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

На правах рукописи

Крючков Василий Борисович

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕФОПЕРАЗОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Фомин Анатолий Николаевич
Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Ларичев Андрей Борисович

ЯРОСЛАВЛЬ – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ……..……2
ВВЕДЕНИЕ……..7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……..14
1.1. Применение, фармакокинетика и побочные действия цефоперазона……14
1.2. Профилактика послеоперационных осложнений при хирургических вмешательствах……...21
1.3. Аналитические методы исследования антибиотиков цефалоспоринового ряда…….....23
1.4. Применение электрофореза для анализа веществ в биологических объектах…….....26
1.4.1. Электрофорез на бумаге……..….....26
1.4.2. Применение капиллярного электрофореза для анализа веществ в биологических объектах……..…….....29
Выводы по главе 1……...…….....34
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ…….....35
2.1. Объекты исследования……..…….....35
2.2. Методы исследования …….…….....36
2.2.1. Условия проведения анализа цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге…….....36
2.2.1.1. Пропитывание полосок бумаги электролитом…….....36
2.2.1.2. Выбор рабочих стандартов……..36
2.2.1.3. Нанесение исследуемых образцов и метчиков……..37
2.2.1.4. Подготовка прибора и проведение электрофореза…….....37
2.2.1.5. Обнаружение зон антибиотиков на электрофореграмме……..37
2.2.2. Условия проведения исследования цефоперазона методом капиллярного электрофореза……38
2.2.2.1. Общая характеристика системы капиллярного электрофореза «Капель–105М»…….……...38

2.2.2.2. Выбор рабочего стандарта…….....40
2.2.2.3. Подготовка капилляра…….....41
2.2.2.3.1. Условия подготовки нового капилляра…….....41
2.2.2.3.2. Условия подготовки капилляра между анализами……42
2.2.2.4. Рабочий электролит…….....42
2.2.2.5. Растворитель пробы…….43
2.2.2.6. Изучение УФ – спектра цефоперазона…….....46
2.2.3. Условия электрофоретического исследования цефоперазона методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»)……..48
2.3. Статистическая обработка результатов исследований…….....48
ГЛАВА 3. Изучение условий скринингового обнаружения и идентификации цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге…….....50
3.1. Условия предварительного (скринингового) обнаружения цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге……..51
3.1.1. Прибор и режим работы……...……..51
3.1.2. Носитель…..……..……....51
3.1.3. Электролиты……...…….52
3.1.4. Изучение чувствительности проявления зон цефалоспориновых антибиотиков на электрофореграмме…….52
3.1.5. Предварительное (групповое) обнаружение цефоперазона в присутствии антибиотиков цефалоспоринового ряда методом электрофореза на бумаге……...……...….53
3.2. Внутригрупповая идентификация цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге с помощью электрофоретических спектров (ЭФС)……...……...55
3.3. Изучение влияния соэкстрактивных веществ в составе биологических объектов на условия скринингового обнаружения цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге……....59

3.3.1. Электрофорез – скрининг антибиотиков в модельных биологических смесях…….59
3.3.1.1. Исследование мочи…….....60
3.3.1.2. Исследование ткани биологического материала (печени, почки).....61
3.3.1.3. Приготовление модельной биологической смеси…….……....61
3.3.1.4. Предварительное (групповое) обнаружение ряда цефалоспориновых антибиотиков в составе модельных биологических смесей методом электрофореза на бумаге……..…….....61
3.3.1.5. Внутригрупповая ЭФС - идентификация (второй этап электрофореза – скрининга) антибиотиков в составе модельных биологических смесей методом электрофореза на бумаге…….....64
Выводы по главе 3……...……...……...71
Глава 4. Изучение возможности идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза……72
4.1. Изучение основных электрофоретических параметров цефоперазона….73
4.1.1. Влияние природы и pH рабочего электролита (РЭ) на качественные параметры цефоперазона на ЭФГ……73
4.1.2. Определение специфичности методики анализа цефоперазона методом капиллярного электрофореза……76
4.2. Количественное определение цефоперазона методом капиллярного электрофореза. Валидационная оценка…….....79
4.2.1. Построение калибровочного графика……...……79
4.2.2. Определение прецизионности и правильности методики…….....83
4.2.3. Определение диапазона применения методики. Предел количественного определения……..……...88
Выводы по главе 4……89
Глава 5. Идентификация и количественное определение цефоперазона в биологических объектах (модельных смесях) методом капиллярного электрофореза……..90

