40-2 (г. Минск Республика Беларусь ЗАО «Пять океанов»); облучатель хроматографический УФС-254/365 (ООО «ИМИД», Краснодар) – имеет действующий аттестат о поверке.

2.2.3. Вспомогательное оборудование

Встряхиватель для лабораторных колб (Польша); аквадистиллятор электрический ДЭ-25, мод.784 (ЗАО «Электромед-оборудование» г. Санкт-Петербург); баня водяная LT-6 (Компания Лабтех, Москва); ультразвуковая ванна «Сапфир» УЗВ-2,8 ТТЦ (Гродненский завод торгового машиностроения ЗАО «ПКФ САПФИР», Россия); магнитная мешалка «Magnetic stripper type 4 mm» (Polamed, Польша); фиксатор (рестрейнер) для лабораторных животных (мыши) AE1001-M1 (Open Science, ООО «НТК Открытая Наука», г. Красногорск, Московская обл., Россия Лабораторные животные); утилизатор отходов «Стеримед-Юниор» (M.C.M. Environmental Technologies Inc.); установка для усыпления (эвтаназия) животных AE0904 (Open Science, ООО «НТК Открытая Наука», г. Красногорск, Московская обл., Россия); плитка электрическая HS-101 (Супра Технолоджис Лимитед, Китай, Гонконг); вакуумный насос Buchi V-700 (CH-9230 Flawil) (Buchi Labortechnik AG, Швейцария); центрифуга медицинская лабораторная "Armed" 80-2S (Shanghai Medical Instruments (Group) Ltd., Corp Surgical Instruments Factory, Китай).

2.3. Реактивы

1,4-Диоксан, ч.д.а.; 1-бутанол, ч.д.а., ГОСТ 6006-78; 1-деканол, ч.д.а.; 1-пентанол, ч.д.а., Cas № 71-41-0; 1-пропанол, ч.д.а., Cas № 71-23-8; 2-метилпропанол-1, ч.д.а., ТУ 2632-029-5678322-2008; 2-пропанол, х.ч., ТУ 6-09-4522-77; D-(+)-глюкоза, Cas № 50-99-7; ацетон для ВЭЖХ, ч.д.а.; ацетонитрил для жидкостной хроматографии, о.с.ч., ТУ 2634-002-54260861-2013; бензол, х.ч., ГОСТ 5955-75; борная кислота, ч.д.а., Cas № 10043-35-3; диметилсульфоксид, ч.д.а.; диметилформамид-N,N для ВЭЖХ-ГПХ-ИК-УФ, раi-acs, PANREAC-361785; диэтиловый эфир, ч.д.а., ТУ 2600-001-45682126-06; калий бромистый для спектроскопии, раi-acs, PANREAC-331489; кислота ортофосфорная, ч., ГОСТ 6552-80, изм. 1-2; кислота уксусная ледяная, х.ч., ГОСТ 61-75; метанол, х.ч., ГОСТ 6995-77; натрия гидроксид, х.ч., ТУ 2642-001-33813273-97; спирт этиловый, ГОСТ Р 51652-2000; вазелиновое масло «АО Татхимфармпрепараты»; н-гексан, х.ч., Cas №110-54-3; стандартный образец (СО) Цефепима

гидрохлорида, USP, Cas № 123171-59-5 с содержанием основного вещества 86%; стандартный образец (СО) Цефпирома сульфата, USP, Cas № 13542-58-1 с содержанием основного вещества 95%; стандартный образец (СО) Цефтриаксона динатриевой соли (Роцефин), Мастер Референс Стандарт, с содержанием основного вещества 90,9 %; толуол для хроматографии, ч.д.а., СТП ТУ КОМП 3-059-08; трихлорметан, х.ч., ТУ 2631-066-44493179-01, цефотаксим субстанция-порошок, производитель: «Рейонг Фармасьютикал Ко., Лтд.», Китай, соответствует НД: ФС 000760-210114.

2.4. Материалы

Кюветы из кварцевого стекла 1 дм³; колонка для ВЭЖХ Zorbax SB-C18 размером 250 мм × 4,6 мм, заполненную обращеннофазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, производства Agilent Technology; лед; снег; хроматографические пластины «Сорбфил» 10×10 см с УФ-индикатором (неподвижная фаза – силикагель марки СТХ-1 ВЭ, размер частиц 8-10 мкм, связующее вещество – силиказоль).

2.5. Посуда

Камеры хроматографические стеклянные; колбы конические стеклянные лабораторные вместимостью 100 и 250 мл; стаканы стеклянные химические лабораторные объемом 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мл; колбы стеклянные лабораторные мерные объемом 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мл; пипетки стеклянные мерные на 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0 мл; воронки стеклянные лабораторные разного диаметра; чашки фарфоровые выпарительные лабораторные разного объема; цилиндры мерные на 10, 50, 100, 250, 500, 1000 мл; палочки стеклянные – посуда, относящаяся к мерной, имеет соответствующие протоколы калибровки.

2.6. Методы исследования

В качестве методов, применяющих в современной практике для исследования лекарственных средств, находят широкое применение физические, химические, физико-химические, биологические методы.

При написании данной диссертационной работы применялись химические методы исследования, а именно – определение реакции среды (рН).

Также были использованы физико-химическим методы анализа, к ним относятся: оптические (спектрофотометрия в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра) и хроматографические методы (колоночная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография).

Широкое применение нашли и биологические методы анализа.

ГЛАВА 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Фотометрические методы определения

3.1.1. ИК-спектрофотометрия

Для установления химической структуры рабочих образцов исследуемых цефалоспоринов применяли метод спектрометрии в инфракрасной области. Инфракрасная спектроскопия использует тот факт, что молекулы поглощают частоты, характерные для их структуры. Эти поглощения происходят на резонансных частотах, т.е. частота поглощаемого излучения соответствует частоте колебаний. На энергию влияет форма поверхностей молекулярной потенциальной энергии, массы атомов и связанная с ними вибронная связь. Использование данного метода позволяет получить знания о химическом составе молекул и о характере расположения групп атомов относительно друг друга при проведении анализа полученных спектров.

Инфракрасные спектры получали из подготовленных образцов анализируемых соединения и соответствующих стандартов. Для подтверждения подлинности рабочих образцов использовали стандартные образцы: Ceftriaxone Disodium (Rocephin), Master Reference Standard, Cefepime Hydrochloride (USP), Cefpirome Sulfate (USP).

Несколько миллиграмм каждого из анализируемых соединений растирают с тщательно измельченным и высушенным калия бромистым (использовали калий бромистый 99,00 % для инфракрасной спектроскопии фирмы «Panreac (ITW Reagents)» Испания). Полученную анализируемую массу скрупулезно перемешивают, измельчают и подвергают прессованию в диск, после измеряют пропускание на фурье-спектрометре инфракрасном VARIAN, модель 670IR, изготовитель: VARIAN, Австралия 2010 г., в интервале $4000-400\text{ см}^{-1}$ через 1 см^{-1} .

По данным ИК-спектров, представленных на рисунках 5-10 выделяли характерные полосы поглощения. Полосами поглощения являются минимумы пропускания и максимумы поглощения.

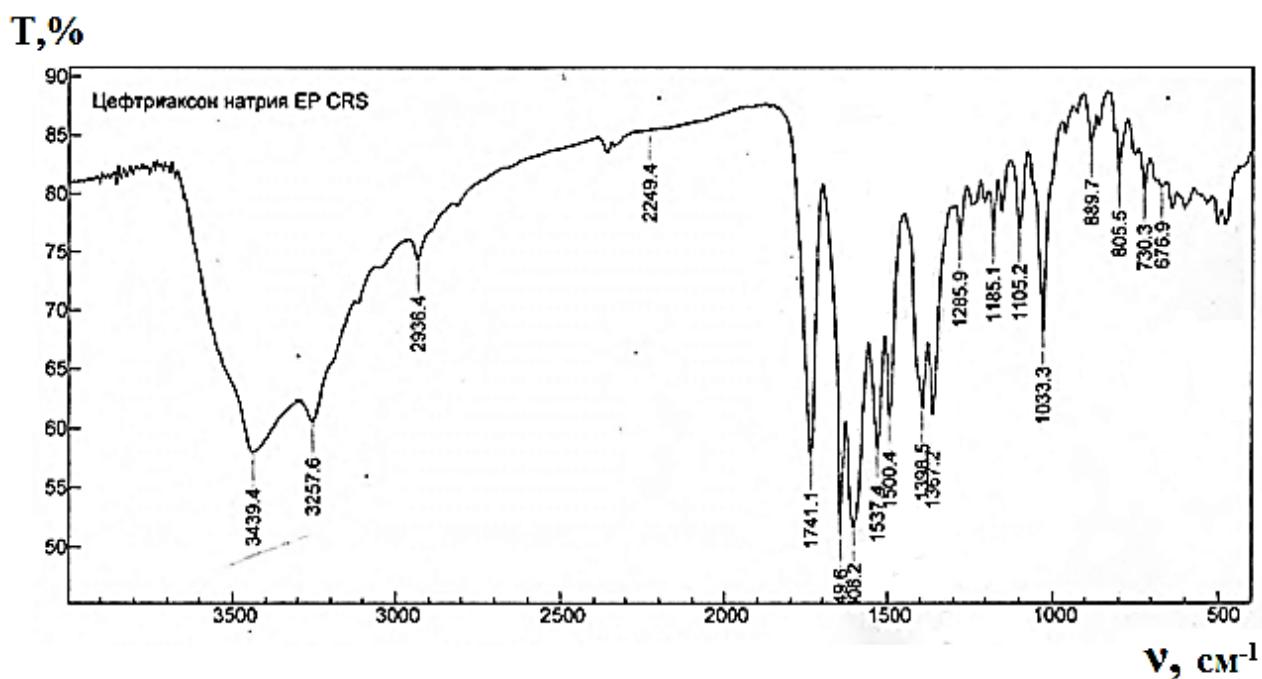


Рисунок 5 – ИК спектр стандартного образца цефтриаксона натрия EP CRS

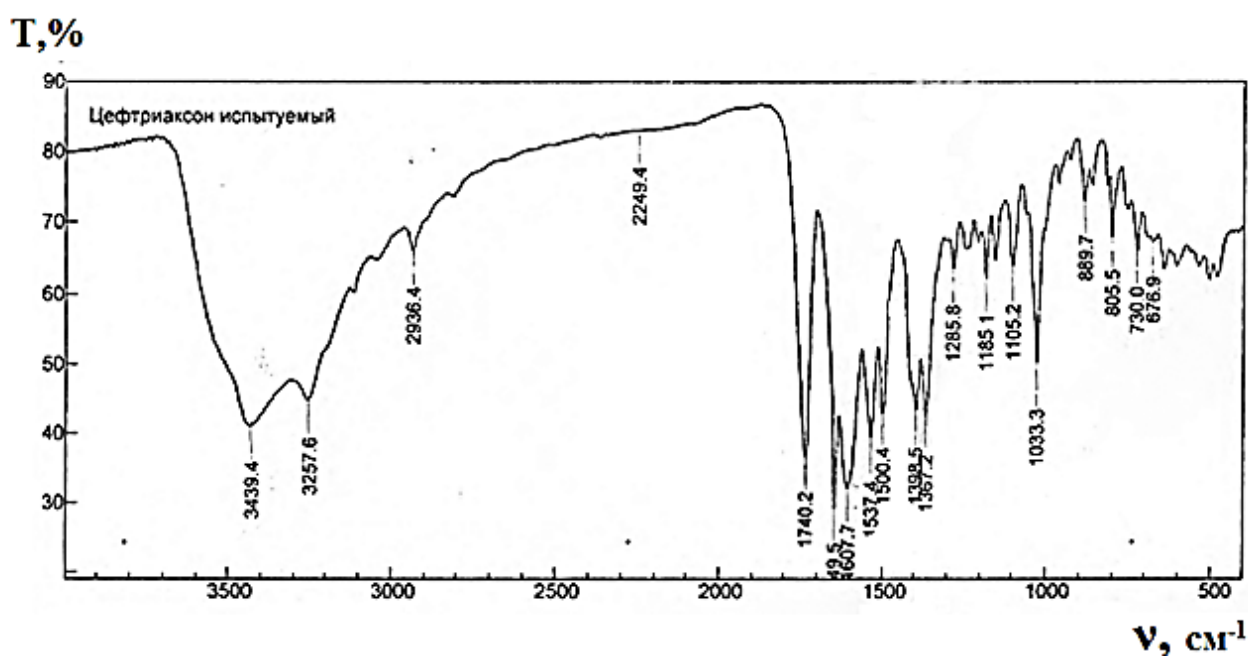


Рисунок 6 – ИК спектр рабочего образца цефтриаксона натрия

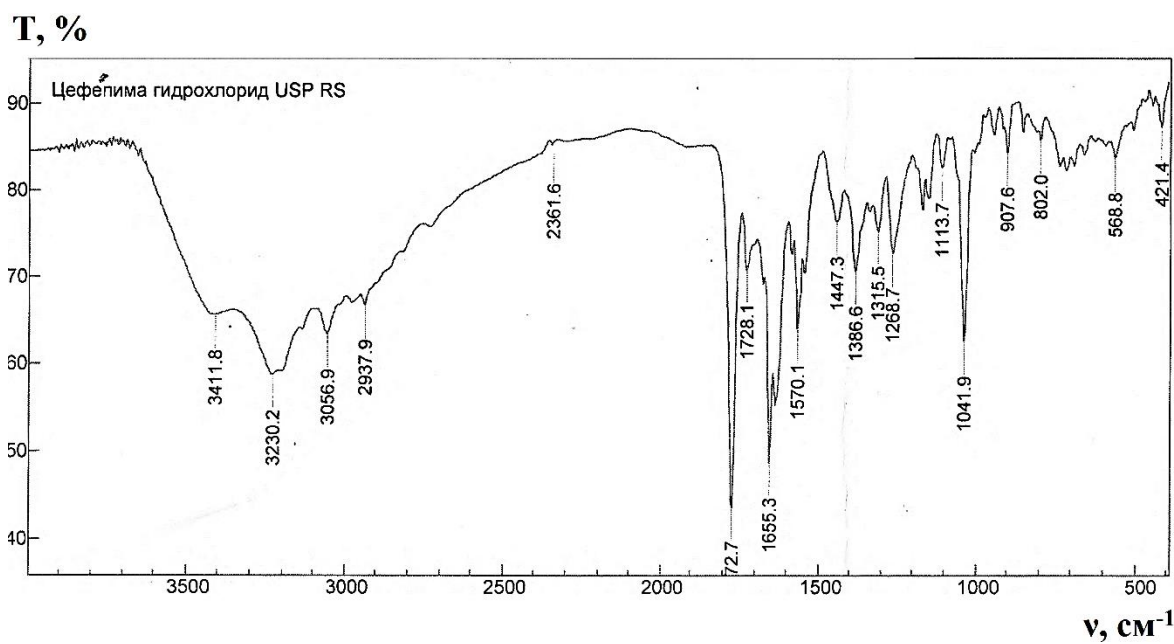


Рисунок 7 – ИК спектр стандартного образца цефелима гидрохлорида USP RS

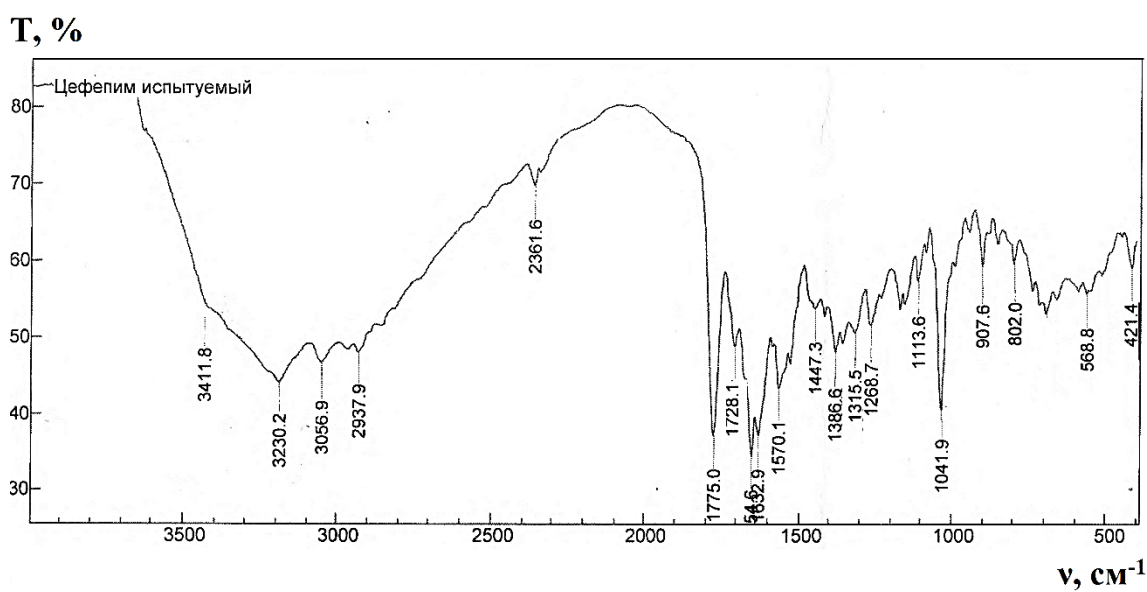


Рисунок 8 – ИК спектр рабочего образца цефелима

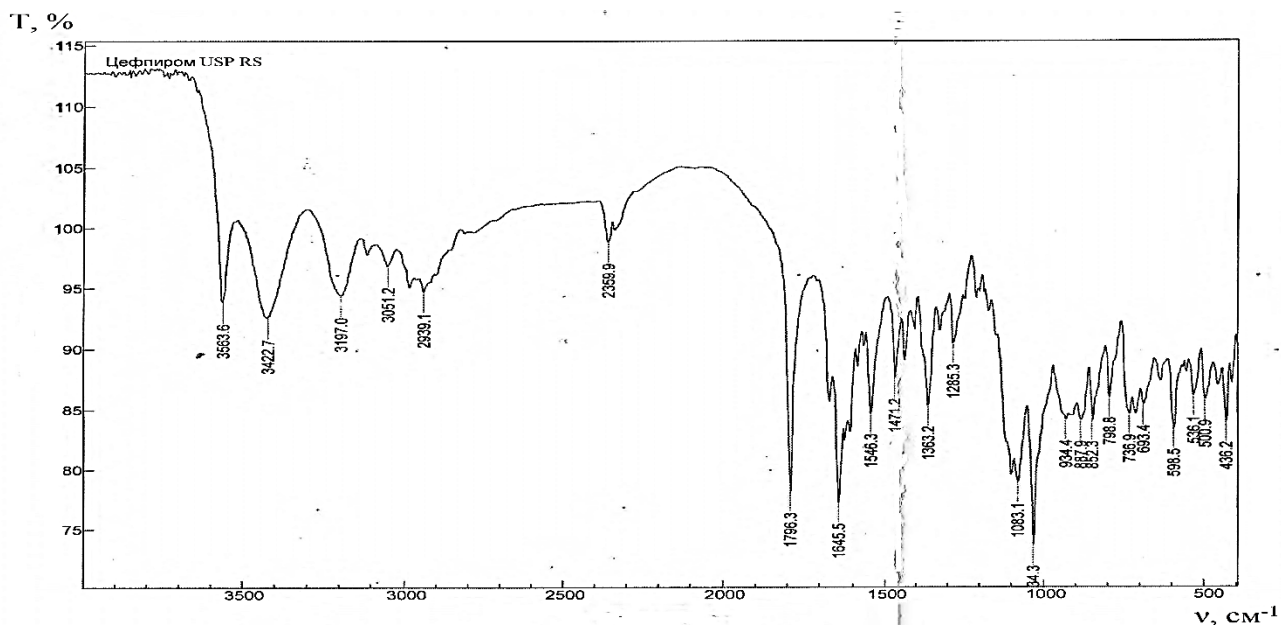


Рисунок 9 – ИК спектр стандартного образца цефпиром USP RS

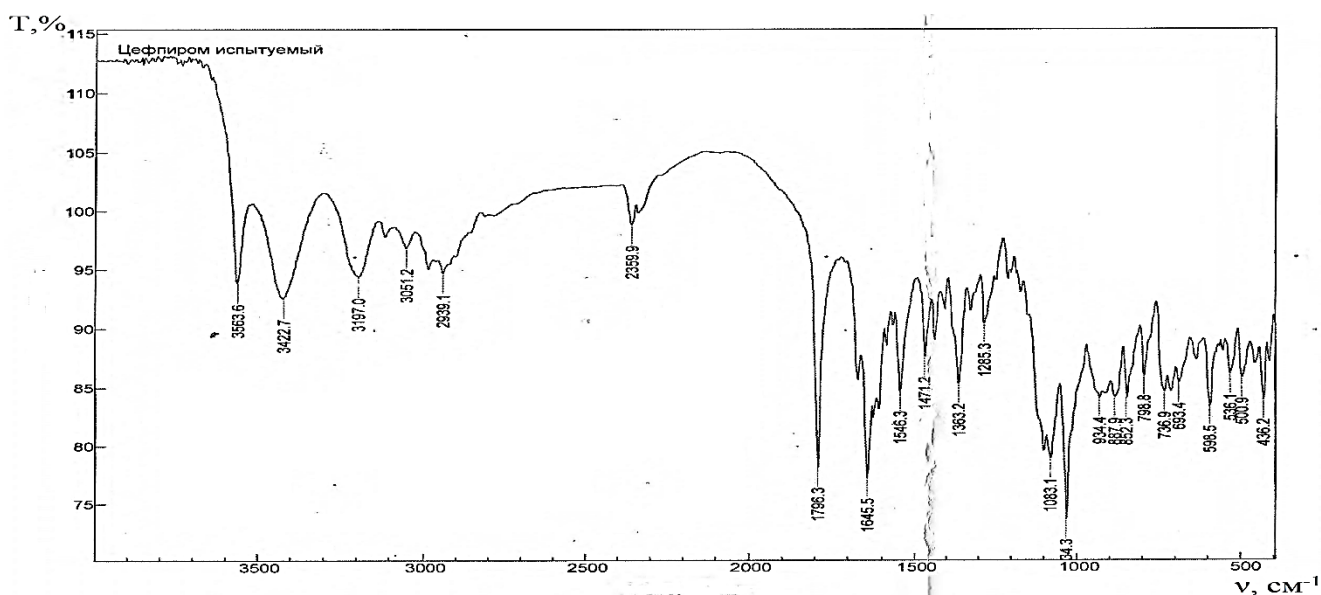


Рисунок 10 – ИК спектр рабочего образца цефпиром

Полосы поглощения в спектре испытуемого образца лекарственного препарата сопоставимы с положением полос поглощения в спектре стандартного образца лекарственного препарата. Результаты проведенного исследования приведены в таблицах 1-3 (приложение).

На основании полученных данных, можно выделить общие полосы поглощения для рабочих образцов следующих цефалоспориновых антибиотиков: цефтриаксона, цефепима и цефпиром. Общими являются валентные колебания

C=O в интервале частот 1796,3-1645,5 см⁻¹, деформационные колебания N–H (1570,1-1500,4 см⁻¹), колебания CO₂ (2361,6-2249,4 см⁻¹), а также колебания вторичной аминогруппы (1285,8-1268,7 см⁻¹).

Для цефалоспориновых антибиотиков, таких как цефпиром и цефепим общими полосами поглощения являются валентные колебания связанной NH₂ в интервале частот 3197,0-3056,9 см⁻¹, колебания CH₂ (1471,2-1447,3 см⁻¹).

Несмотря на схожесть структуры исследуемых соединений, в их ИК-спектрах имеются характерные отличия. Так для цефтриаксона характерной полосой являются валентные колебания C=O в β-кетозэфирах (1608,2 см⁻¹). В ИК-спектре цефпирома можно выделить несколько характерных полос поглощения. Плоскостные деформационные колебания CH в интервале 1083,1-1034,3 см⁻¹, неплоскостные деформационные колебания (798,8 см⁻¹), а также деформационные внеплоскостные колебания CH (736,9 см⁻¹). Для ИК-спектра цефепима характерной полосой поглощения является колебания вторичных амидов (1315,5 см⁻¹).

3.1.2. Электронная ультрафиолетовая спектроскопия

В структуре некоторых антибиотиков цефалоспоринового ряда присутствуют сопряженные системы химических связей, которые позволяют исследовать данные соединения в УФ-области спектра. Эта особенность позволяет проводить идентификацию данных лекарственных препаратов, используя метод электронной спектроскопии.

В ходе данного исследования анализировали отличительные оптические характеристики выбранных лекарственных препаратов в разнополярных органических растворителях, в воде и водных растворах антибиотиков различной реакции среды. Был выбран интервал длин волн от 190 до 340 нм, в которых был снят спектр исследуемых цефалоспориновых антибиотиков. Регистрацию спектров поглощения проводили на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», модель UV-1800. Для этой цели использовали кварцевые кюветы (толщина рабочего слоя 10 мм), в которые помещали испытуемый раствор и измеряли величину оптической плотности на фоне соответствующих

растворителей. По спектрам, полученным с прибора, устанавливали точки максимумов и минимумов спектра исследуемого образца были рассчитаны молярный и удельный коэффициенты светопоглощения. Выводы практического эксперимента приведены в таблицах 4-6 (приложение).

Для электронных спектров цефтриаксона, цефепима и цефпирона характерны по три полосы поглощения. Для цефтриаксона полосы поглощения находятся в интервалах длин волн 191,8-203,3 нм; 239,4-249,8 нм; 264,0-275,0 нм. Для цефепима – 190,8-214,1 нм; 234,6-236,9 нм; 257,4-290,2 нм. Для цефпирона – 195,3-217,8 нм; 225,9-235,5 нм; 254,9-271,2 нм. В качестве приемлемой растворяющей среды для исследуемых веществ можно рекомендовать диметилсульфоксид-вода (5:5).

Для всех анализируемых веществ также возможно применение смеси ацетонитрил-вода (8:2), которая является альтернативной средой растворения и может быть использована для идентификации и количественного определения данных лекарственных препаратов.

3.2. Хроматографические методы определения

3.2.1. Нормальнофазовая ТСХ

Для изучения хроматографической подвижности цефтриаксона, цефепима и цефпирона применяли метод нормальнофазовой тонкослойной хроматографии. Исследования проводили с использованием хроматографических пластинок «Сорбфил» с УФ-индикатором, имеющих размер 10×10 см (в качестве неподвижной фазы использовался силикагель марки СТХ-1 ВЭ, размер частиц 8-10 мкм, в качестве связующего вещества применялся силиказоль).

При проведении хроматографии на стартовую линию пластины наносили по 5-10 мкл 0,04 % водные растворы испытуемых антибактериальных препаратов и веществ-свидетелей. Хроматограммы помещали в заполненные подвижной фазой камеры для хроматографии.

Пластины сушили при комнатной температуре и детектировали в ультрафиолетовом свете.

Данные, полученные после хроматографирования, использовали для расчета показателя абсолютной (R_f) и относительной (R_s) подвижности. Цефотаксим использовали в качестве внутреннего стандарта.

Хроматографическая активность цефтриаксона, цефепима и цефпирона имеет зависимость от характера взаимодействия их с компонентами элюента, молекулярной составляющей сорбента, а также от непосредственного взаимодействия молекул мобильной фазы друг с другом и с силанольными группами силикагеля.

Для изучения хроматографической подвижности анализируемых лекарственных препаратов из группы цефалоспоринов проводилось исследование данных веществ в монокомпонентных подвижных фазах (индивидуальных растворителях). В качестве индивидуальных растворителей использовались следующие химические реактивы, отличающиеся друг от друга полярностью, а именно: ацетон, диметилсульфоксид, диметилформамид, метилацетат, диэтиловый эфир, 1,4-Диоксан, этанол, метанол, пропанол-1, изопропанол, бутанол-1, изобутанол, изопентанол, деканол, этановая кислота, ацетонитрил, хлороформ, бензол, вода, толуол. Выводы полученных данных при проведении процесса хроматографирования в монокомпонентных растворителях, приведены в таблице 7 (приложение).

Следующим этапом данного диссертационного исследования было изучение хроматографического поведения проверяемых лекарственных препаратов с применением многокомпонентных подвижных фаз. Для подобранных приемлемых хроматографических систем подбирали приемлемые соотношения компонентов мобильной фазы. Результаты исследования в многокомпонентных системах представлены в таблице 8 (приложение).

Значения, полученные практическим путем, дают возможность для выявления оптимальных систем хроматографирования: для цефтриаксона – ацетон-вода (8:2), для цефепима и цефпирона ацетон-вода (6:4), в них разделились анализируемые соединения.

3.2.2. Обращеннофазовая ТСХ

Неподвижной фазой для проведения обращеннофазовой тонкослойной хроматографии явился сорбент с искусственно привитой алкильной фазой C₁₄-C₁₅ на силикагеле марки СТХ-1ВЭ.

С целью получения обращеннофазового слоя поверхности сорбента СТХ-1ВЭ пластинки марки «Сорбфил» с УФ-индикатором подготавливали следующим способом: погружали в 10 % раствор вазелинового масла в гексане. После погружения пластины сразу высушивали в токе воздуха и удаляли избытки вазелинового масла фильтровальной бумагой и ватой.

Согласно методике, описанной в разделе 3.2.1. настоящего диссертационного исследования, водные растворы анализируемых соединений и вещества-свидетели наносили на линию старта подготовленных обращеннофазовых пластинок.

Использовались следующие подвижные фазы: вода очищенная, буферные растворы кислой и щелочной реакции среды с различными значениями рН (2,87; 8,95), а также их различные комбинации с ацетонитрилом, ацетоном, метанолом, 1,4-диоксаном, пропанолом-2. Результаты хроматографирования объектов исследования в тонком слое модели обращеннофазового сорбента СТХ-1ВЭ пластинки марки «Сорбфил» с УФ-индикатором представлены в таблице 9 (приложение).

По результатам хроматографирования анализируемых веществ оптимальными подвижными фазами были выбраны: вода-метанол (5:5), буферный раствор рН 2,87-ацетонитрил (8:2), буферный раствор рН 8,95-ацетонитрил (8:2) и буферный раствор рН 8,95-ацетон (8:2). В качестве критериев оценки оптимальных систем хроматографирования использовали такие, как: временная продолжительность проведения хроматографирования, форма и характер расположения пятен на хроматографической пластинке.

3.2.3. Обращеннофазовая ВЭЖХ

Высокоэффективный жидкостный хроматографический метод (ВЭЖХ) широко применяемый метод анализа цефалоспориновых лекарственных

препаратов в лекарственных формах и объектах биологической природы. В последнее время ВЭЖХ широко используется для проведения аналитических испытания β -лактамных антибактериальных препаратов. Метод ВЭЖХ часто используется во всех областях исследований данной группы лекарственных препаратов не только при анализе, но также как способ для очистки антибиотиков.

Идентификацию исследуемых соединений осуществляли обращеннофазовой ВЭЖХ. Для определения оптимальной подвижной фазы, нами были использованы знания, полученные при изучении особенностей хроматографического поведения анализируемых соединений в тонких слоях обращеннофазового сорбента.

Испытания проводили на хроматографе жидкостном лабораторном "МАЭСТРО" производства ООО «Интерлаб» Россия 2016 г. с детектором на диодной матрице. В качестве хроматографической колонки использовали колонку Zorbax SB-C18 размером 250 мм \times 4,6 мм, заполненную обращеннофазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, производства Agilent Technology. Используемая подвижная фаза имела следующий состав: фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1); температура колонки – 25 °С; УФ-детектирование для цефтриаксона – 254 нм, для цефепима – 254 нм и для цефпиррома – 270 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл, скорость потока – 1 мл/мин.

Анализируемые вещества с различными концентрациями 8, 60 и 150 мкг/мл вводили в прибор в двух повторностях для каждого вещества в объеме вводимой пробы 10 мкл, а также вводили в двух повторностях стандартный раствор того или иного из исследуемых веществ. По соответствию времени удерживания испытуемого образца со стандартом делали вывод о подлинности исследуемого вещества. Время удерживания основного вещества и стандарта цефтриаксона составило 6,90; цефепима 2,79; цефпиррома 3,88. Параметры хроматографирования цефтриаксона, цефепима и цефпиррома представлены в таблице 1.

Общий вид хроматограмм исследуемых соединений со стандартом представлены в соответствии с рисунками 11-13. Хроматограмма смеси цефепима, цефпиром и цефтриаксона, при использовании детектора на диодной матрице, приведена на рисунке 14.

По результатам, полученным при обработке хроматограмм, произвели расчет значимых хроматографических параметров. Выявили длину волны для детектирования исследуемых соединений (λ), выяснили «мертвый объем» (V_0), объем удерживания исследуемых соединений (V_R), время удерживания «мертвого объема» (t_0), время удерживания основных веществ (t_R), скорость потока подвижной фазы (v), коэффициент асимметрии пика определяемых препаратов (A_s), число теоретических тарелок (N), длину (L), высоту (H) и диаметр (d) хроматографической колонки, а также абсолютный коэффициент емкости (k').

Таблица 1 – Хроматографические характеристики анализируемых препаратов методом обращеннофазовой ВЭЖХ

Объект исследования	Элюент	λ , нм	V_0 , мл	V_R , мл	t_0 , мин	t_R , мин	v , мл/мин	A_s	N	L , мкм	H , мкм	d , мкм	k'
Цефепим	фосфатный буферный раствор pH 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1)	254	2,21	2,79	2,21	2,79	1,0	1,16	5061,48	250	4,6	5	0,26
Цефтриаксон		254	2,21	6,90	2,21	6,90	1,0	1,31	7983,43	250	4,6	5	2,12
Цефпиром		270	2,21	3,88	2,21	3,88	1,0	1,25	6985,48	250	4,6	5	0,76

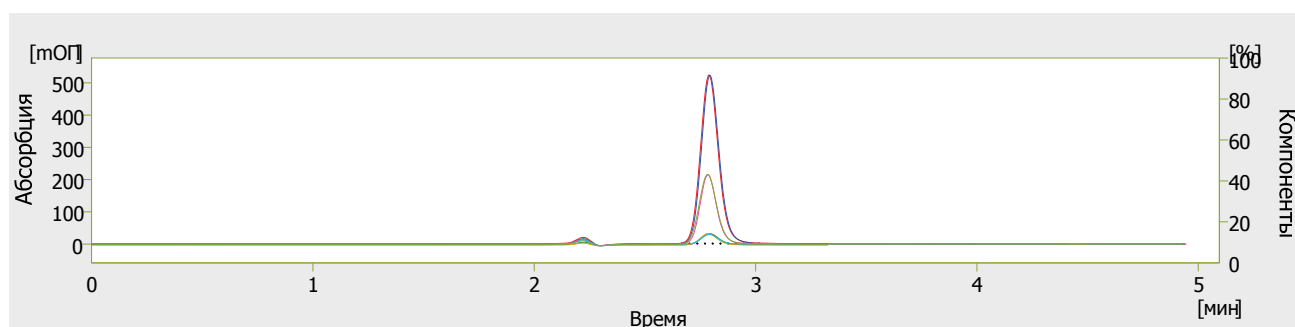


Рисунок 11 – Хроматограмма цефепима и стандартного образца, подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 254 нм.

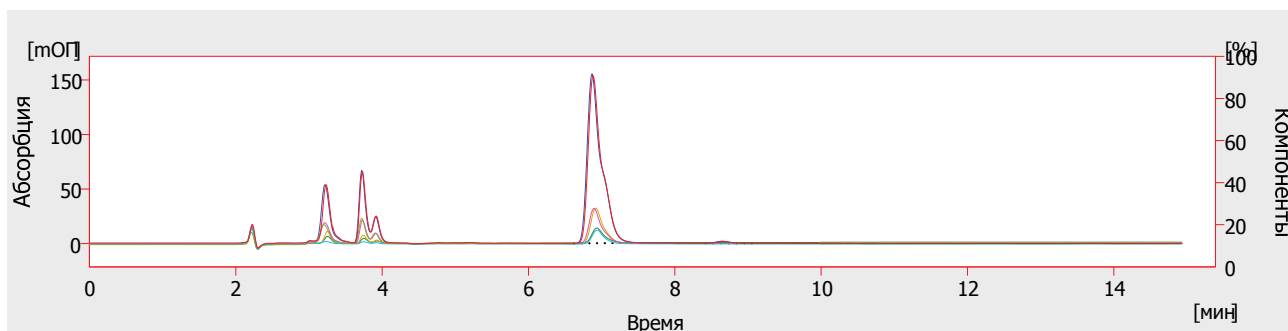


Рисунок 12 – Хроматограмма цефтриаксона и стандартного образца, подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 254 нм.

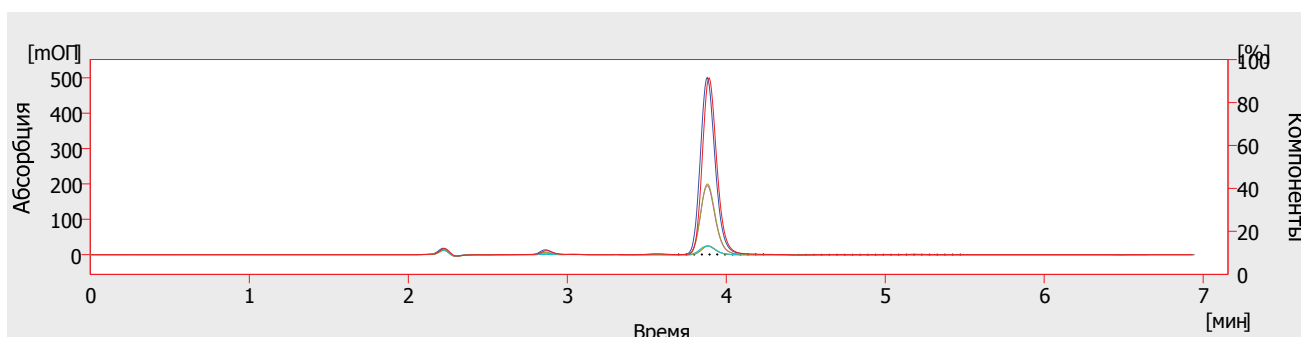


Рисунок 13 – Хроматограмма цефпиромы и стандартного образца, подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 270 нм.

