

На правах рукописи

Крючков Василий Борисович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕФОПЕРАЗОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Фомин Анатолий Николаевич**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Ларичев Андрей Борисович**

Официальные оппоненты:

Ремезова Ирина Петровна – доктор фармацевтических наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России), кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры

Сенченко Сергей Петрович – доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), начальник отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России)

Защита состоится «_____» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1; и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д **208.040.09**

доктор фармацевтических наук,
профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цефоперазон относится к 3 поколению цефалоспориновых антибиотиков и широко применяется в медицинской практике при лечении многих инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе для противoinфекционной профилактики в хирургии.

Вместе с тем при определенных условиях (передозировка, индивидуальная непереносимость, патология внутренних органов и др.) препарат может вызывать острые отравления, вплоть до летального исхода. Для диагностики интоксикации цефоперазоном решающее значение приобретают результаты химико-токсикологического (судебно-химического) исследования.

Актуальной задачей в хирургической практике, с целью исключения вероятности послеоперационных раневых осложнений является обоснование применения антибиотиков, в том числе цефоперазона, и контроль, за уровнем содержания препарата в тканях операционного поля. В связи с этим, в целях эффективной антибиотикопрофилактики в ряде случаев возникает необходимость в использовании современных аналитических методов для контроля уровня содержания антибиотика в тканях операционного поля пациентов.

Для определения микроколичеств токсических веществ в биологических объектах целесообразно использование методов, позволяющих совместить разделение, очистку и аналитическую детекцию искомых веществ. Такими методами являются электромиграционные методы: электрофорез на бумаге, сочетающий эффективную очистку токсических веществ от сопутствующих компонентов биологического субстрата с последующим обнаружением и идентификацией их непосредственно на электрофореграмме (ЭФГ), а также один из современных подтверждающих электромиграционных методов – капиллярный электрофорез, нашедший в последние годы в зарубежной и отечественной аналитической практике применение в связи с достоинствами: высокой эффективностью, экспрессностью, малым расходом биологического объекта для анализа, программированному обеспечению хода исследования и расчёта полученных результатов.

Степень разработанности темы исследования

Обзор зарубежной и отечественной литературы показал, что, несмотря на токсикологическое значение цефоперазона, широкого применения в хирургической практике, методы его выделения, обнаружения и определения в тканях внутренних органов разработаны недостаточно. Отсутствуют доступные методики скрининга цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков.

В настоящее время опубликовано значительное количество методик определения цефалоспориновых антибиотиков в биологических жидкостях, с помощью различных хроматографических методов. Однако, в большинстве случаев, они не пригодны для применения в химико-токсикологической и лабораторно-хирургической практике, главным образом, в связи со сложной, многостадийной пробоподготовкой, и значительным увеличением времени анализа, что является неприемлемым при анализе лабильного антибиотика.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось изучение возможности применения электрофореза на бумаге и капиллярного электрофореза как методов удовлетворяющих требованиям аналитической токсикологии и клинической лабораторной практики для анализа цефоперазона в биологических объектах.

Задачи для исследования:

1. Разработать оптимальные условия электрофореза-скрининга антибиотиков цефалоспоринового ряда методом электрофореза на бумаге.
2. Изучить возможность электрофореза-скрининга ряда цефалоспориновых антибиотиков, в том числе цефоперазона, методом электрофореза на бумаге в присутствии соэкстрактивных веществ биологических объектов.
3. Разработать методику идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза применительно к целям химико-токсикологического и клинического лабораторного анализа.
4. Разработать экспрессные методики выделения и аналитической детекции цефоперазона в биологических объектах (модельных смесях). Провести их валидацию.
5. Установить возможность идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза в биологических объектах в условиях клиники.
6. Изучить распределение цефоперазона в тканях операционного поля у пациентов с хирургическим вмешательством в процессе антибиотикотерапии.
7. Изучить пригодность разработанных электрофоретических методик анализа цефоперазона для химико-токсикологической практики клинической лабораторной диагностики.

Научная новизна

В результате проведённых исследований впервые:

- показана возможность предварительного скринингового обнаружения цефоперазона в ряду цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге («ПВЭФ-1»), как в водных растворах, так и в присутствии соэкстрактивных веществ биологических объектов;
- на базе отечественной системы для капиллярного электрофореза «Капель – 105М» разработаны доступные, экономичные и экспрессные методики идентификации (подтверждающего исследования) и количественного определения цефоперазона, в водном растворе и биологических объектах, определены валидационные параметры методик;
- предложенные электрофоретические методики идентификации и количественного определения цефоперазона апробированы на клинических объектах в хирургической практике, изучено распределение цефоперазона в тканях операционного поля;

Разработанные методики обладают высокой чувствительностью, специфичностью, простотой проведения процедуры пробоподготовки, предполагают использование небольших навесок биологических объектов (до 0,1 г ткани внутренних органов и 0,1 мл биологической жидкости) и малый расход органических растворителей, что обеспечивает экспрессность анализа.

Теоретическая и практическая значимость исследования

На основании результатов исследований выработан подход к разработке системного анализа цефоперазона в биологических объектах с учётом физико-химических свойств молекулы антибиотика (растворимость, липофильность, устойчивость, наличие функциональных групп), с использованием методов электрофореза на бумаге и капиллярного электрофореза. В целях оптимизации режима дозирования показана возможность определения уровня концентрации цефоперазона в тканях операционного поля в процессе антибиотикотерапии.

Практическая значимость заключается в разработке экономичных, доступных и экспрессных методик изолирования, предварительного скринингового обнаружения, идентификации (подтверждающего исследования) и количественного определения цефоперазона в биологических объектах на основе комплекса используемых электромиграционных методов (электрофореза на бумаге, капиллярного электрофореза).

Методики обладают высокой эффективностью, воспроизводимостью, чувствительностью и требуют минимальных затрат исследуемых объектов и реактивов.

Методология и методы исследования

Методология исследования построена на анализе и обработке литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности, поведении цефоперазона в растворах электролитов, выборе наилучших условий извлечения антибиотика из объектов, эффективной очистки от соэкстрактивных веществ, для последующей экспрессной электрофоретической детекции антибиотика, как в составе модельных смесей, так и в составе биосубстратов, полученных с операционного поля пациентов в процессе антибиотикотерапии.

В ходе выполнения работы были использованы методы электрофореза на бумаге и капиллярный электрофорез, при этом с целью дополнительного концентрирования цефоперазона был использован приём «стекинга» в процессе электрофореза.

Основные положения, выносимые на защиту

- Условия электрофореза-скрининга (предварительное обнаружение) цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге.
- Доказательство возможности электрофореза-скрининга цефоперазона в присутствии соэкстрактивных веществ биологических объектов (тканей органов, биологической жидкости).
- Обоснование и выбор условий идентификации (подтверждающего исследования) и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза с использованием отечественной системы капиллярного электрофореза «Капель – 105М».