5.1. Выбор оптимальных условий экстракции цефоперазона из водных растворов…….....91
5.1.1. Влияние pH среды и природы органического растворителя на степень экстракции цефоперазона из водных растворов……..91
5.1.2. Влияние кратности экстрагирования и объёма экстрагента на степень экстракции цефоперазона из водных растворов……..92
5.2. Идентификация и количественное определение цефоперазона в моче. Валидационная характеристика методики…….....94
5.2.1. Построение калибровочного графика……...……97
5.3. Идентификация и количественное определение цефоперазона в крови. Валидация методики……..103
5.3.1. Оптимизация условий пробоподготовки при определении цефоперазона в крови методом капиллярного электрофореза……..…..103
5.3.1.2. Влияние природы осадителей на степень экстрагирования цефоперазона из крови, плазмы, сыворотки…….....103
5.3.2. Валидационная характеристика методики идентификации и количественного определения цефоперазона в плазме крови (на четырёх уровнях концентрации) методом капиллярного электрофореза……..106
5.3.2.1. Построение калибровочного графика……...110
5.4. Идентификация и количественное определение цефоперазона в печени. Валидация методики……...……116
5.4.1. Сравнительная характеристика методов выделения цефоперазона из печени……...……116
5.4.2. Валидационная характеристика методики идентификации и количественного определения цефоперазона в печени методом капиллярного электрофореза…….…….118
5.4.2.1. Построение калибровочного графика……..121
Выводы по главе 5……...128

Глава 6. Идентификация, и количественное определение цефоперазона в клинических объектах (тканях операционного поля) методом капиллярного электрофореза…….....129
6.1. Идентификация антибиотика в тканях операционного поля……...130
6.2. Количественное определение цефоперазона и динамика его распределения в тканях операционного поля…….....133
6.3. Особенности течения раневого процесса и клиническая результативность антибиотикопрофилактики…….138
Выводы по главе 6…….. 141
Общие выводы……142
Список литературы……..144
Приложения.……...171

ВВЕДЕНИЕ

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

Вместе с тем при некоторых 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 электромиграционных методов – капиллярный электрофорез, нашедший в последние годы в зарубежной аналитической практике применение в связи с достоинствами: высокой эффективностью, экспрессностью, малым

расходованием биологического объекта для анализа, программированному обеспечению хода анализа и расчёта полученных результатов [16, 17, 44].

Степень разработанности темы исследования. Обзор зарубежной и отечественной литературы показал что, несмотря на токсикологическое значение цефоперазона, широкое применение 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.

В связи с вышеизложенным, **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 ма-

лый расход органических растворителей, что обеспечивает экспрессность анализа.

Теоретическая значимость результатов 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 результатов исследования 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.

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 разработанных методик изолирования, идентификации и количественного определения цефоперазона в биологических объектах судебно-химическим отделением ГБУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»(4акта внедрения от14.09.2016,13.10.2016,10.10.2016,10.11.2016),

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).

Методология и методы исследования. Методология исследования построена на анализе и обработке литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности, поведении цефоперазона в растворах электролитов, выборе оптимальных условий экстракции 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.

Степень достоверности и апробация результатов. 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.

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.

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.

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.

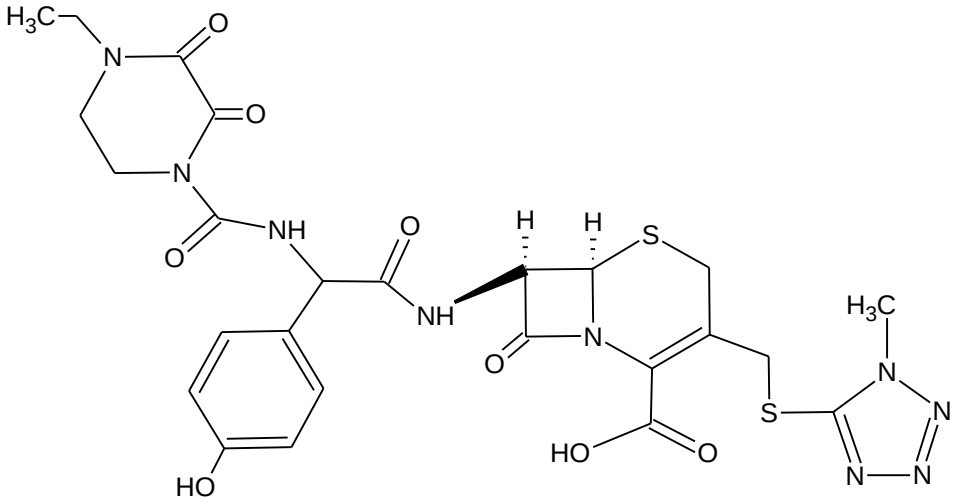
Связь задач исследования с планом научной работы кафедры. Диссертационная работа выполнена по плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (номер государственной регистрации 01201153123).

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

Объём и структура работы. Диссертационная работа изложена на 206 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (5 глав), общих выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 36 рисунком и 37 таблицами. Список литературы включает 244 источника, из них 101 на иностранных языках. В приложение включены акты внедрения и проект информационного письма «Химико-токсикологический анализ цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Применение, фармакокинетика и побочные действия цефоперазона



Цефоперазон (Cefoperazone) [6R-[6альфа,7бета(R*)]]-7-[[[[(4-Этил-2,3-диоксо-1-пиперазинил)карбонил]амино](4-гидроксифенил)ацетил]амино]-3-[[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)тио]метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота (и в виде натриевой соли).