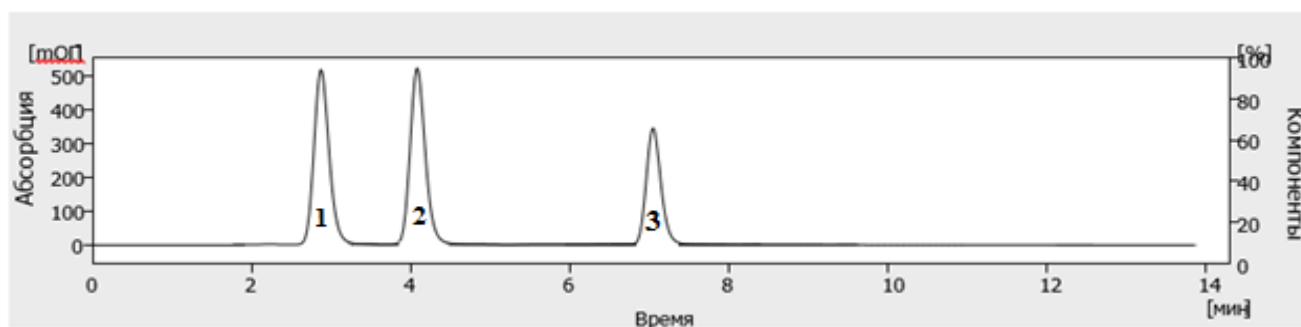


Рисунок 14 – Хроматограмма смеси цефепима (1), цефпиромы (2) и цефтриаксона (3), подвижная фаза – фосфатный буферный раствор-метанол-ацетонитрил (8:1:1), длина волны 254 нм и 270 нм.

Проведенные исследования дают возможность применения разработанной методики определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в современной лабораторной практике для анализа лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. На основании проведенных исследований выбранных объектов исследования идентификацию целесообразно проводить, применяя фотометрические методы анализа ультрафиолетовой области спектра.

2. При проведении анализа исследуемых цефалоспориновых антибактериальных препаратов методом нормальнофазовой тонкослойной хроматографии приемлемой подвижной фазой для цефтриаксона является – ацетон-воды (8:2), а для цефепима и цефпиромы – ацетон-воды (6:4). Используя подвижные фазы указанного состава позволяют оптимально разделить исследуемые соединения.

3. В качестве приемлемой подвижной фазы в обращеннофазовой тонкослойной хроматографии для всех исследуемых соединений была подобрана практическим путем фаза состава – буферный раствор pH 2,87-ацетонитрил в соотношении (8:2).

4. Одним из современных методов идентификации анализируемых препаратов был выбран метод обращеннофазовой ВЭЖХ. Оптимальной подвижной фазой явилась фаза состава фосфатный буферный раствор pH 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1). Применяя подвижную фазу данного состава, можно идентифицировать и разделить все исследуемые лекарственные препараты в данной работе.

ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

4.1. Определение спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области

4.1.1. Анализ цефтриаксона, цефпирона и цефепима в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5)

Оптическую плотность растворов цефтриаксона, цефпирона и цефепима в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5) измеряли на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», модель UV-1800, на фоне диметилсульфоксид-вода (5:5). Показатель оптической плотности испытуемого растворов лекарственного препарата оставался стабильным с момента их приготовления и до 24 часов. **Методика построения калибровочного графика для анализируемых веществ.** В мерные колбы вместимостью 10 мл внесли 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 мл раствора анализируемого вещества в воде (1 мг/мл), прибавили 4,99; 4,975; 4,95; 4,9; 4,85; 4,8 и 4,7 мл воды соответственно и в каждую добавили по 5 мл диметилсульфоксида. Оптическую плотность серии стандартных растворов измеряли на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», модель UV-1800, в качестве раствора сравнения использовали смесь диметилсульфоксид-вода (5:5) в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при 275,0 нм (для цефтриаксона), 270,2 нм (для цефпирона) и 263,8 нм (для цефепима). Определение анализируемых веществ возможно в интервале концентраций 1 – 30 мкг/мл.

Уравнение калибровочного графика для цефтриаксона. Исходя из данных, полученных в результате проведенного эксперимента, рассчитывали уравнение калибровочной прямой линейного участка графика методом наименьших квадратов. Результат рассчитанного уравнения: $D=0,045406 \cdot C+0,058189$, где D – величина оптической плотности, C – концентрация цефтриаксона в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график представлен в соответствии с рисунком 15.

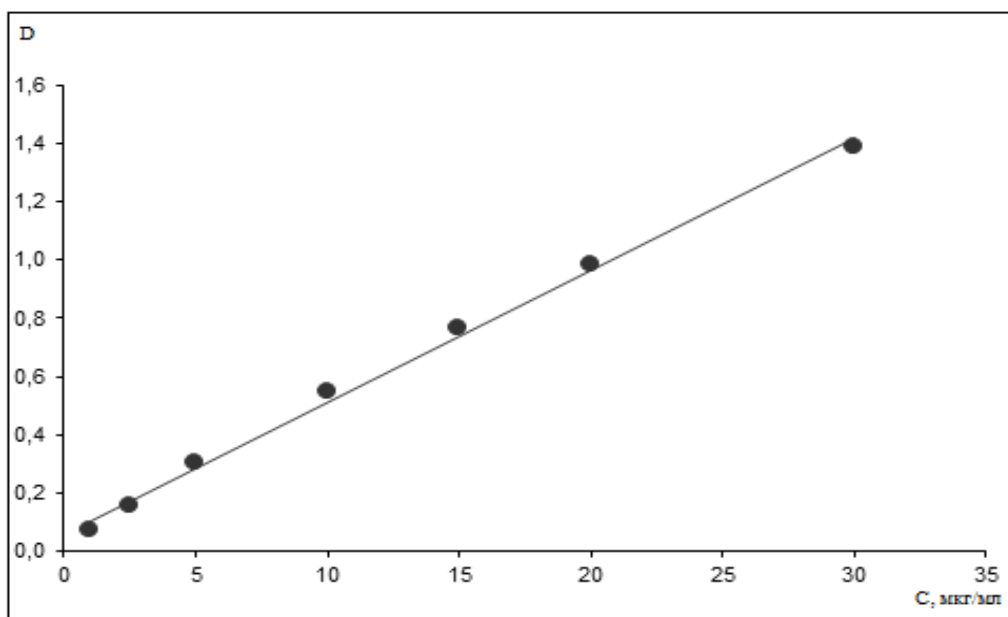


Рисунок 15 – Калибровочный график цефтриаксона в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5).

Уравнение калибровочного графика для цефпирона. Уравнение имеет вид: $D=0,052425 \cdot C+0,033362$, где D – величина оптической плотности, C – концентрация цефпирона в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для цефпирона приведен на рисунке 16.

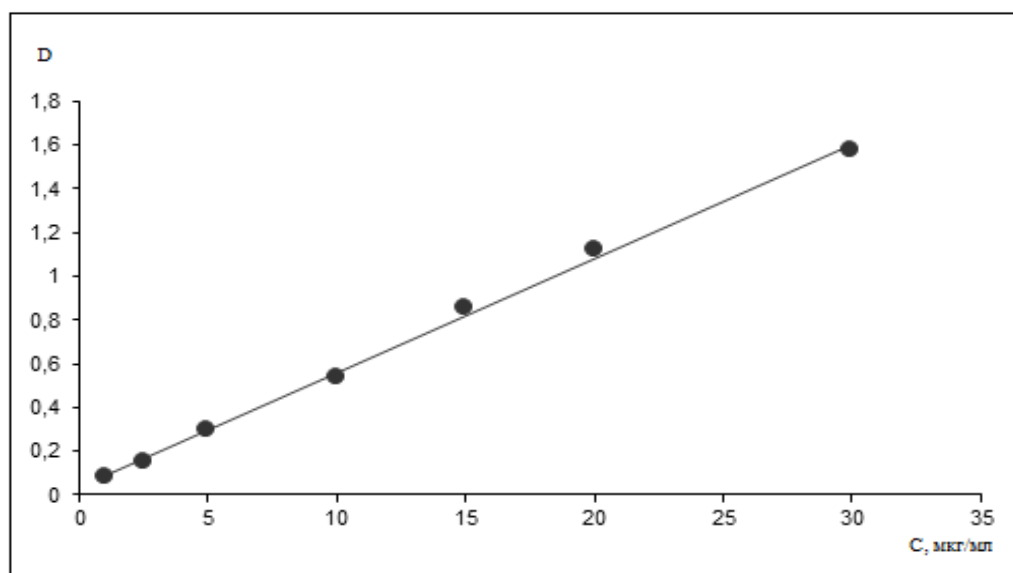


Рисунок 16 – Калибровочный график цефпирона в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5).

Уравнение калибровочного графика для цефепима. Уравнение имеет вид: $D=0,048272 \cdot C-0,023450$, где D – величина оптической плотности, C –

концентрация цефепима в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для цефепима приведен на рисунке 17.

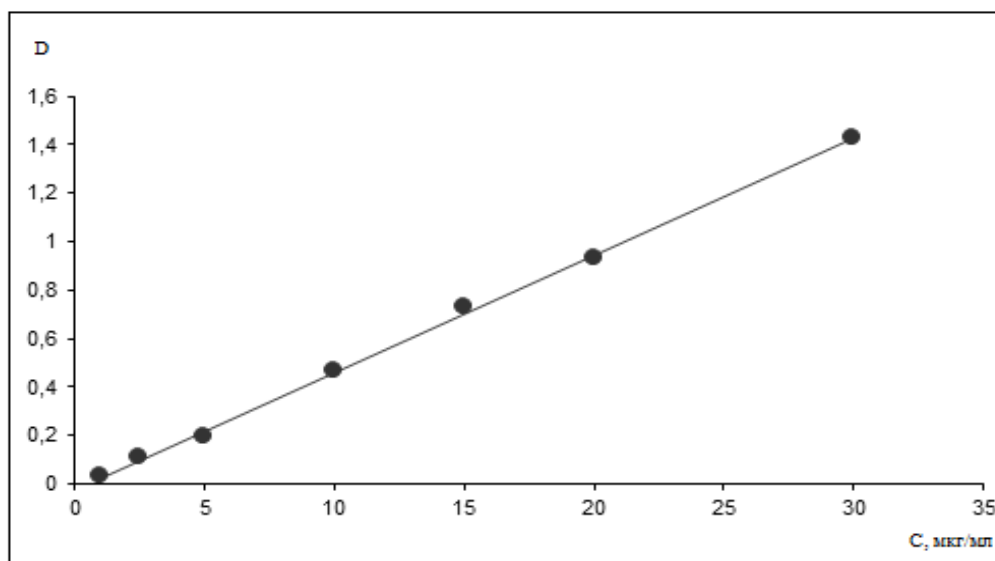


Рисунок 17 – Калибровочный график цефепима в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5).

Методика определения цефтриаксона, цефпирона и цефепима. Около 25 мг (точная навеска) анализируемого лекарственного препарата растворяли в 20 – 30 мл воды в колбе мерной вместимостью 50 мл и доводили раствор до метки водой (раствор А). 0,75 мл раствора А помещали в колбу мерную вместимостью 25 мл и добавили 11,75 мл воды, а затем добавили 12,5 мл ДМСО (раствор Б), таким образом проводили приготовление 6 параллельных растворов. Растворы перемешивали и измеряли величину оптической плотности на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», тип UV-1800 по алгоритму, описанному для построения калибровочного графика. Количественное значение исследуемого лекарственного препарата вычисляли по калибровочному графику с учетом навески взятого лекарственного препарата. Практические выводы приведены в таблице 2.

Значение воспроизводимости и правильности предложенной методики позволяет дальнейшее ее использование. Относительная ошибка среднего результата ($n=6$, $P=0,95$) для цефтриаксона не более 0,93%, для цефпирона 0,94% и для цефепима 0,74%. Длительность проведения эксперимента исследуемых цефалоспоринов в вышеописанных условиях составляет около 10-15 минут.

Таблица 2 – Результаты определения некоторых цефалоспоринов спектрофотометрическим методом в смеси диметилсульфоксид-вода (5:5) (n=6, P=0,95)

Навеска, г	Оптическая плотность	Найдено		Метрологические характеристики
		Г	%	
Цефтриаксон (275,0 нм)				
0,0256	0,756	0,0259	101,25	$\bar{x} = 100,17$ $S = 0,888$ $S_{\bar{x}} = 0,363$ $S_r = 0,886$ $\Delta \bar{x} = 0,932$ $\varepsilon = 0,93 \%$
0,0246	0,728	0,0245	99,86	
0,0262	0,772	0,0260	99,52	
0,0245	0,726	0,0246	100,40	
0,0256	0,756	0,0259	101,03	
0,0246	0,728	0,0243	98,96	
Цефпиром (270,2 нм)				
0,0253	0,829	0,0254	100,32	$\bar{x} = 99,93$ $S = 0,895$ $S_{\bar{x}} = 0,365$ $S_r = 0,895$ $\Delta \bar{x} = 0,939$ $\varepsilon = 0,94\%$
0,0245	0,804	0,0248	101,27	
0,0243	0,798	0,0242	99,83	
0,0256	0,839	0,0255	99,51	
0,0254	0,832	0,0250	98,57	
0,0266	0,870	0,0266	100,06	
Цефепим (263,8 нм)				
0,0263	0,738	0,0262	99,63	$\bar{x} = 99,94$ $S = 0,704$ $S_{\bar{x}} = 0,288$ $S_r = 0,705$ $\Delta \bar{x} = 0,739$ $\varepsilon = 0,74\%$
0,0256	0,718	0,0256	100,08	
0,0242	0,677	0,0243	100,35	
0,0256	0,718	0,0259	101,05	
0,0262	0,735	0,0259	99,14	
0,0259	0,727	0,0257	99,37	

4.1.2. Анализ цефтриаксона, цефпиромы и цефепима в смеси ацетонитрил-вода (8:2)

Оптические плотности растворов цефтриаксона, цефпиромы и цефепима в смеси ацетонитрил-вода (8:2) измеряли на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», модель UV-1800, используя в качестве раствора сравнения смесь ацетонитрил-вода (8:2). Показатель оптической плотности испытуемого растворов лекарственного препарата оставался стабильным с момента их приготовления и до 24 часов.

Методика построения калибровочного графика для цефтриаксона, цефпиромы и цефепима. В мерные колбы на 10 мл внесли 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 мл раствора анализируемого вещества в воде (1 мг/мл), прибавили 1,99; 1,975; 1,95; 1,9; 1,85; 1,8 и 1,7 мл воды соответственно и в каждую добавили по 8 мл ацетонитрила. Оптическую плотность серии стандартных растворов измеряли на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», модель UV-1800, используя в качестве раствора сравнения смесь ацетонитрил-вода (8:2) 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). Определение анализируемых веществ возможно в интервале концентраций 1 – 30 мкг/мл.

Уравнение калибровочного графика для цефтриаксона. По полученным данным, методом наименьших квадратов рассчитали уравнение калибровочной прямой линейного участка графика. Уравнение имеет вид: $D=0,051470 \cdot C - 0,026318$, где D – оптическая плотность, C – концентрация цефтриаксона в фотометрируемом растворе, мкг/мл [21, 35]. Калибровочный график представлен на рисунке 18.

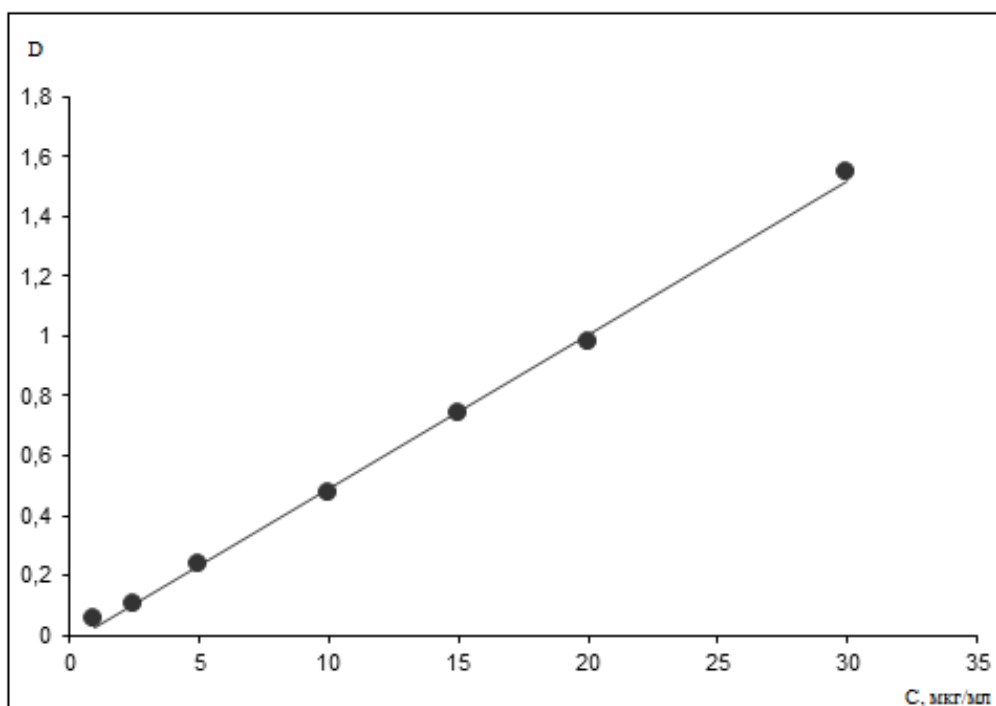


Рисунок 18 – Калибровочный график цефтриаксона в смеси ацетонитрил-вода (8:2).

Уравнение калибровочного графика для цефпирона. Уравнение имеет вид: $D=0,050494 \cdot C+0,002878$, где D – величина оптической плотности, C – концентрация цефпирона в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Модель калибровочного графика для цефпирона в соответствии с рисунком 19.

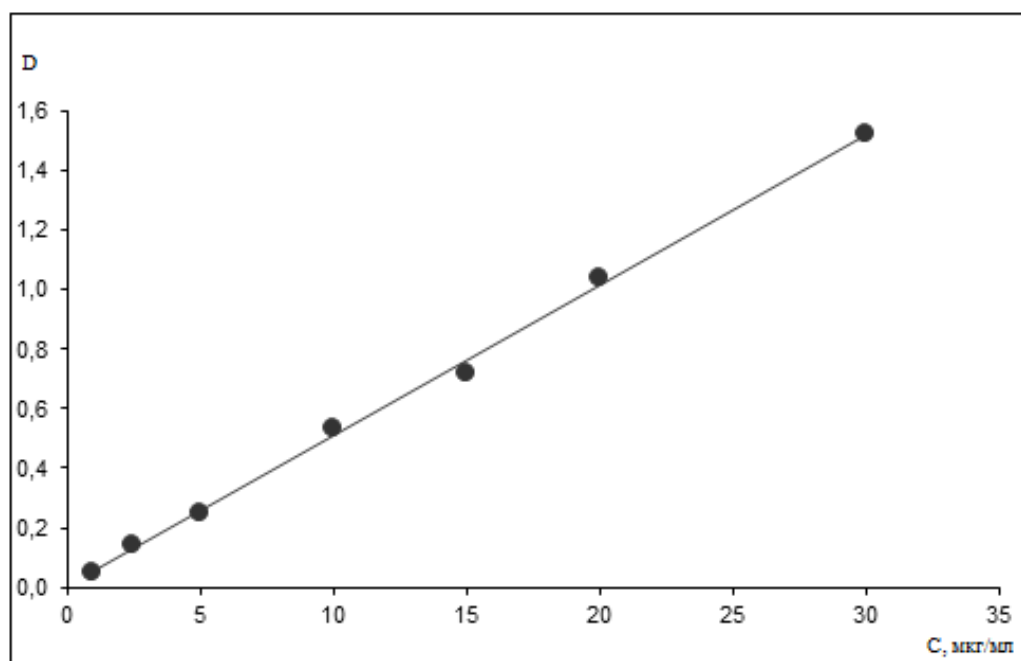


Рисунок 19 – Калибровочный график цефпирона в смеси ацетонитрил-вода (8:2).

Уравнение калибровочного графика для цефепима. Уравнение имеет вид: $D=0,043840 \cdot C+0,012172$, где D – оптическая плотность, C – концентрация цефепима в фотометрируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для цефепима в среде ацетонитрил-вода (8:2) приведен на рисунке 20.

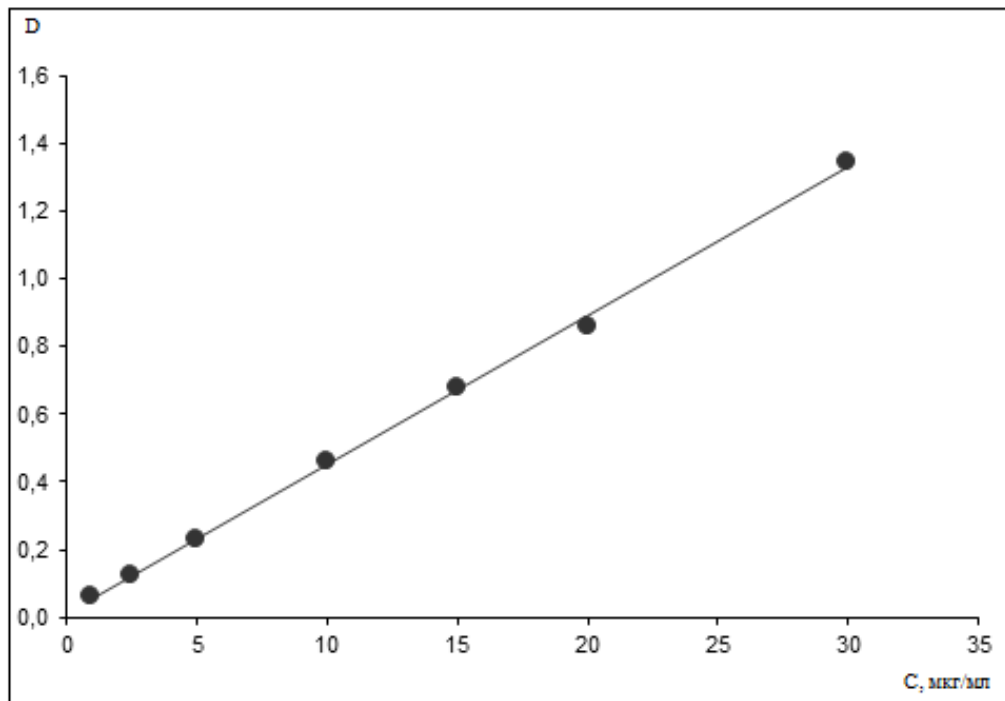


Рисунок 20 – Калибровочный график цефепима в смеси ацетонитрил-вода (8:2).

Методика определения цефтриаксона, цефпирома и цефепима. Около 25 мг (точная навеска) анализируемого вещества лекарственного препарата растворили в 20 – 30 мл воды в колбе мерной вместимостью 50 мл и довели раствор до метки водой (раствор А). 0,75 мл раствора А помещали в колбу мерную вместимостью 25 мл и добавили 4,25 мл воды, а затем добавили 20 мл ацетонитрила (раствор Б), таким образом проводили приготовление 6 параллельных растворов. Растворы перемешивали и измеряли величину оптической плотности на сканирующем спектрофотометре фирмы «Shimadzu», тип UV-1800 по алгоритму, описанному для построения калибровочного графика. Количественное значение исследуемого лекарственного препарата вычисляли по калибровочному графику с учетом навески взятого лекарственного препарата. Практические выводы приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения некоторых цефалоспоринов спектрофотометрическим методом в смеси ацетонитрил-вода (8:2) (n=6, P=0,95)

Навеска, г	Оптическая плотность	Найдено		Метрологические характеристики
		Г	%	
Цефтриаксон (275,0 нм)				
0,02535	0,786	0,0253	99,63	$\bar{x} = 99,95$
0,02420	0,764	0,0240	98,96	$S = 0,833$
0,02685	0,721	0,0271	100,89	$S_{\bar{x}} = 0,340$
0,02530	0,764	0,0256	101,05	$S_r = 0,834$
0,02425	0,783	0,0241	99,52	$\Delta\bar{x} = 0,874$
0,02620	0,774	0,0261	99,62	$\varepsilon = 0,87 \%$
Цефпиром (270,2 нм)				
0,02370	0,771	0,0236	99,71	$\bar{x} = 100,28$
0,02615	0,736	0,0261	99,61	$S = 0,718$
0,02560	0,816	0,0255	99,65	$S_{\bar{x}} = 0,293$
0,02495	0,769	0,0252	100,89	$S_r = 0,716$
0,02500	0,738	0,0253	101,27	$\Delta\bar{x} = 0,754$
0,02495	0,797	0,0251	100,52	$\varepsilon = 0,75 \%$
Цефепим (263,8 нм)				
0,02565	0,636	0,0260	101,25	$\bar{x} = 100,35$
0,02515	0,700	0,0253	100,52	$S = 0,776$
0,02435	0,686	0,0243	99,85	$S_{\bar{x}} = 0,317$
0,02650	0,668	0,0268	101,25	$S_r = 0,774$
0,02450	0,670	0,0240	99,56	$\Delta\bar{x} = 0,815$
0,02635	0,668	0,0263	99,65	$\varepsilon = 0,81 \%$

Предложенная методика характеризуется высокой воспроизводимостью и правильностью. Относительная ошибка среднего результата ($n=6$, $P=0,95$) для цефтриаксона не более 0,87%, для цефпиромы 0,75% и для цефепима 0,81%. Продолжительность определения данных веществ в вышеуказанных условиях составляет 10-15 минут.

4.2. Определение обращеннофазовой ВЭЖХ

4.2.1. Анализ цефтриаксона, цефпиромы и цефепима

Для определения количественного содержания исследуемых соединений в пробе применяли метод обращеннофазовой ВЭЖХ. Исследования проводили на хроматографе жидкостном лабораторном "МАЭСТРО" производства ООО «Интерлаб» Россия 2016 г. с УФ-детектором. В качестве хроматографической колонки использовали колонку Zorbax SB-C18 размером 250 мм × 4,6 мм, заполненную обращеннофазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, производства Agilent Technology. Используемая подвижная фаза имела следующий состав: фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1); температура колонки – 25 °С; УФ-детектирование для цефтриаксона – 254 нм, для цефепима – 254 нм и для цефпиромы – 270 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл, скорость потока – 1 мл/мин.

Методика построения калибровочного графика для анализируемых веществ. 0,025 г (25 мг) того или иного исследуемого препарата вносили в мерные колбы с внутренним объемом 50 см³ и растворяли в 30-35 мл фосфатного буферного раствора с pH=3, далее полученные растворы перемешивали и доводили до метки тем же растворителем (растворы А – 0,05% концентрация).

В ряд мерных колб вместимостью 10 мл внесли 0,16; 0,32; 0,48; 1,2; 1,6; 2,4 и 3,0 мл раствора А, соответственно 7,84; 7,68; 7,52; 6,8; 6,40; 5,60 и 5,0 мл фосфатного буферного раствора с pH=3 и в каждую колбу добавили по 1 мл метанола, затем полученные растворы в каждой мерной колбе довели до метки ацетонитрилом и перемешали. В ходе проведенных разведений получили ряд градуировочных растворов с содержанием анализируемого вещества 8, 16, 24, 60, 80, 120, 150 мкг/мл соответственно.

Полученные растворы вводили в хроматограф при вышеописанных условиях хроматографирования.

Уравнение калибровочного графика для цефтриаксона. Исходя из данных, полученных в результате проведенного эксперимента, рассчитывали уравнение калибровочной прямой линейного участка графика методом наименьших квадратов рассчитали уравнение. Уравнение имеет вид: $S=14,444292 \cdot C+61,659578$, где S – площадь пика, C – концентрация цефтриаксона в хроматографируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для определения цефтриаксона методом ВЭЖХ приведен на рисунке 21.

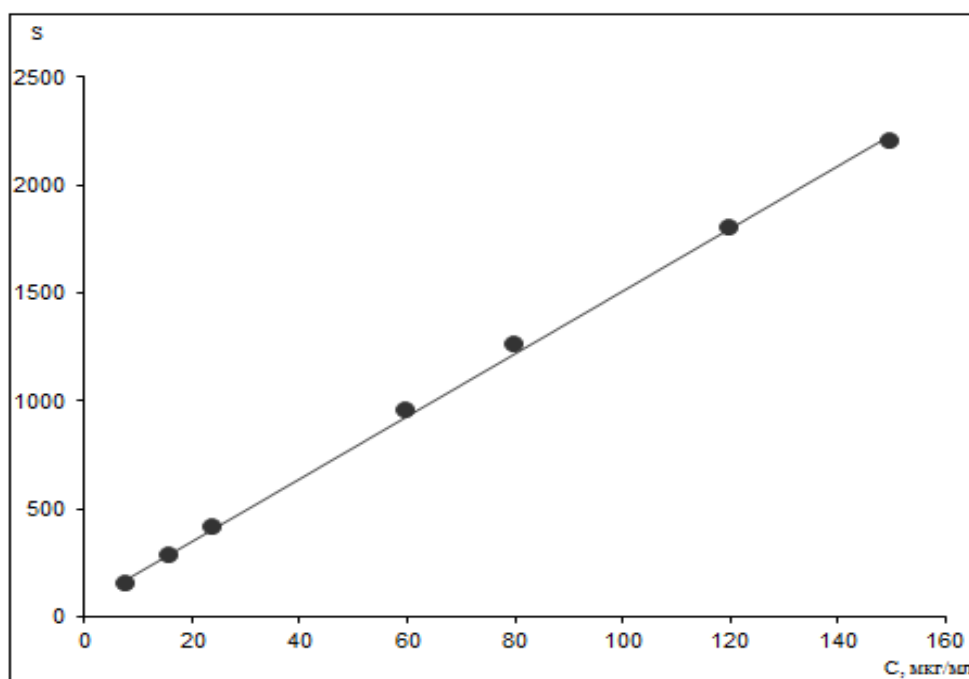


Рисунок 21 – Калибровочный график цефтриаксона, подвижная фаза: фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1).

Уравнение калибровочного графика для цефпиромы. Уравнение имеет вид: $S= 22,191835 \cdot C-6,734796$, где S – площадь пика, C – концентрация цефтриаксона в хроматографируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для определения цефпиромы методом ВЭЖХ представлен на рисунке 22.

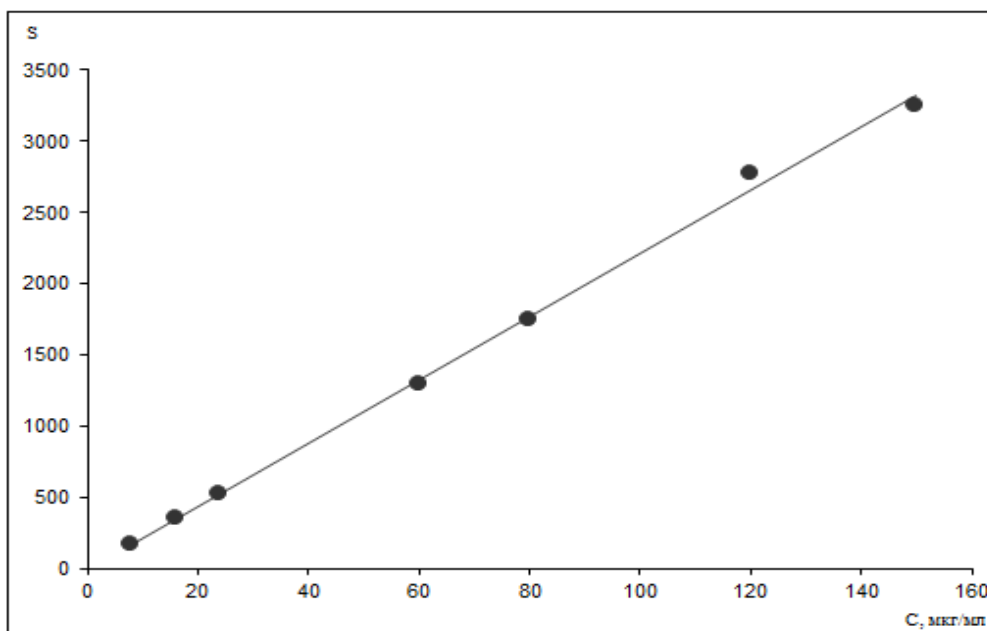


Рисунок 22 – Калибровочный график цефпирома, подвижная фаза: фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1).

Уравнение калибровочного графика для цефепима. Уравнение имеет вид: $S=19,673046 \cdot C-7,576557$, где S – площадь пика, C – концентрация цефтриаксона в хроматографируемом растворе, мкг/мл. Калибровочный график для определения цефепима методом ВЭЖХ представлен на рисунке 23.

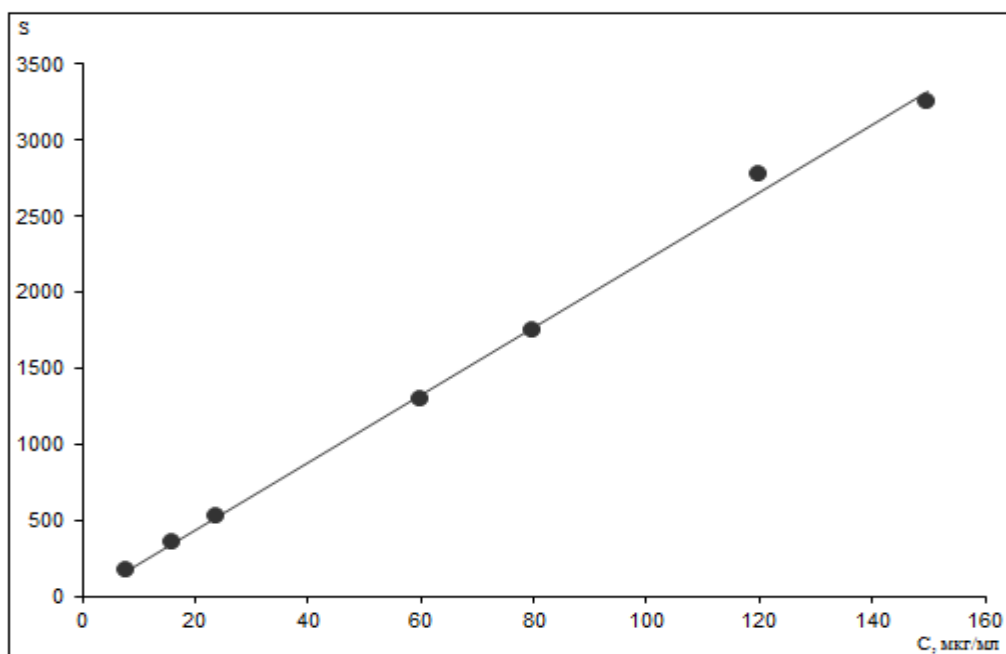


Рисунок 23 – Калибровочный график цефепима, подвижная фаза: фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1).

Методика определения цефтриаксона, цефпирома и цефепима. Около 25 мг (точная навеска) исследуемого лекарственного препарата из группы цефалоспоринов растворили в 20 – 30 мл фосфатного буферного раствора pH=3 в колбе мерной вместимостью 50 мл и довели раствор до метки фосфатным буферным раствором pH=3 (раствор А). 1,5 мл раствора А помещали в колбу мерную вместимостью 10 мл и добавили 6,5 мл фосфатного буферного раствора pH=3, затем добавили 1 мл метанола и 1 мл ацетонитрила и перемешали (раствор Б), таким образом проводили приготовление 6 параллельных растворов. Полученные растворы вводили в хроматограф при вышеописанных условиях хроматографирования.

Количественное содержание исследуемых лекарственных препаратов оценивали по уравнению калибровочного графика и пересчитывали на соответствующую навеску. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения некоторых цефалоспоринов методом обращеннофазовой ВЭЖХ в смеси фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1); (n=6, P=0,95)

Навеска, г	Площадь пика на хроматограмме	Найдено		Метрологические характеристики
		Г	%	
Цефтриаксон (254,0 нм)				
0,0254	1162,314	0,0255	100,25	$\bar{x} = 100,07$
0,0248	1136,315	0,0247	99,51	$S = 0,385$
0,0250	1144,981	0,0252	100,68	$S_{\bar{x}} = 0,157$
0,0249	1140,648	0,0249	99,95	$S_r = 0,385$
0,0250	1144,981	0,0250	100,00	$\Delta\bar{x} = 0,404$
0,0250	1144,981	0,0250	100,00	$\varepsilon = 0,40 \%$
Цефпиром (270,0 нм)				
0,0263	1744,201	0,0266	101,25	$\bar{x} = 100,17$
0,0254	1684,283	0,0254	100,11	$S = 0,561$
0,0248	1644,338	0,0248	99,83	$S_{\bar{x}} = 0,229$

0,0254	1684,283	0,0254	100,03	$Sr = 0,560$ $\Delta\bar{x} = 0,589$ $\bar{\varepsilon} = 0,59 \%$
0,0248	1644,338	0,0247	99,65	
0,0257	1704,256	0,0257	100,17	
Цефепим (254,0 нм)				
0,0254	1491,510	0,0257	101,24	$\bar{x} = 100,80$ $S = 0,646$ $S\bar{x} = 0,264$ $Sr = 0,641$ $\Delta\bar{x} = 0,678$ $\bar{\varepsilon} = 0,67 \%$
0,0252	1479,706	0,0255	101,17	
0,0242	1420,687	0,0242	99,97	
0,0256	1503,313	0,0259	101,23	
0,0255	1497,411	0,0258	101,24	
0,0248	1456,098	0,0248	99,97	

Предложенная методика характеризуется высокой воспроизводимостью и правильностью. Относительная ошибка среднего результата ($n=6$, $P=0,95$) для цефтриаксона не более 0,40 %, для цефпирома 0,59 % и для цефепима 0,67 %. Продолжительность определения данных веществ в вышеуказанных условиях составляет 10-15 минут.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Для количественного определения исследуемых соединений было решено использовать спектрофотометрический метод определения в УФ-области спектра и метод обращеннофазовой ВЭЖХ.

2. Обоснована целесообразность применения среды диметилсульфоксид-воды (5:5) и ацетонитрил-вода (8:2) в качестве оптимальной среды для построения калибровочного графика и количественного определения данных соединений.

3. Построение калибровочного графика и количественное определение цефтриаксона, цефепима и цефпирома методом обращеннофазовой ВЭЖХ целесообразно проводить, используя в качестве среды раствор состава фосфатный буферный раствор рН 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1).

ГЛАВА 5. ОЧИЩЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ

5.1. Методы хроматографического анализа

В настоящее время тщательное очищение анализируемых проб очень важно. Для достижения наивысшей степени очистки исследуемых лекарственных препаратов из группы цефалоспоринов можно достигнуть используя следующие методы очищения, а именно тонкослойная хроматография и макроколочная жидкостная хроматография с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления.

5.1.1. Хроматография в тонком слое нормальнофазового сорбента

Хроматографическое поведение изучаемых препаратов представлено в п. 3.2.1 и 3.2.2 данного диссертационного труда. Исходя из данных, представленных в п. 3.2.1, можно выделить оптимальные системы для разделения анализируемых лекарственных соединений на пластинках «Сорбфил» с УФ-индикатором (неподвижная фаза – силикагель марки СТХ-1 ВЭ, размер частиц 8-10 мкм, связующее вещество – силиказоль): для цефтриаксона – ацетон-вода (8:2), для цефепима и цефпиромы ацетон-вода (6:4).