- Выбор условий экстракции цефоперазона из водных растворов в зависимости от природы органического растворителя, pH среды, объёма экстрагента, кратности экстрагирования.
- Результаты исследований по разработке методик выделения цефоперазона из биологических объектов (печени, мочи, крови) с последующей идентификацией и количественным определением методом капиллярного электрофореза, применительно к целям и задачам химико-токсикологической и клинической лабораторной практики. Валидация методик.
- Обоснование возможности идентификации и количественного определения цефоперазона в биосубстратах операционного поля хирургических пациентов методом капиллярного электрофореза.
- Результаты изучения распределения цефоперазона в тканях операционного поля у пациентов с хирургическим вмешательством в процессе антибиотикотерапии.

Достоверность научных положений и выводов

Полученные с помощью разработанных методик первичные данные являются достоверными и правильными, что подтверждено результатами статистической обработки и валидации. Расчёты, построение графиков и таблиц проводили с помощью программного обеспечения «Эльфоран для Windows», 2012 г. и «Microsoft Office Excel», 2007 г.

Связь задач исследования с планом научной работы кафедры

Диссертационная работа выполнена по плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (номер государственной регистрации 01201153123).

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвящённой 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова, научно – практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию победы в Великой Отечественной войне 25-летию «Ярославской государственной медицинской академии», 70-ой Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», 71 –ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой юбилею президента университета, профессора, академика РАН Ю.В. Новикова, - Ярославль, - 2013– 2017гг.

Апробация была проведена на совместном заседании кафедр фармацевтической и токсикологической химии, управления и экономики фармации, химии фармацевтического факультета, биологической химии, общей хирургии, фармакологии, фармакогнозии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО Минздрава России «Ярославский государственный медицинский университет» 11 мая 2017 года.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведённого исследования соответствуют пунктам 3 и 4 области исследования специальности.

Личный вклад автора

Личное участие автора выразилось в непосредственном исполнении всех этапов исследования: от постановки цели и задач работы, реализации эксперимента, валидации разработанной методики, интерпретации полученных результатов до их обобщения, систематизации и формулировке общих выводов. Автором приведён комплекс исследований по разработке методик изолирования, идентификации и количественного определения цефоперазона в биологических объектах.

Внедрение результатов исследования

По материалам исследования составлен проект информационного письма: «Химико-токсикологический анализ цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза» для использования в практике химико-токсикологических лабораторий бюро судебно-медицинской экспертизы РФ. Полученные акты внедрения подтверждают использование методик изолирования, идентификации и количественного определения цефоперазона в биологических объектах судебно-химическим отделением ГБУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (4 акта внедрения от 14.09.2016, 13.10.2016, 10.10.2016, 10.11.2016), химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая лаборатория» (4 акта внедрения от 23.09.2016, 10.11.2016, 13.10.2016, 05.12.2016); судебно-химическим отделением ГБУЗ ВО «Бюро судмедэкспертизы» г. Владимира (4 акта внедрения от 08.02.2017).

Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 183 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (5 глав), общих выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 33 таблицами. Список литературы включает 212 источников, из них 98 на иностранных языках. В приложение включены акты внедрения и проект информационного письма «Химико-токсикологический анализ цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза».

Публикации

По теме работы опубликовано 8 печатных работ, из них 3 в научных журналах, рекомендованных ВАК.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования: в эксперименте были использованы стандартные образцы препаратов ряда цефалоспориновых антибиотиков: цефоперазон (Орхид Кемикалз энд

Фармасьютикалз Лтд), цефазолин, цефтриаксон (ЗАО Фармацевтическая фирма «Лекко»), цефотаксим (ОАО «Красфарма»), цефуоксим (ООО «АБОЛмед»), в виде натриевых солей.

Модельные смеси биоматериалов (моча, кровь, печень), с различной концентрацией антибиотиков, а также клинические образцы различных тканей, взятые с операционного поля у пациентов при проведении хирургических вмешательств.

В работе использованы следующие химические реагенты: кислота борная (ГФ XII), кислота хлористоводородная концентрированная (ГФ XII), кислота уксусная ледяная (ГФ XII), кислота ортофосфорная концентрированная (ГФ XII), йод кристаллический (чда), аммиака раствор концентрированный (ГФ XII), аммония сульфат (ГФ XII), натрия гидроксид (чда), ацетонитрил для хроматографии (осч), ацетон (осч), хлороформ (чда), спирт изобутиловый (чда), этилацетат (хч).

Методы исследования: исследование проводили с использованием следующих приборов и оборудования:

- Прибор для электрофореза на бумаге «ПВЭФ-1»
- Система капиллярного электрофореза «Капель – 105М» (ООО «Люмекс-маркетинг» Россия) со встроенным УФ - детектором
- Весы аналитические «AUW – 120» (SHIMADZU)
- Лабораторная центрифуга «ЦЛН – 16»
- Лабораторная центрифуга «MINI SPINplus» (Eppendorf)
- Иономер «И – 510» (ООО «НПО Аквилон»)
- Микродозатор с переменным объёмом «Biohit»

Обработку электрофореграмм осуществляли с помощью компьютерной программы «Эльфоран для Windows», 2012г.

Для проведения статистической обработки результатов исследования использовали программное обеспечение «Microsoft Office Excel», 2007 г.

Валидация методик проводилась с учётом требований Российских и зарубежных руководств по валидации биоаналитических методик («Руководство по экспертизе лекарственных средств» М. – 2013; рекомендации FDA и EMA).

Результаты исследования

Разработка методики электрофореза – скрининга цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге

Разработаны оптимальные условия предварительного этапа электрофореза – скрининга ряда цефалоспориновых антибиотиков, в том числе и цефоперазона, с использованием электрофореза на бумаге: прибор – «ПВЭФ-1»; электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,81; хроматографическая бумага марки «FN-4»; напряжение 400 В; время

электрофореза – 1 час; детектор – пары йода (чувствительность обнаружения цефоперазона на ЭФГ – 1 мкг в пробе).

При этом на первом этапе электрофореза – скрининга (таблица 1) установлено, что наблюдаемые длины пути фореза в сантиметрах (ДПФсм) исследуемых цефалоспориновых антибиотиков характеризуются широким диапазоном, что позволяет выделить, с интервалом в 2 см, три электрофоретические группы (ЭГ).

Таблица 1 - Электрофоретические группы цефалоспориновых антибиотиков (ЦФА) – стандартов. Электролит – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 1,8

Антибиотик, 30 мкг/проба	ДПФ см ($\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$; n = 3)	Интервал (группа) по ДПФ см
Цефазолин	3,53±0,07	2,0-4,0 (I группа)
Цефтриаксон Цефотаксим	5,43±0,12 6,0±0,12	4,0-6,0 (II группа)
Цефоперазон	6,77±0,07	6,0-8,0 (III группа)

На втором этапе электрофореза – скрининга предложена внутригрупповая идентификация по электрофоретическим спектрам (ЭФС - графическая зависимость величин ДПФ см от pH электролита) исследуемых антибиотиков, с использованием электрофореза на бумаге, в выше приведённых условиях (электролит – универсальный буферный раствор Бриттона – Робинсона в диапазоне, pH 1,8 ÷ 8,0). Результаты эксперимента показали (рисунок 1), что профили ЭФС исследуемых соединений, индивидуальны, не совпадают по форме и высоте, и могут быть использованы для идентификации цефалоспориновых антибиотиков после их группового разделения электрофоретическим скринингом.