Синонимы: Cefobid, Dardum, Lorizone, Medocef, Cefoperabol, Lorizon, Cefapizon, Цефоперазон КМП [61, 111, 112].

Цефалоспориновый антибиотик III поколения для парентерального применения. Цефоперазон натрия — белый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, плохо растворим в спирте, практически не растворим в эфире и хлороформе. Легко растворим в разбавленных минеральных кислотах и растворах щелочей. Константа диссоциации (pKa) – 5,2. Насыщенный раствор при 20°С имеет значение pH 4,5 – 6,5. Молекулярная масса 667,66 [77].

Антимикробное действие антибиотика определено связыванием препарата с соответствующими мишенями на бактериальных клетках.

Цефалоспорины соединяются с определенными ферментами цитоплазматической мембраны бактерий (пептидазами), участвующими в процессах синтеза стенок бактерий и деления клеток. В результате под влиянием препарата образуются дефектные стенки бактериальных клеток, что приводит к замедлению роста или гибели микроорганизмов, [10, 11, 38, 62, 68, 111, 117, 138].

Ферменты, являющиеся мишенями для β-лактамных антибиотиков, называются пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) и существенно отличаются у разных видов микроорганизмов. Неодинаковое сродство определенных β -лактамных антибиотиков к конкретным ПСБ объясняет различие в морфологических изменениях, возникающих в чувствительных к данному лекарственному средству микроорганизмах. Этим же можно объяснить различия в спектре действия отдельных β-лактамных антибиотиков, которые не связаны с наличием или отсутствием β –лактамаз [143].

Эти ферменты (β-лактамазы) сильно отличаются друг от друга по целому ряду характеристик и, соответственно, клиническое значение их также неодинаково [5, 9, 12, 34].

Основные отличия цефоперазона от других цефалоспоринов III поколения сводятся к следующему: высокая активность в отношении P. aeruginosa и других неферментирующих микроорганизмов, однако несколько ниже, чем у цефтазидима [38, 41, 140, 161]. Цефоперазон проявляет более высокую активность, нежели цефтазидим в отношении S. pneumoniae, уступая при этом цефтриаксону и цефотаксиму. При применении цефоперазона создается наиболее высокая концентрация его в желчи по сравнению с другими препаратами. Большую концентрацию в желчи, создает также цефтриаксон, но при использовании этого препарата в высоких дозах он может вызывать холестаз и псевдохолелитиаз [45]. Следовательно, при условии чувствительности возбудителей заболевания желчевыводящих путей цефалоспоринам III поколения цефоперазон более предпочтителен для применения, чем цефтриаксон [41].

Учитывая, что цефоперазон плохо проникает через гематоэнцефалический барьер, при инфекциях центральной нервной системы (менингит, абсцесс мозга и т. д.), следует отдать предпочтение цефотаксиму или цефтриаксону, которые лучше проникают через гематоэнцефалический барьер [38].

Бактерицидный эффект проявляется только в отношении размножающихся микроорганизмов. Активен in vitro и при лечении клинических инфекций в отношении грамположительных аэробов: Staphylococcus aureus (не продуцирующие и продуцирующие пенициллиназу штаммы), Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes (бета-гемолитический стрептококк группы А), Streptococcus agalactiae (бета-гемолитический стрептококк группы В), Enterococcus (Streptococcus faecalis, S.faecium, S.durans), грамотрицательных аэробов: Escherichia coli, Klebsiella spp. (включая Klebsiella pneumoniae), Enterobacter spp., Citrobacter spp., Haemophilus influenzae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Morganella morganii, Providencia stuartii, Providencia rettgeri, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas spp., некоторые штаммы Acinetobacter calcoaceticus, Neisseria gonorrhoeae. Активен в отношении анаэробных организмов, включая: грамположительные кокки (в т.ч. Peptococcus и Peptostreptococcus), Clostridium spp., Bacteroides fragilis, другие Bacteroides spp.) [136, 141, 142, 143].

Проявляет также активность in vitro в отношении Salmonella spp., Shigella spp., Serratia liquefaciens, Neisseria meningitidis, Bordetella pertussis, Yersinia enterocolitica, Clostridium difficile, Fusobacterium spp., Eubacterium spp., бета-лактамазопродуцирующих штаммов H.influenzae и Neisseria gonorrhoeae. Устойчив по отношению к плазмидным бета-лактамазам широкого спектра (TEM−1,2, SHV−1), однако разрушается под воздействием ферментов расширенного спектра (TEM−3–2, SHV−2–5) [104, 107, 110, 113, 117, 127].

Цефоперазон – антибиотик для внутримышечного и внутривенного введения, так как биодоступность его при пероральном применении очень низкая [127].