Количественное содержание исследуемых лекарственных веществ в силикагеле марки СТХ-1 ВЭ определяли, применяя следующую модель исследования: 0,025 г (точная навеска) проверяемого лекарственного препарата разводили в дистиллированной воде в стеклянном сосуде с точным внутренним объемом на 25 мл. 0,3 мл приготовленного раствора переносили на стартовую линию пластины для хроматографии, без количественной потери лекарственного вещества. Также помещали вещества-свидетели. Процесс разделения происходил в хроматографических камерах первый раз ацетоном для всех препаратов, после хроматограммы высушивали и подвергали повторному хроматографированию с употреблением следующих мобильных фаз: для цефтриаксона – ацетон-вода (8:2), для цефепима и цефпиромы ацетон-вода (6:4). По завершению данного опыта пластины подвергались высушиванию в вытяжном шкафу, при температуре 18-25 °С и производили идентификацию в ультрафиолетовом свете. Проверяемые

лекарственные соединения подвергали элюированию смесью диметилсульфоксид-вода (5:5) и измеряли плотность оптическую испытуемых растворов на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 по алгоритму, представленному в п. 4.1.1. Данные практического исследования отображены в таблице 5.

5.1.2. Хроматография в тонком слое обращеннофазового сорбента

Руководствуясь п. 3.2.2 данного диссертационного труда для очищения анализируемых проб методикой хроматография в тонком слое обращеннофазового сорбента применяли лучшую мобильную фазу, состоящую из буферного раствора рН 2,87-ацетонитрила (8:2).

Процентное содержание антибактериальных средств в обращеннофазовом силикагеле марки СТХ-1 ВЭ выявляли, используя разработанную схему исследования: 0,025 г (точная навеска) проверяемого лекарственного препарата разводили в дистиллированной воде в стеклянном сосуде с точным внутренним объемом на 25 мл. 0,3 мл приготовленного раствора переносили на стартовую линию пластины для хроматографии без количественной потери лекарственного вещества. Также помещали вещества-свидетели. Процесс разделения происходил в хроматографических камерах, применяя следующую мобильную фазу состава: буферный раствор рН 2,87-ацетонитрил (8:2). По завершению данного опыта пластины подвергались высушиванию в вытяжном шкафу, при температуре 18-25 °С и производили идентификацию в ультрафиолетовом свете. Проверяемые лекарственные соединения подвергали элюированию смесью диметилсульфоксид-вода (5:5) и измеряли плотность оптическую испытуемых растворов на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 по алгоритму, описанному в п. 4.1.1. Данные практического исследования отображены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты количественного определения изучаемых лекарственных препаратов методом ультрафиолетовой спектрофотометрии после использования хроматографических методов очистки (n=6, P=0,95)

Вид сорбента	Метод	Мобильная фаза	Количественное содержание, %				
			\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Цефтриаксон							
СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	1 – ацетон 2 – ацетон-вода (8:2)	99,71	1,25	0,51	1,31	1,32
Обращеннофазовый СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	Ацетон-вода (8:2)	99,60	1,16	0,48	1,22	1,23
Силикагель Silasorb С ₈	Макроколлонка	Ацетон-вода (5:5)	99,75	1,43	0,58	1,50	1,50
Цефепим							
СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	1 – ацетон 2 – ацетон-вода (6:4)	99,73	1,21	0,49	1,27	1,27
Обращеннофазовый СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	Ацетон-вода (8:2)	99,65	1,20	0,49	1,25	1,26
Силикагель Silasorb С ₈	Макроколлонка	Ацетон-вода (5:5)	99,79	1,35	0,55	1,42	1,42
Цефпиром							
СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	1 – ацетон 2 – ацетон-вода (6:4)	99,74	1,45	0,59	1,52	1,53
Обращеннофазовый СТХ-1ВЭ	Тонкий слой	Ацетон-вода (8:2)	99,63	1,37	0,56	1,44	1,44
Силикагель Silasorb С ₈	Макроколлонка	Ацетон-вода (5:5)	99,81	1,65	0,67	1,73	1,73

Проанализировав результаты практического исследования делаем заключение, что процент потери анализируемых препаратов после процедуры очищения с применением нормальнофазовой и обращеннофазовой тонкослойной хроматографии незначительны и меньше, чем 0,4 %.

5.1.3. Макроколоночная жидкостная хроматография с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления

При проведении испытания цефтриаксона, цефепима и цефпирона с применением макроколоночной жидкостной хроматографии с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления 0,001 г (точная навеска) проверяемого лекарственного препарата разводили в 1 мл ацетона и 1 мл воды и переносили без количественной потери лекарственного вещества в стеклянную колонку для хроматографии, имеющую размеры 150×10 мм, предварительно наполненную 10,0 г обращеннофазовым сорбентом Silasorb C₈, и ждали входа надсорбентной жидкости в сорбент. Вслед за входом надсорбентной жидкости добавляли подходящий элюент так, чтобы его уровень в стеклянной колонке достигал 28-30 см от высшей границы сорбента, тем самым создавали низкое давление. Фракции по 2 мл собирали в стеклянные пробирки на 10 мл. 10 мкл из каждой собранной пробирки наносили на стартовую линию пластины для хроматографии без количественной потери лекарственного вещества. Также помещали вещества-свидетели. Процесс разделения происходил в хроматографических камерах первый раз ацетоном для всех препаратов, после хроматограммы высушивали и подвергали повторному хроматографированию с употреблением следующих мобильных фаз: для цефтриаксона – ацетон-вода (8:2), для цефепима и цефпирона ацетон-вода (6:4). По завершению данного опыта пластины подвергались высушиванию в вытяжном шкафу, при температуре 18-25 °С и производили идентификацию в ультрафиолетовом свете. При обнаружении пятен на пластине и соответствию их R_f с R_f веществ-свидетелей, выбранные фракции доводили до 10 мл водой дистиллированной и измеряли оптическую плотность испытуемых растворов на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне смеси: 2 мл соответствующего элюента и 8 мл воды

дистиллированной, в кюветах из кварцевого стекла размером 10 мм при следующих длинных волн: 275,0 нм (для цефтриаксона), 270,2 нм (для цефпиромы) и 263,8 нм (для цефепима). Процент содержания анализируемого препарата происходило при использовании соответствующего уравнения калибровочного графика для каждого препарата. Экспериментальные данные позволили провести расчет некоторых параметров хроматографирования. Проводили определение объема удерживания исследуемых препаратов (V_R , мл), «мертвый объем» (V_0 , мл), ширину хроматографического пика у его основания (ω , мл), число теоретических тарелок (N), высоту, эквивалентную теоретической тарелке (H), высоту сорбента в хроматографической колонке (L , см) и абсолютный коэффициент емкости (k').

Процедуры высвобождения исследуемых лекарственных препаратов проводили, применяя макроколоночную жидкостную хроматографию с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления в моносистемах: ацетонитрил, ацетон, 1,4-диоксан, а также с различными соотношениями воды.

Выбирая приемлемую мобильную фазу учитывали важную особенность: исследуемый препарат должен выходить не ранее 2-3 фракции и не позже 8-9 фракций. Приемлемой для цефтриаксона (4-6 фракции), цефепима (4-8), цефпиромы (4-8) выбрана система ацетон-вода (5:5). Результаты проведенного исследования представлены в таблице 6.

Исходя из практических данных, лучшей мобильной фазой для всех изучаемых лекарственных препаратов является подвижная фаза, имеющая состав: ацетон-вода (5:5).

Таблица 6 – Параметры хроматографирования цефтриаксона, цефепима и цефпирома с применением макроколоники с обращеннофазовым сорбентом

Элюент	λ , нм	V_0 , мл	V_R , мл	ω , мл	N	L, см	H	k'
Цефтриаксон								
Вода	275,0	9,3	19,5	4,80	264,06	15,0	0,06	1,10
Ацетонитрил	275,0	9,3	17,6	6,00	137,67	15,0	0,11	0,89
Ацетонитрил-вода 0,5:9,5	275,0	9,3	18,1	5,70	161,33	15,0	0,09	0,95
Ацетонитрил-вода 1:9	275,0	9,3	19,5	6,40	148,54	15,0	0,10	1,10
Ацетонитрил-вода 2,5:7,5	275,0	9,3	17,5	7,40	89,48	15,0	0,17	0,88
Ацетонитрил-вода 5:5	275,0	9,3	19,1	5,60	186,13	15,0	0,08	1,05
Ацетонитрил-вода 7,5:2,5	275,0	9,3	19,1	6,20	151,85	15,0	0,10	1,05
Ацетон	275,0	9,3	18,3	5,70	164,92	15,0	0,09	0,97
Ацетон-вода 5:5	275,0	9,3	17,9	5,50	169,47	15,0	0,09	0,92
1,4-Диоксан	275,0	9,3	17,4	4,00	302,76	15,0	0,05	0,87
1,4-Диоксан -вода 0,5:9,5	275,0	9,3	18,4	6,00	150,47	15,0	0,10	0,98
1,4-Диоксан -вода 1:9	275,0	9,3	17,6	5,30	176,44	15,0	0,09	0,89
1,4-Диоксан -вода 2,5:7,5	275,0	9,3	17,5	5,50	161,98	15,0	0,09	0,88
1,4-Диоксан -вода 5:5	275,0	9,3	18,8	6,00	157,08	15,0	0,10	1,02
1,4-Диоксан -вода 7,5:2,5	275,0	9,3	17,6	5,50	163,84	15,0	0,09	0,89
Цефепим								
Вода	263,8	9,30	11,90	12,70	14,05	15,0	1,07	0,28
Ацетонитрил	263,8	9,30	15,50	8,20	57,17	15,0	0,26	0,67
Ацетонитрил-вода 0,5:9,5	263,8	9,30	19,50	8,10	92,73	15,0	0,16	1,10
Ацетонитрил-вода 5:5	263,8	9,30	20,30	12,60	41,53	15,0	0,36	1,18
Ацетон	263,8	9,30	18,10	10,10	51,38	15,0	0,29	0,95
Ацетон-вода 5:5	263,8	9,30	18,40	4,90	225,61	15,0	0,07	0,98
1,4-Диоксан	263,8	9,30	17,70	8,00	78,32	15,0	0,19	0,90
1,4-Диоксан -вода 0,5:9,5	263,8	9,30	19,50	4,10	361,93	15,0	0,04	1,10
1,4-Диоксан -вода 5:5	263,8	9,30	17,70	6,00	139,24	15,0	0,11	0,90
Цефпиром								
Вода	270,2	9,30	16,90	19,00	12,66	15,0	1,18	0,82
Ацетонитрил	270,2	9,30	19,10	7,10	115,79	15,0	0,13	1,05
Ацетонитрил-вода 5:5	270,2	9,30	21,50	5,00	295,84	15,0	0,05	1,31
Ацетон	270,2	9,30	18,50	8,20	81,44	15,0	0,18	0,99
Ацетон-вода 5:5	270,2	9,30	19,50	4,30	329,04	15,0	0,05	1,10
1,4-Диоксан	270,2	9,30	15,50	5,40	131,82	15,0	0,11	0,67
1,4-Диоксан -вода 5:5	270,2	9,30	21,20	6,00	199,75	15,0	0,08	1,28

Проанализировав результаты анализа количественного выявления цефтриаксона, цефепима и цефпирома после процесса очищения, применяя макроколочную жидкостную хроматографию с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления, можно сделать заключение, что потери анализируемых препаратов при применении разработанной методике очищения не имеют важного значения и равны 0,25 %.

5.2. Имитирование процесса очищения изучаемых лекарственных препаратов, извлеченных из биологического материала в проверочных образцах

Печень была выбрана как имитируемый образец для определения степени очищения изучаемых лекарственных препаратов от биологического материала.

25 г мелкодиспергируемой печени выдерживали с 50 г смеси состава ацетон-вода (5:5) при 18-20°C 30 минут при скрупулёзном перемешивании. Процедуру настаивания проводили дважды. Извлечения, после каждого настаивания, собирали и подвергали объединению.

5.2.1. Схема очистки извлечений с применением нормальнофазовой тонкослойной хроматографии

15% объединённых вытяжек из п. 5.2. испаряли до образования нежидкого остатка, остаток разводили в 0,3-0,5 мл воды очищенной и наносили без потери вещества на стартовую линию хроматографической пластины с неподвижной фазой – силикагель марки СТХ-1ВЭ. Процесс хроматографирования осуществляли вместе с веществами-свидетелями. Процесс хроматографирования проводили согласно методике, описанной в п. 5.1.1.

Величину оптической плотности анализируемых растворов измеряли при соответствующих длинах волн: 275,0 нм (для цефтриаксона), 270,2 нм (для цефпиромы) и 263,8 нм (для цефепима).

Результаты приведены в таблице 7. Значения оптических плотностей, выявленные в ходе данного эксперимента, незначительны и позволяют сделать заключение об эффективности данного метода очистки извлечений.

5.2.2. Схема очистки извлечений с применением обращеннофазовой тонкослойной хроматографии

15% объединённых вытяжек из п. 5.2. испаряли до образования нежидкого остатка, остаток растворяли в 0,3-0,5 мл воды очищенной и переносили на стартовую линию пластины для хроматографии, имеющую модель сорбента с искусственно привитой алкильной фазой C₁₄-C₁₅, без количественной потери лекарственного вещества. Также наносили вещества-свидетели.

Хроматографировали в хроматографических камерах, применяя следующую мобильную фазу состава: буферный раствор рН 2,87-ацетонитрил (8:2). Процесс хроматографирования осуществляли вместе с веществами-свидетелями. Процесс хроматографирования проводили согласно методике, описанной в п. 5.1.2.

Значение оптической плотности исследуемых лекарственных препаратов измеряли при длинах волн, указанных в разделе 5.2.1.

Практические результаты представлены в таблице 7. Величины оптических плотностей, выявленные в процессе настоящего эксперимента, незначительны и позволяют сделать заключение об эффективности разработанной системы очистки извлечений.

5.2.3. Схема очистки извлечений с применением обращеннофазовой макроколоночной хроматографии

2 мл выделенных объединённых вытяжек, полученных в п 5.2., переносили без потери содержания в колонку для хроматографии, имеющую размеры 150×10 мм, предварительно наполненную сорбентом Silasorb C8, и элюировали мобильной фазой ацетон-вода (5:5). Элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями по 2 мл. Фракции с 3 по 7 объединяли, подвергали процедуре испарения в вытяжном шкафу при температуре 18-25 °С до 5 мл (исчезновение запаха ацетона) – раствор А.

0,5 мл раствор А доводили до 10 мл смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) и измеряли значение оптической плотности исследуемых лекарственных препаратов при длинах волн, указанных в разделе 5.2.1.

Практические результаты приведены в таблице 7. Величины оптических плотностей, выявленные в процессе настоящего эксперимента, незначительны и позволяют сделать заключение об эффективности разработанной системы очистки извлечений.

Таблица – 7 Величины оптических плотностей, полученных при имитировании очистки извлечений разными способами из материала биологического происхождения (n=5)

Способ очистки	Вид сорбента	Мобильная фаза	Оптическая плотность полученных растворов
Тонкослойная хроматография	СТХ-1ВЭ	1 – ацетон 2 – ацетон-вода (8:2)	0,004
		1 – ацетон 2 – ацетон-вода (6:4)	0,004
	Обращеннофазовый СТХ-1ВЭ	Ацетон-вода (8:2)	0,005
Обращеннофазовая макроколоночная хроматография	Силикагель Silasorb C ₈	Ацетон-вода (5:5)	0,004

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Для очистки и концентрирования исследуемых препаратов возможно применение хроматографических методов анализа в различной модификации: нормальнофазовая ТСХ, обращеннофазовая ТСХ и макроколоночная жидкостная хроматография с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления.

2. В качестве оптимальной подвижной фазы для макроколоночной жидкостной хроматографии с использованием обращеннофазового сорбента под воздействием низкого давления была подобрана фаза состава ацетон-вода в соотношении (5:5).

3. Данные, полученные при проведении очистки извлечений лекарственных препаратов различными способами, позволяют сделать заключение об эффективности всех предложенных методов очистки извлечений и о возможности использования их как индивидуально, так и в комбинации друг с другом.

ГЛАВА 6. ИЗОЛИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННОФАЗОВОЙ ВЭЖХ

6.1. Подбор приемлемых условий изолирования

В настоящее время в выборе метода изолирования отравляющих веществ находит широкое применение метод настаивания. Экономическая выгода при его использовании, а также отсутствие сложной пробоподготовки, имеет важнейшее преимущество перед остальными методами. При использовании современных способов очистки и надлежащем подборе условий изолирования можно достичь высоких результатов извлечения и снизить влияние эндогенных компонентов, извлекаемых из соответствующего биологического объекта, на результат анализа.

6.1.1. Практическое определение изолирующего компонента

На начальном этапе практического определения изолирующего компонента изучали особенности выделения цефтриаксона, цефепима и цефпирома из биологического материала. Учитывали особенности изолирующего компонента и предъявляли к нему ряд требований: лучшая растворимость всех анализируемых соединений, способность проникновения через стенки клеток, хорошая летучесть компонента и возможность разъединения лабильных связей между испытуемыми препаратами и химическими центрами структурных клеток биологического материала.

Для определения приемлемого изолирующего компонента применяли отдельные органические растворители и их смеси. Изолирование проводили 18 изолирующими компонентами их смесями различной химической природы. Использовали ацетон, метанол, этанол, ацетонитрил, 1,4-диоксан, воду дистиллированную, 8% уксусную кислоту, ледяную уксусную кислоту, ангидрид уксусной кислоты, 0,1 н раствор натрия гидроксида (NaOH), диметилсульфоксид, диметилформамид. В качестве смесей растворителей применяли следующие составы: диметилсульфоксид-вода (5:5), метанол-вода (5:5), диметилсульфоксид-вода (8:2), метанол-вода (8:2), ацетонитрил-вода (5:5), ацетон-вода (5:5).

Имитируемые образцы цефтриаксона, цефепима и цефпиромы с мелкодиспергируемой печенью (0,025 г анализируемого препарата в 50 г биологического образца) настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение аналита каждым изолирующим компонентом при его массовом соотношении к массе биоматериала 2:1. Эту же процедуру повторяли и с проверочными образцами без содержания вещества. Продолжительность каждого настаивания – 30 минут. Полученные вытяжки, после первого и второго настаивания, смешивали и подвергали скрупулёзному перемешиванию. 15% полученных объединённых вытяжек испаряли до образования нежидкого остатка, полученный остаток растворяли в 0,3 мл воды очищенной и наносили без потери вещества на стартовую линию пластины для процесса хроматографирования «Сорбфил» с УФ-индикатором ПТСХ-АФ-А-УФ (неподвижная фаза пластины – силикагель марки СТХ-1 ВЭ, размер частиц 8-10 мкм, связующее вещество – силиказоль), размером 10×10 см. Далее проводили непосредственно процесс хроматографирования. Для цефтриаксона: первый раз проводили процесс хроматографирования, применяя подвижную фазу ацетон, высушивали пластину в вытяжном шкафу и повторно хроматографировали, применяя подвижную фазу состава 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 состава ацетон-вода (6:4). Процедуру хроматографирования проводили в камерах для хроматографии с внутренним рабочим объемом около 600 см³ в присутствии веществ свидетелей.

Аналитические хроматографические пластины по завершению процесса хроматографирования подвергли высушиванию в вытяжном шкафу при температуре 18-25 °С и проводили детектирование в облучателе хроматографическом (254 нм).

После хроматографирования методом ТСХ по выше приведенной схеме участок хроматографической пластины с пятном исследуемого препарата, соответствующего стандарту, вырезали, помещали в стеклянную пробирку для предотвращения взаимодействия диметилсульфоксида и химически нестойких

пробирок, проводили процесс элюирования смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) продолжительностью 15 минут. Анализировали особенность поглощения полученного элюата на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне диметилсульфоксид-вода (5:5) в кюветах кварцевых с толщиной рабочего слоя 10 мм при соответствующих длинных волн: 275,0 нм (для цефтриаксона), 270,2 нм (для цефпирона) и 263,8 нм (для цефепима). Для расчета количественного содержания действующего вещества использовали соответствующие уравнение калибровочного графика для каждого препарата.

Далее по отношению к количеству исследуемых препаратов, помещенных в имитируемую смесь, высчитывали процент выхода исследуемого веществ из биообъектов. Результаты данного практическое исследования (n=5; P=0,95) приведены в таблицах 8-10.

Таблица 8 – Практические результаты извлечения цефтриаксона из биологического материала

Изолирующий агент	Найдено цефтриаксон (n=5, P=0,95), %				
	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Ацетон	72,18	2,48	1,11	3,09	4,28
Метанол	75,46	2,83	1,27	3,52	4,67
Этанол	58,62	3,47	1,55	4,31	7,35
Ацетонитрил	41,28	1,77	0,79	2,20	5,34
1,4-Диоксан	59,88	2,92	1,30	3,63	6,05
Вода дистиллированная	25,79	1,08	0,49	1,35	5,23
8 % раствор уксусной кислоты	37,22	2,84	1,27	3,53	9,50
Уксусная кислота	55,39	3,96	1,77	4,92	8,90
Ангидрид уксусной кислоты	66,72	6,31	2,82	7,85	11,76
0,1 н. р-р натрия гидроксида	27,73	1,44	0,65	1,79	6,47
Диметилсульфоксид	50,09	2,11	0,94	2,62	5,23
Диметилформамид	49,92	1,61	0,72	2,00	4,01
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	65,77	3,00	1,34	3,73	5,67
Метанол-вода (5:5)	82,50	4,92	2,20	6,12	7,42
Диметилсульфоксид-вода (8:2)	81,69	4,15	1,86	5,16	6,32
Метанол-вода (8:2)	84,81	3,50	1,56	4,35	5,12
Ацетонитрил-вода (5:5)	87,99	3,64	1,63	4,53	5,14
Ацетон-вода (5:5)	73,01	1,83	0,82	2,28	3,12

Таблица 9 – Практические результаты извлечения цефепима из биологического материала

Изолирующий агент	Найдено цефепим (n=5, P=0,95), %				
	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Ацетон	70,31	2,75	1,23	3,42	4,87
Метанол	68,87	2,58	1,16	3,21	4,66
Этанол	63,93	3,33	1,49	4,13	6,47
Ацетонитрил	20,04	0,98	0,44	1,22	6,09
1,4-Диоксан	64,82	3,08	1,38	3,83	5,19
Вода дистиллированная	34,84	2,47	1,10	3,07	8,81
8 % раствор уксусной кислоты	37,63	3,27	1,46	4,06	10,80
Уксусная кислота	53,82	3,77	1,68	4,68	8,70
Ангидрид уксусной кислоты	65,09	6,97	3,12	8,67	13,32
0,1 н. р-р натрия гидроксида	28,23	1,51	0,68	1,88	6,65
Диметилсульфоксид	45,78	2,36	1,05	2,93	6,40
Диметилформамид	50,84	1,72	0,77	2,14	4,21
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	62,43	2,78	1,24	3,45	5,53
Метанол-вода (5:5)	82,76	4,71	2,11	5,85	7,07
Диметилсульфоксид-вода (8:2)	74,16	3,53	1,58	4,39	5,92
Метанол-вода (8:2)	72,32	3,52	1,57	4,38	6,05
Ацетонитрил-вода (5:5)	72,05	3,14	1,41	3,91	5,43
Ацетон-вода (5:5)	73,30	1,84	0,82	1,19	3,12

Таблица 10 – Практические результаты извлечения цефпиром из биологического материала

Изолирующий агент	Найдено цефпиром (n=5, P=0,95), %				
	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Ацетон	70,95	2,88	1,29	3,58	5,05
Метанол	75,83	3,29	1,47	4,09	5,40
Этанол	62,38	2,92	1,31	3,63	5,82
Ацетонитрил	37,14	2,76	1,23	3,43	9,22
1,4-Диоксан	63,32	2,88	1,29	3,58	5,66
Вода дистиллированная	39,30	3,35	1,50	4,16	10,59
8 % раствор уксусной кислоты	35,69	2,97	1,33	3,70	10,35
Уксусная кислота	50,82	3,99	1,78	4,96	9,76
Ангидрид уксусной кислоты	65,55	6,30	2,82	7,83	11,94
0,1 н. р-р натрия гидроксида	30,24	2,16	0,97	2,69	8,88
Диметилсульфоксид	39,15	2,08	0,93	2,59	6,62
Диметилформамид	53,68	2,19	0,98	2,72	5,07
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	61,60	3,31	1,48	4,11	6,68
Метанол-вода (5:5)	85,79	5,95	2,66	7,40	8,62
Диметилсульфоксид-вода (8:2)	78,43	3,97	1,77	4,93	6,29
Метанол-вода (8:2)	69,95	3,32	1,49	4,13	5,09
Ацетонитрил-вода (5:5)	71,35	3,26	1,46	4,05	5,67
Ацетон-вода (5:5)	69,45	1,81	0,81	2,26	3,25

При проведении оценки данных, полученных практическим путем, можно сделать заключение, что приемлемым по всем критериям изолирующим компонентом для цефтриаксона, цефепима и цефпиромы является изолирующая смесь состава ацетон-вода (5:5). Процент выхода изолирования для цефтриаксона составил 73,01% [8], для цефепима – 73,30% [10] и для цефпиромы – 69,45%, ошибка полученных результатов является минимальной и не превышает 3,3 %.

6.1.2. Подбор времени настаивания с приемлемым изолирующим компонентом

Следующим этапом в подборе приемлемых условий изолирования было решено рассмотреть длительность непосредственного контакта оптимального изолирующего компонента с биологическим материалом. В качестве оптимального изолирующего компонента использовали смесь состава ацетон-вода (5:5). Имитируемые смеси готовили по вышеуказанной схеме в 6.1.1. Исследовали следующие временные интервалы контакта оптимального изолирующего компонента с биологическим материалом при двукратном настаивании, а именно 15, 30, 45, 60, 75 и 90 минут. Анализ полученных извлечений проводили по методике, описанной в 6.1.1. Результаты полученных определений (n=5) представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Зависимость степени извлечения некоторых цефалоспоринов из биологического материала от длительности настаивания (n=5, P=0,95)

Внесено вещества, мг	Время настаивания, мин	Найдено вещества	
		мг	%
Цефтриаксон			
25	15	16,34	65,37
25	30	18,37	73,48
25	45	18,38	73,52
25	60	18,82	75,30
25	75	19,20	76,79
25	90	19,31	77,26
Цефепим			
25	15	15,44	61,77
25	30	18,33	73,33
25	45	18,44	73,78
25	60	18,50	74,02
25	75	18,97	75,87
25	90	19,10	76,41
Цефпиром			
25	15	15,24	60,96
25	30	17,41	69,66
25	45	17,61	70,43
25	60	17,82	71,27
25	75	18,10	72,41
25	90	18,42	73,69

Полученные практические значения позволяют сделать заключение о том, что оптимальное время непосредственного контакта изолирующего компонента с биологическим материалом составляет не менее 30 минут.

6.1.3. Подбор кратности настаивания и количества изолирующего компонента при оптимальном времени изолирования

На следующем этапе данного исследования было необходимо определить количество изолирующего компонента и кратности настаивания при использовании ранее определенных лучших условий – изолирующая смесь состава ацетон-вода (5:5) и время непосредственного контакта изолирующего компонента с биологическим материалом – 30 минут.

Имитируемые смеси цефтриаксона, цефепима и цефпирома с мелкодиспергируемой тканью трупной печени (0,025 г исследуемого соединения в 50 г биологического материала) выдерживали при 18-20°C 1,5 часа при тщательном периодическом перемешивании. Также готовили и проверочные образцы.

Полученные имитируемые смеси и проверочные образцы делили на пять равных частей (по 10 г) и проводили процедуру настаивания с разными количествами изолирующая смесь состава ацетон-вода (5:5) (5; 10; 12,5; 15 и 20 г) при тщательном постоянном перемешивании на продолжительности 30 минут. Процедуру настаивания проводили четырехкратно на одних и тех же имитируемых смесях, и проверочных образцах биологического объекта. Извлечения, полученные после каждого настаивания, собирали в отдельные емкости и не подвергали объединению, а следовали процедуре проверки согласно п. 6.1.1.

Отчет о полученных практических значениях демонстрируется в таблицах 12-14.

По полученным практическим значениям следует заметить, что масса изолирующего компонента для проведения изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпирома должна превышать массу биологического материала по крайней мере в два раза, а приемлемые количественные содержания анализируемых веществ удастся извлечь при проведении процедуры дважды.

Таблица 12 – Зависимость полноты изолирования цефтриаксона от кратности настаивания и количества изолирующего компонента

Навеска анализируемого препарата, мг	Масса изолирующего компонента, г	Кратность настаивания	Определено анализируемого препарата	
			X, мг	X, %
5	5	1	1,87	37,39
		2	1,44	28,79
		1+2	3,31	66,18
		3	0,84	16,85
		1+2+3	4,15	83,02
		4	0,45	8,93
		1+2+3+4	4,60	91,95
5	10	1	2,32	46,38
		2	1,34	26,83
		1+2	3,66	73,21
		3	0,66	13,27
		1+2+3	4,32	86,48
		4	0,37	7,36
		1+2+3+4	4,69	93,84
5	12,5	1	2,45	48,97
		2	1,28	25,67
		1+2	3,73	74,64
		3	0,64	12,81
		1+2+3	4,37	87,45
		4	0,34	6,84
		1+2+3+4	4,71	94,29
5	15	1	2,62	52,32
		2	1,24	24,89
		1+2	3,86	77,21
		3	0,58	11,56
		1+2+3	4,44	88,77
		4	0,31	6,27
		1+2+3+4	4,75	95,05
5	20	1	2,80	56,00
		2	1,20	24,04
		1+2	4,00	80,04
		3	0,49	9,75
		1+2+3	4,49	89,79
		4	0,30	5,98
		1+2+3+4	4,79	95,77

Таблица 13 – Зависимость полноты изолирования цефепима от кратности настаивания и количества изолирующего компонента

Навеска анализируемого препарата, мг	Масса изолирующего компонента, г	Кратность настаивания	Определено анализируемого препарата	
			X, мг	X, %
5	5	1	1,88	37,60
		2	1,35	26,97
		1+2	3,23	64,57
		3	0,83	16,55
		1+2+3	4,06	81,11
		4	0,56	11,22
		1+2+3+4	4,62	92,33
5	10	1	2,38	47,53
		2	1,29	25,76
		1+2	3,66	73,29
		3	0,62	12,31
		1+2+3	4,28	85,60
		4	0,47	9,38
		1+2+3+4	4,75	94,99
5	12,5	1	2,57	51,43
		2	1,22	24,41
		1+2	3,79	75,84
		3	0,58	11,64
		1+2+3	4,37	87,48
		4	0,38	7,67
		1+2+3+4	4,76	95,15
5	15	1	2,73	54,58
		2	1,11	22,25
		1+2	3,84	76,83
		3	0,58	11,62
		1+2+3	4,42	88,45
		4	0,37	7,45
		1+2+3+4	4,79	95,89
5	20	1	3,20	63,95
		2	0,87	17,31
		1+2	4,06	81,26
		3	0,47	9,40
		1+2+3	4,53	90,66
		4	0,29	5,85
		1+2+3+4	4,83	96,51

Таблица 14 – Зависимость полноты изолирования цефпирона от кратности настаивания и количества изолирующего компонента

Навеска анализируемого препарата, мг	Масса изолирующего компонента, г	Кратность настаивания	Определено анализируемого препарата	
			X, мг	X, %
5	5	1	1,72	34,35
		2	1,38	27,68
		1+2	3,10	62,03
		3	0,91	18,23
		1+2+3	4,01	80,27
		4	0,44	8,87
		1+2+3+4	4,46	89,14
5	10	1	2,20	43,92
		2	1,28	25,55
		1+2	3,47	69,47
		3	0,71	14,21
		1+2+3	4,18	83,68
		4	0,40	7,95
		1+2+3+4	4,58	91,63
5	12,5	1	2,31	46,21
		2	1,22	24,48
		1+2	3,53	70,70
		3	0,69	13,74
		1+2+3	4,22	84,43
		4	0,38	7,64
		1+2+3+4	4,60	92,08
5	15	1	2,47	49,44
		2	1,16	23,19
		1+2	3,63	72,63
		3	0,65	12,95
		1+2+3	4,28	85,58
		4	0,37	7,42
		1+2+3+4	4,65	93,00
5	20	1	2,65	52,93
		2	1,14	22,70
		1+2	3,78	75,64
		3	0,59	11,73
		1+2+3	4,37	87,37
		4	0,33	6,68
		1+2+3+4	4,70	94,05

6.2. Технологии извлечения из трупных органов и биологических жидкостей

Подобранные приемлемые условия извлечения (двукратный контакт продолжительностью 30 минут каждый со смесью ацетон-вода (5:5)) использовали для проведения экспертизы разных объектов трупного биологического материала, а именно печень трупная, кровь, плазма крови и моча.

В стеклянные емкости вносили разных количеств для цефтриаксона (62,5; 125; 250; 600; 1250; 2500; 4000 и 5000 мкг/г), для цефепима и цефпирома (125, 250, 400, 600, 1250, 2500, 4000 и 5000 мкг/г) с 25 г биологического материала (ткани трупной печени, крови, плазмы крови или мочи). Имитируемые смеси цефтриаксона, цефепима и цефпирома с биологическим материалом настаивали при 18-20°C 1,5 часа при тщательном периодическом перемешивании, практические результаты представлены в таблицах 10-12 (приложение). Параллельно готовили проверочные образцы биологического объекта без содержания анализируемых веществ по схеме, описанной выше. Как видно из полученных результатов, относительная погрешность данной методике не превышает 7,66 %, что характеризует хорошую воспроизводимость.

6.2.1. Технология извлечения из ткани трупного органа (печени)

25 г мелкодиспергируемой печени с исследуемым соединением и аналогичное количество проверочного образца настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение смесью ацетон-вода (5:5) при соотношении ее массы к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 минут. Полученные вытяжки после первого и второго настаивания объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. Параллельно готовили проверочные образцы биологического объекта без содержания анализируемых веществ по схеме, описанной выше.

6.2.2. Технология извлечения из крови

25 г смеси крови с исследуемым соединением и аналогичное количество проверочного образца настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение смесью ацетон-вода (5:5) при соотношении ее массы к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 минут.

Полученные вытяжки, после первого и второго настаивания, объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. Параллельно готовили проверочные образцы биологического объекта без содержания анализируемых веществ по схеме, описанной выше.

6.2.3. Технология извлечения из плазмы крови

25 г смеси плазмы крови с исследуемым соединением и аналогичное количество проверочного образца настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение смесью ацетон-вода (5:5) при соотношении ее массы к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 минут. Полученные вытяжки после первого и второго настаивания объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. Параллельно готовили проверочные образцы биологического объекта без содержания анализируемых веществ по схеме, описанной выше.

6.2.4. Технология извлечения из мочи

25 г смеси мочи с исследуемым соединением и аналогичное количество проверочного образца настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение смесью ацетон-вода (5:5) при соотношении ее массы к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 минут. Полученные вытяжки после первого и второго настаивания объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. Параллельно готовили проверочные образцы биологического объекта без содержания анализируемых веществ по схеме, описанной выше.

6.3. Количественное определение с применением разработанной системы очистки извлечения

Для очистки полученных вытяжек нами применялся метод обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления. После процедуры очистки проводили идентификацию и количественное определение анализируемых веществ, извлеченных из биологического материала, методом УФ-спектроскопии и обращеннофазовой ВЭЖХ.

6.3.1. Очистка извлечений методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления

2 мл полученных объединённых вытяжек переносили без потери содержания в колонку для хроматографии, имеющую размеры 150×10 мм, предварительно наполненную сорбентом Silasorb C8, и проводили процесс элюирования подвижной фазой ацетон-вода (5:5). Элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями по 2 мл. Исследуемые препараты обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, объем фракции, наносимый на пластину - 5-10 мкл). Фракции с 3 по 7, содержащие анализируемые препараты, объединяли, проводили процедуру испарения в вытяжном шкафу при температуре 18-25 °С до 5 мл (исчезновение запаха ацетона) – раствор А.

6.3.2. Идентификация и количественное определение методом УФ-спектроскопии

Полученный в п. 6.3.1 0,5 мл раствор А довели до 10 мл смесью диметилсульфоксид-вода (5:5) и измеряли оптическую плотность растворов 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 цефпиррома) и 263,8 нм (для цефепима).

Идентификацию исследуемых соединений проводили по совпадению формы спектров поглощения и максимумов и минимумов спектров при соответствующих длинах волн. Далее находили концентрацию анализируемых веществ, извлеченных из биологического материала, по соответствующим уравнениям калибровочных графиков. Результаты количественного определения анализируемых соединений, извлеченных из печени, крови, плазмы крови и мочи, полученные практическим путем, представлены в таблицах 15-17.

При применении очистки извлечений методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии низкого давления УФ-спектрофотометрией возможно определить цефтриаксон в концентрации – 400

мкг/г [7], цефепим – 600 мкг/г [6], а цефпиром в концентрации – 250 мкг/г в трупной печени, крови, плазме крови и моче.