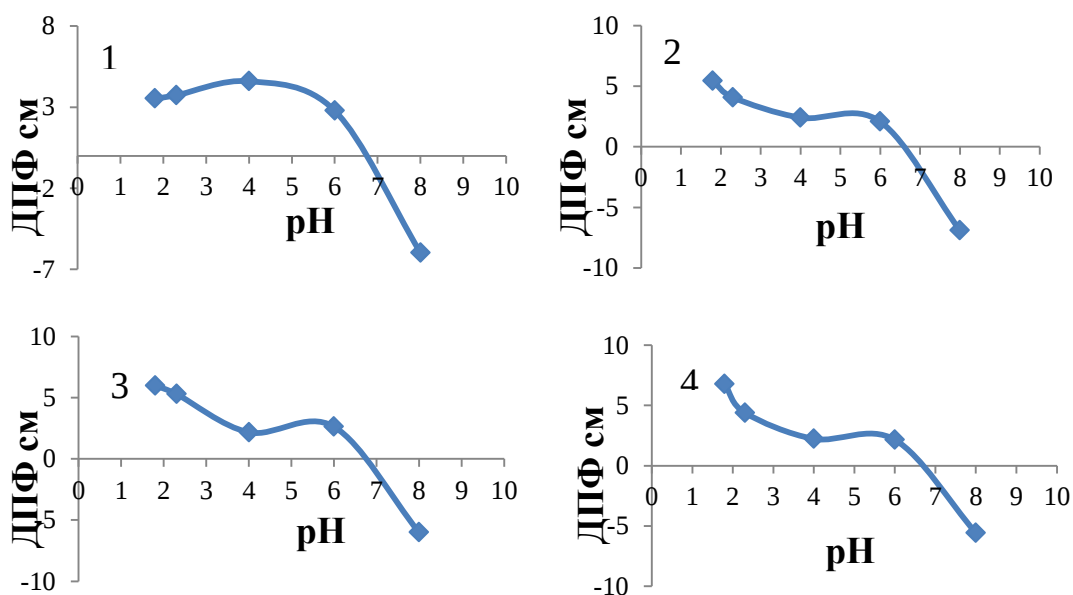


Рисунок 1 – ЭФС по ДПФ см антибиотиков (стандартов):

цефазолина (1), цефтриаксона (2), цефотаксима (3), цефоперазона (4)

Рассчитаны количественные характеристики ЭФС антибиотиков: ДПФ мин, ДПФ макс, а также внутренний коэффициент P_i (как частного отношения приведённых выше величин, увеличенное в 10 раз), представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количественные характеристики ЭФС по ДПФ см ряда цефалоспориновых антибиотиков («ПВЭФ–1»)

Антибиотик	ЭГ	Количественные характеристики ЭФС ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$); n = 5		
		ДПФ _{макс}	ДПФ _{мин}	P_i
Цефазолин	1	4,60±0,07 (рН 2,3)	2,78±0,07 (рН 6,0)	1,65±0,07
Цефтриаксон	2	5,43±0,12 (рН 1,8)	2,07±0,07 (рН 6,0)	2,63±0,12
Цефотаксим		6,00±0,12 (рН 1,8)	2,17±0,07 (рН 6,0)	2,28±0,08
Цефоперазон	3	6,77±0,07 (рН 1,8)	2,15±0,07 (рН 6,0)	3,12±0,07

Примечание: $P_i = \frac{\text{ДПФ}_{\text{мин}}}{\text{ДПФ}_{\text{макс}}} \times 10$

Изучена возможность электрофореза – скрининга методом электрофореза на бумаге ряда представителей цефалоспориновых антибиотиков, в том числе и цефоперазона, в присутствии веществ, соэкстрагируемых органической системой (хлороформ - изобутанол, 3:1) из мочи при рН 2,0, а также из водно-щелочных вытяжек тканей печени и почки.

На первом этапе электрофореза – скрининга (таблица 3) установлено, что независимо от характера биологического объекта, исследуемые соединения в составе модельной биологической смеси (МБС), располагаются по ЭГ, соответствующим расположению антибиотиков стандартов, при этом цефоперазон входит в третью ЭГ.

Таблица 3 - Электрофоретические группы ряда цефалоспориновых антибиотиков в составе модельных биологических смесей (МБС). Электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,8 («ПВЭФ–1»)

№ п/п	МБС	ДПФ см ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$; n = 3)	Электрофоретические группы	
			Антибиотик – МБС	Антибиотик – стандарт
Цефазолин, модельная смесь (30 мкг/проба)				
1.	Моча	2,43±0,07	1	1
2.	Печень	2,37±0,07	1	1
3.	Почка	2,33±0,07	1	1
Цефтриаксон, модельная смесь (30 мкг/проба)				
1.	Моча	4,53±0,07	2	2
2.	Печень	4,63±0,07	2	2
3.	Почка	4,83±0,07	2	2
Цефотаксим, модельная смесь (30 мкг/проба)				
1.	Моча	5,07±0,12	2	2
2.	Печень	5,0±0,12	2	2
3.	Почка	4,9±0,12	2	2
Цефоперазон, модельная смесь (30 мкг/проба)				
1.	Моча	6,10±0,12	3	3
2.	Печень	6,07±0,12	3	3
3.	Почка	6,07±0,12	3	3

В свою очередь, конфигурация ЭФС антибиотиков в составе МБС идентична конфигурации ЭФС соответствующих антибиотиков стандартов, в том числе и для цефоперазона (рисунок 2).

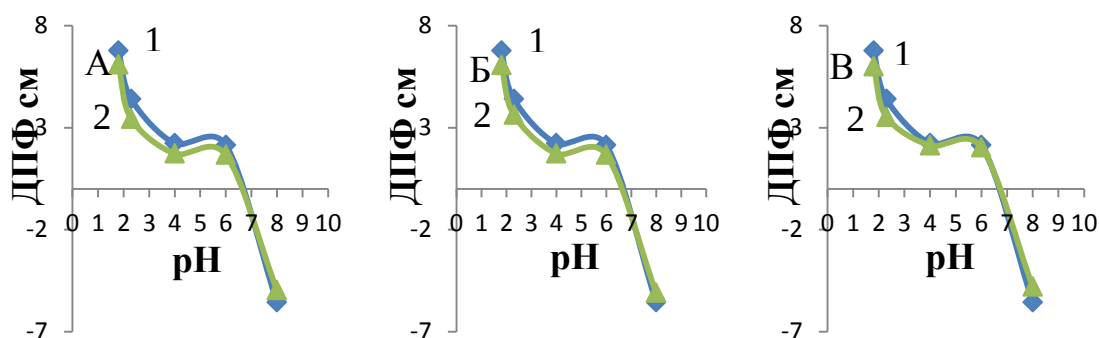


Рисунок 2 - ЭФС по ДПФ см цефоперазона – стандарта (1) и цефоперазона в составе МБС (2): мочи (А), печени (Б), почки (В)

В качестве примера (таблица 4), показана ЭФС – идентификация по количественным характеристикам R_f исследуемых антибиотиков на примере МБС – почки.