После введения одной дозы препарата большие концентрации вещества отмечались в сыворотке крови и желчи. Через 1 ч после однократной 15-минутной в/в инфузии с постоянной скоростью в дозе 1, 2, 3 или 4 г сывороточные концентрации цефоперазона составляли 73, 114, 142 и 251 мкг/мл. После одной в/м инъекции в дозе 1 и 2 г T_{max} составляло 1 ч, сывороточные концентрации цефоперазона — 65 и 93 мкг/мл. Максимальные концентрации в желчи наблюдались спустя 1–3 ч после введения и превышали таковые в сыворотке примерно в 100 раз. Концентрации цефоперазона были в диапазоне от 66 мкг/мл через 30 мин до более 6000 мкг/мл через 3 ч после в/в болюсной инъекции в дозе 2 г [98].

После 15-минутной инфузии 2 г цефоперазона концентрация его в моче была более 2200 мкг/мл. Через 12 ч после однократного в/м или в/в введения в моче определялось 20–30% вещества. После в/м инъекции 2 г C_{max} в моче составляла почти 1000 мкг/мл., период полувыведения из крови — примерно 2 ч (не зависит от способа введения — в/м или в/в). Параметры C_{max}, AUC и $T_{1/2}$ из сыворотки у пациентов с выраженными нарушениями функции почек не отличались от таковых у нормальных добровольцев [99]. При нарушении функции печени $T_{1/2}$ из сыворотки пролонгируется (до 3–7 ч) и экскреция с мочой увеличивается. При одновременной почечной/печеночной недостаточности возможна кумуляция вещества в сыворотке. У новорожденных детей с низкой массой тела $T_{1/2}$ из сыворотки — 6–10 ч; у детей в возрасте около 1 мес — 4–6 ч; у новорожденных и детей в возрасте от 2 мес до 2 лет — 2,2 ч [98]. Связывается с белками плазмы (82–93%). Несмотря на высокое сывороточное содержание, практически не проникает в ликвор, накапливается в антибактериальных концентрациях в асцитической, амниотической и перитонеальной жидкостях, моче, мокроте, легких, небных миндалинах, слизистой оболочке носовых пазух, миокарде,

половых органах, костях и др. Уровень в желчи достигает очень высоких значений. Выводится преимущественно с желчью (70–80%) [45, 137].

Показаниями к назначению цефоперазона являются бактериальные инфекции верхних и нижних дыхательных путей включая пневмонию [76, 97, 104], в том числе нозокомиальную [110], кроме того этот антибиотик используется при лечении инфекций мочевыводящих путей (в т.ч. гонококковый уретрит) и половых органов (эндометрит), кожи и мягких тканей [71, 91], костей и суставов [135], интраабдоминальных инфекций (перитонит, холецистит, холангит), септицемии, сепсисе менингите [89, 127, 139]. Данный антибиотик используют в качестве средства предотвращения инфекционных осложнений после абдоминальных, гинекологических и ортопедических операций [34, 91, 107] а также в сердечнососудистой хирургии [74, 75] и онкологии [31].

Обычная суточная доза назначается взрослым больным, колеблется в пределах от 2 г до 4 г; она делится на равные части, вводимые через каждые 12 часов. Для инфекций с тяжелым течением ежедневную дозу можно увеличить до 8 г; равные части этой дозы вводятся через каждые 12 часов. Не отмечено никаких осложнений при введении цефоперазона в суточной дозе 12 - 16 г, разделенной на три приёма (с интервалом 8 часов). Лечение препаратом можно начинать до получения результатов исследования чувствительности микроорганизмов [38].

Во время лечения новорожденных и детей цефоперазон должен назначаться в суточных дозах от 50 мг до 200 мг на 1 кг массы тела; доза вводится в 2 приема (каждые 12 часов) или более, в случае необходимости. Новорожденным (до 8 дней) препарат следует вводить через каждые 12 часов. Суточные дозы даже до 300 мг / кг не вызвали осложнений у детей раннего возраста и у детей, страдающих инфекции, включая нескольких пациентов с бактериальным менингитом [13, 179].

Особенности применения. Следует иметь в виду, что 1 г цефоперазона содержит 34 мг натрия. Перед назначением больному препарата следует

установить, у него не было отмечено повышенной чувствительности к цефалоспоринам, пенициллинам и других лекарственных средств. Больным с высокой чувствительностью к пенициллину препарат следует назначать с большой осторожностью. Всем больным, в анамнезе которых было зафиксировано склонность к различным аллергическим реакциям (особенно - медикаментозная аллергия), антибиотики следует применять с осторожностью [36].

Цефоперазон интенсивно выводится с желчью. Период полувыведения, как правило, удлиняется, а выделение препарата с мочой усиливается у больных, страдающих заболеваниями печени или закупорки желчных протоков.

Период полувыведения цефоперазона из сыворотки крови несколько уменьшается во время гемодиализа. Введение препарата должно осуществляться после окончания диализа.