Таблица 15 – Результаты количественного определения цефтриаксона в материале биологической природы с применением очистки методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления (n=5, P=0,95)

Анализируемый биологический объект	Навеска препарата, мкг/г	Найдено, %									
		Спектрофотометрия					Обращеннофазовая ВЭЖХ				
		\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Трупная печень	125	-	-	-	-	-	94,54	4,07	1,82	5,06	5,35
	250	-	-	-	-	-	95,72	3,61	1,61	4,48	4,68
	400	94,83	3,50	1,56	4,35	4,59	95,84	3,49	1,56	4,33	4,51
	600	95,16	3,44	1,54	4,27	4,49	96,03	3,45	1,54	4,28	4,46
	1250	95,71	3,15	1,41	3,92	4,09	96,04	3,09	1,38	3,85	4,00
	2500	96,13	2,95	1,32	3,67	3,81	96,32	2,85	1,28	3,54	3,68
	4000	96,20	2,87	1,28	3,57	3,71	96,60	2,77	1,24	3,45	3,57
	5000	96,34	2,65	1,19	3,30	3,42	96,63	2,58	1,15	3,21	3,32
Кровь	125	-	-	-	-	-	87,07	3,15	1,41	3,92	4,05
	250	-	-	-	-	-	87,86	2,99	1,34	3,72	4,23
	400	87,43	3,91	1,75	4,86	5,56	88,11	2,84	1,27	3,53	4,01
	600	87,82	2,70	1,21	3,36	3,82	88,33	2,52	1,13	3,13	3,54
	1250	88,67	2,49	1,14	3,10	3,50	88,67	2,42	1,08	3,01	3,39
	2500	89,01	2,46	1,10	3,06	3,44	89,84	2,35	1,05	2,92	3,25
	4000	89,81	2,19	0,98	2,72	3,03	90,31	2,08	0,93	2,58	2,86
	5000	90,56	1,98	0,88	2,46	2,71	91,03	1,88	0,84	2,34	2,57
Плазма крови	125	-	-	-	-	-	93,23	2,43	1,09	3,02	3,24
	250	-	-	-	-	-	94,40	2,31	1,03	2,88	3,05
	400	93,07	2,61	1,17	3,25	3,49	93,79	2,12	0,95	2,63	2,80
	600	93,25	2,19	0,98	2,72	2,92	94,17	2,02	0,90	2,21	2,66
	1250	93,64	2,13	0,95	2,65	2,83	94,29	1,85	0,83	2,30	2,44
	2500	94,02	1,97	0,88	2,45	2,60	94,96	1,81	0,81	2,25	2,37
	4000	94,22	1,82	0,81	2,26	2,40	95,08	1,74	0,78	2,16	2,27
	5000	94,93	1,69	0,76	2,10	2,21	95,19	1,59	0,71	1,97	2,07
Моча	125	-	-	-	-	-	96,03	2,17	0,97	2,69	2,80
	250	-	-	-	-	-	96,91	1,98	0,88	2,46	2,54
	400	95,89	3,15	1,41	3,92	4,09	97,12	1,94	0,87	2,42	2,49
	600	96,63	2,42	1,08	3,00	3,11	97,87	1,94	0,87	2,41	2,46
	1250	97,12	2,39	1,07	2,97	3,06	98,07	1,84	0,82	2,29	2,33
	2500	97,19	2,23	1,00	2,77	2,85	98,08	1,81	0,81	2,25	2,29
	4000	97,74	2,06	0,92	2,56	2,62	98,30	1,73	0,77	2,15	2,18
	5000	98,14	1,90	0,85	2,36	2,40	98,48	1,72	0,77	2,13	2,17

Таблица 16 – Результаты количественного определения цефепима в материале биологической природы с применением очистки методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления (n=5, P=0,95)

Вид биоматериала	Внесено вещества, мкг/г	Обнаружено, %									
		Спектрофотометрия					Обращеннофазовая ВЭЖХ				
		\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Трупная печень	125	-	-	-	-	-	94,66	3,38	1,51	4,21	4,44
	250	-	-	-	-	-	94,76	3,30	1,48	4,11	4,33
	400	-	-	-	-	-	95,07	3,29	1,47	4,09	4,30
	600	94,53	3,30	1,48	4,11	4,34	95,61	3,09	1,38	3,84	4,01
	1250	95,09	3,14	1,41	3,91	4,11	96,06	3,09	1,38	3,84	4,00
	2500	95,62	3,10	1,39	3,85	4,03	96,31	3,02	1,35	3,76	3,90
	4000	96,01	2,98	1,33	3,71	3,86	96,56	2,90	1,30	3,61	3,74
	5000	96,86	2,82	1,26	3,50	3,62	97,05	2,74	1,11	3,40	3,51
Кровь	125	-	-	-	-	-	90,61	3,08	1,38	3,83	4,23
	250	-	-	-	-	-	91,10	2,84	1,27	3,53	3,87
	400	-	-	-	-	-	91,76	2,72	1,22	3,38	3,68
	600	91,77	2,83	1,27	3,52	3,84	92,23	2,64	1,18	3,28	3,55
	1250	92,44	2,69	1,20	3,35	3,62	92,81	2,26	1,14	3,18	3,43
	2500	92,96	2,62	1,17	3,26	3,51	93,05	2,40	1,07	2,98	3,20
	4000	93,11	2,48	1,11	3,09	3,31	93,97	2,37	1,06	2,95	3,14
	5000	93,55	2,44	1,09	3,04	3,25	94,12	2,31	1,03	2,87	3,05
Плазма крови	125	-	-	-	-	-	95,14	2,46	1,10	3,06	3,22
	250	-	-	-	-	-	95,23	2,37	1,06	2,94	3,09
	400	-	-	-	-	-	95,30	2,24	1,00	2,78	2,92
	600	94,53	2,21	0,99	2,75	2,90	95,78	2,12	0,95	2,63	2,75
	1250	94,09	2,05	0,92	2,55	2,71	96,01	1,99	0,89	2,47	2,57
	2500	95,28	1,92	0,86	2,39	2,50	96,25	1,83	0,82	2,27	2,36
	4000	95,59	1,85	0,83	2,30	2,41	96,38	1,61	0,72	2,00	2,08
	5000	96,23	1,71	0,77	2,13	2,21	96,80	1,57	0,70	1,95	2,02
Моча	125	-	-	-	-	-	97,01	2,50	1,12	3,11	3,21
	250	-	-	-	-	-	97,70	2,44	1,09	3,03	3,10
	400	-	-	-	-	-	97,31	2,33	1,04	2,90	2,98
	600	95,92	2,25	1,01	2,80	2,92	97,94	2,08	0,93	2,59	2,64
	1250	97,08	2,12	0,95	2,63	2,71	98,11	2,03	0,91	2,52	2,57
	2500	97,93	2,00	0,90	2,49	2,54	98,23	1,87	0,84	2,32	2,36
	4000	98,08	1,90	0,85	2,36	2,41	98,38	1,80	0,81	2,24	2,27
	5000	98,19	1,85	0,83	2,30	2,34	99,03	1,73	0,77	2,15	2,17

Таблица 17 – Результаты количественного определения цефпиром в материале биологической природы с применением очистки методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления (n=5, P=0,95)

Вид биоматериала	Внесено вещества, мкг/г	Обнаружено, %									
		Спектрофотометрия					Обращеннофазовая ВЭЖХ				
		\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Трупная печень	62,5	-	-	-	-	-	95,72	3,93	1,76	4,88	5,10
	125	-	-	-	-	-	95,81	3,68	1,65	4,58	4,78
	250	95,64	3,26	1,46	4,05	4,23	96,02	3,39	1,52	4,22	4,39
	600	96,19	3,13	1,40	3,89	4,05	96,70	3,23	1,44	4,01	4,15
	1250	96,83	3,05	1,37	3,79	3,92	97,23	2,95	1,32	3,67	3,77
	2500	97,25	2,98	1,33	3,71	3,81	97,49	2,80	1,25	3,48	3,57
	4000	97,59	2,86	1,28	3,55	3,64	98,04	2,69	1,20	3,34	3,41
	5000	98,07	2,76	1,24	3,44	3,50	98,93	2,63	1,18	3,27	3,31
Кровь	62,5	-	-	-	-	-	92,88	3,29	1,47	4,09	4,40
	125	-	-	-	-	-	93,36	3,06	1,37	3,81	4,08
	250	91,82	3,02	1,35	3,75	4,08	93,76	2,90	1,30	3,61	3,85
	600	92,37	2,75	1,23	3,42	3,07	94,00	2,74	1,23	3,41	3,63
	1250	93,17	2,42	1,08	3,00	3,22	94,35	2,41	1,08	2,99	3,17
	2500	93,59	2,28	1,02	2,83	3,02	94,61	2,21	0,99	2,75	2,90
	4000	94,16	2,13	0,95	2,65	2,81	94,96	2,10	0,94	2,61	2,75
	5000	94,71	2,08	0,93	2,58	2,72	95,14	1,92	0,86	2,39	2,51
Плазма крови	62,5	-	-	-	-	-	95,46	2,29	1,02	2,85	2,98
	125	-	-	-	-	-	96,11	2,18	0,98	2,71	2,82
	250	93,54	2,28	1,02	2,83	3,03	96,87	2,14	0,96	2,66	2,75
	600	94,91	2,22	0,99	2,76	2,91	97,10	1,96	0,87	2,43	2,50
	1250	95,61	2,09	0,94	2,60	2,72	97,43	1,82	0,81	2,26	2,32
	2500	96,03	1,97	0,88	2,44	2,55	97,66	1,79	1,80	2,22	2,27
	4000	96,83	1,90	0,85	2,37	2,44	97,71	1,65	0,74	2,06	2,10
	5000	97,61	1,74	0,78	2,16	2,22	98,23	1,59	0,71	1,98	2,01
Моча	62,5	-	-	-	-	-	96,10	2,29	1,03	2,85	2,97
	125	-	-	-	-	-	96,90	2,07	0,93	2,58	2,66
	250	95,64	2,64	1,18	3,28	3,43	97,01	1,96	0,88	2,43	2,51
	600	96,19	2,10	0,94	2,61	2,71	97,43	1,92	0,86	2,39	2,45
	1250	96,83	1,88	0,84	2,34	2,42	97,90	1,81	0,81	2,25	2,30
	2500	97,86	1,86	0,83	2,31	2,36	98,41	1,73	0,77	2,15	2,19
	4000	98,17	1,83	0,82	2,27	2,31	98,97	1,66	0,74	2,06	2,08
	5000	98,98	1,68	0,75	2,08	2,11	99,50	1,60	0,72	1,99	2,00

6.3.3. Идентификация и количественное определение методом обращеннофазовой ВЭЖХ

Полученный в п. 6.3.1 0,5 мл раствор А довели до 5 мл подвижной фазой состава - фосфатный буферный раствор pH=3-метанол-ацетонитрил (8:1:1). Для идентификации и определения количественного содержания исследуемых соединений в пробе исследования проводили на хроматографе жидкостном лабораторном "МАЭСТРО" производства ООО «Интерлаб» Россия 2016 г. с УФ-детектором. В качестве хроматографической колонки использовали колонку Zorbax SB-C18 размером 250 мм × 4,6 мм, заполненную обращенно-фазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, производства Agilent Technology. Температура колонки – 25 °С; УФ-детектирование для цефтриаксона – 254 нм, для цефепима – 254 нм и для цефпиром – 270 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл, скорость потока – 1 мл/мин.

Идентификацию исследуемых веществ проводили по совпадению их времен удерживания с временами удерживания стандартных веществ. Далее находили концентрацию анализируемых веществ, извлеченных из биологического материала, по соответствующим уравнениям калибровочных графиков.

Результаты количественного определения анализируемых соединений, извлеченных из печени, крови, плазмы крови и мочи, полученные практически путем, представлены в таблицах 15-17.

Результаты практического исследования позволяют сделать вывод о том, что при применении очистки извлечений методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления возможно определить методом ВЭЖХ цефтриаксон и цефепим – 125 мкг/г, а цефпиром – 62,5 мкг/г в трупной печени, крови, плазме крови и моче.

6.4. Валидация методики определения количественного содержания анализируемых препаратов, изолированных из биологических объектов, методом обращеннофазовой ВЭЖХ

Валидация аналитического метода - это процесс демонстрации того, что аналитическая процедура подходит по прямому назначению. Методология и цель аналитических процедур должны быть четко определены и поняты до начала валидационных исследований. Это понимание получается из научно обоснованных методов разработки и исследований оптимизации.

На первом этапе процедуры необходимо выявить характеристики, по которым проводится валидация методики. Хотя не все характеристики валидации применимы для всех типов тестов, однако, типичными валидационными характеристиками являются: «линейность», «точность (правильность)», «повторяемость (сходимость)», «прецизионность».

6.4.1. Проверка пригодности хроматографической системы

Предварительно необходимо провести проверку пригодности хроматографической системы. Для этого требуется приготовить стандартный раствор цефтриаксона, цефепима и цефпирома с концентрацией 120 мкг/мл. Далее проводили испытание по методике, указанной в п. 3.2.3. Полученные практические данные представлены в виде таблицы 18.

Таблица 18 – Критерии пригодности хроматографической системы

Проверяемый параметр	Полученное значение проверяемого параметра	Отметка о соответствии
Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика исследуемого препарата на хроматограмме раствора стандартного образца и должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок	Цефтриаксон	Соответствует
	7525,81	
	Цефепим	Соответствует
	4938,63	
	Цефпиром	Соответствует
7380,67		
Фактор асимметрии пика анализируемого препарата на хроматограмме раствора стандартного образца анализируемого препарата не более 3,0	Цефтриаксон	Соответствует
	2,32	
	Цефепим	Соответствует
	1,28	
	Цефпиром	Соответствует
1,23		

6.4.2. Специфичность аналитической методики

На следующем этапе процедуры валидации методики определения количественного содержания анализируемых препаратов, изолированных из биологических объектов, методом обращеннофазовой ВЭЖХ необходимо проанализировать такую характеристику валидации, как специфичность. Специфичность – это возможность аналитической методики безусловно проводить определение действующих веществ в присутствии компонентов, которые могут содержаться в анализируемой пробе. Устанавливается отсутствие влияния растворителя и соэкстрактивных веществ на итоговые результаты.

Необходимо получить хроматограммы растворителя и проверочных образцов разного биологического материала. Для этого чистый растворитель и вытяжки из проверочных образцов вкальваем в хроматограф при условиях, описанных в п. 3.2.3. Критерий приемлемости: на хроматограмме растворителя и проверочных образцов должны отсутствовать пики, по времени удерживания, соответствующие пикам исследуемых соединений. Для цефтриаксона время удерживания – 6,9 мин., для цефепима – 2,8 мин., для цефпирома – 3,9 мин. Хроматограммы растворителя и проверочных образцов представлена на рисунках 24-28.

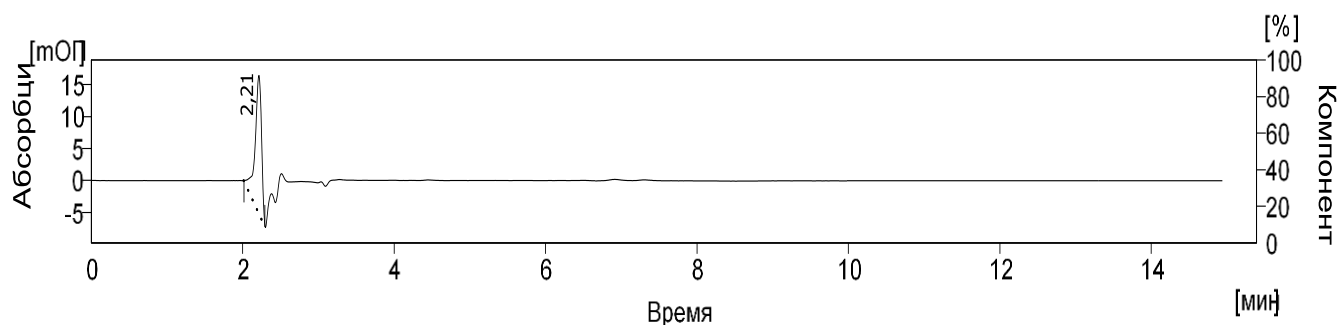


Рисунок 24 – Общий вид хроматограммы растворителя

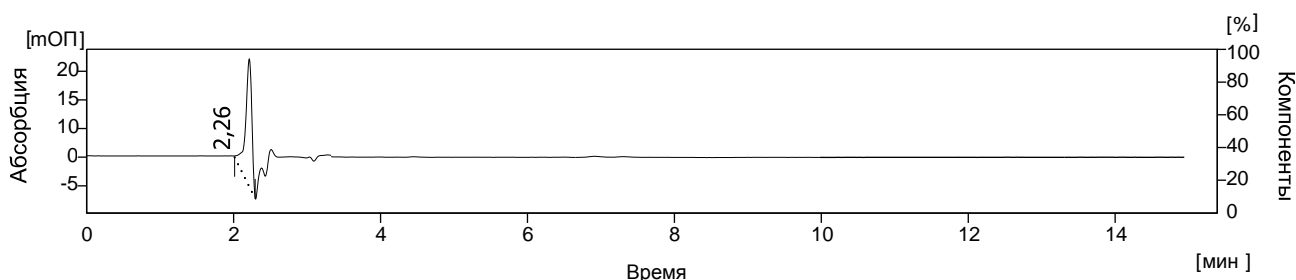


Рисунок 25 – Хроматограмма проверочного образца из печени

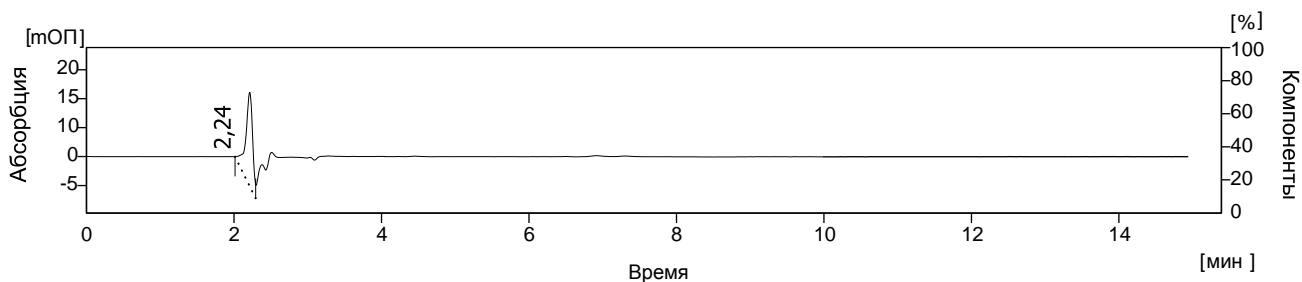


Рисунок 26 – Хроматограмма проверочного образца из крови

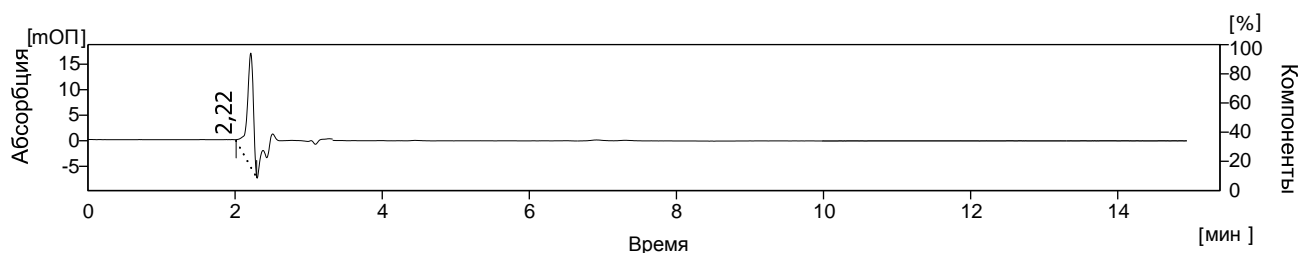


Рисунок 27 – Хроматограмма проверочного образца из мочи

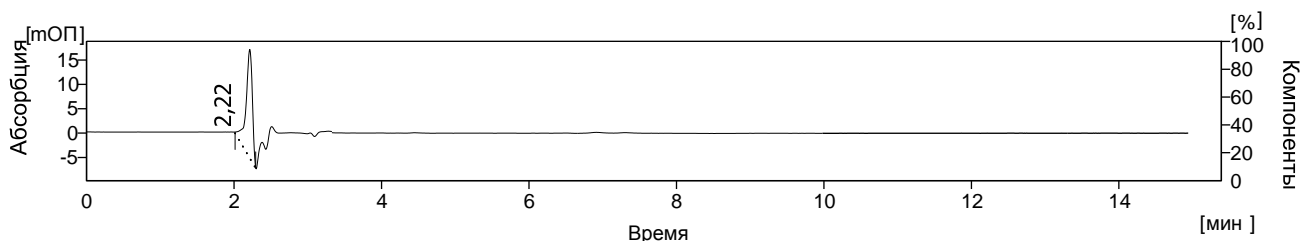


Рисунок 28 – Хроматограмма проверочного образца из плазмы крови

Как видно из полученных экспериментальных данных, на хроматограммах растворителя, проверочного образца из печени, крови, мочи и плазмы крови, отсутствуют пики, по времени удерживания соответствующие пикам исследуемых соединений. Это позволяет сделать заключение о специфичности аналитической методики.

6.4.3. Линейность аналитической методики

Линейность методики оценивается на серии испытуемых растворов, полученных при изолировании биологических объектов с разными диапазонами концентраций анализируемых веществ. Для этой цели готовили имитируемые смеси разных количеств для цефтриаксона (62,5; 125; 250; 600; 1250; 2500; 4000 и 5000 мкг/г), цефепима и цефпирома (125, 250, 400, 600, 1250, 2500, 4000 и 5000

мкг/г) с 25 г биологического материала. Имитируемые смеси цефтриаксона, цефепима и цефпирома с биологическим материалом настаивали при 18-20°C 1,5 часа и осуществляли двукратное извлечение смесью ацетон-вода (5:5) при соотношении ее массы к массе биоматериала 2:1. Временной интервал каждого настаивания – 30 минут. Полученные вытяжки, после первого и второго настаивания, объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. 2 мл полученных объединённых вытяжек переносили без потери содержания в колонку для хроматографии имеющую размеры 150×10 мм, предварительно наполненную сорбентом Silasorb C₈, и проводили процесс элюирования подвижной фазой ацетон-вода (5:5). Элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями по 2 мл. Фракции с 3 по 7 объединяли, проводили процедуру испарения в вытяжном шкафу при температуре 18-25 °С до 5 мл (исчезновение запаха ацетона), полученный раствор переносили в стеклянную колбу с точным объемом на 10 мл и добавляли подвижную фазу состава: фосфатный буферный раствор рН 3-метанол-ацетонитрил (8:1:1) до метки (раствор А). 0,5 мл раствора А вносили в стеклянную колбу с точным объемом на 5 мл и добавляли подвижную фазу состава: фосфатный буферный раствор рН-3-метанол-ацетонитрил (8:1:1) до метки (испытуемый раствор). 10 мкл раствора, полученного после разбавления, вносили в виалу и проводили процесс хроматографирования. Для каждого раствора получали хроматограммы. Строили градуировочный график в координатах: концентрация анализируемого препарата, мкг/г – значение площади пика анализируемого препарата на хроматограмме. Данные для построения калибровочного графика представлены в таблицах 19-21.

Для цефтриаксона, изолированного из печени, уравнение регрессии имеет следующий вид: $S = 0,069944 \cdot C + 60,887220$, где S – площадь пика, C – концентрация цефтриаксона в хроматографируемом растворе, мкг/г. Коэффициент корреляции (r) = 0,999986. Для цефтриаксона изолированного из крови: $S = 0,065637 \cdot C + 60,769429$, $r = 0,999973$; из мочи: $S = 0,071103 \cdot C + 61,396502$, $r = 0,999999$; и из плазмы крови: $S = 0,068771 \cdot C + 61,306352$, $r = 0,999999$.

Уравнение регрессии для цефепима изолированного из печени: $S = 0,095398 \cdot C - 8,390688$, $r = 0,999993$; из крови: $S = 0,092661 \cdot C - 8,724532$, $r = 0,999989$; из мочи: $S = 0,097249 \cdot C - 8,232251$, $r = 0,999989$; и из плазмы крови: $S = 0,095146 \cdot C - 8,171533$, $r = 0,999995$.

Для цефпирона, изолированного из печени, уравнение регрессии представляет следующее: $S = 0,109562 \cdot C - 8,168037$, $r = 0,999975$; из крови: $S = 0,105596 \cdot C - 7,478363$, $r = 0,999997$; из мочи: $S = 0,110350 \cdot C - 8,046563$, $r = 0,999987$; и из плазмы крови: $S = 0,108889 \cdot C - 7,467466$, $r = 0,999994$.

Критерий приемлемости – значение коэффициента корреляции (r) не менее 0,990.

Таблица 19 – Первичные данные количественного определения цефтриаксона в биологическом материале для расчета линейности

Концентрация цефтриаксона, мкг/г	Площадь пика цефтриаксона, изолированного из печени	Площадь пика цефтриаксона, изолированного из крови	Площадь пика цефтриаксона, изолированного из мочи	Площадь пика цефтриаксона, изолированного из плазмы
62,5	63,71	65,59	65,99	65,87
125	70,30	69,59	70,41	70,09
250	78,96	77,57	79,20	78,59
600	103,27	99,94	104,07	102,46
1250	148,36	141,71	150,19	146,78
2500	235,57	223,86	238,74	233,11
4000	340,72	322,51	345,64	336,33
5000	410,57	390,36	417,26	405,40

Таблица 20 – Первичные данные количественного определения цефепима в биологическом материале для расчета линейности

Концентрация цефепима, мкг/г	Площадь пика цефепима, изолированного из печени	Площадь пика цефепима, изолированного из крови	Площадь пика цефепима, изолированного из мочи	Площадь пика цефепима, изолированного из плазмы
125	4,06	3,56	4,35	4,12
250	15,73	14,83	16,45	15,84
400	29,83	28,53	30,71	29,92
600	48,85	46,85	50,23	48,95
1250	110,54	106,54	113,06	110,47
2500	229,26	221,26	233,98	229,10
4000	372,36	362,16	379,53	371,63
5000	469,74	455,32	479,47	468,52

Таблица 21 – Первичные данные количественного определения цефпирома в биологическом материале для расчета линейности

Концентрация цефпирома, мкг/г	Площадь пика цефпирома, изолированного из печени	Площадь пика цефпирома, изолированного из крови	Площадь пика цефпирома, изолированного из мочи	Площадь пика цефпирома, изолированного из плазмы
125	6,54	6,15	6,59	6,51
250	19,84	19,16	20,15	19,93
400	35,88	34,88	36,32	36,26
600	57,65	55,85	58,13	57,93
1250	128,13	124,13	129,05	128,40
2500	263,70	255,70	266,25	264,17
4000	428,38	414,75	432,54	426,95
5000	542,10	521,10	545,29	538,22

6.4.4. Точность и прецизионность аналитической методики

Точность методики характеризует близость результатов испытаний, полученных в данных условиях, к истинному значению. Точность устанавливается путем проведения 9 параллельных определений модельных растворов на трех уровнях концентрации в пределах аналитической области. Для цефтриаксона готовили имитируемые смеси с 250, 2500 и 4000 мкг цефтриаксона в 1 г биологического объекта. А для цефепима и цефпирома готовили смеси с 400, 2500 и 4000 мкг исследуемого препарата в 1 г биологического объекта.

Далее проводили экспертизу по схеме, описанной в разделе линейность аналитической методики. Результаты экспертизы приведены в таблицах 13-24 (приложение).

Прецизионность характеризует влияние внутрилабораторных вариаций: различные дни, различное оборудование и т. д.

Для оценки прецизионности приведенная выше методика выполняется в разные два дня. Каждый день выполняется шесть параллельных испытаний.

Полученные результаты практической оценки прецизионности представлены в таблицах 13-24 (приложение).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. В качестве приемлемого изолирующего агента после проведенного практического исследования явилась смесь ацетон-вода (5:5). При применении данного изолирующего агента достигается наибольший процент извлечения и наименьший процент ошибки определяемых лекарственных препаратов из биологического материала.

2. Оптимальные временной интервал воздействия изолирующего агента на модель биологического материала с исследуемым препаратом составляет не менее 30 минут.

3. Должно производиться двукратное настаивание, при этом количество изолирующего агента должно превышать модель биологического материала с исследуемым препаратом по крайней мере в два раза.

4. Очистку извлечений целесообразно производить методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления.

5. Практические данные показали, что при применении очистки извлечений методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления меньшие количества исследуемых соединений в печени, крови, плазме крови и моче возможно определить, используя метод обращеннофазовой ВЭЖХ.

6. При определении анализируемых веществ из биологических объектов методом ВЭЖХ относительная погрешность данных методик не превышает 10 %. С увеличением концентрации исследуемых препаратов в имитируемых смесях относительная погрешность методики снижается.

7. Замечена тенденция снижения относительной погрешности методики при определении в разных биологических объектах. Так в печени наблюдается наибольшая погрешность и дальше снижается в крови, плазме. Наименьшая погрешность методики наблюдается в моче. Это связано с взаимодействием лекарственных препаратов с биологическими объектами и фоновым влиянием соэкстрактивных веществ.

8. При определении исследуемых веществ на второй день относительная погрешность результатов не превышает 1 % по сравнению с первым днем экспертизы, что позволяет сделать заключение о невысокой степени влияния внутрилабораторной прецизионности.

ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И СОХРАНЯЕМОСТИ ЦЕФТРИАКСОНА, ЦЕФЕПИМА И ЦЕФПИРОМА

7.1. Получение эритроцитарных носителей с включенным антибиотиком

Включение исследуемых лекарственных соединений в эритроцитарные носители осуществлялось методом гипоосмотического гемолиза в модификации по методике Жумадилова Ж.Ш. и Макаренковой Р.В.

Для проведения анализа выделяли эритроцитарные клетки из 5 мл донорской крови, полученной от мышей, взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Проводили процедуры отделения осадка от надосадочной жидкости путем аккуратного сливания последнего. К полученному объему осадка эритроцитарной массы добавляли семикратный объем воды очищенной, охлажденной до 0°C и снова проводили операцию центрифугирования при 8000 об/мин в течение 25 мин. Отделяли центрифугат от надосадочной жидкости путем медленного и аккуратного сливания надосадочной жидкости. К полученному объему осадка (ЭН) добавляли семикратный объем раствора антибиотика в воде очищенной, охлажденной до 0°C. Взвесь инкубировали в течение 60 мин при 4°C, затем добавляли 1/9 объема 9% раствора хлорида натрия для восстановления целостности мембраны эритроцитов и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После включения антибиотиков в ЭН последние отмывали 4 мл 0,9 % (изотоническим) раствором натрия хлорида, затем проводили процедуру осаждения путем центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали, процедуру с осадком проводили еще раз, отмывали 4 мл 0,9 % (изотоническим) раствором натрия хлорида, затем проводили процедуру осаждения путем центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали.

7.2. Определение содержания исследуемых веществ в инкубационной жидкости и в клеточных носителях.

С целью определения влияния концентрации исследуемых антибактериальных препаратов и продолжительности инкубации на процент включения анализируемых препаратов в ЭН, полученные эритроцитарные носители подвергались инкубации с растворами исследуемых препаратов в концентрациях 25, 50, 100, 125 мг/мл в течение 15, 30, 60 и 75 минут. Процедуру проводили по вышеописанной методике. Полученный фильтрат от двух промывок объединяли, далее проводили очистку методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления и количественно определяли методом УФ-спектрофотометрии. Полученный осадок обрабатывали 1 мл ацетона и затем прибавляли 1 мл воды очищенной. Смесь из ацетоноводной и эритроцитарной массы подвергали заморозке при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильной камере в течение 1 часа, затем оставляли при комнатной температуре до выравнивания температуры раствора и окружающей среды. Затем проводили отделение эритроцитарной массы от надосадочной жидкости, путем центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали. Далее проводили очистку методом обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления и количественно определяли методом УФ-спектрофотометрии.

Для каждого анализа (эритроцитарные носители и инкубационная жидкость) 2 мл полученных вытяжек переносили, без потери содержания, в колонку для хроматографии имеющую размеры 150×10 мм, предварительно наполненную сорбентом Silasorb C8, и проводили процесс элюирования подвижной фазой ацетон-вода (5:5), элюат, выходящий из колонки, собирали фракциями по 2 мл. Исследуемые препараты обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, объем фракции, наносимый на пластину - 5-10 мкл). Фракции с 3 по 7, содержащие анализируемые препараты, объединяли, проводили процедуру испарения в вытяжном шкафу при температуре $18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до 5 мл (исчезновение запаха ацетона) – раствор А.

0,5 мл раствор А довели до 10 мл смесью диметилсульфоксид-вода (5:5) и измерял оптическую плотность растворов 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 цефпирома) и 263,8 нм (для цефепима).

Идентификацию исследуемых соединений проводили по совпадению формы спектров поглощения и максимумов и минимумов спектров при соответствующих длинах волн. Далее находили концентрацию анализируемых веществ в эритроцитарных носителях и в инкубационной жидкости по соответствующим уравнениям калибровочных графиков. Результаты содержания исследуемых веществ в эритроцитарных носителях и в инкубационной жидкости представлены в таблицах 22-23.

Исходя из цифр практического эксперимента было сделано заключение о том, что время продолжительности инкубации значительно не оказывает влияния на степень включения цефтриаксона, цефепима и цефпирома в эритроцитарные носители, но при заметном увеличении концентрации увеличивалось и содержание данных лекарственных препаратов. Приемлемым временем продолжительности инкубации для всех исследуемых препаратов было выбрано 60 минут, а приемлемым уровнем исходной концентрации для цефтриаксона, цефепима и цефпирома – 100 мг/мл.

Таблица 22 – Содержание исследуемых веществ в эритроцитарных носителях

Антибиотик	Время инкубации, мин	Исходная концентрация, мг/мл	Найдено вещества, %
Цефтриаксон	15	25	15,24
		50	17,39
		100	22,31
		125	23,87
	30	25	20,45
		50	26,56
		100	27,62
		125	28,14
	60	25	24,39
		50	28,91
		100	30,87
		125	30,88
	75	25	24,41
		50	28,95
		100	30,85
		125	30,87
Цефепим	15	25	13,25
		50	15,69
		100	21,41
		125	22,45
	30	25	17,01
		50	22,28
		100	23,39
		125	24,53
	60	25	22,12
		50	26,70
		100	26,98
		125	27,01
	75	25	22,41
		50	26,70
		100	27,01
		125	27,02
Цефпиром	15	25	10,12
		50	12,36
		100	18,44
		125	20,86
	30	25	17,35
		50	19,19
		100	20,93
		125	21,95
	60	25	18,98
		50	22,75
		100	23,02
		125	23,02
	75	25	19,00
		50	22,79
		100	23,03
		125	23,03

Таблица 22 – Содержание исследуемых веществ в инкубационной жидкости

Антибиотик	Время инкубации, мин	Исходная концентрация, мг/мл	Найдено вещества, %
Цефтриаксон	15	25	83,76
		50	81,61
		100	76,69
		125	75,13
	30	25	78,55
		50	70,51
		100	69,29
		125	70,86
	60	25	74,61
		50	68,16
		100	67,06
		125	68,12
	75	25	74,59
		50	70,05
		100	68,15
		125	68,13
Цефепим	15	25	85,75
		50	83,31
		100	77,59
		125	76,55
	30	25	81,99
		50	76,24
		100	75,34
		125	74,47
	60	25	76,88
		50	72,93
		100	72,28
		125	71,99
	75	25	76,59
		50	72,32
		100	71,99
		125	71,98
Цефпиром	15	25	88,88
		50	86,64
		100	80,56
		125	78,14
	30	25	81,65
		50	80,33
		100	78,90
		125	77,05
	60	25	80,02
		50	76,77
		100	75,64
		125	75,98
	75	25	80,01
		50	76,21
		100	75,97
		125	75,97

7.3. Изучение особенностей распределения исследуемых соединений в организме здоровых теплокровных животных и в организме животных с моделированным токсическим поражением почек

Тестирование на группе здоровых мышей. Исследование для каждого анализируемого лекарственного средства осуществляли на 5 группах из 5 здоровых белых мышах обоего пола массой 25-35 г, ранее не привлекавшихся к тестированиям. Требования, предъявляемые к содержанию и кормлению, должны создать условия для нормальной жизнедеятельности лабораторных животных.

Испытуемое лекарственное средство в количестве LD₅₀ диссолировали изотоническим раствором хлористого натрия 0,9% для инъекций. Температура вводимого препарата в хвостовую вену составляла 36±1°C. Тест-доза содержалась в объеме 0,5 мл испытуемого раствора, который вводили в хвостовую вену животного со скоростью 0,1 мл в секунду (ОФС.1.2.4.0004.15). Испытание продолжали после истечения 2 часов, с момента введения анализируемого лекарственного препарата. Исследуемых животных умерщвляли путем ингаляционного воздействия двуокиси углерода в установке для эвтаназии АЕ0904. Трупы животных подвергались анатомическому вскрытию, аналогичные ткани органов и биологические жидкости, полученные от 5 лабораторных мышей внутри каждой группы, объединяли и проводили анализ на обнаружение и количественное определение исследуемого препарата. Параллельно исследование проводили с органами и биожидкостями 5 животных контрольной группы по той же методике. Далее проводили изолирование, очистку и количественное определение. Результаты распределения анализируемых веществ в организме теплокровных животных представлены в таблицах 25-27 (приложение).

Тестирование на группе мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂. Исследование для каждого анализируемого лекарственного средства, проводили на 5 группах из 5 здоровых белых мышах обоего пола массой 25-35 г, которые ранее не привлекались к использованию в экспериментах. Предварительно, за 48 часов до начала эксперимента, моделировали токсическое поражение почек путем однократного

внутрижелудочного введения ртути дихлорида в дозе 2 мг/кг. Далее проводили испытание по схеме, указанной выше в разделе «Тестирование на группе здоровых мышей». Результаты распределения анализируемых веществ в организме теплокровных животных с моделированным токсическим поражением почек представлены в таблицах 28-30 (приложение).

Изолирование. Определенное количество диспергированных тканей органов или биожидкостей от 5 мышей в каждой из групп двукратно настаивали с изолирующей смесью состава ацетон-вода (5:5) при массовом соотношении изолирующей смеси и биологического объекта 2:1. В случае, если масса биологического объекта была менее 2 г, масса изолирующей смеси составляла 4 г. Продолжительность каждого настаивания – 30 минут. Первое и второе извлечения объединяли.

Очистка методом ТСХ. 0,3 мл каждого полученного извлечения количественно наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» с УФ-индикатором ПТСХ-АФ-А-УФ. Также на пластину наносили стандартные растворы, соответствующие определяемому препарату. 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 цефпирома 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. Хроматограммы проявляли в УФ-свете (254 нм). Определяемые препараты идентифицировали по величине R_f и R_s соответствующему веществу стандарту.

Количественное определение методом УФ-спектрофотометрии. Для дальнейшего анализа анализируемое вещество по площади светящегося пятна в УФ-свете вырезали из хроматограммы и элюировали из сорбента смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) 15 минут. Исследовали особенности поглощения каждого элюта на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне контроля в

кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при соответствующих длинах волн для каждого анализируемого вещества.

По величине полученной оптической плотности элюатов, измеренных на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне контроля в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при соответствующих длинах волн определяли количественное содержание цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в каждом органе и биожидкостях. Расчет количественного содержания осуществляли, используя соответствующие уравнение калибровочного графика для каждого вещества.

7.4. Изучение особенностей распределения исследуемых соединений, включенных в эритроцитарные носители, в организме здоровых теплокровных животных и в организме животных с моделированным токсическим поражением почек

Испытания на здоровых мышах, которым вводили эритроцитарные носители (ЭН).

Исследование для каждого анализируемого лекарственного средства осуществляли на 5 группах из 5 здоровых белых мышей обоего пола массой 25-35 г, ранее не привлекавшихся к тестированиям. Требования, предъявляемые к содержанию и кормлению, должны создать условия для нормальной жизнедеятельности лабораторных животных.

Объем полученных эритроцитарных носителей с соответствующим антибиотиком по методике, описанной в п 7.1., довели до 0,5 мл раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций. Полученную суспензию из эритроцитарных носителей, нагревали до температуры $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ и вводили внутривенно. Тест-дозу вводили в хвостовую вену животного со скоростью 0,1 мл в секунду. После прохождения 2 часов, после введения испытуемого препарата мышей подвергали эвтаназии ингаляцией двуокисью углерода в установке для эвтаназии АЕ0904. Группы животных вскрывали, одинаковые органы и биожидкости, взятые от 5 животных внутри каждой группы, объединяли и проводили исследование на обнаружение и количественное определение цефтриаксона. Параллельно

исследование проводили с органами и биожидкостями 5 животных контрольной группы по той же методике.

Далее проводили изолирование, очистку методом ТСХ и количественно определяли методом УФ-спектрофотометрии по методике, указанной в разделе 6.3. Результаты распределения анализируемых веществ вводимых в эритроцитарных носителях в организме теплокровных животных представлены в таблицах 31-33 (приложение).