Таблица 4 – Идентификация цефалоспориновых антибиотиков в составе модельной биологической смеси (почки) по ЭФС (количественные характеристики)

ЭФС по ДПФСм							
Цефазолин, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x};)$		Цефтриаксон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x};)$		Цефтриаксон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x};)$		Цефоперазон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x};)$	
Стандарт	МБС (почка)	Стандарт	МБС (почка)	Стандарт	МБС (почка)	Стандарт	МБС (почка)
1,65± 0,07	1,65± 0,08	2,63± 0,12	2,47± 0,07	2,28± 0,08	2,21± 0,07	3,12± 0,07	3,00± 0,08

Таким образом, созэкстрактивные вещества биологических объектов не оказывают существенного влияния на электрофоретический скрининг антибиотиков, в том числе и цефоперазона.

Разработка методики идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза (КЭ)

При ненаправленном химико-токсикологическом анализе наряду со скрининговой программой необходимо использовать подтверждающие независимые методы, обладающие более высокими селективными свойствами.

На основании проведенных исследований были установлены оптимальные условия электрофореза цефоперазона методом КЭ («Капель – 105М»):

- кварцевый капилляр внутренним диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см;
- рабочий электролит (РЭ) - буферный раствор Бриттона - Робинсона, рН 9,0;
- растворитель пробы (РП) – РЭ разбавленный водой в 10 раз;
- ввод пробы давлением – 30 мБар × 15 сек.;
- положительный электрод со стороны введения РЭ;
- напряжение : +20 кВ;
- детекция – встроенный УФ – детектор, 230 нм;
- программное обеспечение – «Эльфоран для Windows», 2012г.

При анализе, пробу цефоперазона растворяют в РП (РЭ, разбавленный водой в 10 раз), чем достигается концентрирование пробы в начальной стадии электрофоретического процесса непосредственно в капилляре с использованием приёма прямого стекинга.

Специфичность электрофоретической методики анализа цефоперазона, изученная в присутствии близких по строению антибиотиков, показывает, что времена миграции (t_m) анализируемых компонентов на ЭФГ в составе стандартных образцов, соответствует таковым в составе смеси антибиотиков (рисунок. 3).

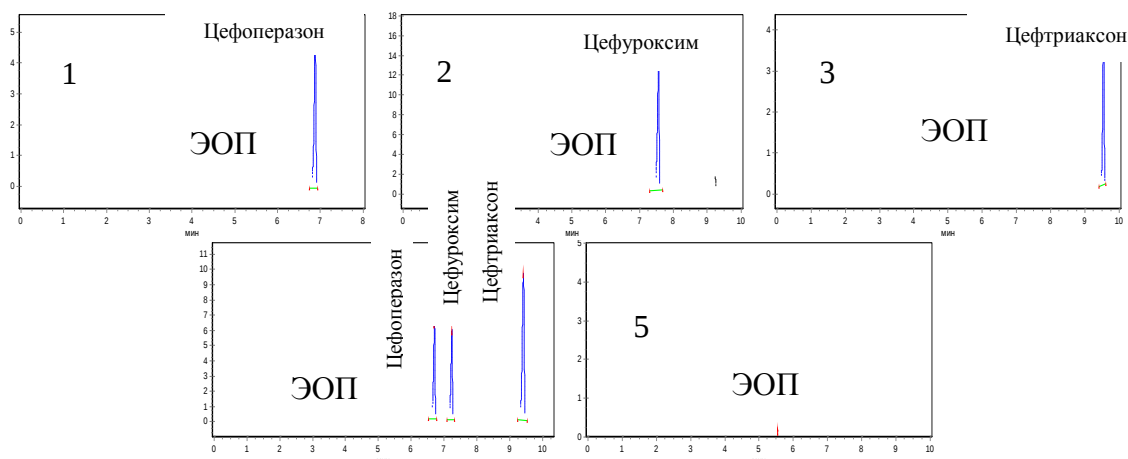


Рисунок 3 - ЭФГ стандартных растворов антибиотиков цефалоспоринового ряда: цефоперазон, 10 мкг/мл (1); цефуроксим, 10 мкг/мл (2); цефтриаксон, 10 мкг/мл (3); смеси антибиотиков (4) по 10 мкг/мл и ЭФГ растворителя пробы – (5)

Результаты статистической обработки t_m (таблица 5) цефоперазона, цефуроксима, цефтриаксона стандартов и в составе смеси, показывают, что сходимость методики идентификации соответствует валидационным требованиям, а специфичность подтверждается разрешительной способностью смеси антибиотиков (таблица 6), при этом разрешение пика цефуроксима от ЭОП, цефоперазона от цефуроксима и цефтриаксона от цефоперазона составляет значительно более 1,5, что соответствует валидационным требованиям при идентификации компонентов.

Таблица 5 - Результаты статистической обработки величин t_m цефоперазона, цефуроксима и цефтриаксона (стандартов) и в составе смеси антибиотиков

Антибиотик стандарт, 10 мкг/мл	Метрологические характеристики	Смесь стандартов антибиотиков, 10 мкг/мл	Метрологические характеристики
t_m цефоперазона ($\bar{x}$; n = 5)			
$\bar{x} = 6,64$	SD = 0,04 RSD,% = 0,60	$\bar{x} = 6,70$	SD = 0,05 RSD,% = 0,69
t_m цефуроксима ($\bar{x}$; n = 5)			
$\bar{x} = 7,51$	SD = 0,06 RSD,% = 0,83	$\bar{x} = 7,38$	SD = 0,04 RSD,% = 0,52
t_m цефтриаксона ($\bar{x}$; n = 5)			
$\bar{x} = 9,57$	SD = 0,04 RSD,% = 0,37	$\bar{x} = 9,40$	SD = 0,09 RSD,% = 0,98

Таблица 6 - Результаты разрешения (R_S) пиков антибиотиков на ЭФГ (концентрация 10 мкг/мл)

$R_S(\bar{x}; n = 5)$		
Цефоперазона от ЭОП	Цефуроксима от цефоперазона	Цефтриаксона от цефуроксима
6,07	2,26	9,94

Предложенные оптимальные условия для идентификации цефоперазона были взяты за основу при разработке методики количественного определения.