У некоторых пациентов лечение препаратом может привести к недостатку витамина К в организме [36]. Наиболее вероятно это связано с подавлением кишечной флоры, которая синтезирует этот витамин. Такому риску подвергаются истощенные пациенты или пациенты с нарушениями усвоения пищи (больные, страдающие муковисцидозом поджелудочной железы), а также пациенты, на протяжении длительного времени находящиеся на парентеральном питании. Для таких больных следует проводить контроль протромбинового времени, а при необходимости им назначается экзогенный витамин К [36].

Длительное применение цефоперазона может вызвать усиленный рост устойчивых микроорганизмов. По этой причине во время лечения следует проводить тщательное наблюдение за больными.

Изменения лабораторных показателей. Может иметь место ложноположительная реакция на глюкозу в моче при проведении тестов с растворами Бенедикта или Фелинга [36].

При применении цефоперазона, как и во время лечения другими цефалоспоринами, были отмечены реакции, связанные с индивидуальной

непереносимостью: макулопапулезная сыпь, крапивница, эозинофилия и медикаментозная лихорадка.

Во время лечения препаратом были отмечены случаи небольшого снижения уровня нейтрофилов. Так же, при длительном применении может обратимая нейтропения. Во время лечения цефалоспоринами у некоторых пациентов была установлена положительная прямая антиглобулиновая проба Кумбса. Такие явления, как снижение гемоглобина или гематокрита, которые отмечались во время лечения препаратом, известны из исследований других цефалоспоринов. Были отмечены случаи непродолжительной эозинофилии и гипопротромбинемии. Зарегистрированы также случаи умеренного увеличения уровня АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы.

Было отмечено изменение кишечных функций (жидкое испражнения), которое имело в большей или меньшей степени острое течение. Во всех случаях эти явления поддавались симптоматической терапии или исчезали с прекращением лечения.

При внутривенной инфузии у некоторых больных в месте вливания развивается флебит [12, 14, 36, 45].

При употреблении алкогольных напитков, которые принимали во время и, самое позднее, на пятые сутки после введения антибиотика, были зарегистрированы такие характерные реакции, как внезапный прилив крови к лицу, потливость, головная боль и тахикардия. Похожие реакции было замечено при лечении некоторыми другими цефалоспоринами. Поэтому пациентам следует воздерживаться от употребления алкогольных напитков во время лечения цефоперазоном [36, 102].

Проведенные опыты на мышах, крысах и обезьянах показали, что во время введения им препарата в дозах, в 10 раз превышающих дозы, предназначенные для лечения людей, у животных не было отмечено тератогенного эффекта. Однако тщательно проверенных данных наблюдений над беременными женщинами нет. Поскольку результаты изучения репродуктивной функции у животных не всегда можно перенести на

организм человека, препарат во время беременности следует вестись лишь при крайней необходимости [93].

Повышенная доза цефалоспорина может быть причиной эпилептических приступов [36]. Имели место случаи анафилактического шока, в том числе и со смертельным исходом – так, в 2017 году в Беларуси, в деревне Тюрли Молодечненский район в фельдшерско-акушерском пункте от инъекции цефтриаксона скончалась 31 летняя женщина. В январе того же года в Борисове, после введения цефтриаксона у 11–ти летнего пациента произошло развитие анафилактического шока, но благодаря вовремя принятым реанимационным мероприятиям ребёнок остался жив [206]. Чаще всего такие реакции на лечение возникают у больных, в анамнезе которых отмечена склонность к аллергическим реакциям, особенно на пенициллин. Возникновение таких эффектов указывает на необходимость разработки методик анализа препаратов этой группы, для целей химико-токсикологической практики.

1.2. Профилактика послеоперационных осложнений при хирургических вмешательствах

Послеоперационные раневые осложнения до настоящего времени остаются актуальной проблемой современной хирургии. Антибиотики могут предотвращать развитие раневой инфекции только в случае контаминации раны чувствительными к ним микроорганизмами. Это крайне необходимый фактор для избежания образования антибиотикорезистентных штаммов [170]. Возбудители послеоперационной раневой инфекции в абдоминальной хирургии сегодня хорошо известны: Enterobacter spp., Escherichia coli, Proteus spp.,Streptococcus spp. [20]. При выборе профилактического антибиотика надо руководствоваться несколькими критериями. Из них самый основной – чувствительность к этому антибиотику наиболее часто встречаемых возбудителей. Также антибиотик должен обладать достаточной пенетрационной

способностью для попадания в ткани, меньшей токсичностью и экономической доступностью. Гостищев и соавторы предлагают для периоперационной антибиотикопрофилактики цефалоспорины II – III поколения, которые полностью соответствуют всем требованиям [20].

Другие авторы не рекомендуют использование цефалоспоринов III поколения для антибиотикопрофилактики при «чистых» и «условно чистых» операциях, так, как эта группа антибиотиков имеет большую антибактериальную активность по отношению к грамотрицательным микроорганизмам, что может привести к подавлению собственной микрофлоры даже при коротких курсах [32]. Однако цефалоспорины III поколения имеют продолжительный период полувыведения (12 часов), что позволяет вводить их однократно в профилактических целях и достигать высокой концентрации антибиотика в течении всей операции и раннего послеоперационного периода. Это упрощает работу всей операционной бригады, среднего медицинского персонала, а также просто для больного, которому больше не приходится вводить препараты.