Испытания на мышах с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl_2 , которым вводили эритроцитарные носители (ЭН).

Испытание проводили на 5 группах из 5 здоровых белых мышах обоего пола массой 25-35 г, которые ранее не использовались в экспериментах. Предварительно за 48 часов до начала эксперимента моделировали токсическое поражение почек путем однократного внутривентрикулярного введения ртути дихлорида в дозе 2 мг/кг. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Проводили процедуру включения антибиотика в эритроцитарные носители по вышеописанной методике в п 7.1. После прохождения 2 часов, после введения испытуемого препарата, мышей подвергали эвтаназии ингаляцией двуокисью углерода в установке для эвтаназии АЕ0904. Трупы животных вскрывали, одинаковые органы и биожидкости, взятые от 5 животных внутри каждой группы, объединяли и проводили исследование на обнаружение и количественное определение цефтриаксона. Параллельно исследование проводили с органами и биожидкостями 5 животных контрольной группы по той же методике.

Далее проводили изолирование, очистку методом ТСХ и количественно определяли методом УФ-спектрофотометрии по методике, указанной в разделе 6.3. Результаты распределения анализируемых веществ, вводимых в эритроцитарных носителях, в организме теплокровных животных с моделированным токсическим поражением почек, представлены в таблицах 34-36 (приложение).

7.5. Создание условия сохраняемости и получение результатов

С целью определения сроков давности гибели теплокровных организмов от отравления анализируемыми веществами необходимо проанализировать сроки их сохранения в ткани трупного материала (печени). С этой целью были моделированы четыре сезона окружающей среды с температурными диапазонами: 20-22 °С, 8-10 °С, 1-2 °С и -10-12 °С в течении срока сохраняемости анализируемых веществ – 190 дней [9].

Для осуществления целей исследования готовили имитируемые образцы в емкостях вместимостью 500 мл каждая, изготовленных из темного стекла, для минимизации внешнего светового воздействия. В подготовленные емкости помещали по 500 г мелкодиспергируемой ткани печени и вносили точно известное количество антибиотика из расчета 100 мг (для цефепима и цефпирома), 200 мг (для цефтриаксона) на 50 г биологического материала. Полученные имитируемые смеси подвергались скрупулёзному перемешиванию до обеспечения однородности полученной массы, емкости закрывали пленкой полиэтиленовой и пленку закрепляли резинкой для предотвращения случайного срыва. Для создания аэробных условий сохранения биологического материала в пленке проделывали по 2-3 отверстия диаметром 1-2 мм. Для исключения ошибочного результата параллельно была приготовлена группа проверочных смесей мелкоизмельченного трупного материала без содержания исследуемых веществ для соответствующего исследуемого лекарственного препарата.

При каждом температурном интервале сохранения помещались имитируемый и проверочный образец. Образцы подвергались скрупулёзному перемешиванию каждые 24 часа.

Сохраняемые имитируемые смеси подвергались анализу через 1,5 часа после начала эксперимента, спустя трое суток после начала эксперимента, а дальше происходило увеличение или уменьшение временного интервала анализа в зависимости от результатов предыдущего анализа. Проверочный образец подвергался параллельному исследованию при каждом анализе.

В каждом опыте из емкостей с имитируемым и проверочными образцами изымали по 25 г трупной печени. Образцы полученного биоматериала настаивали

двукратно по 30 минут с 50 мл смеси ацетон-вода (5:5), периодически производя перемешивание. Полученные вытяжки после первого и второго настаивания объединяли и подвергали скрупулёзному перемешиванию. Очистку полученных извлечений проводили методом тонкослойной хроматографии.

Для проведения очистки из совместной вытяжки отбирали 1,5 мл, помещали в фарфоровую чашку для выпаривания вместимостью 25 мл и раствор подвигали процессу испарения в вытяжном шкафу с принудительной вентиляцией при комнатной температуре. Остаток, полученный после процесса выпаривания, растворяли в 0,3 мл воды очищенной и наносили без потери вещества 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. Далее проводили непосредственно процесс хроматографирования. 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 цефпирома первый раз хроматографирование также проводили с использованием ацетона в качестве подвижной фазы, а второй раз – применяя подвижную фазу состава ацетон-вода (6:4). Процедуру хроматографирования проводили в хроматографических камерах с внутренним объемом около 600 см³ в присутствии веществ свидетелей.

Аналитические хроматографические пластины по окончании хроматографии подвергли высушиванию в токе воздуха при комнатной температуре и проявляли в УФ-свете (254 нм).

После хроматографирования методом тонкослойной хроматографии по выше приведенной схеме участок хроматографической пластины с пятном анализируемого вещества, соответствующего стандарту, вырезали, помещали в стеклянную пробирку, для предотвращения взаимодействия диметилсульфоксида и химически нестойких пробирок, проводили процесс элюирования смесью вода-диметилсульфоксид (5:5) в течение 15 минут. Анализировали особенность поглощения полученного элюата на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 на фоне полученных по той же схеме растворов из проверочных

образцов в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм при соответствующих длинных волн: 275,0 нм (для цефтриаксона), 270,2 нм (для цефпирома) и 263,8 нм (для цефепима). Определение количественного содержания действующего вещества проводили, используя соответствующие уравнение калибровочного графика для каждого вещества.

Результаты сохраняемости цефтриаксона, цефепима и цефпирома в биологическом материале представлены на рис. 29-31.

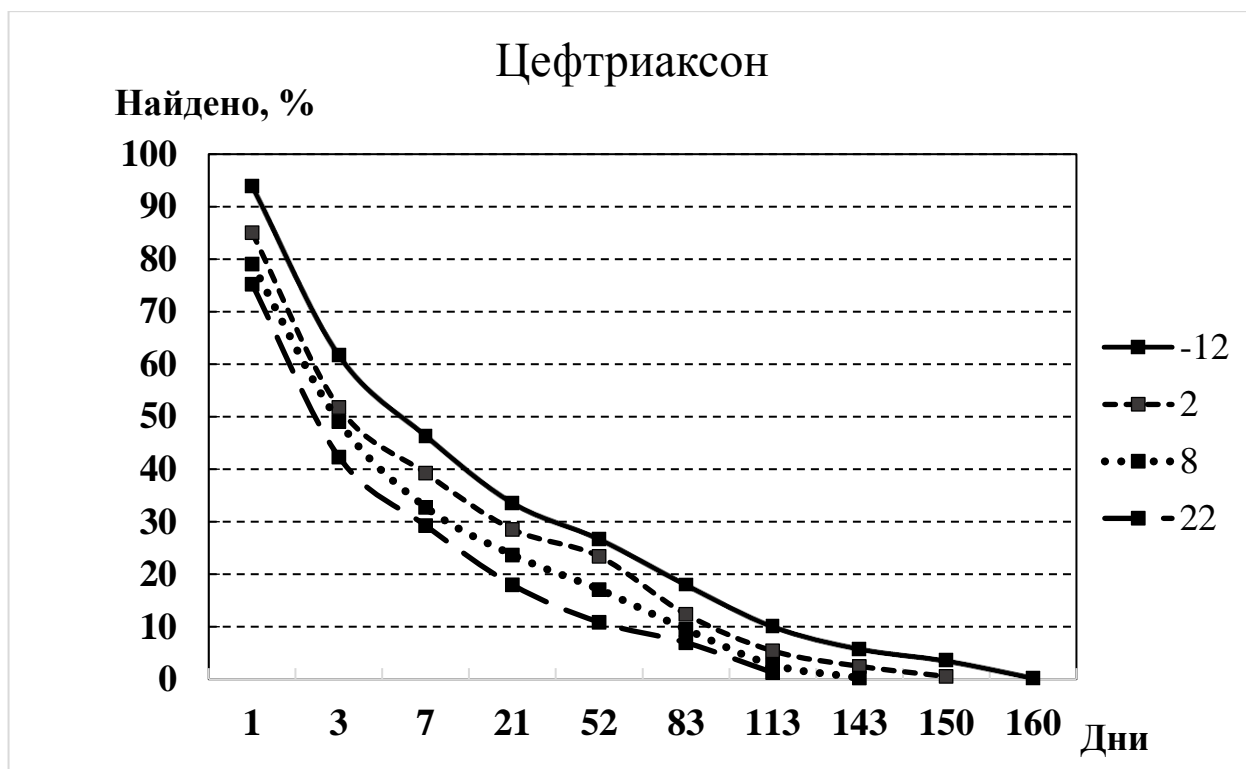


Рисунок 29 – Зависимость количества найденного цефтриаксона (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

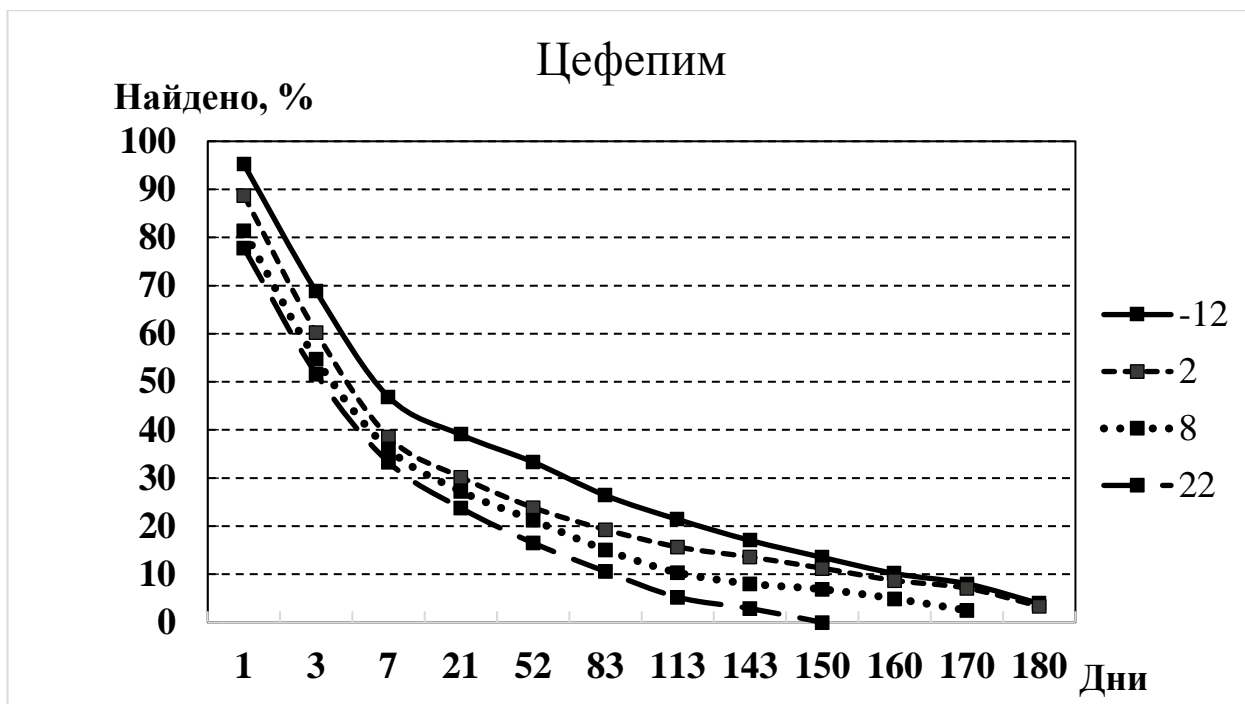


Рисунок 30 – Зависимость количества найденного цефепима (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

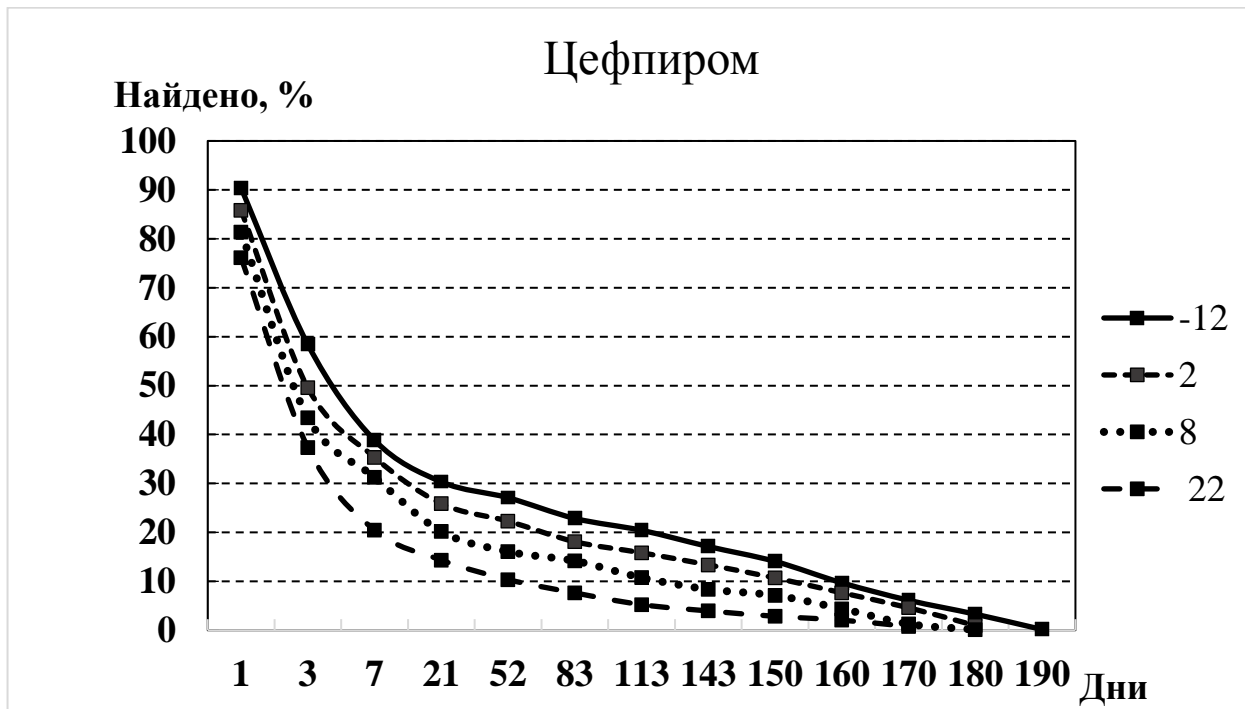


Рисунок 31 – Зависимость количества найденного цефпирома (%) в модельных смесях с трупной печенью от времени сохраняемости (дни) при разной температуре

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7.

1. Из экспериментально полученных данных можно видеть, что время продолжительности инкубации значительно не оказывает влияния на степень включения цефтриаксона, цефепима и цефпиром в эритроцитарные носители, но при заметном увеличении концентрации увеличивалось и содержание данных лекарственных препаратов. Приемлемым временем продолжительности инкубации для всех исследуемых препаратов было выбрано 60 минут, а приемлемым уровнем исходной концентрации для цефтриаксона, цефепима и цефпиром – 100 мг/мл.

2. Было выявлено присутствие рассматриваемых веществ в неизменном виде в органах и биожидкостях испытуемых животных. Как видно из полученных данных, наибольшая концентрация цефтриаксона, цефепима и цефпиром через 2 часа после внутривенного введения группе здоровых мышей в свободном виде наблюдалась в мочевом пузыре с мочой, а у испытуемой группы с моделированным токсическим поражением почек максимальная концентрация наблюдалась в сердце и крови.

3. При введении исследуемого препарата, включенного в эритроцитарные носители, пиковая концентрация препаратов у группы здоровых мышей была обнаружена в сердце и мочевом пузыре с мочой, а в группе животных с моделированным токсическим поражением почек максимум концентрации наблюдался в сердце и крови.

Можно сделать вывод о том, что при заболеваниях почек замедляется процесс выведения данных лекарственных препаратов, однако направленный транспорт анализируемых антибиотиков в эритроцитарных носителях позволяет доставить наибольшее количество антибиотика в очаг заболевания.

4. Сохраняемость анализируемых лекарственных препаратов изучалась в четырех различных температурных условиях: -12°C, 2°C, 8°C и 22°C. 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.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ:

1. Рассмотрены особенности спектров исследуемых веществ в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Определены точки экстремума цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в растворителях различной химической природы. Выявлена оптимальная среда растворения для изучаемых лекарственных препаратов – диметилсульфоксид-вода (5:5).

2. Изучено хроматографическое поведение цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в тонких слоях нормальнофазового и обращеннофазового сорбента, а также при использовании обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления.

Показано, что оптимальной подвижной фазой для нормальнофазовой ТСХ для цефтриаксона – ацетон-вода (8:2), а для цефепима и цефпиромы – ацетон-вода (6:4). Для обращеннофазовой ТСХ для всех анализируемых веществ оптимальной подвижной фазой является – буферный раствор pH2,87-ацетонитрил (8:2). В качестве подвижной фазы при использовании обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления доказано целесообразное использование мобильной фазы состава ацетон-вода (5:5).

3. Разработана современная методика идентификации и количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведена процедура валидации предложенной методики по стандартным параметрам валидации.

4. Исследованы особенности изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпиромы из материала биологического происхождения. В качестве приемлемых условий изолирования для всех анализируемых веществ были подобраны следующие условия: изолирующий агент – ацетон-вода (5:5), время настаивания – 30 минут, кратность настаивания – двукратно, количество изолирующего агента – в два раза превышает биологический материал.

В качестве очистки вытяжек находит обоснованное использование метод обращеннофазовой макроколоночной жидкостной хроматографии с применением низкого давления.

5. Разработана методика получения эритроцитарных носителей. Установлено оптимальное время инкубации эритроцитарных носителей с исследуемыми лекарственными препаратами – 60 минут, а концентрации лекарственных препаратов – 100 мг/мл. Для очистки применяли разработанную схему методом нормальнофазовой ТСХ, а количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии в среде диметилсульфоксид-вода (5:5).

6. Исследована особенность распределения цефтриаксона, цефепима и цефпиром в организме теплокровных животных при различных технологиях введения. Было определено, что наибольшая концентрация исследуемого препарата, через 2 часа после внутривенного введения группе здоровых мышей в свободном виде, наблюдалась в мочевом пузыре с мочой, а у испытуемой группы с моделированным токсическим поражением почек максимальная концентрация наблюдалась в сердце и крови. При введении исследуемого препарата, включенного в эритроцитарные носители, пиковая концентрация препаратов у группы здоровых мышей была обнаружена в сердце и мочевом пузыре с мочой, а в группе животных с моделированным токсическим поражением почек максимум концентрации наблюдался в сердце и крови. Это объясняется тем, что при наличии почечной патологии снижается скорость выведения данных лекарственных препаратов.

7. Исследованы особенности сохранения цефтриаксона, цефепима и цефпиром в трупном материале при различном температурном режиме хранения –12°C, 2°C, 8°C и 22°C. Все исследуемые соединения при всех изученных температурах можно обнаружить в течении 1/3 года. Продолжительность сохранности увеличивается в линии цефтриаксон-цефепим-цефпиром.

Практические рекомендации. В настоящее время зарегистрированы случаи летального исхода от аллергической реакции немедленного типа на антибактериальные препараты из группы цефалоспоринов. Однако методики для современного определения исследуемых веществ в судебно-медицинской экспертизе отсутствуют. Из этого следует, что методики, разработанные в данном диссертационном труде, можно применять в работе бюро, что имеет огромное практическое значение для работы данных организаций.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Интересным для продолжения исследования остается вопрос разработки и применения методики введения антибактериальных препаратов в эритроцитарных носителях в организм человека с целью снижения аллергического воздействия и увеличения концентрации в очаге воспаления.

Список использованной литературы:

1. Агеев, В. А. Проблемы устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения [Текст] / В. А. Агеев, А. В. Лазарева, С. В. Сидоренко // Фарматека. – 2015. – № 14. – С. 9–16.
2. Аносова, Ю. А. Направленный транспорт антибиотиков в лечении острого гнойного пиелонефрита у экспериментальных животных : автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Ю. А. Аносова. – Саратов, 2010. – 23 с.
3. Антибактериальная терапия : практ. рук. [Текст] / под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – М.: Фармединфо, 2000. – 192 с.
4. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет [Текст] / под ред. Н. Д. Ющука, И. П. Балмасовой, В. Н. Царева. – М. : Практик. медицина, 2012. – 232 с.
5. Безъязычная, А. А. Разработка лабораторной технологии получения клеточной (эритроцитарной) формы цефтриаксона и экспериментальное обоснование целесообразности ее использования при необструктивном пиелонефрите [Текст] / О.И. Братчиков, Г.В. Сипливый, В.Ю. Ипатов, А.А. Безъязычная, А.В. Кукурека, Л.Е. Сипливая // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 2. – С. 34–38.
6. Безъязычная, А. А. Определение цефепима в биологическом материале методом электронной спектрофотометрии [Текст] // Биотехнология и биомедицинская инженерия : сб. науч. тр. по материалам X Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием, посвящ. 25-летию биотехнол. фак. и 20-летию каф. биол. и хим. технологии. – Курск, 2017. – С. 375–377.
7. Безъязычная, А. А. Определение цефтриаксона в биологическом материале [Текст] / А. А. Безъязычная, В. К. Шорманов, Л. Е. Сипливая // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2018. – № 1. – С. 128–132.
8. Безъязычная, А. А. Особенности изолирования цефтриаксона из биологического материала [Текст] / А. А. Безъязычная, В. К. Шорманов,

Л. Е. Сипливая // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : материалы 7-й Междунар. науч.-метод. конф. "Фармообразование-2018" / Воронеж. гос. ун-т. – Воронеж, 2018. – С. 376–379.

9. Безъязычная, А. А. Сохраняемость некоторых антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов в биологическом материале [Текст] / А. А. Безъязычная, В. К. Шорманов, Л. Е. Сипливая // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 1. – С. 213–218.

10. Безъязычная, А.А. Оптимизация процедуры изолирования цефепима из биологического материала [Текст] / А.А. Безъязычная, В.К. Шорманов, Л.Е. Сипливая // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. –2019. – №3. – С. 173–176. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-173-176>.

11. Белобородов, В. Б. Новые Российские национальные рекомендации по нозокомиальной пневмонии [Текст] // Болезни и антибиотики. – 2009. – № 2 (2). – С. 46–52.

12. Березняков, И. Г. Цефепим сегодня и завтра [Текст] // Болезни и антибиотики. – 2011. – № 2 (5). – С. 65–72.

13. Богданов, М. Б. Алгоритмы и организация антибиотикотерапии : рук. для врачей [Текст] / М. Б. Богданов, Т. В. Черненькая. – М. : Вилар-М, 2004. – 224 с.

14. Волосовец, А. П. Пероральные цефалоспорины в практике современной педиатрии [Текст] // Новости медицины и фармации. Антимикроб. и противовирус. терапия. – 2008. – № 8. – С. 236.

15. Гараев, Р. С. Изыскание новых лекарственных средств в рядах фосфорорганических соединений [Текст] // Казан. мед. журн. – 2008. – № 5. – С. 585–590.

16. Горчакова, Н. А. Клиническая фармакология антибиотиков группы цефалоспоринов [Текст] // Therapia. – 2008. – № 5 (26). – С. 69–91.

17. Грэхам-Смит, Д. Г. Оксфордский справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии [Текст] / Д. Г. Грэхам-Смит, Дж. К. Аронсон. – М. : Медицина, 2000. – 744 с.

18. Дмитриева, Н. В. Цефпиром. Обзор литературы [Текст] // Педиатр. фармакология. – 2014. – № 5. – С. 77–81.

19. Ержанов, О. Н. Введение антибиотиков в клеточной взвеси крови при плазмаферезе в лечении острых абсцессов легких, осложненных пиопневмотораксом [Текст] / О. Н. Ержанов, Д. А. Швецов, Б. А. Даниярова // Тр. 3-го Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». – М., 1996. – С. 116.

20. Ивонин, А.Г. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы [Текст] / А. Г. Ивонин, Е. В. Пименов, В. А. Оборин [et al.] // Известия Коми научного центра УрО РАН. – 2012. – Vol. 1. – № 9.

21. Идентификация цефтриаксона методом электронной спектrophотометрии [Текст] / В. К. Шорманов, Л. Е. Сипливая, А. А. Безъязычная, Д. А. Герасимов // Биотехнология и биомедицинская инженерия : сб. материалов IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Курск : КГМУ, 2016. – С. 108–112.

22. Изменения свойств форменных элементов крови под влиянием экстракорпоральной обработки диметилсульфоксидом и некоторыми иммуномодуляторами [Текст] / Н. А. Пятаев [и др.] // Медицинские проблемы жизнедеятельности организма : материалы X науч.-практ. конф. молодых ученых МГУ им. Н. П. Огарева. – Саранск, 2005. – С. 48–53.

23. Илюкевич, Г. В. Антимикробная химиотерапия в хирургии [Текст] / Г. В. Илюкевич. – Минск : Беларус. наука, 2003. – 150 с.

24. Катцунг, Б. Г. Базисная и клиническая фармакология : учеб. Пособие [Текст] / Б. Г. Катцунг. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Бином ; СПб : Диалект, 2007. – Т. 1. – 648 с.

25. Клиническая фармакология : учебник [Текст] / под ред. В. Г. Кукеса, Д. А. Сычева. – 5-е изд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 1024 с.

26. Коломиец, Л. Антибиотикотерапия. По материалам I Международного медико-фармацевтического конгресса «Антибиотикотерапия-2007» [Текст] // Мед. аспекты здоровья женщин. – 2007. – № 5 (8). – С. 103–109.
27. Костюченко, А. Л. Интенсивная терапия послеоперационной раневой инфекции и сепсиса [Текст] / А. Л. Костюченко, А. Н. Бельских, А. Н. Тулупов. – СПб. : Фолиант, 2000. – 447 с.
28. Люльман, Х. Наглядная фармакология : пер. с нем. [Текст] / Х. Люльман, К. Мор, Л. Хайн. – М. : Мир, 2008. – 383 с.
29. Машковский, М. Д. Лекарственные средства [Текст] / М. Д. Машковский. – 16-е изд. – М. : Новая волна, 2012. – 1216 с.
30. Парамонова, Н. С. Клиническая фармакология : учеб. пособие [Текст] / Н. С. Парамонова, О. Ф. Харченко. – Минск, 2012. – 320 с.
31. Провоторов, В. М. Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств [Текст] / В. М. Провоторов, Г. А. Иванова // Клинич. медицина. – 2009. – № 9. – С. 4–8.
32. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств [Текст] / под ред. Ю. Ф. Крылова. – М. : РЛС, 2001. – 1504 с.
33. Сизенцов, А. Н. Антибиотики и химиотерапевтические препараты [Текст] / А. Н. Сизенцов, И. А. Мисетов, И. Ф. Каримов. – Оренбург, 2012. – 489 с.
34. Создание новой лекарственной формы антрациклинового антибиотикаминоксантрона путем включения его в эритроциты [Текст] / Т. А. Вуймо [и др.] // Молекуляр. медицина. – 2008. – № 2. – С. 37–43.
35. Спектрофотометрическое определение цефтриаксона по поглощению в среде ацетонитрил-вода (8:2) [Текст] / В. К. Шорманов, Л. Е. Сипливая, А. А. Безъязычная, Д. А. Герасимов // Биотехнология и биомедицинская инженерия : сб. материалов IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Курск : КГМУ, 2016. – С. 112–117.
36. Справочник Видаль 2018 [Текст] / под ред. Е. А. Толмачевой. – М., 2018. – 1240 с.

37. Страчунский, Л. С. Сравнительная активность цефепима и других антибиотиков в отношении нозокомиальных грамотрицательных возбудителей в России [Текст] / Л. С. Страчунский, Г. К. Решедько, М. В. Эдельштейн // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2003. – № 3 (5). – С. 110–116.

38. Сэнфордский справочник: антимикробная терапия [Текст] / Д. Н. Гилберт [и др.]. – М. : ЭКСМО, 2009. – 288 с.

39. Харкевич, Д. А. Фармакология : учебник [Текст] / Д. А. Харкевич. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 908 с.

40. Шатунов, С. М. Инъекционные цефалоспорины при лечении тяжелых инфекций различной локализации: алгоритм выбора [Текст] // Лечебное дело. – 2003. – № 1. – С. 34–42.

41. Экспериментальное обоснование использования клеточных носителей для направленного транспорта антибиотиков и фторхинолонов при необструктивном пиелонефрите [Текст] / А. И. Лазарев [и др.] // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. – 2009. – № 1. – С. 58–62.

42. Экстракорпоральное насыщение форменных элементов крови антибиотиками для направленного транспорта [Текст] / О. В. Золотухин [и др.] // Вестн. ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация. – 2009. – № 1. – С. 62–66.

43. A degradation study of cefepime hydrochloride in solutions under various stress conditions by TLCdensitometry [Текст] / M. Dąbrowska [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2015. – Vol. 29, Iss. 3. – P. 388–395.

44. A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium [Текст] / M. L. Manfio [et al.] // Brazil. J. Pharmaceut. Sci. – 2013. – Vol. 49, Iss. 4. – P. 753–762.

45. A new extractive spectrophotometric method for the determination of gatifloxacin and cefotaxime sodium in pure and pharmaceutical dosage forms [Текст] / R. Sayed [et al.] // Oriental J. Chemistry. – 2012. – Vol. 28, No 2. – P. 639–650.

46. A Randomized, Double-blind Trial Comparing Ceftobiprole Medocaril with Vancomycin Plus Ceftazidime for the Treatment of Patients with Complicated Skin and

Skin-structure Infections [Текст] / G. J. Noel [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, Iss. 5. – P. 647–655.

47. A simple ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of 15 antibiotics in plasma [Текст] / S. Lefevre [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2017. – Vol. 1065–1066. – P. 50–58.

48. A Validated RP – HPLC Method for Simultaneous Estimation of Cefixime and Cloxacillin in Tablets [Текст] / G. Rathinavel [et al.] // Chemistry. – 2008. – Vol. 5, No 3. – P. 648–651.

49. A Validated Stability Indicating HPTLC Method for Determination of Cephalexin in Bulk and Pharmaceutical Formulation [Текст] / R. M. Jeswani [et al.] // Int. J. Pharm. Tech Res. – 2009. – Vol. 1, Iss. 3. – P. 527–536.

50. Ali Ahmed, S. M. New spectrophotometric method for determination of cephalosporins in pharmaceutical formulations [Текст] / S. M. Ali Ahmed, A. A. Elbashir, H. Y. Aboul-Enein // Arab. J. Chem. – 2015. – Vol. 8. – P. 233–239.

51. Ali, T. In vitro interaction study of cefixime with diclofenac sodium, flurbiprofen, mefenamic acid and tiaprofenic acid [Текст] / T. Ali, O. A. Mohiuddin // J. Chem. Pharma Res. – 2012. – Vol. 4, Iss. 6. – P. 2911–2918.

52. Analysis of cephalosporin antibiotics [Текст] / S. R. El-Shaboury [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 45, Iss. 1. – P. 1–19.

53. Analytical method development and validation of cefixime and dicloxacillin tablets by RP-HPLC [Текст] / K. Kathiresan [et al.] // Rasayan J. Chem. – 2009. – Vol. 2, Iss. 3. – P. 588–592.

54. André, M. A survey of public knowledge and awareness related to antibiotic use and resistance in Sweden [Текст] / M. André, A. Vernby, J. Berg [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2010. – Vol. 65. – № 6. – P. 1292-1296.

55. Antibiotic toxicity and absorption in zebrafish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / F. Zhang [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, Iss. 5. – e0124805.

56. Argekar, A. P. Simultaneous determination of Cephalexin and Carbocisteine from capsules by reverse phase high performance liquid chromatography (RP - HPLC) [Текст] / A. P. Argekar, S. V. Raj, S. U. Kapadia // Analytical Letters. – 1997. – Vol. 30, Iss. 4. – P. 821–831.

57. Avery, L. M. Assessment of the In Vivo Efficacy of WCK 5222 (Cefepime-Zidebactam) against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Neutropenic Murine Lung Infection Model [Текст] / L. M. Avery, K. Abdelraouf, D. P. Nicolau // Antimicrob. Agents Chemotherapy. – 2018. – Vol. 62, Iss. 11. – DOI: [10.1128/AAC.00948-18](https://doi.org/10.1128/AAC.00948-18).

58. Bhagawati, S. T. Comparative evaluation of disintegrants by formulating cefixime dispersible tablets [Текст] / S. T. Bhagawati, S. N. Hiremath, S. A. Sreenivas // India J. Pharma Edu Res. – 2005. – Vol. 39. – P. 194–197.

59. Bhushan, R. Separation and Identification of Some Cephalosporin's on Impregnated TLC Plates [Текст] / R. Bhushan, V. Parshad // Biomed. Chromatogr. – 1996. – Vol. 10, Iss. 5. – P. 258–260.

60. Bioanalytical Method Validation : Guidance for Industry [Электронный ресурс] / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, CDER, CVM. – May 2018. – URL: - Режим доступа: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../UCM070107.pdf>

61. Cefepime plasma concentrations and clinical toxicity: a retrospective cohort study [Текст] / T. Huwyler [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23, Iss. 7. – P. 454–459.

62. Cefepime vs other antibacterial agents for the treatment of *Enterobacter* species bacteremia [Текст] / M. J. Siedner [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 58, Iss. 11. – P. 1554–1563.

63. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland [Текст] / K. Zurfluh [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79, Iss. 9. – P. 3021–3026.

64. Choma, I. M. TLC Separation of cephalosporins: searching for better selectivity [Текст] // J. liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2007. – Vol. 30, Iss. 15. – P. 2231–2244.

65. Classification of oral cephalosporins. A matter for debate [Текст] / J. D. Williams [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2001. – Vol. 17, Iss. 6. – P. 443–450.

66. Comparative Analysis of the Antibacterial Activity of a Novel Peptide Deformylase Inhibitor, GSK1322322 [Текст] / K. O'Dwyer [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, Iss. 5. – P. 2333–2342.

67. Convenient solid phase extraction of cephalosporins in milk using a molecularly imprinted polymer [Текст] / C. Quesada-Molina [et al.] // Food Chem. – 2012. – Vol. 135, Iss. 2. – P. 775–779.

68. Dabrowska, M. Simultaneous Identification and Quantitative Analysis of Eight Cephalosporins in Pharmaceutical Formulations by TLC-Densitometry [Текст] / M. Dabrowska, M. Starek, S. Pikulska // J. Planar. Chromatogr. Mod TLC. – 2011. – Vol. 24. – P. 23–29.

69. Damodaran, S.E. Telavancin: A novel lipoglycopeptide antibiotic [Текст] / S.E. Damodaran, S. Madhan // J Pharmacol Pharmacother. – 2011. – Vol. 2. – № 2. – P. 135–137.

70. Deana, C. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA USA, Determination HPLC Determination of Impurities in the Cephalosporin Antibiotic Cefepime by Ion Chromatography and HPLC [Текст] / C. Deana // Dionex Application note, 2012. – № 4. – P. 113–119.

71. Determination of a new oral cephalosporin, S-1090, in human plasma and urine by direct injection high performance liquid chromatography with ultraviolet detection and column switching [Текст] / H. Fujitomo [et al.] // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 1999. – Vol. 728, Iss. 1. – P. 125–131.

72. Determination of avibactam and ceftazidime in human plasma samples by LC–MS [Текст] / H. Sillén [et al.] // Bioanalysis. – 2015. – Vol. 7, Iss. 12. – P. 1423–1434.

73. Determination of ceftazidime and cefepime in plasma and dialysate-ultrafiltrate from patients undergoing continuous veno-venous hemodiafiltration by HPLC [Текст] / A. Isla [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 39, Iss. 5. – P. 996–1005.

74. Determination of ceftazidime in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic chromatography with direct sample injection [Текст] / H.-H. Yeh [et al.] // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 26, Iss. 4–5. – P. 927–934.

75. Determination of Cephalexin Monohydrate in Pharmaceutical Dosage Form by Stability-Indicating RP-UFLC and UV Spectroscopic Methods [Текст] / S. S. Panda [et al.] // Sci. Pharm. – 2013. – Vol. 81, Iss. 4. – P. 1029–1041.

76. Determination of Some Cephalosporins by Adsorptive Stripping Voltammetry [Текст] / O. A. Farghaly [et al.] // Int. J. Electrochem. Sci. – 2008. – Vol. 3. – P. 1055–1064.

77. Development and validation of a measurement procedure based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of beta-lactam antibiotic concentration in human plasma [Текст] / R. Rigo-Bonin [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2017. – Vol. 468. – P. 215–224.

78. Development and validation of a spectrofluorimetric method for the quantification of ceftriaxone in pharmaceutical formulations and plasma [Текст] / J. Shah [et al.] // Luminescence. – 2013. – Vol. 28, Iss. 4. – P. 516–522.

79. Development and Validation of High Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Ceftazidime and Sulbactam in Spiked Plasma and Combined Dosage form-Zydotam [Текст] / M. R. Siddiqui [et al.] // Am. J. Applied Sci. – 2009. – Vol. 6, Iss. 10. – P. 1781–1787.

80. Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Determination of Ceftriaxone and Cefaclor in Commercial Formulations and Biological Samples Article [Текст] / J. Shah [et al.] // J. Mexican Chem. Society. – 2013. – Vol. 574. – P. 314–320.

81. Development of a densitometric method for the determination of cephalexin as an alternative to the standard HPLC procedure [Текст] / S. A. Coran [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – Vol. 18, Iss. 1–2. – P. 271–274.

82. Development of a sensitive and quantitative UHPLC-MS/MS method to study the whole-body uptake of pharmaceuticals in zebrafish [Текст] / S. Kislyuk [et al.] // *Talanta*. – 2017. – Vol. 174. – P. 780–788.

83. Development of HPLC-UV method for analysis of cefixime in raw materials and in capsule [Текст] / H. M. Arshad [et al.] // *Jordan J. Pharma Sci.* – 2009. – Iss. 2. – P. 53–65.

84. Does the eclipse limit bacterial nucleoid complexity and cell width? [Текст] / A. Zaritsky [et al.] // *Synth. Syst. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 2, Iss. 4. – P. 267–275.

85. Effective drug targeting by erythrocytes as carrier systems [Текст] / V.S. Gopal [et al.] // *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* – 2007. – Vol. 1, Iss. 1. – C. 18–33.

86. El Solh, A. Ceftobiprole: A New Broad Spectrum Cephalosporin [Текст] // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2009. – Vol. 10, Iss. 10. – P. 1675–1686.

87. Embryo and developmental toxicity of cefazolin sodium impurities in zebrafish [Текст] / B. Chen [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8 : 403. – Published online: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00403>.

88. Fair, R. J. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century [Текст] / R. J. Fair, Y. Tor // *Perspect Medicin Chem.* – 2014. – Vol. 6. – P. 25–64.

89. FDA Drug Safety Communication: Cefepime and risk of seizure in patients not receiving dosage adjustments for kidney impairment [Электронный ресурс] // U.S. Department of Health and Human Services. – June 26, 2012. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm309661.htm> (Accessed on June 27, 2012).