Установлена линейная зависимость величины фотометрического сигнала (mAU) в диапазоне концентраций от 0,1 до 20 мкг/мл, и на основе полученных данных рассчитано уравнение калибровочного графика $Y = 0,0664 \times X$, коэффициент корреляции составил 0,9998.

Оценка правильности и прецизионности методики количественного определения цефоперазона методом КЭ на трёх уровнях концентрации в течении 1-го и 2-го дней, показала, что величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности соответствуют нормам валидации. Нижний предел количественного определения (нПКО) составил 0,1 мкг вещества в 1 мл пробы.

Таблица 7 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона

Intra – day				Inter – day			
Проба, мкг/мл	Определено, цефоперазона ($\bar{x}, \%$; $n = 5$)	RSD, % ($n = 5$)	$\varepsilon, \%$ ($n = 5$)	Проба, мкг/мл	Определено, цефоперазона ($\bar{x}, \%$; $n = 5$)	RSD, % ($n = 5$)	$\varepsilon, \%$ ($n = 5$)
0,1	106,00	10,76	13,37	0,1	104,00	12,90	16,04
1,0	99,80	1,49	1,85	1,0	100,20	1,92	2,39
20,0	98,59	1,55	1,92	20,0	100,00	0,47	0,59

Идентификация и количественное определение цефоперазона в биологических объектах (МБС) методом капиллярного электрофореза

При разработке методик количественного определения цефоперазона в биологических объектах (моча, кровь, печень) с использованием капиллярного электрофореза, учитывая прежде всего, условия клинического лабораторного анализа, хирургической практики и химико-токсикологического анализа при острых отравлениях, а также лабильность антибиотика при длительном процессе пробоподготовки, было предпринято уменьшение навески до 0,1 г ткани и 0,1 мл биологической жидкости, при этом исключили процессы упаривания, и ввели приём дополнительной очистки путём реэкстрагирования в РЭ разбавленный в 10 раз водой. Это позволило в процессе электрофореза в кварцевом капилляре осуществить концентрирование пробы за счёт «стекинга». Предварительно были изучены условия экстракции антибиотика из водных растворов. Исследовалось влияние pH среды (от 2,0 до 6,0), природы органического растворителя (хлороформ, этилацетат, эфир диэтиловый, смесь хлороформ ÷ изобутанол, 3:1), объёма экстрагента и кратности экстрагирования. Установлено, что наибольший процент

экстракции наблюдается при использовании в качестве экстрагента органической системы (хлороформ - изобутанол 3:1), при pH 2,0, соотношении водной и органической фаз 3:10, кратности экстрагирования равной 3 и составляет 69,80%.

По результатам исследования разработана методика определения цефоперазона в моче (проба 0,1 мл), включающая жидкость-жидкостную экстракцию органической системой (хлороформ ÷ изобутанол, 3:1) с последующей реэкстракцией исследуемого компонента в рабочий электролит, разбавленный водой в 10 раз и проведением электрофореза пробы в разработанных ранее условиях. При оценке линейности методики проводили анализ семи проб интактной мочи содержащей от 0,1 до 20 мкг цефоперазона в 0,1 мл ($y = 0,0571 + 0,0967 \times X$; $r = 0,9999$).

ЭФГ цефоперазона в составе МБС (мочи), на трёх уровнях концентрации, показывают, что выбранные условия пробоподготовки и электрофореза позволяют осуществлять идентификацию антибиотика в присутствии эндогенных компонентов мочи. При этом, на ЭФГ интактной мочи (без добавления цефоперазона) не наблюдается пиков со временем миграции цефоперазона (рисунок 4).

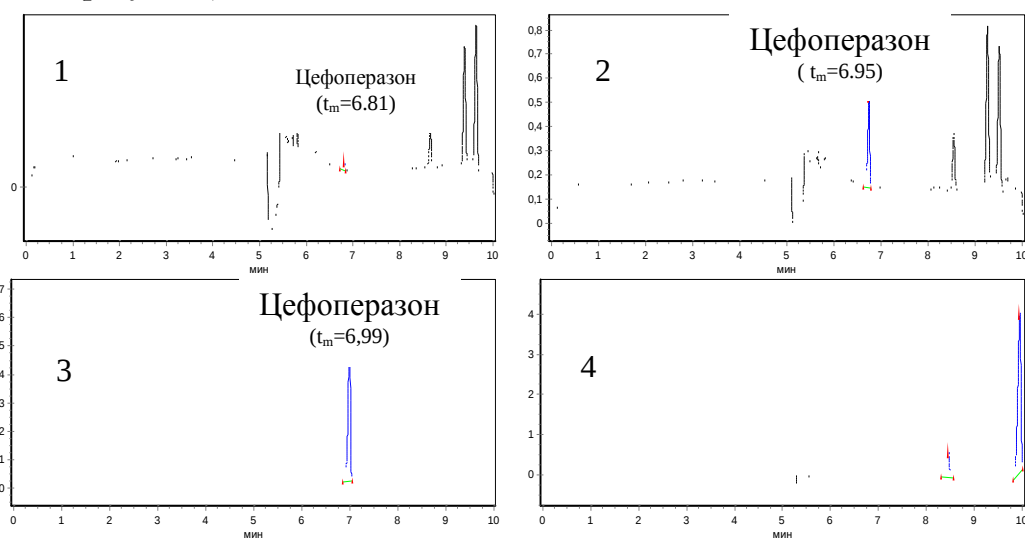


Рисунок 4 - ЭФГ цефоперазона в составе мочи: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0 мкг/0,1 мл (2); 20,0 мкг/0,1 мл (3); ЭФГ 0,1 мл интактной мочи (4). «Капель – 105М»

Результаты количественного определения цефоперазона в составе МБС на четырёх уровнях концентрации отражают вполне удовлетворительную сходимость и воспроизводимость результатов в пределах рекомендованной аналитической области, при этом, нПКО составил 0,1 мкг цефоперазона в 0,1 мл мочи (таблица 8).

Таблица 8 - Оценка правильности и прецизионности методики определения
цефоперазона в моче

Intra – day					Inter – day				
МБС, мкг/мл моча	Взято на анализ мочи мл	Определено, в пересчёте на 1 мл МБС ($\bar{x}$,%; n = 3)	RSD, % (n = 3)	ε ,% (n = 3)	МБС, мкг/мл моча	Взято на анализ мочи мл	Определено, в пересчёте на 1 мл МБС ($\bar{x}$,%; n = 3)	RSD, % (n = 3)	ε ,% (n = 3)
1,0	0,1	101,00	13,47	16,75	1,0	0,1	97,00	11,95	14,85
10,0	0,1	99,30	2,53	3,15	10,0	0,1	94,63	4,28	5,32
100,0	0,1	98,33	0,88	1,09	100,0	0,1	99,30	5,90	7,33
200,0	0,1	99,60	2,85	3,54	200,0	0,1	97,24	0,44	0,54

При разработке методики идентификации и количественного определения цефоперазона в крови, предварительно было изучено влияние ряда осадителей белковых веществ на степень экстракции антибиотика из крови, плазмы и сыворотки.