Также спорным остаётся вопрос о времени введения антибиотика до операции. Есть мнение, что введение антибиотика должно проводиться за 30 – 90 минут до операции [32]. Дозу можно повторять через каждые 12 часов, в течение суток. При операциях с повышенным риском инфицирования (операции в колоректальной зоне) и когда инфицирование может нанести особенно большой вред (при операциях на открытом сердце или протезировании суставов), профилактическое применение может продолжаться в течение 72 часов после окончания операции [74].

Э. П. Деллинджер в своей работе показал, что есть чёткая связь между временем введения антибиотика и количеством послеоперационных осложнений [170]. Вводить антибиотик с профилактической целью стоит не раньше, чем за час до разреза, а введение антибиотика после зашивания раны вовсе не имеет никакой профилактической ценности [170]. Таким образом, в связи с изучением вопросов оптимизации антибиотикотерапии при

хирургических вмешательствах, встаёт вопрос о проведении аналитического мониторинга уровня концентрации антибиотика в тканях операционного поля с использованием экспрессных, высокочувствительных методов анализа.

1.3. Аналитические методы исследования антибиотиков цефалоспоринового ряда

Фармакопейными методами установления подлинности и доброкачественности цефалоспоринов являются

- высокоэффективная жидкостная хроматография [72, 73, 128, 129, 130];
- снятие спектра в УФ-[72, 73, 128, 129, 130] и ИК-области [73, 231];
- определение оптической плотности водного раствора [119, 129];
- определение удельного вращения [72, 73, 116, 119, 128, 130];
- проведение реакций на обнаружение ионов натрия [72, 73, 116, 119, 128, 129, 130].

В литературе имеется значительное количество описания методик качественного и количественного анализа цефалоспориновых антибиотиков с использованием химических, фотометрических и хроматографических методов [218, 223]. Имеются сведения об использовании для определения цефалоспоринов йодометрического метода так же, как для солей бензилпенициллина, с применением ацетатного буфера pH 4,7 [119]; тонкослойной хроматографии (фосфатный буфер pH 7,0, метанол 1:1, детекция в УФ-свете 254 нм) [118], и капиллярного электрофореза [174, 180, 181, 194, 202].

Для количественного определения в России и за рубежом в основном используется высокоэффективная жидкостная хроматография [72, 73, 128, 129, 130, 175, 231, 235].

Для определения подлинности и качества субстанции цефалоспоринов, в том числе и цефоперазона, А.П. Арзамасцев предложил доступный и экспрессный метод микроколоночной хемосорбционной индикаторно – жидкостной хроматографии. Метод основан на хемосорбции вещества из 0,05% - 3% водного раствора индикаторным сорбентом. Цефалоспорины

определялись по образованию зон адсорбции, имеющих специфическую окраску. Результат исследования оценивался визуально [3].

В Варшавском институте лекарственных средств на отделении микробиологии и антибиотикотерапии в 2000 году было проведено исследование смеси цефалоспоринов в водном растворе на возможность их разделения методом капиллярного электрофореза и влиянии pH фонового электролита на степень разделения цефалоспоринов. В результате исследования лучшее разделение смеси наблюдалось при применении мицеллярной электрокинетической хроматографии с фосфатно – боратным буфером pH 6,5 использованным в качестве фонового электролита [208].

Цефалоспорины были объектами многих клинических исследований по оценке эффективности, но этот параметр в клинических исследованиях субъективен, так как зависит не только от концентрации антибиотика в крови и тканях пациента, но и от его иммунологического статуса, степени инвазии, применении других антимикробных препаратов и прочих индивидуальных особенностей человека [10, 11, 13, 48, 94, 133, 150].

В связи с этим для более полной и достоверной оценки эффективности цефалоспоринов требуются методы, селективно определяющие концентрации конкретных соединений этой группы в биологических жидкостях и тканях. К таким методам относятся различные виды хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ) [118, 148, 203, 205]. Основной проблемой применения этих методов для анализа биологического материала стала его загрязнённость различными сопутствующими веществами, которые снижают эффективность анализа [148].

В 2004 году была опубликована работа по обнаружению и определению цефалоспоринов III поколения в крови пациентов. Исследование проводилось с помощью метода ионообменной ТСХ. В качестве неподвижной фазы – двуокись олова. В этом исследовании приведено сравнение двадцати подвижных фаз с обоснованием выбора для анализа цитратного и боратного буфера при различных pH, так как при их

использовании достигалось лучшее разделение цефалоспоринов. Проявление хроматограмм проводили обработкой их парами йода. Цефалоспорины обнаруживались как коричневые пятна на желтом фоне [204].