90. Guidelines on Urological infections [Электронный ресурс] / M. Grabe [et al.] / European Association of Urology, 2013. – P. 106. – Режим доступа: https://uroweb.org/wp-content/uploads/18_Urological-infections_LR.pdf

91. Gut microbiome recovery after antibiotic usage is mediated by specific bacterial species [Электронный ресурс] / T. Nandi [et al.] // *BioRxiv.* – 2018. – Jun. 19, online. – Режим доступа: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/350470v1.abstract>.

92. Hamidi, M. Carrier erythrocytes: an overview [Текст] / M. Hamidi, H. Tajerzadeh // *J. Drug Deliv.* – 2003. – Vol. 10, Iss. 1. – P. 9–20.

93. Hamilton-Miller, J. M. Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins [Текст] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2008. – Vol. 31, Iss. 3. – P. 189–192.
94. Harrison, C. J. Cephalosporins: A review / C. J. Harrison, D. Bratcher [Текст] // *Pediatr. Rev.* – 2008. – Vol. 29, Iss. 8. – P. 264–267.
95. High performance liquid chromatographic analysis of cephalexin in serum and urine [Текст] / N.M. Najib [et al.] // *J. Clinial pharm. Therapeutics.* – 2008. – Vol. 12. – P. 419–426.
96. High variability among emergency departments in 3rd-generation cephalosporins and fluoroquinolones use for community-acquired pneumonia [Текст] / E. Batard [et al.] // *Infection.* – 2015. – Vol. 43, Iss. 6. – P. 681–689.
97. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery [Текст] / M. Attimarad [et al.] // *Pharm. Methods.* – 2011. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 71–75.
98. Hiremath, B. Development and validation of spectrophotometric methods for determination of ceftazidime in pharmaceutical dosage forms [Текст] / B. Hiremath, B. H. Mruthyunjayaswamy // *Acta Pharm.* – 2008. – Vol. 58, Iss. 3. – P. 275–285.
99. HPTLC assay of cephalexin and cefaclor in pharmaceuticals [Текст] / D. Agbaba [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 1998. – Vol. 12, Iss. 3. – P. 133–135.
100. Hussein, R. F. Determination of cephalexin level and stability in human plasma by fully validated rapid HPLC analysis [Текст] / R. F. Hussein, M. M. Hammami // *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* – 2014. – Vol. 3, Iss. 12. – P. 20–31.
101. In vitro Activity of TD-1792, a Multivalent Glycopeptide-cephalosporin Antibiotic, Against 377 Strains of Anaerobic Bacteria and 34 Strains of *Corynebacterium* Species [Текст] / K. L. Tyrrell [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56, Iss. 4. – P. 2194–2197.
102. In vitro assessment of the formation of ceftriaxone-calcium precipitates in human plasma [Текст] / H.-R. Schmutz [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 100, Iss. 6. – P. 2300–2310.

103. Investigations of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* [Текст] / C. Tollnick [et al.] // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 86. – P. 1–45.

104. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from UK river water [Текст] / H. Dhanji [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66, Iss. 3. – P. 512–516.

105. Jiang, E. Determination of ceftazidime and impurities using high performance liquid chromatography [Текст] / E. Jiang, C. Hu // *Se Pu.* – 2008. – Vol. 26, Iss. 1. – P. 75–79.

106. Jin, H.-E. Recent bioanalytical methods for quantification of third-generation cephalosporins using HPLC and LC-MS(/MS) and their applications in pharmacokinetic studies [Текст] / H.-E. Jin, S.-E. Jin, H.-J. Maeng // *Biomed. Chromatogr.* – 2014. – Vol. 28, Iss. 11. – P. 1565–1587.

107. Johannesson, H. Dimethylsulfoxide binding to globular proteins: a nuclear magnetic relaxation dispersion study [Текст] / H. Johannesson, V. Denisov, B. Halle // *Protein Sci.* – 1997. – Vol. 6, Iss. 8. – P. 1756–1763.

108. Johnson, V. M. Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [Текст] / V. M. Johnson, J. P. Allanson, R. C. Causon // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci Appl.* – 2000. – Vol. 740, Iss. 1. – P. 71–80.

109. Joshi, S. HPLC Separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples [Текст] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 28, Iss. 5. – P. 795–809.

110. Kalman, D. Review of the Pharmacology, Pharmacokinetics, and Clinical use of cephalosporins [Текст] / D. Kalman, S. L. Barriere // *Tex. Heart Inst. J.* – 1990. – Vol. 17, Iss. 3. – P. 203–215.

111. Khasanov, V. V. Determination of ceftriaxone in blood and tissues using ion-exchange chromatography [Текст] / V. V. Khasanov, E. G. Sokolovich, K. A. Dychko // *Pharm. Chem. J.* – 2006. – Vol. 40, Iss. 2. – P. 109–111.

112. Kollef, M. H. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [Текст] // *Crit. Care Resusc.* – 2009. – Vol. 11, Iss. 4. – P. 282–286.
113. Kosinski, M. A. Update on the treatment of diabetic foot infections / M. A. Kosinski, W. S. Joseph [Текст] // *Clin. Podiatr. Med. Surg.* – 2007. – Vol. 24, Iss. 3. – P. 383–396.
114. Lindenmann, J. I. High extracellular levels of cefpirome in unaffected and infected lung tissue of patients [Текст] / J. I. Lindenmann, S. A. Kugler, V. Matzi // *Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66, Iss. 1. – P. 175–183.
115. Liu, Y. Validated LC-MS/MS method for simultaneous analysis of 21 cephalosporins in zebrafish for a drug toxicity study [Текст] / Y. Liu, J. Zhang, C. Hu // *Anal. Biochem.* – 2018. – Vol. 558. – P. 28–34.
116. Mehta, D. Cephalosporins: A Review on Imperative Class of Antibiotics [Текст] / D. Mehta, A. K. Sharma // *Mol. Pharm.* – 2016. – Iss. 1. – P. 1–6.
117. Microbiota-accessible carbohydrates suppress *Clostridium difficile* infection in a murine model [Текст] / A. J. Hryckowian [et al.] // *Nat. Microbiol.* – 2018. – Vol. 3, Iss. 6. – P. 662–669.
118. Mohammeda, T. A. Spectrophotometric Determination of Certain Antiepileptic's in Tablets Using Vanillin Reagent [Текст] / T. A. Mohammeda, M. A. Mohamed // *J. Advances Chemistry.* – 2015. – Vol 11, Iss. 2. – P. 3540–3551.
119. Moreno, A. DH. Spectrophotometric determination of ceftazidime in pharmaceutical preparations using neocuproin as a complexing agent [Текст] // *Anal. Lett.* – 2008. – Vol. 41. – P. 2143–2152.
120. Moreno, A. H. Development of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of ceftazidime [Текст] / A. H. Moreno, H. R. N. Salgado // *J. AOAC Int.* – 2008. – Vol. 91. – P. 739–743.
121. Moreno, A. H. Rapid and selective UV spectrophotometric method for the analysis of ceftazidime [Текст] / A. H. Moreno, H. R. N. Salgado // *J. AOAC Int.* – 2009. – Vol. 92. – P. 820–824.

122. Morsch, L. M. LC method for the analysis of cefetamet pivoxil hydrochloride in drug substance and powder for oral suspension [Текст] / L. M. Morsch, C. F. Bittencourt, J. Milano // J. Pharmaceut. Biomed. Analysis. – 2002. – Vol. 30, Iss. 3. – P. 643–649.

123. Muzykantov, V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature [Текст] / V. R. Muzykantov // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2010. – Vol. 7. – № 4. – P. 403-427.

124. Mycek, M. J. Pharmacology [Текст] / M. J. Mycek, R. A. Harvey, P. C. Champe. – 2nd ed. – New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2000. – 514 p.

125. Nanda, R. K. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Ceftazidime Sodium and Tazobactam Sodium in Marketed Formulation [Текст] / R. K. Nanda, A. V. Shelke // Int. J. Pharm. Tech. Res. – 2013. – Vol. 5, No. 3. – P. 983–990.

126. Naqvi, I. Cefixime: A drug as efficient corrosion inhibitor for mild steel in acidic media Electrochemical and thermodynamic studies [Текст] / I. Naqvi, A. R. Saleemi, S. Naveed // Int. J. Electrochem. Sci. – 2011. – Vol. 6. – P. 146–161.

127. Nilsson-Ehle, I. High-pressure liquid chromatography as a tool for determination of antibiotics in biological fluids [Текст] // Acta Pathol. Microbiol. Scand. – 1977. – Vol. 259. – P. 61–66.

128. Nishino, I. Determination of a new oral cephalosporin, cefmatilen hydrochloride hydrate, and its seven metabolites in human and animal plasma and urine by coupled systems of ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography [Текст] / I. Nishino, H. Fujitomo, T. Umeda // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 2000. – Vol. 749, Iss. 1. – P. 101–110.

129. Omar, M. A. Kinetic Spectrophotometric Determination of Certain Cephalosporins in Pharmaceutical Formulations [Текст] / M. A. Omar, O. H. Abdelmageed, T. Z. Attia // Int. J. Anal. Chem. – 2009. – Vol. 2009. – Article ID 596379, 12 p. – <http://dx.doi.org/10.1155/2009/596379>.

130. Othman, Z. A. A. Oxidative coupling for the spectrophotometric determination of certain cephalosporins and acetaminophen in drug formulations [Текст]

/ Z. A. A. Othman, M. A. Abdalla // Arab. J. Chem. – 2011. – Vol. 4, Iss. 2. – P. 239–242.

131. Palanikumar, B. An RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Ceftriaxone Sodium And Sulbactam Sodium In Injection Dosage Form [Текст] / B. Palanikumar, A. Thenmozhi, D. Sridharan // Int. J. Pharm. and Pharmaceut. Sci. – 2010. – Vol. 2, Iss. 3. – P. 34–38.

132. Parasrampurua, J. Quantitation of cefadroxil in pharmaceutical dosage forms using high performance liquid chromatography [Текст] / J. Parasrampurua, V. Das-Gupta // Drug Dev. Ind. Pharm. – 1990. – Vol. 16. – P. 1435–1440.

133. Patel, S. A. Spectrophotometric methods for the estimation of Cephalexin in tablet dosage forms [Текст] / S.A. Patel, N. M. Patel, M. M. Patel // Indian J. Pharm. Sci. – 2006. – Vol. 68, Iss. 2. – P. 278–280.

134. Pedroso, T. M. Validation of cefazolin Sodium by UV-Spectrophotometric method [Текст] / T. M. Pedroso, H. R. N. Salgado // Physical Chemistry. – 2013. – Vol. 3, Iss. 1. – P. 11–20.

135. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. – 26th ed. CLSI supplement M100S. – Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. – 253 p.

136. Plasma and tissue pharmacokinetics of cefpirome in patients with sepsis [Текст] / C. I. Joukhadar [et al.] // Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 30, Iss. 7. – P. 47–55.

137. Prayanka, P. Development of colorimetric method for cephalexin in dosage forms [Текст] // Asian J. Pharmaceut. – 2008. – Vol. 2. – P. 120–122.

138. Protective effect of serum thymic factor, FTS, on cephaloridine-induced nephrotoxicity in rats [Текст] / Y. Kohda [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2015. – Vol. 28, Iss. 11. – P. 2087–2091.

139. Quantification of piperacillin, tazobactam, cefepime, meropenem, ciprofloxacin and linezolid in serum using an isotope dilution UHPLC-MS/MS method with semi-automated sample preparation [Текст] / J. Zander [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2015. – Vol. 53, Iss. 5. – P. 781–791.

140. Quantitation of antibiotics of high-pressure liquid chromatography: cephalothin [Текст] / I. Nilsson-Ehle [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1978. – Vol. 13, Iss. 2. – P. 221–227.

141. Quantitative Analysis Of Eight Cephalosporin Antibiotics In Pharmaceutical Products And Urine By Capillary Zone Electrophoresis [Текст] / A. R. Solangi [et al.] // Acta Chromatographica. – 2007. – Vol. 19. – P. 25–33.

142. Ragya, R. V. Resealed erythrocytes: A promising drug carrier [Текст] // Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. – 2012. – Vol. 4, Iss. 4, suppl. – P. 75–82.

143. Raju, V. J. High Performance Thin Layer Chromatographic Method for Estimation of Cefprozil in Tablet Dosage Form [Текст] / V. J. Raju, J. V. L. N. Seshagiri Rao // Chemistry. – 2008. – Vol. 5, Iss. 3. – P. 427–430.

144. Redely, K. H. In-vitro formulation and evaluation of cefixime liposome formulation [Текст] / K. H. Redely, M. M. Reddy // Int. J. Pharmacy Bio. Sci. – 2012. – Iss. 2. – P. 198–207.

145. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Method For Simultaneous Determination Of Cefuroxime Axetil And Potassium Clavulanate In Tablet Dosage Form [Текст] / M. R. Sengar [et al.] // Int. J. Chem Tech Res. – 2009. – Vol. 4. – P. 1105–1108.

146. Saha, R. N. Modeling of biological activity and pharmacokinetics of cefixime [Текст] / R. N. Saha, M. Raman // Indian J. Pharma Edu Res. – 2005. – Vol. 42. – P. 207–214.

147. Sahin, H. Evaluation of primary health care physicians' knowledge on rational antibiotic use [Текст] / H. Sahin, G. Arsu, D. Köseli [et al.] // Mikrobiyol Bul. – 2008. – Vol. 42. – № 2. – P. 343–348.

148. Santosh, S. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method of Cefuroxime Axetil in Bulk and Pharmaceutical Formulation [Текст] // Research Chem. – 2009. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 23–29.

149. Selective Densitometric Analysis of Cephalosporins Using Dragendorff's Reagent [Текст] / F. A. Mohamed [et al.] // Chromatographia. – 2008. – Vol. 68, Iss. 5–6. – doi: 10.1365/s10337-008-0714-3.

150. Shah, S. Novel drug delivery carrier: resealed erythrocytes [Текст] // Int. J. Pharm. Bio Sci. – 2011. – Vol. 2, Iss. 1. – P. 394–406.
151. Shahbaz, K. Pharmenzymonetics and Pharmgeonetics: A New Door in Pharmacology [Текст] // WJPP Sci. – 2016. – Vol. 2, Iss. 5. – P. 1424–1432.
152. Shapiro, S. Speculative Strategies for New Antibacterials: All Roads should not Lead to Rome [Текст] // J. Antibiot. (Tokyo). – 2013. – Vol. 66, Iss. 7. – P. 371–386.
153. Shazalia, M. A. Spectroscopic Methods for Analysis of Cephalosporins in Pharmaceutical Formulations [Текст] / M. A. Shazalia, A. Elbashir, Y. Hassan // World J. Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 3, No 1A. – P. 21–32.
154. Shukla, R. S. Novel HPLC analysis of cefadroxil in bulk formulation / R. S. Shukla, S. Pandey [Текст] // Asian J. Pharmaceut. – 2010. – Vol. 41. – P. 34–42.
155. Signs, S. A. High-Pressure Liquid Chromatographic Method for Analysis of Cephalosporins [Текст] / S. A. Signs, T. M. File, J. S. Tan // Antimicrob. Agents Chemother. – 1984. – Vol. 26, Iss. 5. – P.652–655.
156. Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / T. Ohmori [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2011. – Vol. 879, Iss. 15–16. – P. 1038–1042.
157. Simultaneous determination of vancomycin and ceftazidime in cerebrospinal fluid in craniotomy patients by high-performance liquid chromatography [Текст] / G. Ye [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2009. – Vol. 48, Iss. 3. – P. 860–865.
158. Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone [Текст] / E. Nemitlu [et al.] // Talanta. – 2009. – Vol. 80, Iss. 1. – P. 117–126.
159. Simultaneous quantification of cefepime, meropenem, ciprofloxacin, moxifloxacin, linezolid and piperacillin in human serum using an isotope-dilution HPLC-MS/MS method [Текст] / M. Paal [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – Vol. 152. – P. 102–110.

160. Smith, R. V. Textbook of biopharmaceutical analysis [Текст] // Agents Chemother. – 1981. – No 7. – P. 79–92.

161. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) [Текст] / A. H. Rageh [et al.] // Natural Science. – 2010. – Vol. 2, Iss. 8. – 828-840.

162. Spectrofluorimetric Protocol for Ceftriaxone in Commercial Formulation and Human Plasma After Condensation with Formaldehyde and Ethyl Acetoacetate [Текст] / J. Shah [et al.] // J. Fluoresc. – 2011. – Vol. 21, Iss. 6. – P. 2155–2163.

163. Spectrophotometric determination of aciclovir, ceftazidime pentahydrate, famotidine and isoxsuprine hydrochloride by ternary complex formation with eosin and Cu(II) [Текст] / M.S. Elazazy [et al.] // J. Chinese Pharmaceut. Sci. – 2003. – Vol. 55, Iss. 6. – P. 481–490.

164. Stability-indicating reverse phase HPLC method for the determination of cefazolin [Текст] / N. Lalitha [et al.] // Trop. J. Res. – 2010. – Vol. 9, Iss. 1. – P. 45–50.

165. Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefepime administered by prolonged infusion in hospitalised patients [Текст] / S. C. Cheatham [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2011. – Vol. 37, Iss. 1. – P. 46–50.

166. Sultana, N. Simultaneous Determination of Ceftriaxone Sodium and Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Pharmaceutical Formulations and Human Serum by RP-HPLC [Текст] / N. Sultana, M. S. Arayne, W. Shahzad // J. Chinese Chem. Society. – 2013. – Vol. 57, Iss. 6. – P. 1278–285.

167. Sun, Y. Advances of blood cell-based drug delivery systems [Текст] / Y. Sun, J. Su, G. Liu [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2017. – Vol. 96. – P. 115-128.

168. Technological Excipients of Tablets: Study of Flow Properties and Compaction Behavior [Текст] / J. Conceicao [et al.] // Am. J. Med. Sci. – 2014. – Vol. 2, No. 4. – P. 71–74.

169. The Stability Of Cefprozil In Oral Suspension Cefzil [Текст] / A. Jelińska [et al.] // Acta Pol. Pharm. – 2008. – Vol. 65, Iss. 2. – P. 261–265.

170. The United States Pharmacopeia XXX and NF XXV, American Pharmaceutical, 2007.

171. The use of cefepime for treating AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae [Текст] / P. D. Tamma [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 57, Iss. 6. – P. 781–788.

172. Tissera, S. Isolation of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface waters in Malaysia [Текст] / S. Tissera, S. M. Lee // Malays. J. Med. Sci. – 2013. – Vol. 20, Iss. 3. – P. 14–22.

173. Toxic effects of cephalosporins with specific functional groups as indicated by zebrafish embryo toxicity testing [Текст] / J. Zhang [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2013. – Vol. 26, Iss. 8. – P. 1168–1181.

174. Ultrafast quantification of β -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS [Текст] / M. Carlier [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2015. – Vol. 978–979. – P. 89–94.

175. Waterman, N. Rate of binding of antibiotics to canine serum protein [Текст] / N. Waterman, L. Scharfenberger, M. J. Raff // Antimicrob. Agents Chemother. – 1974. – Vol. 5, Iss. 3. – P. 294–295.

176. Weismuller, J. A. Quantitative multicomponent analysis of complex mixtures by means of full spectrum quantitation and principal component analysis [Текст] / J. A. Weismuller, A. Chanady // Trends Anal. Chem. – 1992. – Vol. 11, Iss. 3. – P. 86–90.

177. Widmer, A. F. Ceftobiprole: a new option for treatment of skin and soft-tissue infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, Iss. 5. – P. 656–658.

178. Wiest, D. B. Chloramphenicol toxicity revisited: a 12-year-old patient with a brain abscess [Текст] / D. B. Wiest, J. B. Cochran, F. W. Tecklenburg // J. Pediatr. Pharmacol. Ther. – 2012. – Vol. 17, Iss. 2. – P. 182–188.

179. Zendelovska, D. Simultaneous quantification of cefaclor and cephalexine in blood plasma using high-performance liquid chromatography with UV detection [Текст] / D. Zendelovska, T. Stafilov, S. Petrov // Acta Pharm. – 2002. – Vol. 52. – P. 243–250.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 – Характеристика ИК-спектра цефпирома

Длина волны, см ⁻¹ стандартного образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца извлеченного из биоматериала	Характеристическая полоса
3563,6	3563,6	3563,6	Асимметрические валентные колебания свободной NH ₂
3422,7	3422,7	3422,7	Симметрические валентные колебания свободной NH ₂
3197,0	3197,0	3197,0	Валентные колебания связанной NH ₂
3051,2	3052,2	3051,2	Валентные колебания CH ₂
2939,1	2939,1	2939,2	Асимметрические валентные колебания CH ₂
2359,9	2359,9	2359,9	Колебания CO ₂
1796,3	1796,3	1796,3	Валентные колебания C=O
1645,5	1645,5	1645,2	
1546,3	1546,3	1546,4	Деформационные колебания N–N
1471,2	1471,2	1471,2	Колебания CH ₂
1363,2	1363,2	1363,5	Симметрические деформационные колебания CH ₃ ?
1285,3	1285,3	1283,5	Колебания вторичной аминогруппы
1083,1	1083,1	1083,1	Плоскостные деформационные колебания CH
1034,3	1034,3	1034,3	
798,8	798,8	798,8	Неплоскостные деформационные колебания CH
736,9	736,9	736,9	Деформационные внеплоскостные колебания CH
693,4	693,4	693,4	Валентные колебания C-S ?
598,5	598,5	598,5	

Таблица 2 – Характеристика ИК-спектра цефтриаксона

Длина волны, см ⁻¹ стандартного образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца извлеченного из биоматериала	Характеристическая полоса
3439,4	3439,4	3435,6	Асимметрические валентные колебания связанной NH ₂
3257,6	3257,6	3257,1	
2936,4	2936,4	2936,4	Асимметрические валентные колебания CH ₂
2249,4	2249,4	2249,4	Колебания CO ₂
1741,1	1740,2	1740,2	Валентные колебания C=O
1649,6	1649,5	1649,5	
1608,2	1608,2	1607,7	Валентные колебания C=O в β-кетоксидах
1537,4	1537,4	1537,8	Деформационные колебания N–H
1500,4	1500,4	1500,8	
1398,5	1398,5	1398,2	Деформационные колебания O–H
1367,2	1367,2	1367,7	
1285,9	1285,8	1285,8	Колебания вторичной аминогруппы
1185,1	1185,1	1185,1	Валентные колебания –C– N–
1105,2	1105,2	1105,4	

Таблица 3 – Характеристика ИК-спектра цефепима

Длина волны, см ⁻¹ стандартного образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца	Длина волны, см ⁻¹ рабочего образца извлеченного из биоматериала	Характеристическая полоса
3230,2	3230,2	3193,5	Валентные колебания связанной NH ₂
3056,9	3056,9	3054,6	Валентные колебания NH ₂
2937,9	2937,9	2933,7	Асимметрические валентные колебания CH ₂
2361,6	2361,6	2361,6	Колебания CO ₂
1772,7	1775,0	1775,0	Валентные колебания C=O
1655,3	1654,6	1654,6	
1570,1	1570,1	1567,3	Деформационные колебания N–H
1447,3	1447,3	1451,6	Колебания CH ₂
1386,6	1386,6	1382,8	Деформационные колебания O–H
1315,5	1315,5	1318,2	Вторичные амиды
1268,7	1268,7	1267,2	Колебания вторичной аминогруппы
1113,7	1113,6	1113,6	Валентные колебания –C– N–
802,0	802,0	801,9	Деформационные колебания C–H

Таблица 4. – Основные оптические характеристики электронных спектров цефтриаксона

Растворитель	Длина волны, нм	$\sum \bar{\epsilon}_{cm}^{1\%}$	$\bar{\epsilon}$
Ацетонитрил-вода (8:2)	193,5	365	29111
	239,4	468	37381
	272,6	388	30963
Диоксан-вода (8:2)	264,0	577	37182
Диметилсульфоксид	265,6	625	37579
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	275,0	615	38770
Метанол	241,0	433	36190
	266,7	373	31228
Глюкоза 5% (для инъекций)	202,5	452	29375
	241,9	547	35595
	265,3	518	33676
Вода	191,8	591	39101
	240,7	611	40424
	270,4	557	36852
0,1н р-р натрия гидроксида	249,8	617	40821
0,1н р-р кислоты хлороводородной	201,9	502	33213
	265,8	595	39366
Изотонический р-р натрия хлорида	203,3	462	30566
	241,2	548	36256
	271,1	505	33411

Таблица 5 – Основные оптические характеристики электронных спектров цефпирома

Растворитель	Длина волны, нм	$\sum \bar{\epsilon}_{1\%}^{1\text{см}}$	$\bar{\epsilon}$
Ацетонитрил-вода (8:2)	196,0	414	46198
	235,5	625	27817
	268,4	360	26591
Диоксан-вода (8:2)	266,9	450	26836
Диметилсульфоксид-вода (8:2)	266,3	470	26652
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	270,2	282	32959
Диметилформамид-вода (8:2)	271,2	440	28184
Метанол	215,7	302	23405
	234,8	323	24998
	268,7	284	21996
Глюкоза 5% (р-р для инъекций)	199,8	533	32105
	234,2	312	18749
	262,0	325	19545
Вода	195,3	539	33025
	235,9	282	17278
	267,5	299	18320
0,1н р-р натрия гидроксида	217,8	523	32044
	225,9	498	30512
	266,0	310	18994
0,1н р-р кислоты хлороводородной	201,5	672	41173
	271,2	562	34434
Изотонический р-р натрия хлорида	202,4	696	42644
	234,3	482	29532
	264,9	499	30574

Таблица 6 – Основные оптические характеристики электронных спектров цефепима

Растворитель	Длина волны, нм	$\sum \bar{\epsilon}_{cm}^{1\%}$	$\bar{\epsilon}$
Ацетонитрил-вода (8:2)	191,3	686	47320
	236,2	269	18517
	260,4	129	17831
Диоксан-вода (8:2)	263,2	383	21317
Диметилсульфоксид-вода (5:5)	263,8	175	19088
Диметилформамид-вода (8:2)	268,2	351	20974
Метанол	214,1	274	19774
	236,9	349	25203
	259,1	304	21946
Глюкоза 5% (р-р для инъекций)	198,8	561	31490
	235,3	380	21317
	257,4	372	20917
Вода	190,8	913	52178
	234,6	337	19260
	258,2	332	18974
0,1н р-р натрия гидроксида	229,1	570	32576
	290,5	196	11201
0,1н р-р кислоты хлороводородной	201,4	509	29089
	264,6	477	27261
Изотонический р-р натрия хлорида	204,2	399	22803
	234,7	370	21146
	257,9	357	20403

Таблица 7 – Подвижность некоторых цефалоспоринов при хроматографировании в индивидуальных растворителях на пластинках для тонкослойной хроматографии «Сорбфил»

Подвижная фаза	Цефепим		ЦефОтаксим (стандарт)	Цефтриаксон		Цефпиром	
	Rf	Rs	Rf	Rf	Rs	Rf	Rs
Ацетон	0,00	0,00	0,01	0,03	2,00	0,00	0,00
Диметилсульфоксид	0,33	0,37	0,90	0,96	1,07	0,53	0,59
Диметилформамид	0,01	0,01	0,87	0,91	1,04	0,08	0,10
Метилацетат	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Диэтиловый эфир	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,4-Диоксан	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
Этанол	0,07	0,09	0,73	0,06	0,08	0,08	0,11
Метанол	0,09	0,12	0,76	0,32	0,42	0,59	0,77
Пропанол-1	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,11	0,47
Пропанол-2	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
Бутанол-1	0,01	0,33	0,04	0,00	0,00	0,01	0,33
Изобутанол	0,01	0,25	0,06	0,01	0,25	0,00	0,00
Изопентанол	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Деканол	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,03	1,00
Этановая кислота	0,00	0,00	0,25	0,04	0,14	0,00	0,00
Ацетонитрил	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Хлороформ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Бензол	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Вода	0,17	0,21	0,80	0,85	1,07	0,10	0,13
Толуол	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Таблица 8 – Подвижность некоторых цефалоспоринов при хроматографировании в многокомпонентных подвижных фазах

Подвижная фаза		Цефепим		Цефотаксим (стандарт)	Цефтриаксон		Цефпиром	
Компоненты	Объемные доли	Rf	Rs	Rf	Rf	Rs	Rf	Rs
Ацетон-диметилсульфоксид	2:8	0,20	0,21	0,93	0,96	1,04	0,37	0,40
	4:6	0,08	0,08	0,93	0,94	1,01	0,16	0,18
	5:5	0,04	0,04	0,86	0,94	1,09	0,06	0,07
Хлороформ-диметилсульфоксид	2:8	0,23	0,26	0,90	0,94	1,04	0,40	0,44
	4:6	0,07	0,08	0,92	0,90	0,99	0,18	0,20
	5:5	0,04	0,06	0,70	0,80	1,14	0,11	0,15
Ацетонитрил-диметилсульфоксид	2:8	0,23	0,25	0,94	0,95	1,01	0,39	0,42
	4:6	0,10	0,11	0,92	0,91	0,99	0,24	0,26
	5:5	0,08	0,08	0,94	0,92	0,99	0,17	0,18
Метанол-диметилсульфоксид	2:8	0,54	0,56	0,96	0,96	1,00	0,70	0,73
	5:5	0,53	0,58	0,91	0,95	1,04	0,67	0,74
	8:2	0,35	0,37	0,95	0,90	0,95	0,51	0,53
	9:1	0,26	0,28	0,92	0,89	0,96	0,39	0,42
Ацетон-вода	6:4	0,62	0,67	0,92	0,89	0,96	0,61	0,66
	8:2	0,21	0,24	0,88	0,70	0,80	0,24	0,27
	9:1	0,01	0,02	0,76	0,00	0,00	0,01	0,02
Этановая кислота- диметилсульфоксид	2:8	0,75	0,88	0,85	0,85	1,00	0,83	0,97
	5:5	0,69	0,75	0,92	0,84	0,91	0,84	0,91
	8:2	0,90	1,06	0,84	0,91	1,08	0,91	1,08
Диметилсульфоксид-вода- этановая кислота	2,5:1,5:6,1	0,80	0,85	0,94	0,84	0,89	0,89	0,94
	2,5:2,5:5	0,84	1,02	0,83	0,93	1,12	0,86	1,03
	4:2:4	0,86	1,09	0,79	0,96	1,22	0,83	1,06
Ацетон-вода-диметилсульфоксид	6:1:3	0,38	0,40	0,94	0,91	0,97	0,40	0,43
	6:2:2	0,55	0,58	0,95	0,93	0,99	0,63	0,66
	6:3:1	0,64	0,67	0,95	0,91	0,96	0,66	0,70

Таблица 9 – Подвижность некоторых цефалоспоринов при хроматографировании на пластинках для тонкослойной хроматографии «Сорбфил» с искусственно привитой алкильной фазой C₁₄-C₁₅

Подвижная фаза		Цефепим		Цефотаксим (стандарт)	Цефтриаксон		Цефпиром	
Компоненты	Объемные доли	Rf	Rs	Rf	Rf	Rs	Rf	Rs
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Вода	-	0,04	0,21	0,19	0,08	0,43	0,01	0,07
Буферный раствор pH=2,87	-	0,04	0,50	0,08	0,03	0,33	0,04	0,50
Буферный раствор pH=8,95	-	0,04	0,25	0,15	0,10	0,67	0,02	0,17
Буферный раствор pH=2,87 - Метанол	9:1	0,17	0,34	0,51	0,60	1,18	0,07	0,13
	8:2	0,28	0,35	0,79	0,74	0,94	0,20	0,25
	5:5	0,41	0,48	0,86	0,77	0,90	0,40	0,47
	2:8	0,30	0,33	0,89	0,77	0,87	0,31	0,35
Вода - Метанол	8:2	0,28	0,41	0,68	0,54	0,80	0,17	0,24
	5:5	0,38	0,48	0,80	0,77	0,97	0,39	0,49
	2:8	0,20	0,36	0,56	0,26	0,46	0,47	0,85
Буферный раствор pH=8,95 - Метанол	9:1	0,15	0,26	0,57	0,60	1,05	0,08	0,14
	8:2	0,28	0,37	0,76	0,57	0,76	0,20	0,26
	5:5	0,44	0,52	0,85	0,83	0,98	0,41	0,48
	2:8	0,80	0,90	0,88	0,71	0,81	0,85	0,96
Вода-пропанол-2	8:2	0,38	0,47	0,80	0,49	0,61	0,31	0,39
	5:5	0,40	0,56	0,71	0,44	0,63	0,40	0,56
	2:8	0,20	0,44	0,45	0,28	0,61	0,30	0,67
Буферный раствор pH=2,87 - ацетон	9:1	0,42	0,48	0,86	0,88	1,02	0,32	0,37
	8:2	0,58	0,68	0,86	0,92	1,07	0,53	0,61
	5:5	0,61	0,66	0,93	0,90	0,97	0,60	0,64
	2:8	0,24	0,27	0,88	0,25	0,29	0,27	0,31

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Вода-ацетон	8:2	0,48	0,57	0,84	0,57	0,68	0,44	0,52
	5:5	0,63	0,78	0,81	0,60	0,75	0,58	0,71
	2:8	0,33	0,45	0,73	0,31	0,42	0,62	0,85
	1:9	0,40	0,54	0,74	0,56	0,76	0,23	0,31
Буферный раствор рН=8,95 - ацетон	9:1	0,43	0,52	0,83	0,85	1,03	0,31	0,37
	8:2	0,55	0,66	0,84	0,89	1,07	0,47	0,56
	5:5	0,63	0,69	0,91	0,89	0,99	0,60	0,66
	2:8	0,20	0,23	0,86	0,48	0,55	0,23	0,27
Буферный раствор рН=2,87 - ацетонитрил	9:1	0,27	0,40	0,66	0,18	0,27	0,16	0,24
	8:2	0,41	0,52	0,80	0,56	0,70	0,31	0,39
	5:5	0,52	0,62	0,84	0,60	0,71	0,52	0,62
	2:8	0,01	0,03	0,49	0,03	0,05	0,10	0,21
Вода - ацетонитрил	9:1	0,28	0,66	0,42	0,47	1,11	0,18	0,43
	8:2	0,40	0,50	0,80	0,51	0,65	0,35	0,44
	5:5	0,54	0,72	0,76	0,67	0,89	0,53	0,70
	2:8	0,13	0,24	0,55	0,13	0,24	0,17	0,31
Буферный раствор рН=8,95 - ацетонитрил	9:1	0,31	0,40	0,78	0,81	1,05	0,16	0,21
	8:2	0,49	0,55	0,90	0,92	1,03	0,43	0,48
	5:5	0,49	0,52	0,95	0,59	0,62	0,49	0,52
	2:8	0,01	0,02	0,59	0,05	0,09	0,16	0,27
Вода - диоксан	9:1	0,36	0,48	0,75	0,51	0,68	0,20	0,27
	8:2	0,45	0,60	0,75	0,61	0,82	0,35	0,47
	5:5	0,51	0,60	0,84	0,65	0,78	0,47	0,56
	2:8	0,18	0,28	0,64	0,55	0,86	0,16	0,26

Таблица – 10 Количественное содержание цефтриаксона, изолированного из различного биологического материала

Концентрация цефтриаксона, мкг/г	Найдено цефтриаксона, изолированного из печени, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефтриаксона, изолированного из крови, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефтриаксона, изолированного из мочи, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефтриаксона, изолированного из плазмы, мкг/г	Относительная погрешность, %
62,5	61,80	-1,12	63,44	1,50	64,60	3,37	66,36	6,18
125	134,58	7,66	134,38	7,51	126,77	1,41	127,72	2,18
250	258,39	3,36	255,96	2,38	250,39	0,16	251,32	0,53
600	605,95	0,99	596,78	-0,54	600,16	0,03	598,42	-0,26
1250	1250,61	0,05	1233,15	-1,35	1248,80	-0,10	1242,87	-0,57
2500	2497,47	-0,10	2484,74	-0,61	2494,18	-0,23	2498,20	-0,07
4000	4000,81	0,02	3987,70	-0,31	3997,63	-0,06	3999,12	-0,02
5000	4999,47	-0,01	5021,41	0,43	5004,90	0,10	5003,47	0,07

Таблица – 11 Количественное содержание цефепима, изолированного из различного биологического материала

Концентрация цефепима, мкг/г	Найдено цефепима, изолированного из печени, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефепима, изолированного из крови, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефепима, изолированного из мочи, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефепима, изолированного из плазмы, мкг/г	Относительная погрешность, %
125	130,51	4,41	132,57	6,06	129,38	3,51	129,19	3,35
250	252,84	1,14	254,20	1,68	253,80	1,52	252,37	0,95
400	400,64	0,16	402,05	0,51	400,44	0,11	400,35	0,09
600	600,02	0,00	599,76	-0,04	601,16	0,19	600,36	0,06
1250	1246,68	-0,27	1243,94	-0,48	1247,23	-0,22	1246,94	-0,24
2500	2491,15	-0,35	2482,00	-0,72	2490,64	-0,37	2493,76	-0,25
4000	3991,18	-0,22	4002,60	0,06	3987,31	-0,32	3991,78	-0,21
5000	5011,96	0,24	5007,98	0,16	5014,98	0,30	5010,11	0,20

Таблица – 12 Количественное содержание цефпиромы, изолированного из различного биологического материала

Концентрация цефпиромы, мкг/г	Найдено цефпиромы, изолированного из печени, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефпиромы, изолированного из крови, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефпиромы, изолированного из мочи, мкг/г	Относительная погрешность, %	Найдено цефпиромы, изолированного из плазмы, мкг/г	Относительная погрешность, %
125	134,24	7,40	129,06	3,25	132,64	6,11	128,32	2,65
250	255,64	2,25	252,27	0,91	255,52	2,21	251,56	0,63
400	402,04	0,51	401,14	0,28	402,05	0,51	401,53	0,38
600	600,74	0,12	599,72	-0,05	599,70	-0,05	600,54	0,09
1250	1244,03	-0,48	1246,34	-0,29	1242,38	-0,61	1247,72	-0,18
2500	2481,41	-0,74	2492,31	-0,31	2485,70	-0,57	2494,58	-0,22
4000	3984,48	-0,39	3998,53	-0,04	3992,63	-0,18	3989,50	-0,26
5000	5022,44	0,45	5005,67	0,11	5014,38	0,29	5011,36	0,23