С этой целью использовали: аммония сульфат, ацетонитрил, водный раствор трихлоруксусной кислоты pH 2,0, а также проведено прямое экстрагирование без добавления осадителей. Полученные результаты показали, что наибольшая степень экстракции отмечается из плазмы, при использовании в качестве осадителя аммония сульфата, и составляет 44,90% (n=2).

На основании проведённых исследований разработана методика идентификации и количественного определения цефоперазона в плазме крови (проба 0,1 мл) на трёх уровнях концентрации, включающая осаждение белков аммония сульфатом, с последующей дополнительной очисткой и электрофоретическим определением, как при исследовании мочи. При оценке линейности методики проводили анализ семи проб интактной плазмы содержащей от 0,1 до 20 мкг цефоперазона в пробе ($y = 0,0351 + 0,1148 \times X$; $r = 0,9996$).

Результаты определения, представленные на рисунке 8 и в таблице 10, показывают, что выбранные условия пробоподготовки и электрофореза позволяют надёжно осуществлять идентификацию цефоперазона в присутствии эндогенных компонентов плазмы, а результаты количественного определения антибиотика на трёх уровнях концентрации отражают вполне удовлетворительную сходимость и воспроизводимость в пределах рекомендуемой аналитической области. нПКО и нПО составил 0,1 мкг цефоперазона в 0,1 мл плазмы крови.

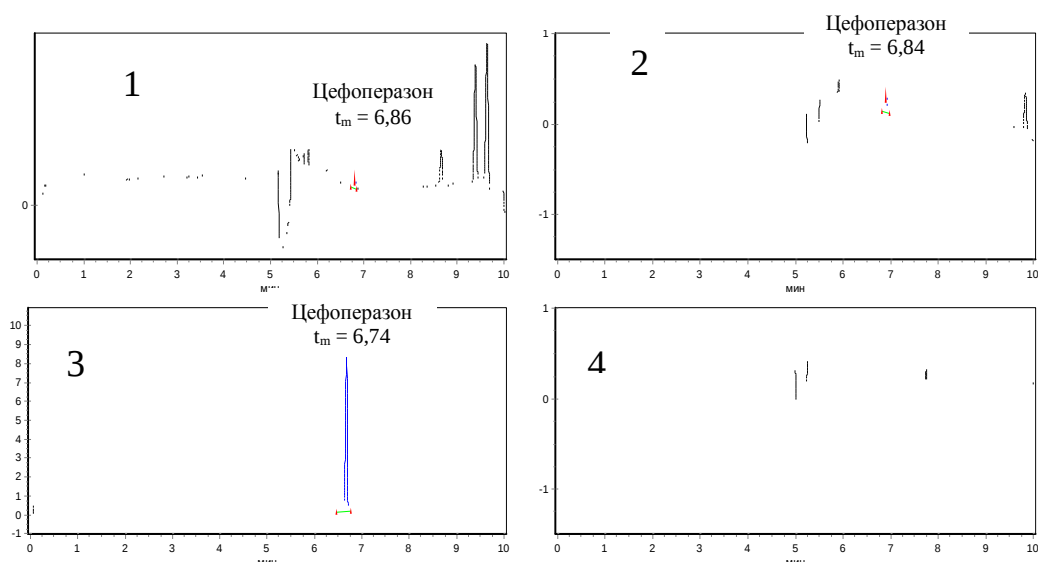


Рисунок 5 – ЭФГ цефоперазона в составе плазмы: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0 мкг/0,1 мл (2); 20 мкг/0,1 мл (3). ЭФГ 0,1 мл интактной плазмы (4). «Капель 105М»

Таблица 9 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в плазме крови

Intra – day					Inter – day				
МБС, мкг/мл плазма	Взято на анализ плазмы мл	Определено, в пересчёте на 1 мл МБС ($\bar{x}$,%; n = 3)	RSD, % (n = 3)	ε ,% (n = 3)	МБС, мкг/мл плазма	Взято на анализ плазмы мл	Определено, в пересчёте на 1 мл МБС ($\bar{x}$,%; n = 3)	RSD, % (n = 3)	ε ,% (n = 3)
1,0	0,1	87,00	2,88	3,58	1,0	0,1	87,00	1,75	2,17
10,0	0,1	99,70	5,58	7,31	10,0	0,1	102,30	1,49	1,86
100,0	0,1	89,70	1,79	2,23	100,0	0,1	89,10	1,07	1,33
200,0	0,1	100,30	1,08	1,35	200,0	0,1	97,54	0,83	1,03

При разработке методики идентификации и количественного определения цефоперазона в ткани печени, проведена сравнительная оценка методов изолирования антибиотика с использованием таких экстрагентов как: водный раствор натрия гидроксида, pH 9,0, буферный раствор Бриттона – Робинсона pH 9,0, ацетонитрил. Полученное извлечение подвергали экстракционной очистке и проводили определение, как при исследовании мочи.

Установлено, что наибольшая степень извлечения наблюдается при использовании водного раствора натрия гидроксида pH 9,0 и составляет 65,60% (n=2).

При оценке линейности методики, проводили анализ семи проб интактной печени, содержащей от 0,1 до 20 мкг цефоперазона в 0,1 г ткани печени ($y = -0,0179 + 0,1278 \times X$; $r = 0,9995$).

Разработанная методика идентификации и количественного определения цефоперазона в ткани печени на трёх уровнях концентрации, показывает, что выбранные условия пробоподготовки и электрофореза позволяют надёжно осуществить идентификацию антибиотика в присутствии эндогенных компонентов печени (рис. 9), а результаты количественного определения отражают

вполне удовлетворительную сходимость и воспроизводимость в пределах рекомендуемой аналитической области. нПКО и нПО составил 0,1 мкг антибиотика в 0,1 г ткани печени.

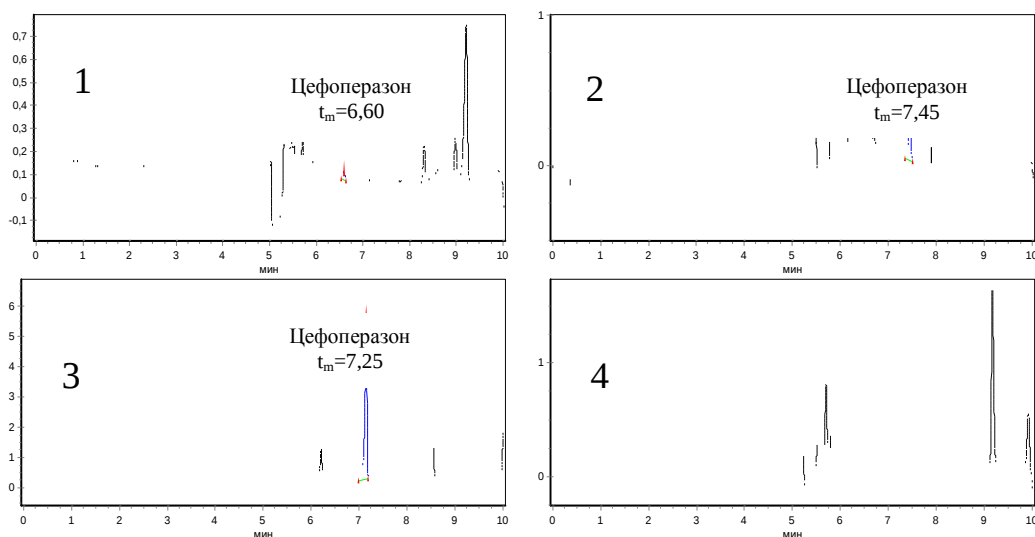


Рисунок 6 – ЭФГ цефоперазона в составе печени: 0,1мкг/0,1г(1); 1,0мкг/0,1г (2); 20,0мкг/0,1г (3). ЭФГ контрольной пробы 0,1г печени (без добавления цефоперазона) (4)