Toothaker R.D., Wright S.D. проводили анализ цефоперазона методом обращено-фазовой ВЭЖХ при исследовании плазмы, мочи, сыворотки и цереброспинальной жидкости. Обнаружение проводилось после осаждения белков путем обработки пробы метанолом. Некоторые методики предполагают использование экстракционной очистки. Экстракция из подкисленных образцов осуществлялась: этилацетатом, смесью хлороформа с бутанолом, с последующим разделение компонентов пробы и обнаружением их методом ОФ ВЭЖХ [234].

Обнаружению и количественной оценке цефоперазона в сыворотке крови и мышечной ткани с помощью метода ВЭЖХ посвящена статья Американского Общества Микробиологии. В анализе использована метанольная экстракция, с добавлением цефокситина как внутреннего стандарта. Предел обнаружения составил 1 мкг/мл, с коэффициентом вариации 7,4%. Разделение проводили на стандартной хроматографической колонке Bondapak. В качестве подвижной фазы - 0,005М тетрабутиламмониевый буфер с добавлением ацетонитрила в соотношении 80:20. Детектирование проводилось при длине волны 254 нм. Определение осуществлялось по отношению обнаруженного цефоперазона к концентрации внутреннего стандарта цефокситина. У пациентов, которым вводилось 2,0 г цефоперазона во время операции в области шеи, бралась навеска мышечной ткани 0,1 – 0,2 г., и одновременно проба сыворотки, через 1 час после введения препарата. Определение в крови и тканях составило от 48 до 120 мкг/мл и 9,3 – 20,7 мкг/мл соответственно [203].

Применению метода ОФ ВЭЖХ в анализе цефалоспоринов в биологических объектах посвящены работы Л.И. Соколовой [108, 109]. В работе дан аналитический подход к выбору экстрагента и материала сорбента в зависимости от структуры антибиотика. Для осуществления

депротеинизации предложена обработка трихлоруксусной, хлорной кислотой, метанолом, этилмочевиной и ацетонитрилом. Также приведены длины УФ-волн – оптимальных для анализа различных цефалоспоринов в объектах. Автором приведены сведения о мониторинге цефалоспоринов в крови и моче пациентов. Таким образом, следует отметить, что в литературе встречается мало сведений о методах анализа цефалоспориновых антибиотиков, в том числе и цефоперазона в биологическом материале, отсутствуют скрининговые программы для ненаправленного химико-токсикологического и клинического лабораторного анализа.

1.4. Применение электрофореза для анализа веществ в биологических объектах

1.4.1. Электрофорез на бумаге

Эффективным физико-химическим методом анализа является электрофорез на бумаге, позволяющий сочетать в себе очистку и обнаружение искомых веществ. При этом требуется небольшое количество исследуемого вещества и этот метод прост в лабораторном оформлении [16, 58].

Goldbaum L.P. и Kazyak L. использовали электрофорез на бумаге с целью очистки морфина, выделенного из мочи. Электрофорез проводили на бумаге ватман № 2 при напряжении 300 В в течение 1 ч, электролит - 1 н раствор уксусной кислоты [183].

Песахович Л.В. применил электрофорез на бумаге для очистки и извлечения резерпина и продуктов его метаболизма, выделенных из биологического материала. Автор проводил электрофорез на хроматографической бумаге марки “М” при напряжении 400 В в течение 2 ч, используя в качестве электролита 30% раствор уксусной кислоты. Обнаружение зон резерпина и продуктов его метаболизма на электрофореграммах проводилось по их флюоресценции в УФ-свете. Длину пути фореза (ДПФ, см) исследуемых веществ вычисляли путём измерений расстояния от линии

старта до переднего края зоны на электрофореграмме. Резерпин элюировали 30% раствором уксусной кислоты. Элюат использовали для флюориметрического определения искомых веществ. Автором показана эффективность степени очистки резерпина и резерпиноподобных продуктов его превращения методом электрофореза на бумаге и достаточна для проведения флуориметрии. Показана возможность разделения резерпина и ряда флуоресцирующих веществ – котарнина, этакридина, акрихина, рибофлавина, хинина [82, 83, 84].

Для обнаружения ряда азотсодержащих оснований в водных вытяжках из печени Михно В.В. использовала электрофорез на бумаге марки “Б”. При этом установлена возможность идентификации галантамина, промедола, пахикарпина, папаверина, дибазола и других соединений [63, 64, 65].

Вергейчик Т.Х. и Грязнова Е.А. использовали электрофорез на бумаге марки “Б” (электролит – ацетатный буферный раствор pH 5,6; 300 В, 1 ч) для очистки 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-ДУ), выделенной из биологического объекта. Данный способ очистки позволил провести УФ-спектрофотометрию исследуемого соединения [15].

Песахович Л.В. и Фомин А.Н. использовали электрофорез на бумаге «ФН 15» (400 В, 1 ч, электролит – 5% раствор уксусной кислоты) для очистки мезидина и тримекаина, изолированных из биологических объектов. Электрофоретическая очистка позволила провести последующее фотоэлектроколориметрическое определение мезидина на основе реакции азосочетания с 8-оксихинолином и экстракционно-фотометрическое определение тримекаина, базирующееся на реакции образования тропеолината тримекаина [87, 88, 123].