Таблица 13 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефтриаксона в ткани печени с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
250	78,518	252,07	8,22	$\bar{x} = 270,550; S = 16,813;$ $S_{\bar{x}} = 7,519;$ $\Delta\bar{x} = 20,902; \bar{\mathcal{E}} = 7,726;$ $S_r = 6,214 \%$	80,774	284,32	8,33	$\bar{x} = 270,822; S = 16,300;$ $S_{\bar{x}} = 7,290;$ $\Delta\bar{x} = 20,265; \bar{\mathcal{E}} = 7,483$ $S_r = 6,019 \%$
250	79,664	268,45			78,877	257,20		
250	78,917	257,78			81,237	290,95		
250	81,377	292,95			78,661	254,12		
250	80,576	281,50			79,599	267,52		
2500	224,783	2343,25	-2,28	$\bar{x} = 2442,912; S = 98,860;$ $S_{\bar{x}} = 44,212;$ $\Delta\bar{x} = 122,908; \bar{\mathcal{E}} = 5,031$ $S_r = 4,047 \%$	235,651	2498,63	-3,30	$\bar{x} = 2417,548; S = 82,130;$ $S_{\bar{x}} = 36,729;$ $\Delta\bar{x} = 102,108; \bar{\mathcal{E}} = 4,224;$ $S_r = 3,397 \%$
2500	242,698	2599,38			227,862	2387,27		
2500	231,421	2438,15			233,039	2461,28		
2500	232,776	2457,52			221,011	2289,32		
2500	227,092	2376,26			232,337	2451,24		
4000	357,825	4245,36	4,48	$\bar{x} = 4179,206; S = 135,878;$ $S_{\bar{x}} = 60,766;$ $\Delta\bar{x} = 168,931; \bar{\mathcal{E}} = 4,042$ $S_r = 3,251 \%$	363,439	4325,63	4,66	$\bar{x} = 4186,202; S = 115,782;$ $S_{\bar{x}} = 51,779;$ $\Delta\bar{x} = 143,946; \bar{\mathcal{E}} = 3,439;$ $S_r = 2,766 \%$
4000	349,459	4125,75			355,742	4215,58		
4000	367,619	4385,39			357,218	4236,69		
4000	346,150	4078,45			341,962	4018,57		
4000	344,935	4061,08			350,073	4134,54		

Таблица 14 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефтриаксона в крови с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
250	77,594	256,32	7,53	$\bar{x} = 268,814; S = 14,531;$ $S_{\bar{x}} = 6,499;$ $\Delta\bar{x} = 18,066; \bar{\mathcal{E}} = 6,721;$ $S_r = 5,406 \%$	78,113	264,23	8,07	$\bar{x} = 270,164; S = 14,686;$ $S_{\bar{x}} = 6,568;$ $\Delta\bar{x} = 18,258; \bar{\mathcal{E}} = 6,758$ $S_r = 5,436 \%$
250	79,032	278,24			80,042	293,63		
250	79,694	288,32			77,455	254,21		
250	78,300	267,08			78,237	266,13		
250	77,448	254,11			78,663	272,62		
2500	224,883	2500,32	- 1,03	$\bar{x} = 2474,324; S = 80,551;$ $S_{\bar{x}} = 36,023;$ $\Delta\bar{x} = 100,145; \bar{\mathcal{E}} = 4,047$ $S_r = 3,255 \%$	224,945	2501,26	-1,49	$\bar{x} = 2462,730; S = 96,910;$ $S_{\bar{x}} = 43,340;$ $\Delta\bar{x} = 120,484; \bar{\mathcal{E}} = 4,892;$ $S_r = 3,935 \%$
2500	224,184	2489,67			222,126	2458,32		
2500	230,655	2588,26			225,073	2503,21		
2500	217,973	2395,05			211,712	2299,65		
2500	218,188	2398,32			228,223	2551,21		
4000	318,363	3924,52	3,27	$\bar{x} = 4130,690; S = 156,458;$ $S_{\bar{x}} = 69,970;$ $\Delta\bar{x} = 194,517; \bar{\mathcal{E}} = 4,709$ $S_r = 3,788 \%$	331,277	4121,26	3,52	$\bar{x} = 4140,978; S = 142,676;$ $S_{\bar{x}} = 63,807;$ $\Delta\bar{x} = 177,383; \bar{\mathcal{E}} = 4,284;$ $S_r = 3,445 \%$
4000	343,885	4313,36			340,174	4256,81		
4000	327,057	4056,98			323,992	4010,27		
4000	340,145	4256,38			344,078	4316,29		
4000	330,026	4102,21			323,334	4000,26		

Таблица 15 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефтриаксона в моче с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
250	79,553	255,36	5,26	$\bar{x} = 263,162; S = 9,747;$ $S_{\bar{x}} = 4,359;$ $\Delta\bar{x} = 12,118; \bar{\mathcal{E}} = 4,605;$ $S_r = 3,704 \%$	79,617	256,26	6,15	$\bar{x} = 265,378; S = 11,938;$ $S_{\bar{x}} = 5,339;$ $\Delta\bar{x} = 14,841; \bar{\mathcal{E}} = 5,593$ $S_r = 4,498 \%$
250	80,183	264,21			80,193	264,36		
250	81,109	277,24			81,658	284,96		
250	80,333	266,32			79,548	255,28		
250	79,363	252,68			80,312	266,03		
2500	241,025	2526,32	4,25	$\bar{x} = 2606,188; S = 90,936;$ $S_{\bar{x}} = 40,668;$ $\Delta\bar{x} = 113,056; \bar{\mathcal{E}} = 4,338$ $S_r = 3,489 \%$	259,157	2781,32	4,96	$\bar{x} = 2624,016; S = 103,025;$ $S_{\bar{x}} = 46,074;$ $\Delta\bar{x} = 128,087; \bar{\mathcal{E}} = 4,881;$ $S_r = 3,926 \%$
2500	245,504	2589,31			242,302	2544,28		
2500	247,713	2620,37			246,547	2603,97		
2500	257,232	2754,25			250,775	2663,44		
2500	242,047	2540,69			241,079	2527,07		
4000	342,703	3956,32	-1,72	$\bar{x} = 3931,322; S = 109,170;$ $S_{\bar{x}} = 48,822;$ $\Delta\bar{x} = 135,726; \bar{\mathcal{E}} = 3,452$ $S_r = 2,777 \%$	342,707	3956,38	-1,85	$\bar{x} = 3926,060; S = 163,676;$ $S_{\bar{x}} = 73,198;$ $\Delta\bar{x} = 203,491; \bar{\mathcal{E}} = 5,183;$ $S_r = 4,169 \%$
4000	346,537	4010,25			342,268	3950,21		
4000	349,256	4048,48			356,854	4155,34		
4000	330,476	3784,36			336,158	3864,28		
4000	335,655	3857,20			324,768	3704,09		

Таблица 16 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефтриаксона в плазме с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
250	78,776	254,03	4,77	$\bar{x} = 261,924; S = 7,836;$ $S_{\bar{x}} = 3,505;$ $\Delta\bar{x} = 9,743; \bar{\mathcal{E}} = 3,720;$ $S_r = 2,992 \%$	79,621	266,32	4,89	$\bar{x} = 262,220; S = 9,446;$ $S_{\bar{x}} = 4,224;$ $\Delta\bar{x} = 11,744; \bar{\mathcal{E}} = 4,479$ $S_r = 3,602 \%$
250	79,825	269,28			80,029	272,24		
250	79,934	270,87			78,307	247,21		
250	79,211	260,35			79,188	260,02		
250	78,849	255,09			79,552	265,31		
2500	243,363	2647,29	3,80	$\bar{x} = 2595,068; S = 71,031;$ $S_{\bar{x}} = 31,766;$ $\Delta\bar{x} = 88,310; \bar{\mathcal{E}} = 3,403$ $S_r = 2,737 \%$	245,105	2672,62	4,21	$\bar{x} = 2605,354; S = 82,719;$ $S_{\bar{x}} = 36,993;$ $\Delta\bar{x} = 102,841; \bar{\mathcal{E}} = 3,947;$ $S_r = 3,175 \%$
2500	240,020	2598,68			240,319	2603,03		
2500	233,318	2501,22			231,669	2477,24		
2500	245,404	2676,97			245,888	2684,01		
2500	236,754	2551,18			239,414	2589,87		
4000	331,277	3925,65	-1,32	$\bar{x} = 3947,274; S = 85,291;$ $S_{\bar{x}} = 38,143;$ $\Delta\bar{x} = 106,039; \bar{\mathcal{E}} = 2,686$ $S_r = 2,161 \%$	336,476	4001,25	-1,42	$\bar{x} = 3943,088; S = 96,916;$ $S_{\bar{x}} = 43,342;$ $\Delta\bar{x} = 120,492; \bar{\mathcal{E}} = 3,056;$ $S_r = 2,458 \%$
4000	324,863	3832,38			333,545	3958,62		
4000	330,962	3921,07			337,790	4020,35		
4000	336,474	4001,21			321,023	3776,55		
4000	340,246	4056,06			333,548	3958,67		

Таблица 17 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефепима в ткани печени с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	33,130	435,24	8,37	$\bar{x} = 433,472; S = 33,169;$ $S_{\bar{x}} = 14,833;$ $\Delta\bar{x} = 41,237; \bar{\mathcal{E}} = 9,513;$ $S_r = 7,652 \%$	33,230	436,28	8,80	$\bar{x} = 435,218; S = 31,138;$ $S_{\bar{x}} = 13,926;$ $\Delta\bar{x} = 38,713; \bar{\mathcal{E}} = 8,895$ $S_r = 7,155 \%$
400	28,743	389,25			37,107	476,92		
400	37,314	479,09			30,777	410,57		
400	31,538	418,55			29,770	400,02		
400	34,083	445,23			34,758	452,30		
2500	251,409	2723,32	7,81	$\bar{x} = 2695,188; S = 149,195;$ $S_{\bar{x}} = 66,722;$ $\Delta\bar{x} = 185,488; \bar{\mathcal{E}} = 6,882$ $S_r = 5,536 \%$	255,225	2763,32	8,30	$\bar{x} = 2707,430; S = 168,524;$ $S_{\bar{x}} = 75,366;$ $\Delta\bar{x} = 209,518; \bar{\mathcal{E}} = 7,739;$ $S_r = 6,224 \%$
2500	272,202	2941,28			273,425	2954,11		
2500	236,674	2568,87			240,487	2608,84		
2500	243,566	2641,11			230,840	2507,71		
2500	239,774	2601,36			249,486	2703,17		
4000	407,199	4356,38	5,03	$\bar{x} = 4201,040; S = 206,623;$ $S_{\bar{x}} = 92,405;$ $\Delta\bar{x} = 256,885; \bar{\mathcal{E}} = 6,115$ $S_r = 4,918 \%$	385,181	4125,58	6,01	$\bar{x} = 4240,230; S = 158,071;$ $S_{\bar{x}} = 70,691;$ $\Delta\bar{x} = 196,522; \bar{\mathcal{E}} = 4,635;$ $S_r = 3,728 \%$
4000	382,955	4102,24			379,563	4066,69		
4000	379,245	4063,35			393,116	4208,75		
4000	419,090	4481,02			415,942	4448,02		
4000	373,412	4002,21			406,792	4352,11		

Таблица 18. – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефепима в крови с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	31,802	437,36	8,11	$\bar{x} = 432,424; S = 33,218;$ $S_{\bar{x}} = 14,856;$ $\Delta\bar{x} = 41,298; \bar{\mathcal{E}} = 9,550;$ $S_r = 7,682 \%$	33,762	458,52	8,48	$\bar{x} = 433,928; S = 34,379;$ $S_{\bar{x}} = 15,375;$ $\Delta\bar{x} = 42,741; \bar{\mathcal{E}} = 9,850$ $S_r = 7,923 \%$
400	33,563	456,37			26,732	382,65		
400	31,751	436,81			34,667	468,28		
400	26,072	375,52			32,233	442,01		
400	33,534	456,06			30,024	418,18		
2500	237,941	2662,02	7,00	$\bar{x} = 2675,052; S = 187,863;$ $S_{\bar{x}} = 84,015;$ $\Delta\bar{x} = 233,561; \bar{\mathcal{E}} = 8,731$ $S_r = 7,023 \%$	249,999	2792,15	7,07	$\bar{x} = 2676,672; S = 187,817;$ $S_{\bar{x}} = 83,994;$ $\Delta\bar{x} = 233,504; \bar{\mathcal{E}} = 8,724;$ $S_r = 7,017 \%$
2500	248,769	2778,88			230,172	2578,18		
2500	246,481	2754,18			213,247	2395,52		
2500	209,592	2356,08			255,747	2854,18		
2500	252,959	2824,10			247,328	2763,33		
4000	392,162	4326,38	6,07	$\bar{x} = 4242,640; S = 240,842;$ $S_{\bar{x}} = 107,708;$ $\Delta\bar{x} = 299,427; \bar{\mathcal{E}} = 7,058$ $S_r = 5,677 \%$	385,296	4252,28	6,41	$\bar{x} = 4206,124; S = 216,875;$ $S_{\bar{x}} = 96,990;$ $\Delta\bar{x} = 269,631; \bar{\mathcal{E}} = 6,410;$ $S_r = 5,156 \%$
4000	363,884	4021,20			350,271	3874,29		
4000	410,246	4521,54			394,868	4355,58		
4000	358,400	3962,02			373,543	4125,44		
4000	397,322	4382,06			401,118	4423,03		

Таблица 19 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефепима в моче с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	33,879	433,02	6,09	$\bar{x} = 424,364; S = 17,015;$ $S_{\bar{x}} = 7,609;$ $\Delta\bar{x} = 21,154; \bar{\mathcal{E}} = 4,985;$ $S_r = 4,009 \%$	34,002	434,29	6,40	$\bar{x} = 425,602; S = 18,913;$ $S_{\bar{x}} = 8,458;$ $\Delta\bar{x} = 23,513; \bar{\mathcal{E}} = 5,525$ $S_r = 4,444 \%$
400	32,638	420,26			35,652	451,26		
400	35,101	445,59			32,600	419,87		
400	30,626	399,57			32,863	422,58		
400	32,941	423,38			30,668	400,01		
2500	229,177	2441,25	4,75	$\bar{x} = 2618,636; S = 142,908;$ $S_{\bar{x}} = 63,911;$ $\Delta\bar{x} = 177,671; \bar{\mathcal{E}} = 6,785$ $S_r = 5,457 \%$	230,885	2458,81	5,33	$\bar{x} = 2633,314; S = 141,259;$ $S_{\bar{x}} = 63,173;$ $\Delta\bar{x} = 175,621; \bar{\mathcal{E}} = 6,669;$ $S_r = 5,364 \%$
2500	254,494	2701,58			256,387	2721,05		
2500	233,899	2489,81			234,957	2500,69		
2500	260,222	2760,48			258,759	2745,44		
2500	254,346	2700,06			258,286	2740,58		
4000	370,681	3896,32	-2,06	$\bar{x} = 3917,446; S = 134,426;$ $S_{\bar{x}} = 60,117;$ $\Delta\bar{x} = 167,125; \bar{\mathcal{E}} = 4,266$ $S_r = 3,431 \%$	366,787	3856,28	-2,74	$\bar{x} = 3890,502; S = 144,754;$ $S_{\bar{x}} = 64,736;$ $\Delta\bar{x} = 179,966; \bar{\mathcal{E}} = 4,626;$ $S_r = 3,721 \%$
4000	380,814	4000,52			390,708	4102,26		
4000	361,536	3802,28			360,307	3789,65		
4000	390,739	4102,57			355,581	3741,05		
4000	359,908	3785,54			377,192	3963,27		

Таблица 20 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефепима в плазме с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	32,185	424,15	5,19	$\bar{x} = 420,752; S = 14,378;$ $S_{\bar{x}} = 6,430;$ $\Delta\bar{x} = 17,876; \bar{\mathcal{E}} = 4,249;$ $S_r = 3,417 \%$	32,507	427,54	5,24	$\bar{x} = 420,976; S = 15,463;$ $S_{\bar{x}} = 6,915;$ $\Delta\bar{x} = 19,225; \bar{\mathcal{E}} = 4,567$ $S_r = 3,673 \%$
400	32,758	430,18			29,843	399,54		
400	32,292	425,28			33,276	435,62		
400	29,450	395,41			30,853	410,15		
400	32,621	428,74			32,934	432,03		
2500	235,860	2564,81	4,75	$\bar{x} = 2618,676; S = 78,554;$ $S_{\bar{x}} = 35,130;$ $\Delta\bar{x} = 97,663; \bar{\mathcal{E}} = 3,729$ $S_r = 3,000 \%$	233,891	2544,12	4,91	$\bar{x} = 2622,696; S = 100,323;$ $S_{\bar{x}} = 44,866;$ $\Delta\bar{x} = 124,727; \bar{\mathcal{E}} = 4,756;$ $S_r = 3,825 \%$
2500	249,063	2703,58			253,705	2752,36		
2500	248,543	2698,11			229,816	2501,29		
2500	232,602	2530,57			245,234	2663,33		
2500	238,857	2596,31			244,192	2652,38		
4000	393,879	4225,62	3,85	$\bar{x} = 4153,972; S = 111,569;$ $S_{\bar{x}} = 49,895;$ $\Delta\bar{x} = 138,709; \bar{\mathcal{E}} = 3,339$ $S_r = 2,686 \%$	392,713	4213,36	4,14	$\bar{x} = 4165,738; S = 100,956;$ $S_{\bar{x}} = 45,149;$ $\Delta\bar{x} = 125,514; \bar{\mathcal{E}} = 3,013;$ $S_r = 2,423 \%$
4000	391,492	4200,53			394,183	4228,81		
4000	368,205	3955,78			372,944	4005,59		
4000	391,086	4196,26			396,420	4252,32		
4000	390,649	4191,67			384,649	4128,61		

Таблица 21 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цefпирома в ткани печени с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	31,955	366,21	-4,06	$\bar{x} = 383,756; S = 23,008;$ $S_{\bar{x}} = 10,289;$ $\Delta\bar{x} = 28,605; \bar{\mathcal{E}} = 7,454;$ $S_r = 5,995 \%$	37,033	412,56	-5,55	$\bar{x} = 377,816; S = 26,999;$ $S_{\bar{x}} = 12,074;$ $\Delta\bar{x} = 33,566; \bar{\mathcal{E}} = 8,884$ $S_r = 7,146 \%$
400	31,510	362,15			35,794	401,25		
400	37,837	419,90			31,147	358,84		
400	34,479	389,25			31,510	362,15		
400	33,605	381,27			30,648	354,28		
2500	272,681	2563,38	5,29	$\bar{x} = 2632,320; S = 113,799;$ $S_{\bar{x}} = 50,892;$ $\Delta\bar{x} = 141,481; \bar{\mathcal{E}} = 5,375$ $S_r = 4,323 \%$	272,674	2563,32	5,45	$\bar{x} = 2636,360; S = 128,218;$ $S_{\bar{x}} = 57,341;$ $\Delta\bar{x} = 159,408; \bar{\mathcal{E}} = 6,047;$ $S_r = 4,863 \%$
2500	278,292	2614,59			290,025	2721,68		
2500	266,107	2503,38			287,508	2698,71		
2500	298,464	2798,71			293,290	2751,48		
2500	285,627	2681,54			259,887	2446,61		
4000	458,163	4256,32	4,59	$\bar{x} = 4183,540; S = 149,917;$ $S_{\bar{x}} = 67,045;$ $\Delta\bar{x} = 186,385; \bar{\mathcal{E}} = 4,455$ $S_r = 3,584 \%$	426,276	3965,28	5,08	$\bar{x} = 4203,312; S = 141,912;$ $S_{\bar{x}} = 63,465;$ $\Delta\bar{x} = 176,433; \bar{\mathcal{E}} = 4,197;$ $S_r = 3,376 \%$
4000	421,485	3921,55			457,640	4251,55		
4000	451,649	4196,87			467,202	4338,82		
4000	461,211	4284,14			458,555	4259,90		
4000	458,437	4258,82			452,103	4201,01		

Таблица 22 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефпинома в крови с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	34,892	401,25	-3,65	$\bar{x} = 385,386; S = 16,585;$ $S_{\bar{x}} = 7,417;$ $\Delta\bar{x} = 20,620; \bar{\mathcal{E}} = 5,350;$ $S_r = 4,304 \%$	32,149	375,27	-3,95	$\bar{x} = 384,190; S = 20,106;$ $S_{\bar{x}} = 8,992;$ $\Delta\bar{x} = 24,996; \bar{\mathcal{E}} = 6,506$ $S_r = 5,233 \%$
400	32,182	375,59			31,126	365,59		
400	35,349	405,58			36,405	415,58		
400	31,834	372,29			31,834	372,29		
400	31,827	372,22			33,939	392,22		
2500	268,477	2613,31	5,29	$\bar{x} = 2632,332; S = 105,885;$ $S_{\bar{x}} = 47,353;$ $\Delta\bar{x} = 131,642; \bar{\mathcal{E}} = 5,001$ $S_r = 4,022 \%$	273,757	2663,31	5,72	$\bar{x} = 2642,896; S = 123,666;$ $S_{\bar{x}} = 55,305;$ $\Delta\bar{x} = 153,748; \bar{\mathcal{E}} = 5,817;$ $S_r = 4,679 \%$
2500	257,026	2504,87			249,344	2432,12		
2500	263,884	2569,82			274,444	2669,82		
2500	285,246	2772,12			283,771	2758,15		
2500	277,793	2701,54			276,689	2691,08		
4000	436,262	4202,25	4,32	$\bar{x} = 4172,976; S = 153,589;$ $S_{\bar{x}} = 68,687;$ $\Delta\bar{x} = 190,950; \bar{\mathcal{E}} = 4,576$ $S_r = 3,681 \%$	441,442	4251,30	4,83	$\bar{x} = 4193,394; S = 170,238;$ $S_{\bar{x}} = 76,133;$ $\Delta\bar{x} = 211,649; \bar{\mathcal{E}} = 5,047;$ $S_r = 4,060 \%$
4000	438,684	4225,18			417,185	4021,59		
4000	404,685	3903,21			428,515	4128,88		
4000	444,352	4278,86			463,485	4460,05		
4000	441,873	4255,38			426,009	4105,15		

Таблица 23. – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефпирома в моче с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	39,322	429,26	5,40	$\bar{x} = 421,610; S = 15,126;$ $S_{\bar{x}} = 6,765;$ $\Delta\bar{x} = 18,806; \bar{\mathcal{E}} = 4,460;$ $S_r = 3,588 \%$	38,416	421,05	5,57	$\bar{x} = 422,278; S = 16,786;$ $S_{\bar{x}} = 7,507;$ $\Delta\bar{x} = 20,870; \bar{\mathcal{E}} = 4,942$ $S_r = 3,975 \%$
400	39,432	430,25			38,883	425,28		
400	35,573	395,28			36,719	405,67		
400	38,549	422,25			41,480	448,81		
400	39,515	431,01			37,261	410,58		
2500	284,754	2653,38	4,38	$\bar{x} = 2609,576; S = 67,063;$ $S_{\bar{x}} = 29,991;$ $\Delta\bar{x} = 83,376; \bar{\mathcal{E}} = 3,195$ $S_r = 2,570 \%$	285,620	2661,23	4,65	$\bar{x} = 2616,372; S = 80,869;$ $S_{\bar{x}} = 36,166;$ $\Delta\bar{x} = 100,541; \bar{\mathcal{E}} = 3,843;$ $S_r = 3,091 \%$
2500	284,539	2651,43			279,479	2605,58		
2500	267,355	2495,71			291,617	2715,57		
2500	279,064	2601,82			267,631	2498,21		
2500	283,889	2645,54			279,004	2601,27		
4000	447,215	4125,61	4,07	$\bar{x} = 4162,824; S = 93,432;$ $S_{\bar{x}} = 41,784;$ $\Delta\bar{x} = 116,160; \bar{\mathcal{E}} = 2,790$ $S_r = 2,244 \%$	447,203	4125,51	4,33	$\bar{x} = 4173,290; S = 127,387;$ $S_{\bar{x}} = 56,969;$ $\Delta\bar{x} = 158,375; \bar{\mathcal{E}} = 3,795;$ $S_r = 3,052 \%$
4000	447,541	4128,57			447,089	4124,47		
4000	469,639	4328,82			469,322	4325,95		
4000	444,672	4102,57			434,709	4012,28		
4000	447,539	4128,55			464,057	4278,24		

Таблица 24 – Практическая оценка валидационных показателей точности и прецизионности методики количественного определения цефпинома в плазме с использованием нормальнофазовой ВЭЖХ

Уровень концентрации вещества, мкг в 1 г биологического объекта	Определение в первый день эксперимента				Определение во второй день эксперимента			
	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики	Значение площади пика на хроматограмме модельного раствора	Найдено, мкг в 1 г биологического объекта	Относительная погрешность, %	Метрологические характеристики
400	37,422	412,25	4,56	$\bar{x} = 418,226; S = 11,873;$ $S_{\bar{x}} = 5,310;$ $\Delta\bar{x} = 14,761; \bar{\mathcal{E}} = 3,530;$ $S_r = 2,839 \%$	35,714	396,56	5,19	$\bar{x} = 420,774; S = 13,831;$ $S_{\bar{x}} = 6,185;$ $\Delta\bar{x} = 17,195; \bar{\mathcal{E}} = 4,087$ $S_r = 3,287 \%$
400	36,145	400,52			38,545	422,56		
400	38,470	421,87			39,382	430,25		
400	39,102	427,68			39,164	428,25		
400	39,225	428,81			38,946	426,25		
2500	280,139	2641,28	4,18	$\bar{x} = 2604,492; S = 63,869;$ $S_{\bar{x}} = 28,563;$ $\Delta\bar{x} = 79,406; \bar{\mathcal{E}} = 3,049$ $S_r = 2,452 \%$	263,806	2491,28	4,33	$\bar{x} = 2608,200; S = 67,955;$ $S_{\bar{x}} = 30,390;$ $\Delta\bar{x} = 84,485; \bar{\mathcal{E}} = 3,239;$ $S_r = 2,605 \%$
2500	275,844	2601,84			282,538	2663,31		
2500	264,245	2495,32			277,176	2614,07		
2500	281,368	2652,57			278,594	2627,09		
2500	279,068	2631,45			280,571	2645,25		
4000	430,634	4023,38	3,61	$\bar{x} = 4144,336; S = 81,954;$ $S_{\bar{x}} = 36,651;$ $\Delta\bar{x} = 101,890; \bar{\mathcal{E}} = 2,459$ $S_r = 1,978 \%$	446,844	4172,24	3,72	$\bar{x} = 4148,778; S = 89,098;$ $S_{\bar{x}} = 39,846;$ $\Delta\bar{x} = 110,771; \bar{\mathcal{E}} = 2,670;$ $S_r = 2,148 \%$
4000	444,561	4151,28			427,048	3990,44		
4000	440,125	4110,54			449,057	4192,57		
4000	452,702	4226,04			449,875	4200,08		
4000	451,003	4210,44			448,621	4188,56		

Таблица 25 – Распределение цефтриаксона при внутривенном введении в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,04	10,813	107,664	$\bar{x} = 97,75$	Мышцы (бедренные)	2,60	2,088	80,307	$\bar{x} = 82,63$
	10,10	9,595	94,996	$S = 5,73$		2,57	2,097	81,607	$S = 4,44$
	10,60	9,971	94,070	$S^x = 2,56$		2,54	2,295	90,488	$S^x = 1,99$
	10,20	9,952	97,567	$\Delta\bar{x} = 7,13$		2,67	2,156	80,750	$\Delta\bar{x} = 5,52$
	10,00	9,428	94,282	$\bar{e} = 7,29\%$		2,62	2,095	79,975	$\bar{e} = 6,68\%$
Почки	2,70	7,167	265,399	$\bar{x} = 272,22$	Легкие	1,35	5,095	377,403	$\bar{x} = 359,19$
	2,70	7,392	273,786	$S = 10,17$		1,48	5,094	344,186	$S = 14,67$
	2,68	7,757	289,327	$S^x = 4,55$		1,40	5,052	360,239	$S^x = 6,56$
	2,68	7,167	267,230	$\Delta\bar{x} = 12,64$		1,46	5,036	344,946	$\Delta\bar{x} = 18,24$
	2,71	7,196	265,357	$\bar{e} = 4,64\%$		1,38	5,095	369,198	$\bar{e} = 5,08\%$
Кровь	1,11	4,101	367,962	$\bar{x} = 376,49$	Желудок с содержимым	1,54	8,699	564,868	$\bar{x} = 578,03$
	1,13	4,165	367,127	$S = 16,78$		1,50	8,862	590,828	$S = 60,61$
	1,14	4,209	370,151	$S^x = 7,50$		1,43	9,525	666,056	$S^x = 27,10$
	1,11	4,507	406,372	$\Delta\bar{x} = 20,86$		1,56	8,913	571,367	$\Delta\bar{x} = 75,35$
	1,12	4,166	370,813	$\bar{e} = 5,54\%$		1,32	6,561	497,025	$\bar{e} = 13,04\%$
Селезенка	2,26	7,442	328,986	$\bar{x} = 337,11$	Тонкий кишечник с содержимым	10,29	8,706	84,605	$\bar{x} = 89,08$
	2,31	7,478	323,179	$S = 19,78$		10,35	10,559	102,017	$S = 7,65$
	2,39	8,068	337,497	$S^x = 8,85$		9,77	8,580	87,860	$S^x = 3,42$
	2,15	7,969	371,072	$\Delta\bar{x} = 24,59$		9,85	8,720	88,523	$\Delta\bar{x} = 9,51$
	2,38	7,731	324,814	$\bar{e} = 7,29\%$		11,23	9,252	82,391	$\bar{e} = 10,67\%$
Сердце	1,32	10,692	808,152	$\bar{x} = 829,99$	Мочевой пузырь с мочой	0,26	7,231	2781,275	$\bar{x} = 2718,93$
	1,39	12,752	915,419	$S = 58,86$		0,16	4,315	2765,906	$S = 140,62$
	1,42	12,250	864,172	$S^x = 26,32$		0,16	4,209	2566,227	$S^x = 62,89$
	1,38	10,857	789,279	$\Delta\bar{x} = 73,18$		0,28	7,237	2584,500	$\Delta\bar{x} = 174,83$
	1,38	10,701	772,925	$\bar{e} = 8,82\%$		0,14	4,055	2896,733	$\bar{e} = 6,43\%$

Таблица 26 –Распределение цефепима при внутривенном введении в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,29	10,919	106,112	$\bar{x} = 111,29$	Мышцы (бедренные)	3,89	7,695	197,816	$\bar{x} = 203,03$
	10,35	12,026	116,194	$S = 7,29$		4,01	7,796	194,411	$S = 6,78$
	10,01	10,785	107,704	$S\bar{x} = 3,26$		3,65	7,697	211,118	$S\bar{x} = 3,03$
	11,08	11,613	104,812	$\Delta\bar{x} = 9,07$		4,36	8,993	206,257	$\Delta\bar{x} = 8,42$
	9,38	11,410	121,638	$\bar{\varepsilon} = 8,15\%$		3,68	7,564	205,539	$\bar{\varepsilon} = 4,15\%$
Почки	2,30	7,472	324,880	$\bar{x} = 302,28$	Легкие	1,24	4,355	351,187	$\bar{x} = 355,65$
	2,54	7,289	286,987	$S = 18,14$		1,52	4,998	328,835	$S = 23,68$
	2,46	7,626	310,000	$S\bar{x} = 8,11$		1,36	5,301	389,172	$S\bar{x} = 10,59$
	2,91	8,166	280,634	$\Delta\bar{x} = 22,56$		1,28	4,714	368,265	$\Delta\bar{x} = 29,44$
	2,37	7,321	308,913	$\bar{\varepsilon} = 7,46\%$		1,44	4,907	340,774	$\bar{\varepsilon} = 8,28\%$
Кровь	0,98	5,445	555,643	$\bar{x} = 587,04$	Желудок с содержимым	2,05	5,186	252,959	$\bar{x} = 258,50$
	1,25	7,257	580,544	$S = 29,24$		1,89	4,850	256,593	$S = 13,56$
	0,83	4,769	571,772	$S\bar{x} = 13,08$		1,80	5,068	281,311	$S\bar{x} = 6,06$
	1,36	8,083	594,314	$\Delta\bar{x} = 36,36$		1,48	3,794	256,383	$\Delta\bar{x} = 16,85$
	0,87	5,507	632,940	$\bar{\varepsilon} = 6,19\%$		2,00	4,905	245,242	$\bar{\varepsilon} = 6,52\%$
Селезенка	2,01	9,858	490,438	$\bar{x} = 458,28$	Тонкий кишечник с содержимым	8,42	10,439	123,983	$\bar{x} = 123,35$
	2,51	11,016	438,886	$S = 21,48$		9,28	10,420	112,288	$S = 11,58$
	2,22	10,318	465,620	$S\bar{x} = 9,60$		8,75	12,325	140,847	$S\bar{x} = 5,18$
	2,28	10,004	438,780	$\Delta\bar{x} = 26,70$		8,39	9,513	113,390	$\Delta\bar{x} = 14,40$
	2,64	12,082	457,660	$\bar{\varepsilon} = 5,83\%$		10,81	13,652	126,263	$\bar{\varepsilon} = 11,67\%$
Сердце	0,98	5,093	519,707	$\bar{x} = 489,95$	Мочевой пузырь с мочой	0,35	9,311	2660,151	$\bar{x} = 2761,84$
	1,24	6,474	522,112	$S = 28,30$		0,29	7,488	2582,032	$S = 192,87$
	1,05	4,927	470,621	$S\bar{x} = 12,66$		0,20	5,245	2655,603	$S\bar{x} = 86,25$
	1,63	7,621	467,542	$\Delta\bar{x} = 35,18$		0,31	8,855	2856,498	$\Delta\bar{x} = 239,79$
	1,05	4,932	469,759	$\bar{\varepsilon} = 7,18\%$		0,21	6,415	3054,889	$\bar{\varepsilon} = 8,68\%$

Таблица 27 – Распределение цефпирома при внутривенном введении в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	11,02	10,236	92,890	$\bar{x} = 94,01$	Мышцы (бедренные)	3,86	6,109	158,256	$\bar{x} = 157,84$
	11,59	12,275	105,913	$S = 8,42$		4,98	7,516	150,915	$S = 9,20$
	11,05	10,454	94,649	$S^x = 3,77$		4,40	7,616	173,234	$S^x = 4,11$
	10,63	10,037	94,424	$\Delta\bar{x} = 10,47$		3,92	6,117	156,039	$\Delta\bar{x} = 11,43$
	10,38	8,529	82,164	$\bar{\varepsilon} = 11,14\%$		4,14	6,242	150,778	$\bar{\varepsilon} = 7,24\%$
Почки	2,28	6,588	288,952	$\bar{x} = 302,26$	Легкие	1,59	4,262	268,065	$\bar{x} = 282,02$
	2,36	7,134	302,291	$S = 13,01$		1,14	3,032	265,975	$S = 20,81$
	2,61	8,446	323,345	$S^x = 5,82$		1,05	3,332	317,446	$S^x = 9,31$
	3,08	9,298	301,883	$\Delta\bar{x} = 16,18$		1,24	3,491	281,513	$\Delta\bar{x} = 25,87$
	2,24	6,604	294,830	$\bar{\varepsilon} = 5,35\%$		1,37	3,796	277,077	$\bar{\varepsilon} = 9,17\%$
Кровь	1,36	8,827	649,017	$\bar{x} = 671,11$	Желудок с содержимым	1,98	3,450	174,267	$\bar{x} = 182,05$
	1,85	12,133	655,835	$S = 40,04$		2,05	3,743	182,584	$S = 13,24$
	1,50	11,136	742,426	$S^x = 17,91$		2,69	5,502	204,303	$S^x = 5,92$
	1,06	6,974	657,949	$\Delta\bar{x} = 49,78$		2,57	4,382	170,513	$\Delta\bar{x} = 16,46$
	1,28	8,324	650,309	$\bar{\varepsilon} = 7,42\%$		2,46	4,393	178,588	$\bar{\varepsilon} = 9,04\%$
Селезенка	2,59	7,609	293,777	$\bar{x} = 314,55$	Тонкий кишечник с содержимым	12,92	5,821	45,056	$\bar{x} = 45,78$
	2,27	6,878	302,978	$S = 21,27$		10,53	4,634	44,003	$S = 2,93$
	2,43	7,786	320,759	$S^x = 9,51$		13,92	7,094	50,978	$S^x = 1,31$
	2,68	9,337	348,395	$\Delta\bar{x} = 26,44$		9,83	4,350	44,248	$\Delta\bar{x} = 3,65$
	2,13	6,536	306,852	$\bar{\varepsilon} = 8,41\%$		9,82	4,380	44,599	$\bar{\varepsilon} = 7,97\%$
Сердце	1,20	5,958	496,481	$\bar{x} = 499,60$	Мочевой пузырь с мочой	0,58	9,668	1666,978	$\bar{x} = 1709,88$
	1,28	6,852	535,326	$S = 23,60$		0,96	16,346	1702,659	$S = 74,90$
	0,83	4,118	495,212	$S^x = 10,55$		0,50	9,270	1841,201	$S^x = 33,50$
	0,98	4,599	469,308	$\Delta\bar{x} = 29,34$		0,48	8,020	1670,918	$\Delta\bar{x} = 93,12$
	1,15	5,769	501,665	$\bar{\varepsilon} = 5,87\%$		0,53	8,839	1667,643	$\bar{\varepsilon} = 5,45\%$

Таблица 28 – Распределение цефтриаксона при внутривенном введении в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	8,94	10,309	115,315	$\bar{x} = 117,32$	Мышцы (бедренные)	4,26	1,860	43,660	$\bar{x} = 38,91$
	8,45	10,857	128,488	$S = 9,15$		5,24	1,950	37,223	$S = 4,53$
	8,41	9,243	109,972	$S_{\bar{x}} = 4,09$		5,76	1,898	32,965	$S_{\bar{x}} = 2,03$
	8,76	9,438	107,739	$\Delta\bar{x} = 11,37$		4,36	1,887	43,276	$\Delta\bar{x} = 5,63$
	8,34	10,431	125,066	$\bar{\varepsilon} = 9,69\%$		5,02	1,878	37,411	$\bar{\varepsilon} = 14,48\%$
Почки	2,76	1,805	65,403	$\bar{x} = 69,94$	Легкие	1,42	4,548	320,297	$\bar{x} = 324,73$
	2,86	2,036	71,179	$S = 2,77$		1,35	4,491	332,649	$S = 11,88$
	2,74	1,995	72,779	$S_{\bar{x}} = 1,24$		1,33	4,173	313,670	$S_{\bar{x}} = 5,32$
	2,83	1,999	70,650	$\Delta\bar{x} = 3,45$		1,44	4,545	315,648	$\Delta\bar{x} = 14,78$
	2,77	1,931	69,711	$\bar{\varepsilon} = 4,93\%$		1,26	4,302	341,397	$\bar{\varepsilon} = 4,55\%$
Кровь	2,83	13,943	492,686	$\bar{x} = 523,02$	Желудок с содержимым	1,65	9,971	604,329	$\bar{x} = 561,45$
	2,85	15,120	530,528	$S = 22,89$		1,85	9,105	492,172	$S = 41,99$
	2,73	14,164	518,646	$S_{\bar{x}} = 10,24$		1,68	9,525	567,785	$S_{\bar{x}} = 18,78$
	2,54	14,115	555,727	$\Delta\bar{x} = 28,46$		1,59	9,234	580,779	$\Delta\bar{x} = 52,20$
	2,76	14,284	517,523	$\bar{\varepsilon} = 5,44\%$		1,62	9,107	562,169	$\bar{\varepsilon} = 9,30\%$
Селезенка	1,13	2,831	250,567	$\bar{x} = 268,48$	Тонкий кишечник с содержимым	11,29	9,049	80,150	$\bar{x} = 75,42$
	1,05	2,973	283,175	$S = 17,65$		12,39	9,114	73,559	$S = 6,87$
	1,02	2,949	288,281	$S_{\bar{x}} = 7,89$		12,34	9,239	74,878	$S_{\bar{x}} = 3,07$
	1,09	2,939	269,654	$\Delta\bar{x} = 21,94$		10,65	8,861	83,201	$\Delta\bar{x} = 8,54$
	1,20	3,009	250,715	$\bar{\varepsilon} = 8,17\%$		13,92	9,092	65,318	$\bar{\varepsilon} = 11,32\%$
Сердце	1,25	9,254	740,356	$\bar{x} = 776,51$	Мочевой пузырь с мочой	0,35	2,058	588,039	$\bar{x} = 571,10$
	1,20	9,969	830,790	$S = 38,83$		0,20	1,184	591,779	$S = 49,47$
	1,19	9,282	782,330	$S_{\bar{x}} = 17,37$		0,21	1,187	577,608	$S_{\bar{x}} = 22,12$
	1,28	9,440	737,537	$\Delta\bar{x} = 48,28$		0,25	1,214	485,561	$\Delta\bar{x} = 61,51$
	1,15	9,103	791,542	$\bar{\varepsilon} = 6,22\%$		0,19	1,164	612,519	$\bar{\varepsilon} = 10,77\%$