Таблица 10 – Оценка правильности и прецизионности определения цефоперазона в печени

Intra – day					Inter – day				
МБС, мкг/г печень	Взято на анализ печени г	Определено, в пересчёте на 1 г МБС ($\bar{x}, \%$; $n = 3$)	RSD, % ($n = 3$)	$\varepsilon, \%$ ($n = 3$)	МБС, мкг/г печень	Взято на анализ печени г	Определено, в пересчёте на 1 г МБС ($\bar{x}, \%$; $n = 3$)	RSD, % ($n = 3$)	$\varepsilon, \%$ ($n = 3$)
1,0	0,1	94,00	3,72	4,63	1,0	0,1	98,00	6,17	7,67
10,0	0,1	94,70	1,22	1,52	10,0	0,1	99,00	5,62	6,99
100,0	0,1	99,83	1,21	1,51	100,0	0,1	99,20	0,97	1,21
200,0	0,1	100,30	0,41	0,51	200,0	0,1	100,29	0,56	0,70

Идентификация и количественное определение цефоперазона в клинических объектах (тканях операционного поля) методом капиллярного электрофореза

Разработанные экспрессные методики определения цефоперазона в биологических объектах, были применены для решения вопросов связанных с установлением эффективности периоперационного однократного болюсного введения цефоперазона в профилактике послеоперационных инфекций в области хирургического вмешательства и изучения распределения антибиотика в тканях операционного поля.

Исследования проводились на базе ГБУЗ ЯО «Городская больница им. Н.А. Семашко», г. Ярославль, совместно с сотрудниками кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «Ярославского государственного медицинского университета» (заведующий кафедрой, д.м.н., профессор Ларичев А.Б.) на группе больных оперируемых по поводу грыж различной локализации,

которым однократно, внутривенно вводили 1 г цефоперазона не ранее чем за 20 минут до начала оперативного вмешательства. Отбор проб тканей с операционного поля и биологических жидкостей (крови и мочи) осуществляли через определённые промежутки времени (навески не превышали 0,1 г ткани и 0,1 мл жидкости). Последующую пробоподготовку, идентификацию и количественное определение проводили согласно методикам, разработанным на модельных биологических смесях. На рисунке 10, в качестве примера, предоставлена ЭФГ цефоперазона, выделенного из брюшины через 20 минут после внутривенного введения 1 г антибиотика, и ЭФГ повторного анализа исследуемого извлечения, с добавлением 1 мкг цефоперазона. При повторном анализе наблюдался рост пика соответствующего цефоперазону.

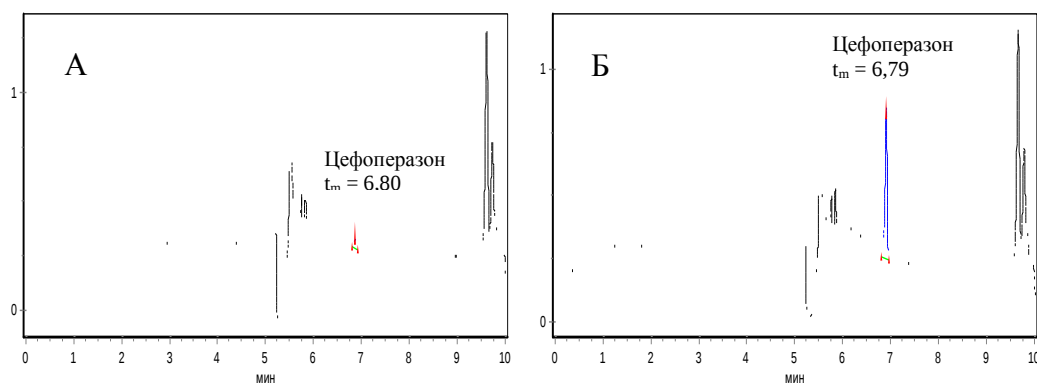


Рисунок 7 – ЭФГ цефоперазона, выделенного из брюшины через 20 минут после в/в введения 1 г препарата (А) и с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта (Б)

Таким образом, результаты исследования цефоперазона в клинических объектах показывают, что идентификация цефоперазона осуществляется в селективных условиях при этом исследуется минимальное количество объекта, что позволяет уменьшить количество соэкстрактивных веществ в пробах, и в сочетании с приёмом стекинга при электрофорезе обеспечивает высокую чувствительность методики.

В таблице 11 представлена динамика изменений концентрации цефоперазона в тканях передней брюшной стенки, крови и моче.

Таблица 11 - Динамика концентрации цефоперазона в биологических объектах (в мкг / 0,1 г, мл; $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$)

Исследуемый объект	Этап исследования		
	20 мин	40 мин	60 мин
кровь (n=10)	3,09±0,59	2,63±0,34	2,34±0,56
моча (n=6)	169,8±42,53	-	319,4±50,16*
кожа (n=7)	4,15±0,53	6,02±0,41*	15,31±0,75*
подкожная жировая клетчатка (n=10)	2,95±0,65	2,58±0,39	2,52±0,65
апоневроз (n=7)	5,15±1,29	6,36±1,16	28,68±4,23*
мышца (n=6)	3,84±0,59	11,83±1,11*	3,47±1,25*
брюшина (n=5)	9,96±1,48	19,08±0,77*	16,74±2,46

* – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим этапом исследования,

Анализ результатов показал:

- Концентрация антибиотика в крови уменьшается, а в моче увеличивается в пределах исследованного временного промежутка от 20 до 60 минут после введения препарата
- Введённый за 20 минут до операции антибиотик эффективно пенетрирует во все ткани операционного поля и стойко определяется спустя 60 минут
- Наибольшая концентрация определяется в коже, апоневрозе, брюшине и статистически достоверно увеличивается в течении изученного временного интервала. Несколько ниже определяется концентрация препарата в подкожной жировой клетчатке и мышце, но сохраняется на стабильном уровне в течении длительного времени, что гарантирует профилактическую ценность метода и минимизирует послеоперационные раневые осложнения.

Таким образом, разработанные электрофоретические методики определения цефоперазона в клинических объектах предлагаются в качестве способа объективного контроля уровня содержания антибиотика в тканях операционного поля и биологических жидкостях, с целью противомикробной профилактики и лечения гнойных хирургических инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Изучены оптимальные условия электрофореза-скрининга ряда антибиотиков цефалоспоринового ряда, в том числе цефоперазона, методом электрофореза на бумаге («ПВЭФ – 1»; электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона pH 1,8), позволившего на этапе группового обнаружения выделить исследуемый антибиотик в отдельную, третью электрофоретическую группу (чувствительность обнаружения на ЭФГ - 1 мкг цефоперазона в пробе, детектор – пары йода). На втором этапе электрофореза-скрининга антибиотиков предложена методика внутригрупповой идентификации по ЭФС («ПВЭФ – 1», электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,8 ÷ 8,0).
2. Результаты исследования цефалоспориновых антибиотиков, в том числе цефоперазона, методом электрофореза на бумаге, показали, что на их групповое обнаружение и внутригрупповую

идентификацию не оказывают существенного влияния соэкстрактивные вещества биологических объектов (моча, печень, почка).

3. Предложена методика дополнительной идентификации и количественного определения цефоперазона с использованием отечественной системы для капиллярного электрофореза «Капель – 105М», которая является доступной, экспрессной и характеризуется экономным расходом проб и реактивов. Установлены валидационные характеристики разработанной методики (специфичность, селективность, правильность, прецизионность, предел количественного определения).
4. Установлены оптимальные условия экстракции цефоперазона из водных растворов. Разработаны методики изолирования цефоперазона из модельных проб мочи, крови и печени. Получена удовлетворительная воспроизводимость результатов на трёх уровнях концентрации в пределах рекомендованной аналитической области. Нижний предел количественного определения составил 0,1 мкг антибиотика в 0,1 мл мочи, крови и 0,1 г печени.
5. Показана возможность применения разработанной методики идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза в клинических биологических объектах, при этом установлено, что введённый за 20 минут до операции антибиотик эффективно пенетрирует в ткани операционного поля и стойко определяется спустя 60 минут во всех тканях. Наибольшая концентрация определяется в коже, апоневрозе и брюшине.
6. Разработанные методики определения цефоперазона в клинических объектах на базе системы для капиллярного электрофореза «Капель – 105М», предлагаются в качестве способа объективного контроля уровня содержания антибиотика в мягких тканях операционного поля и в биологических жидкостях, с целью противомикробной профилактики и лечения гнойных хирургических инфекций.
7. Предложенные электрофоретические методики анализа цефоперазона внедрены в практику химико-токсикологических лабораторий, бюро судебно-медицинской экспертизы и наркологических больниц городов Ярославля и Владимира, а также в учебный процесс студентов фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет».

Практические рекомендации

1. Результаты исследования предложены для целей химико-токсикологической практики при исследовании цефоперазона в биологических объектах на базе доступных отечественных электрофоретических приборов («ПВЭФ – 1», «Капель – 105М»)
2. Разработанные электрофоретические методики позволяют проводить анализ цефоперазона в клинических биологических объектах с использованием небольших навесок (0,1 г ткани, 0,1 мл биологической жидкости) и предлагаются в качестве способа объективного контроля уровня

концентрации антибиотика в тканях операционного поля с целью потивоинфекционной профилактики при хирургических вмешательствах.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования будут направлены на расширение программы электрофоретического скрининга, с включением как новых представителей антибиотиков цефалоспоринового ряда, так и представителей других групп антибактериальных средств, обладающих токсичностью и не изученных в химико-токсикологическом отношении; разработку скрининговых методов анализа указанных веществ на базе капиллярного электрофореза в сочетании с идентификацией по электрофоретическим спектрам.

Целесообразно продолжить дальнейшую разработку и внедрение экспрессных методик в лабораторно-клиническую диагностику для проведения мониторинга концентрации антибактериальных средств, в тканях операционного поля, с целью оптимизации антибиотикотерапии не только в общей хирургической практике, но и в челюстно-лицевой хирургии в стоматологической практике.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Изучение условий скринингового обнаружения ряда азотсодержащих соединений основного характера методом электрофореза на бумаге / А.Н. Фомин, А.В. Смирнова, М.Б. Семёнов, **В.Б. Крючков** и др. // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** - Москва, 2011 - №11. - С.32 – 38.
2. Фомин А.Н. К разработке оптимальных условий выделения цефоперазона из мочи. [Текст] / А.Н. Фомин, **В.Б. Крючков**, С.В. Добротина // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ студентов и молодых учёных Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова. – Ярославль, 2013.- С. 227.
3. Фомин А.Н. Сравнительная характеристика методов выделения цефоперазона из биологического материала [Текст] / А.Н. Фомин, **В.Б. Крючков**, Н.А. Василенко // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник тезисов научных работ студентов и молодых учёных Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию победы в Великой Отечественной войне. - Ярославль, 2015.- С. 88.
4. Фомин А.Н. Экспрессный вариант определения цефоперазона в моче капиллярным электрофорезом [Электронный ресурс] (дата обращения: 05.11.2015). / Фомин А.Н., **Крючков В.Б.**, Смирнова А.В., Каджоян Л.В. **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. № 2; URL: [18http://www.science-education.ru/129-22952](http://www.science-education.ru/129-22952)
5. Экспрессный вариант определения цефоперазона в тканях операционного поля капиллярным электрофорезом / **Крючков В.Б.**, Фомин А.Н., Ларичев А.Б., Смирнова А.В. // **Успехи современного естествознания.** - М., 2016. - №8. – С. 31 – 35.

6. Фомин А.Н. Разработка и применение электрофоретических методик экспресс-диагностики цефоперазона в биологических субстратах для мониторинга уровней концентраций в клинической лабораторной практике [Текст] / А.Н. Фомин, **В.Б. Крючков**, Н.А. Василенко // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник тезисов научных работ студентов и молодых учёных 70-ой Юбилейной всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки». - Ярославль, ЯГМУ Издат. дом ЯГТУ, 2016. – С. 77-79.
7. Смирнова А.В.К изучению специфичности методики анализа цефтриаксона методом капиллярного электрофореза [Текст] / А.В. СмирноваА.А. Куликов, **В.Б. Крючков** // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник тезисов научных работ студентов и молодых учёных 71 – й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой юбилею президента университета, профессора, академика РАН Ю.В. Новикова. – Ярославль, 2017. – С. 106 – 107.
8. Клинико-фармакокинетические параллели периоперационной антибиотикопрофилактики в абдоминальной хирургии / Ларичев А.Б., Бабаджанян А.Р., Фомин А.Н., **Крючков В.Б.**, Ефремов К.Н., Смирнова А.В. // Российский медицинский журнал. М., 2018. - 24(2) – С. 73 – 75.