Таблица 29 – Распределение цефепима при внутривенном введении в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,02	10,163	101,423	$\bar{x} = 107,68$	Мышцы (бедренные)	6,21	3,083	49,649	$\bar{x} = 46,86$
	9,13	10,159	111,269	$S = 6,45$		5,63	2,685	47,691	$S = 1,90$
	8,84	9,910	112,139	$S_{\bar{x}} = 2,89$		6,04	2,799	46,356	$S_{\bar{x}} = 0,85$
	9,87	11,212	113,594	$\Delta\bar{x} = 8,02$		6,32	2,820	44,628	$\Delta\bar{x} = 2,37$
	11,23	11,226	99,960	$\bar{\varepsilon} = 7,45\%$		5,95	2,736	45,978	$\bar{\varepsilon} = 5,05\%$
Почки	2,89	6,110	211,422	$\bar{x} = 213,82$	Легкие	1,18	4,804	407,082	$\bar{x} = 436,69$
	2,69	6,053	225,000	$S = 16,71$		1,02	4,711	461,911	$S = 21,81$
	3,05	6,191	203,186	$S_{\bar{x}} = 7,47$		1,11	4,776	432,017	$S_{\bar{x}} = 9,75$
	3,15	6,107	193,882	$\Delta\bar{x} = 20,77$		1,12	4,799	428,438	$\Delta\bar{x} = 27,12$
	2,61	6,150	235,618	$\bar{\varepsilon} = 9,71\%$		1,02	4,631	454,013	$\bar{\varepsilon} = 6,21\%$
Кровь	2,13	12,340	579,322	$\bar{x} = 548,72$	Желудок с содержимым	2,19	8,626	393,897	$\bar{x} = 336,56$
	2,36	12,722	539,053	$S = 42,57$		2,35	8,096	344,492	$S = 35,17$
	2,52	12,809	507,795	$S_{\bar{x}} = 19,04$		2,25	6,845	304,270	$S_{\bar{x}} = 15,73$
	1,89	11,440	605,317	$\Delta\bar{x} = 52,92$		2,12	6,737	317,786	$\Delta\bar{x} = 43,72$
	2,61	13,366	512,113	$\bar{\varepsilon} = 9,65\%$		1,98	6,383	322,353	$\bar{\varepsilon} = 12,99\%$
Селезенка	1,02	3,967	388,887	$\bar{x} = 400,92$	Тонкий кишечник с содержимым	9,86	9,315	94,473	$\bar{x} = 97,19$
	1,23	4,542	369,238	$S = 28,18$		11,59	13,054	112,636	$S = 8,74$
	0,82	3,625	443,947	$S_{\bar{x}} = 12,60$		10,54	9,652	91,601	$S_{\bar{x}} = 3,91$
	0,89	3,655	410,672	$\Delta\bar{x} = 35,04$		10,32	9,542	92,460	$\Delta\bar{x} = 10,86$
	0,93	3,644	391,870	$\bar{\varepsilon} = 8,74\%$		9,83	9,317	94,780	$\bar{\varepsilon} = 11,18\%$
Сердце	0,93	7,970	857,026	$\bar{x} = 835,36$	Мочевой пузырь с мочой	0,42	3,195	760,626	$\bar{x} = 859,72$
	1,12	8,297	740,821	$S = 57,96$		0,25	2,092	836,889	$S = 89,54$
	1,08	9,688	894,567	$S_{\bar{x}} = 25,92$		0,21	2,060	1005,032	$S_{\bar{x}} = 40,01$
	1,52	12,578	827,532	$\Delta\bar{x} = 72,05$		0,36	3,010	836,246	$\Delta\bar{x} = 111,21$
	1,28	10,968	856,852	$\bar{\varepsilon} = 8,63\%$		0,28	2,407	859,794	$\bar{\varepsilon} = 12,94\%$

Таблица 30 – Распределение цефпирома при внутривенном введении в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	11,23	10,835	96,479	$\bar{x} = 88,35$	Мышцы (бедренные)	5,93	1,637	27,607	$\bar{x} = 28,10$
	10,95	9,301	84,936	$S = 5,23$		4,56	1,425	31,254	$S = 1,81$
	10,79	9,169	84,996	$S_{\bar{x}} = 2,34$		5,82	1,552	26,644	$S_{\bar{x}} = 0,81$
	11,28	9,538	84,556	$\Delta\bar{x} = 6,50$		5,93	1,620	27,321	$\Delta\bar{x} = 2,25$
	10,56	9,586	90,775	$\varepsilon_{\bar{x}} = 7,36\%$		5,26	1,456	27,683	$\varepsilon_{\bar{x}} = 8,00\%$
Почки	2,59	11,132	429,813	$\bar{x} = 423,83$	Легкие	1,29	3,743	290,186	$\bar{x} = 307,22$
	3,25	12,836	394,967	$S = 21,91$		1,48	4,588	310,014	$S = 16,77$
	2,85	11,667	409,013	$S_{\bar{x}} = 9,80$		1,37	4,142	302,767	$S_{\bar{x}} = 7,50$
	2,12	9,551	450,502	$\Delta\bar{x} = 27,24$		1,11	3,711	334,341	$\Delta\bar{x} = 20,84$
	2,56	11,132	434,833	$\varepsilon_{\bar{x}} = 6,43\%$		1,25	3,735	298,793	$\varepsilon_{\bar{x}} = 6,79\%$
Кровь	1,39	6,172	444,048	$\bar{x} = 445,65$	Желудок с содержимым	1,85	4,859	262,629	$\bar{x} = 268,49$
	1,25	5,761	460,887	$S = 28,97$		2,38	6,034	253,533	$S = 27,01$
	0,98	4,730	484,857	$S_{\bar{x}} = 12,96$		2,54	6,210	244,352	$S_{\bar{x}} = 12,08$
	1,87	8,022	428,967	$\Delta\bar{x} = 36,02$		2,42	7,600	314,063	$\Delta\bar{x} = 33,58$
	0,93	3,808	409,489	$\varepsilon_{\bar{x}} = 8,08\%$		2,98	7,982	267,861	$\varepsilon_{\bar{x}} = 12,51\%$
Селезенка	1,03	3,485	338,333	$\bar{x} = 356,43$	Тонкий кишечник с содержимым	9,83	7,444	75,732	$\bar{x} = 77,56$
	0,89	3,079	345,993	$S = 21,19$		11,26	9,889	87,827	$S = 5,84$
	0,57	2,235	391,381	$S_{\bar{x}} = 9,48$		10,76	7,893	73,374	$S_{\bar{x}} = 2,61$
	0,65	2,346	360,899	$\Delta\bar{x} = 26,35$		10,52	7,855	74,668	$\Delta\bar{x} = 7,26$
	0,89	3,075	345,545	$\varepsilon_{\bar{x}} = 7,39\%$		10,27	7,825	76,197	$\varepsilon_{\bar{x}} = 9,36\%$
Сердце	1,24	8,748	705,501	$\bar{x} = 732,84$	Мочевой пузырь с мочой	0,93	1,740	187,136	$\bar{x} = 183,59$
	1,05	8,330	793,363	$S = 46,64$		1,21	2,071	171,164	$S = 12,03$
	1,19	8,316	700,855	$S_{\bar{x}} = 20,86$		0,98	1,761	179,085	$S_{\bar{x}} = 5,38$
	1,28	8,856	691,836	$\Delta\bar{x} = 57,98$		0,58	1,032	177,969	$\Delta\bar{x} = 14,96$
	1,29	9,967	772,660	$\varepsilon_{\bar{x}} = 7,91\%$		0,85	1,722	202,575	$\varepsilon_{\bar{x}} = 8,15\%$

Таблица 31 – Распределение цефтриаксона при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	9,85	59,074	599,737	$\bar{x} = 612,17$	Мышцы (бедренные)	2,54	1,309	51,529	$\bar{x} = 48,42$
	9,52	62,613	657,695	$S = 27,98$		2,58	1,216	47,126	$S = 3,49$
	10,11	62,500	618,200	$S\bar{x} = 12,51$		2,69	1,182	43,926	$S\bar{x} = 1,56$
	9,89	59,319	599,786	$\Delta\bar{x} = 34,79$		2,58	1,216	47,126	$\Delta\bar{x} = 4,34$
	10,11	59,187	585,427	$\bar{\varepsilon} = 5,68\%$		2,63	1,377	52,371	$\bar{\varepsilon} = 8,97\%$
Почки	2,51	9,551	380,500	$\bar{x} = 372,60$	Легкие	1,55	6,125	395,139	$\bar{x} = 427,50$
	2,55	9,697	380,289	$S = 11,17$		1,50	6,252	416,794	$S = 24,52$
	2,70	9,541	353,361	$S\bar{x} = 5,00$		1,49	6,281	421,562	$S\bar{x} = 10,97$
	2,61	9,756	373,797	$\Delta\bar{x} = 13,89$		1,36	6,125	450,343	$\Delta\bar{x} = 30,48$
	2,54	9,526	375,042	$\bar{\varepsilon} = 3,73\%$		1,35	6,125	453,678	$\bar{\varepsilon} = 7,13\%$
Кровь	1,15	11,063	961,984	$\bar{x} = 937,57$	Желудок с содержимым	1,53	5,733	374,714	$\bar{x} = 347,45$
	1,18	11,699	991,445	$S = 52,61$		1,54	4,245	275,670	$S = 40,74$
	1,29	11,792	914,112	$S\bar{x} = 23,53$		1,55	5,621	362,617	$S\bar{x} = 18,22$
	1,11	10,686	962,700	$\Delta\bar{x} = 65,41$		1,58	5,621	355,732	$\Delta\bar{x} = 50,65$
	1,25	10,720	857,619	$\bar{\varepsilon} = 6,98\%$		1,48	5,454	368,525	$\bar{\varepsilon} = 14,58\%$
Селезенка	2,10	11,454	545,445	$\bar{x} = 524,45$	Тонкий кишечник с содержимым	10,25	7,872	76,799	$\bar{x} = 70,42$
	2,15	12,120	563,719	$S = 34,48$		10,36	6,761	65,260	$S = 6,67$
	2,16	11,577	535,958	$S\bar{x} = 15,42$		9,89	7,769	78,555	$S\bar{x} = 2,98$
	2,22	10,720	482,893	$\Delta\bar{x} = 42,87$		10,15	6,614	65,163	$\Delta\bar{x} = 8,29$
	2,38	11,763	494,230	$\bar{\varepsilon} = 8,17\%$		10,26	6,805	66,325	$\bar{\varepsilon} = 11,77\%$
Сердце	1,35	13,808	1022,846	$\bar{x} = 1140,62$	Мочевой пузырь с мочой	0,35	4,015	1147,227	$\bar{x} = 1184,59$
	1,36	16,999	1249,955	$S = 92,73$		0,36	4,001	1111,281	$S = 58,39$
	1,38	16,446	1191,764	$S\bar{x} = 41,47$		0,24	2,841	1183,628	$S\bar{x} = 26,11$
	1,38	14,753	1069,057	$\Delta\bar{x} = 115,28$		0,29	3,545	1222,572	$\Delta\bar{x} = 62,59$
	1,39	16,255	1169,459	$\bar{\varepsilon} = 10,11\%$		0,26	3,271	1258,226	$\bar{\varepsilon} = 6,13\%$

Таблица – 32 Распределение цефепима при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,26	75,661	737,435	$\bar{x} = 721,52$	Мышцы (бедренные)	4,12	4,278	103,842	$\bar{x} = 99,79$
	10,39	75,306	724,797	$S = 51,21$		3,59	3,836	106,862	$S = 5,53$
	10,59	82,708	781,000	$S_{\bar{x}} = 22,90$		3,89	3,836	98,621	$S_{\bar{x}} = 2,47$
	10,26	65,644	639,800	$\Delta\bar{x} = 63,67$		4,11	3,832	93,230	$\Delta\bar{x} = 6,88$
	10,36	75,062	724,540	$\bar{\varepsilon} = 8,82\%$		4,09	3,942	96,387	$\bar{\varepsilon} = 6,89\%$
Почки	2,69	9,835	365,605	$\bar{x} = 399,22$	Легкие	1,11	4,711	424,418	$\bar{x} = 397,47$
	2,54	9,586	377,409	$S = 28,54$		1,45	6,106	421,097	$S = 23,80$
	2,55	10,152	398,134	$S_{\bar{x}} = 12,77$		1,26	4,697	372,796	$S_{\bar{x}} = 10,64$
	2,36	10,212	432,723	$\Delta\bar{x} = 35,49$		1,25	4,753	380,234	$\Delta\bar{x} = 29,59$
	2,87	12,118	422,235	$\bar{\varepsilon} = 8,89\%$		1,69	6,571	388,809	$\bar{\varepsilon} = 7,44\%$
Кровь	1,25	12,086	966,873	$\bar{x} = 987,17$	Желудок с содержимым	1,96	3,325	169,662	$\bar{x} = 170,17$
	1,22	11,644	954,424	$S = 57,90$		2,56	4,725	184,564	$S = 9,52$
	1,05	11,446	1090,097	$S_{\bar{x}} = 25,89$		1,85	3,206	173,280	$S_{\bar{x}} = 4,26$
	1,03	9,844	955,727	$\Delta\bar{x} = 71,98$		2,36	3,804	161,192	$\Delta\bar{x} = 11,83$
	1,25	12,109	968,714	$\bar{\varepsilon} = 7,29\%$		2,44	3,956	162,133	$\bar{\varepsilon} = 6,95\%$
Селезенка	2,06	13,932	676,307	$\bar{x} = 630,21$	Тонкий кишечник с содержимым	10,60	8,316	78,449	$\bar{x} = 93,58$
	2,36	14,912	631,885	$S = 27,70$		9,58	9,466	98,815	$S = 9,13$
	2,54	15,341	603,961	$S_{\bar{x}} = 12,39$		9,36	9,513	101,630	$S_{\bar{x}} = 4,08$
	2,41	15,005	622,596	$\Delta\bar{x} = 34,44$		9,54	9,236	96,817	$\Delta\bar{x} = 11,35$
	2,49	15,345	616,274	$\bar{\varepsilon} = 5,46\%$		10,05	9,264	92,179	$\bar{\varepsilon} = 12,13\%$
Сердце	1,25	11,188	895,058	$\bar{x} = 962,65$	Мочевой пузырь с мочой	0,34	4,062	1194,687	$\bar{x} = 1126,89$
	1,63	15,354	941,989	$S = 49,36$		0,35	4,126	1178,967	$S = 68,12$
	1,06	10,709	1010,326	$S_{\bar{x}} = 22,07$		0,55	5,800	1054,504	$S_{\bar{x}} = 30,46$
	1,27	12,118	954,184	$\Delta\bar{x} = 61,36$		0,42	4,426	1053,718	$\Delta\bar{x} = 84,69$
	1,11	11,230	1011,680	$\bar{\varepsilon} = 6,37\%$		0,37	4,264	1152,565	$\bar{\varepsilon} = 7,52\%$

Таблица 33 – Распределение цефпирома при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме здоровых мышей

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	11,03	11,593	105,104	$\bar{x} = 110,54$	Мышцы (бедренные)	3,91	6,455	165,100	$\bar{x} = 167,24$
	11,56	12,030	104,062	$S = 11,00$		4,95	8,007	161,754	$S = 7,58$
	11,06	14,386	130,075	$S_{\bar{x}} = 4,92$		4,35	7,049	162,043	$S_{\bar{x}} = 3,39$
	10,59	11,398	107,629	$\Delta\bar{x} = 13,67$		3,98	7,172	180,196	$\Delta\bar{x} = 9,42$
	10,38	10,987	105,845	$\bar{\varepsilon} = 12,37\%$		4,18	6,985	167,112	$\bar{\varepsilon} = 5,63\%$
Почки	2,28	8,007	351,177	$\bar{x} = 356,27$	Легкие	1,59	4,760	299,363	$\bar{x} = 268,31$
	2,36	8,037	340,530	$S = 16,21$		1,10	3,064	278,576	$S = 20,85$
	2,61	9,613	368,046	$S_{\bar{x}} = 7,25$		1,08	2,763	255,868	$S_{\bar{x}} = 9,33$
	3,08	10,580	343,501	$\Delta\bar{x} = 20,15$		1,31	3,234	246,861	$\Delta\bar{x} = 25,93$
	2,24	8,469	378,075	$\bar{\varepsilon} = 5,66\%$		1,35	3,522	260,898	$\bar{\varepsilon} = 9,66\%$
Кровь	1,34	12,233	912,909	$\bar{x} = 954,43$	Желудок с содержимым	2,01	1,873	93,195	$\bar{x} = 102,52$
	1,89	17,222	911,223	$S = 46,51$		2,06	2,060	99,986	$S = 7,62$
	1,56	15,637	1002,358	$S_{\bar{x}} = 20,80$		2,89	2,920	101,045	$S_{\bar{x}} = 3,41$
	1,11	10,440	940,536	$\Delta\bar{x} = 57,82$		2,04	2,128	104,291	$\Delta\bar{x} = 9,47$
	1,29	12,966	1005,140	$\bar{\varepsilon} = 6,06\%$		2,56	2,920	114,071	$\bar{\varepsilon} = 9,24\%$
Селезенка	2,56	11,835	462,286	$\bar{x} = 497,50$	Тонкий кишечник с содержимым	11,25	7,159	63,636	$\bar{x} = 63,02$
	2,24	11,835	528,327	$S = 36,71$		10,26	6,197	60,398	$S = 3,15$
	2,54	11,695	460,419	$S_{\bar{x}} = 16,42$		14,20	8,621	60,715	$S_{\bar{x}} = 1,41$
	2,64	13,102	496,286	$\Delta\bar{x} = 45,63$		9,87	6,138	62,183	$\Delta\bar{x} = 3,92$
	2,11	11,398	540,186	$\bar{\varepsilon} = 9,17\%$		11,02	7,511	68,157	$\bar{\varepsilon} = 6,21\%$
Сердце	1,21	7,346	607,073	$\bar{x} = 588,61$	Мочевой пузырь с мочой	0,89	9,986	1122,066	$\bar{x} = 1124,83$
	1,27	7,825	616,108	$S = 35,41$		0,54	6,112	1131,865	$S = 40,96$
	0,85	4,506	530,064	$S_{\bar{x}} = 15,84$		0,68	7,981	1173,737	$S_{\bar{x}} = 18,32$
	0,99	5,748	580,559	$\Delta\bar{x} = 44,03$		0,49	5,196	1060,506	$\Delta\bar{x} = 50,92$
	1,15	7,006	609,258	$\bar{\varepsilon} = 7,48\%$		0,65	7,384	1135,958	$\bar{\varepsilon} = 4,53\%$

Таблица 34 – Распределение цефтриаксона при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	8,55	20,151	235,686	$\bar{x} = 241,26$	Мышцы (бедренные)	5,52	1,847	33,464	$\bar{x} = 35,80$
	9,12	23,230	254,710	$S = 11,24$		5,23	1,901	36,349	$S = 2,83$
	7,59	18,893	248,925	$S\bar{x} = 5,03$		5,22	1,705	32,668	$S\bar{x} = 1,27$
	8,86	20,019	225,949	$\Delta\bar{x} = 13,97$		4,89	1,798	36,774	$\Delta\bar{x} = 3,52$
	8,45	20,367	241,024	$\bar{\varepsilon} = 5,79\%$		4,29	1,705	39,750	$\bar{\varepsilon} = 9,84\%$
Почки	2,75	18,634	677,601	$\bar{x} = 668,61$	Легкие	1,45	2,880	198,611	$\bar{x} = 207,35$
	2,56	17,528	684,685	$S = 29,27$		1,55	3,169	204,427	$S = 8,04$
	2,84	18,017	634,414	$S\bar{x} = 13,09$		1,52	3,071	202,022	$S\bar{x} = 3,60$
	2,56	18,017	703,803	$\Delta\bar{x} = 36,39$		1,48	3,183	215,087	$\Delta\bar{x} = 10,00$
	2,75	17,670	642,541	$\bar{\varepsilon} = 5,44\%$		1,42	3,076	216,593	$\bar{\varepsilon} = 4,82\%$
Кровь	2,36	16,040	679,667	$\bar{x} = 663,41$	Желудок с содержимым	1,59	3,859	242,684	$\bar{x} = 216,26$
	2,98	18,654	625,960	$S = 23,10$		1,85	3,824	206,726	$S = 14,98$
	2,99	19,975	668,060	$S\bar{x} = 10,33$		1,56	3,325	213,155	$S\bar{x} = 6,70$
	2,56	17,513	684,112	$\Delta\bar{x} = 28,72$		1,55	3,266	210,742	$\Delta\bar{x} = 18,63$
	2,54	16,745	659,248	$\bar{\varepsilon} = 4,33\%$		1,62	3,369	207,980	$\bar{\varepsilon} = 8,61\%$
Селезенка	1,12	5,195	463,819	$\bar{x} = 477,03$	Тонкий кишечник с содержимым	11,01	4,642	42,159	$\bar{x} = 44,52$
	1,07	5,283	493,726	$S = 29,22$		12,22	5,278	43,191	$S = 4,65$
	1,05	4,588	436,943	$S\bar{x} = 13,07$		11,02	5,816	52,780	$S\bar{x} = 2,08$
	1,11	5,293	476,816	$\Delta\bar{x} = 36,33$		12,33	5,278	42,806	$\Delta\bar{x} = 5,78$
	1,03	5,293	513,850	$\bar{\varepsilon} = 7,62\%$		12,30	5,126	41,677	$\bar{\varepsilon} = 11,99\%$
Сердце	1,29	12,609	977,470	$\bar{x} = 880,70$	Мочевой пузырь с мочой	0,45	1,377	306,081	$\bar{x} = 354,82$
	1,28	11,146	870,783	$S = 54,95$		0,32	1,216	379,956	$S = 34,42$
	1,11	9,546	859,968	$S\bar{x} = 24,58$		0,34	1,162	341,772	$S\bar{x} = 15,39$
	1,26	10,676	847,316	$\Delta\bar{x} = 68,32$		0,26	1,025	394,227	$\Delta\bar{x} = 42,79$
	1,24	10,515	847,958	$\bar{\varepsilon} = 7,76\%$		0,28	0,986	352,084	$\bar{\varepsilon} = 12,06\%$

Таблица 35 – Распределение цефепима при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,24	23,121	225,787	$\bar{x} = 227,86$	Мышцы (бедренные)	5,36	1,825	34,041	$\bar{x} = 31,42$
	9,88	22,214	224,835	$S = 14,06$		6,32	1,940	30,691	$S = 1,53$
	9,26	20,418	220,500	$S\bar{x} = 6,29$		5,26	1,627	30,925	$S\bar{x} = 0,68$
	8,15	20,543	252,057	$\Delta\bar{x} = 17,48$		6,11	1,912	31,294	$\Delta\bar{x} = 1,90$
	9,22	19,926	216,114	$\bar{\varepsilon} = 7,67\%$		5,98	1,802	30,127	$\bar{\varepsilon} = 6,05\%$
Почки	2,96	24,552	829,470	$\bar{x} = 837,49$	Легкие	1,23	2,819	229,185	$\bar{x} = 214,66$
	2,65	24,824	936,751	$S = 59,74$		0,98	2,216	226,114	$S = 12,87$
	3,12	25,441	815,410	$S\bar{x} = 26,72$		1,24	2,649	213,601	$S\bar{x} = 5,76$
	2,99	24,819	830,077	$\Delta\bar{x} = 74,27$		1,11	2,221	200,047	$\Delta\bar{x} = 16,00$
	3,26	25,289	775,732	$\bar{\varepsilon} = 8,87\%$		1,26	2,575	204,364	$\bar{\varepsilon} = 7,46\%$
Кровь	2,25	13,163	585,028	$\bar{x} = 612,45$	Желудок с содержимым	2,25	2,916	129,585	$\bar{x} = 117,17$
	2,15	13,407	623,587	$S = 47,07$		2,12	2,732	128,845	$S = 11,28$
	1,85	12,767	690,121	$S\bar{x} = 21,05$		2,36	2,557	108,330	$S\bar{x} = 5,05$
	2,36	13,867	587,605	$\Delta\bar{x} = 58,52$		2,28	2,418	106,073	$\Delta\bar{x} = 14,03$
	2,36	13,591	575,901	$\bar{\varepsilon} = 9,56\%$		2,25	2,543	113,012	$\bar{\varepsilon} = 11,97\%$
Селезенка	1,24	6,566	529,537	$\bar{x} = 537,19$	Тонкий кишечник с содержимым	10,25	5,033	49,105	$\bar{x} = 45,49$
	1,05	5,553	528,903	$S = 29,14$		11,25	4,863	43,226	$S = 3,38$
	0,89	5,033	565,537	$S\bar{x} = 13,03$		11,23	4,757	42,360	$S\bar{x} = 1,51$
	1,23	6,106	496,415	$\Delta\bar{x} = 36,23$		10,36	4,508	43,518	$\Delta\bar{x} = 4,21$
	0,89	5,033	565,537	$\bar{\varepsilon} = 6,75\%$		9,89	4,868	49,217	$\bar{\varepsilon} = 9,25\%$
Сердце	1,24	10,097	814,289	$\bar{x} = 882,27$	Мочевой пузырь с мочой	0,45	2,405	534,369	$\bar{x} = 521,61$
	1,11	9,591	864,035	$S = 52,91$		0,56	2,732	487,770	$S = 31,72$
	1,56	14,047	900,450	$S\bar{x} = 23,66$		0,26	1,350	519,404	$S\bar{x} = 14,19$
	1,24	11,888	958,706	$\Delta\bar{x} = 65,78$		0,39	2,216	568,183	$\Delta\bar{x} = 39,44$
	1,56	13,633	873,891	$\bar{\varepsilon} = 7,46\%$		0,55	2,741	498,313	$\bar{\varepsilon} = 7,56\%$

Таблица 36 – Распределение цефпиром при внутривенном введении в эритроцитарных носителях (ЭН) в организме мышей с моделированным токсическим поражением почек, вызванным HgCl₂

Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные	Вид биоматериала	Масса биоматериала, используемого при исследовании, г	Количество распределенного вещества		Статистические данные
		мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биоматериала				мг в анализируемой массе биоматериала	мг в 100 г биологического объекта	
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Печень	10,56	23,691	224,343	$\bar{x} = 204,48$	Мышцы (бедренные)	4,58	0,958	20,909	$\bar{x} = 19,46$
	11,25	21,770	193,515	S = 14,05		5,96	1,034	17,348	S = 1,41
	10,26	21,245	207,064	$S_{\bar{x}} = 6,28$		5,23	0,983	18,796	$S_{\bar{x}} = 0,63$
	10,02	20,923	208,809	$\Delta\bar{x} = 17,47$		4,89	0,979	20,017	$\Delta\bar{x} = 1,75$
	11,08	20,906	188,680	$\bar{\varepsilon} = 8,54\%$		4,44	0,898	20,231	$\bar{\varepsilon} = 8,98\%$
Почки	3,22	35,873	1114,072	$\bar{x} = 1134,77$	Легкие	1,22	2,780	227,896	$\bar{x} = 232,18$
	2,89	34,601	1197,282	S = 49,46		1,56	3,543	227,136	S = 12,81
	2,95	34,572	1171,925	$S_{\bar{x}} = 22,12$		1,25	3,187	254,981	$S_{\bar{x}} = 5,72$
	3,26	34,996	1073,487	$\Delta\bar{x} = 61,49$		1,22	2,763	226,506	$\Delta\bar{x} = 15,93$
	2,26	25,246	1117,092	$\bar{\varepsilon} = 5,42\%$		1,63	3,658	224,403	$\bar{\varepsilon} = 6,86\%$
Кровь	1,52	7,341	482,983	$\bar{x} = 529,67$	Желудок с содержимым	2,26	4,667	206,488	$\bar{x} = 204,02$
	0,98	5,731	584,752	S = 51,67		1,89	3,967	209,905	S = 13,03
	0,69	4,039	585,401	$S_{\bar{x}} = 23,11$		2,63	4,891	185,980	$S_{\bar{x}} = 5,83$
	1,25	6,324	505,921	$\Delta\bar{x} = 64,24$		2,44	4,815	197,335	$\Delta\bar{x} = 16,20$
	1,29	6,286	487,276	$\bar{\varepsilon} = 12,14\%$		2,25	4,959	220,405	$\bar{\varepsilon} = 7,94\%$
Селезенка	1,11	7,524	677,803	$\bar{x} = 746,07$	Тонкий кишечник с содержимым	11,02	4,900	44,462	$\bar{x} = 45,04$
	0,98	7,426	757,767	S = 39,01		10,59	4,929	46,548	S = 2,00
	0,95	7,303	768,757	$S_{\bar{x}} = 17,45$		9,98	4,667	46,760	$S_{\bar{x}} = 0,89$
	0,68	5,120	752,967	$\Delta\bar{x} = 48,51$		10,26	4,675	45,566	$\Delta\bar{x} = 2,48$
	0,88	6,803	773,069	$\bar{\varepsilon} = 6,50\%$		11,26	4,713	41,858	$\bar{\varepsilon} = 5,52\%$
Сердце	1,26	9,584	760,611	$\bar{x} = 791,78$	Мочевой пузырь с мочой	0,98	0,936	95,553	$\bar{x} = 102,06$
	1,28	9,969	778,862	S = 54,69		1,21	1,165	96,308	S = 7,63
	1,26	9,757	774,404	$S_{\bar{x}} = 24,46$		1,11	1,085	97,728	$S_{\bar{x}} = 3,41$
	1,24	9,384	756,812	$\Delta\bar{x} = 67,99$		0,98	1,089	111,125	$\Delta\bar{x} = 9,49$
	1,11	9,859	888,218	$\bar{\varepsilon} = 8,59\%$		0,87	0,953	109,584	$\bar{\varepsilon} = 9,30\%$

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПО
ЭКСПЕРТИЗЕ, УЧЕТУ И АНАЛИЗУ ОБРАЩЕНИЯ СРЕДСТВ
МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» РОСЗДРАВНАДЗОРА
(КУРСКИЙ ФИЛИАЛ)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП»
Росздравнадзора (Курский филиал),
д.б.н. Маркелов М.Ю.
« 23 » 09 20 19 г.

АКТ № 1

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

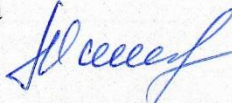
Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах».

Объект внедрения: методика идентификации цефтриаксона сочетанием методов хроматографии в тонком слое гидроксилированного сорбента и электронной спектрофотометрии.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (Курский филиал).

Заключение: использование предложения позволяет повысить селективность метода идентификации цефтриаксона в присутствии других антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов.

Руководитель испытательной лаборатории
ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора
(Курский филиал)

 Мануйлова И.Н.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПО
ЭКСПЕРТИЗЕ, УЧЕТУ И АНАЛИЗУ ОБРАЩЕНИЯ СРЕДСТВ
МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» РОСЗДРАВНАДЗОРА
(КУРСКИЙ ФИЛИАЛ)**

ПРЕДТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП»
Росздравнадзора (Курский филиал),
д.б.н. Маркелов М.Ю.
« 23 » 20 19 г.

АКТ № 2

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

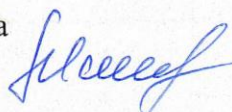
Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах».

Объект внедрения: методика определения цефтриаксона, цефепима и цефпиром в лекарственных формах методом обращённофазовой ВЭЖХ.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (Курский филиал).

Заключение: использование предложения позволяет определять цефтриаксона, цефепима и цефпиром в лекарственных формах с высокой селективностью и чувствительностью при сравнительно небольшом времени анализа.

Руководитель испытательной лаборатории
ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора
(Курский филиал)

 Мануйлова И.Н.

**ОБЛАСТНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ» КОМИТЕТА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КУРСКОЙ ОБЛАСТИ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник ОБУЗ «Бюро СМЭ»

Лыскова С.В.

« 27 » 09



АКТ № 44

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах».

Объект внедрения: методика химико-токсикологического определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы в тканях органов и биологических жидкостях при проведении судебно-химического исследования.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в работе Областного бюджетного учреждения здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы» комитета здравоохранения Курской области.

Заключение: использование предложения позволило оптимизировать процесс изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпиромы из тканей органов и биологических жидкостей, усовершенствовать очистку анализируемых веществ и обеспечить их определение в извлечениях с необходимыми для химико-токсикологических исследований чувствительностью и правильностью.

Зав. судебно-химическим отделением

Комаров С.Л.



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ФАРМОБОРОНА

Адрес: 141074, Королев, Московская область, ул. Гагарина 46А
Тел.: +7 495 511-01-10 | e-mail: info@farmoborona.ru
Сайт: www.farmoborona.ru

Аттестат аккредитации № РОСС RU. 0001.21 ФЛ40
Сертифицированная система менеджмента качества в соответствии с ГОСТ Р ИСО 9001:2015 (ISO 9001:2015)

Утверждаю
Генеральный директор
ООО ИЦ «ФАРМОБОРОНА»
Степнова И. В.
« 23 » октября 2019г.

АКТ № _____

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах».

Объект внедрения: валидация методики количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпирома, извлеченного из биологического материала, методом обращённофазовой ВЭЖХ.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в работе ООО Испытательного центра «ФАРМОБОРОНА».

Заключение: использование предложения позволяет применять валидированную методику для количественного определения цефтриаксон, цефепим и цефпиром, извлеченные из биологического материала.

Заведующий аналитической лабораторией

Капитурова О.А.

8495 511-01-10



Утверждаю
Генеральный директор
ООО ИЦ «ФАРМОБОРОНА»
Степнова И. В.
« 13 » октября 2019г.

АКТ № _____

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах».

Объект внедрения: методика количественного определения цефтриаксона, цефепима и цефпиромы, извлеченного из биологического материала, методом обращённофазовой ВЭЖХ.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в работе ООО Испытательного центра «ФАРМОБОРОНА».

Заключение: использование предложения позволяет идентифицировать и количественно определить цефтриаксон, цефепим и цефпиром, извлеченные из биологического материала.

Заведующий аналитической лабораторией

Капитурова О.А.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Н. БУРДЕНКО» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-инновационной
деятельности ВГМУ, профессор,
д.мед.н. А.В. Будневский
« 01 » 10 2019 г.

АКТ № 4

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах для судебно-химической экспертизы».

Объект внедрения: методика количественного определения цефепима и цефпирома в лекарственных формах методом электронной спектрофотометрии.

Использовано: с 25 сентября 2019 года в научной работе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГМУ.

Заключение: использование предложения позволило повысить селективность и чувствительность количественного определения цефепима и цефпирома в лекарственных формах

Заведующий кафедрой
фармацевтической химии и
фармацевтической технологии
ВГМУ им. Н.Н. Бурденко,
д.х.н., доцент

Рудакова Л.В.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Н. БУРДЕНКО» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**



«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научно-инновационной
деятельности ВГМУ, профессор,
д.мед.н. А.В. Будневский
« 01 » 10 2019 г.

АКТ № 5

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета.

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах для судебно-химической экспертизы».

Объект внедрения: методика идентификации цефтриаксона в лекарственных формах методами ТСХ и электронной спектрофотометрии.

Использовано: с 25 сентября 2019 года в научной работе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГМУ.

Заключение: использование предложения обеспечило повышение селективности и чувствительности идентификации цефтриаксона в лекарственных формах.

Заведующий кафедрой
фармацевтической химии и
фармацевтической технологии
ВГМУ им. Н.Н. Бурденко,
д.х.н., доцент

Рудакова Л.В.

**ФГБОУ ВО «КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе и

инновационному развитию

ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,

д.м.н., доцент П.В. Ткаченко

10 20 19 г.

АКТ №

Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах»

Объект внедрения: методика изолирования цефтриаксона, цефепима и цефпирома из биожидкостей и определения методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии.

Апробировано: с 23 сентября 2019 года в учебной (практические занятия) и научной работе на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

Заключение: использование предложения способствовало формированию у обучающихся на кафедре студентов навыков и умений по извлечению некоторых цефалоспориновых антибиотиков из биожидкостей, их очистке и последующей оценке количественного содержания, позволило повысить селективность и чувствительность определения анализируемых соединений в условиях проведения химико-токсикологических исследований.

Заведующая кафедрой фармацевтической,
токсикологической и аналитической химии
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,
д.б.н., профессор

Сипливая Л.Е.

**ФГБОУ ВО «КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе и
инновационному развитию
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,

д.м.н., доцент П.В. Ткаченко
10 20 19 г.

АКТ №



Авторы внедрения: А.А. Безъязычная, очный аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; В.К. Шорманов, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета; Л.Е. Сипливая, доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета

Источник предложения: материалы собственного диссертационного исследования А.А. Безъязычной: «Разработка методик анализа некоторых цефалоспоринов в традиционных и иммобилизованных формах и биологических объектах»

Объект внедрения: методика изучения сохраняемости некоторых цефалоспориновых антибиотиков в биологическом материале при различных температурных режимах.

Использовано: с 23 сентября 2019 года в учебной (практические занятия) и научной работе на кафедре фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

Заключение: использование предложения способствовало формированию у обучающихся на кафедре студентов навыков и умений по извлечению сохраняемости некоторых цефалоспориновых антибиотиков и последующей оценке количественного содержания, позволило повысить воспроизводимость и правильность определения анализируемых соединений в условиях проведения химико-токсикологических исследований.

Заведующая кафедрой фармацевтической,
токсикологической и аналитической химии
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,
д.б.н., профессор

Сипливая Л.Е.