Лайпановым А.Х. и Фоминым А.Н. показана возможность исследования клофелина в моче с использованием электрофореза на бумаге (прибор ПВЭФ-1, 400 В, 1 ч, электролит – 5% раствор уксусной кислоты). Авторами показано, что электрофоретическая очистка исследуемого основания позволила провести его экстракционно-фотометрическое определение,

основанное на образовании ионного ассоциата с метиловым оранжевым. Граница определения составила 2 мкг клофелина в исследуемой пробе [49].

Исследованиями Фомина А.Н. и соавторов была показана эффективность очистки клофелина от соэкстрактивных веществ в вытяжках из тканей внутренних органов с использованием электрофореза на бумаге марки «Б» при напряжении 400 В в течение 1 ч в электролите – буферном растворе Бриттона-Робинсона, pH 2,3 [121, 122].

Предложена методика электрофорезо-спектрофотометрического определения доксициклина в моче в условиях клиники, для мониторинга экскреции препарата. Предварительное электрофоретическое выделение проводили при напряжении 400 В в течение 1,5 ч. В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона (pH 2,3) [8, 42, 51, 125].

Важным фактором, определяющим скорость миграции веществ, при прочих равных условиях, является pH электролита. Песаховичем Л.В. на примере ряда лекарственных веществ показана возможность построения электрофоретических спектров (ЭФС), представляющих собой графическую зависимость электрофоретической подвижности исследуемых веществ (ДПФ, см) от pH электролита. Автором было показано, что независимо от химического строения вещества, природы исследуемого субстрата, метода выделения и плотности бумаги ЭФС идентифицированных оснований и соответствующих им «свидетелей» сходны. Несмотря на различия в высоте ЭФС, закономерности изменения их профилей одинаковы, так как они характеризуются внутренним строением веществ. При этом показано, что ЭФС, построенные с использованием индикатора электроосмоса и реофореза – 1,3,5-тринитробензола, позволили устранить влияние реофореза на миграцию веществ и получить количественные характеристики, базирующиеся на их ионном состоянии (pKa, Pi – внутренние коэффициенты и др.) и тем самым способствовать их надежной идентификации [79, 80, 81, 85, 86].

Фомин А.Н. показал эффективность применения электрофореза на бумаге в варианте электрофореза-скрининга для очистки, предварительного

обнаружения и последующей идентификации по ЭФС ряда азотсодержащих соединений основного характера (аминазин, трифтазин, диазепам, клофелин и др.) при ненаправленном химико-токсикологическом исследовании биологических объектов. На предварительном этапе электрофоретического исследования вещества последовательно располагались по ДПФ величинам на 5 электрофоретических групп. Идентификация веществ в каждой группе осуществлялась по ЭФС (сравнение профилей, pKa, Pi и др.) [123].

Разработаны условия ЭФС-идентификации ряда производных тетрациклина с использованием электрофореза на бумаге (400 В, 1,5 ч, электролит – буферный раствор Бриттона-Робинсона со значениями pH 1,8 – 10,0, индикатор электроосмоса и реофореза – 1,3,5-тринитробензол). При этом показано, что конфигурации ЭФС стандартного раствора доксициклина гидрохлорида и доксициклина в составе модельной смеси (моча, кровь) аналогичны. Рассчитаны количественные характеристики ЭФС антибиотика (pKa, Pi и др.) [8]. Таким образом, электрофорез на бумаге является эффективным методом очистки и обнаружения веществ в химико-токсикологических и клинических исследованиях. Сочетание электрофореза на бумаге с фотометрическими методами позволяет в значительной степени увеличить чувствительность и селективность исследований.

1.4.2. Применение капиллярного электрофореза для анализа веществ в биологических объектах

На сегодняшний день капиллярный электрофорез является одним из наиболее перспективных методов анализа [1, 16, 17, 44, 95, 211, 215, 242]. Он динамично развивается, и получает всё более широкое применение в анализе органических соединений [18, 105, 178, 184, 219, 221, 232] для определения лекарственных веществ [193, 195, 233, 244], в том числе в биологических жидкостях для идентификации и количественного анализа

[132, 154, 158, 160, 175, 237]. Метод характеризуется экспрессностью, микрообъёмами анализируемого раствора (объём пробы ~ 2 нл), отсутствием колонки и твёрдого сорбента, проблем с его «старением» (в отличие от ВЭЖХ), физической и химической деструкции и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы, а также практически не требуется органических растворителей [145, 151, 159, 209, 210].

Используются преимущественно кварцевые капилляры и УФ - детекторы [21, 33, 43, 62, 212, 220].

В качестве объектов для исследования методом капиллярного электрофореза используются биологические жидкости, прежде всего моча. Так КЭ с приёмом стекинга был использован при определении бруцина и стрихнина [197], антибиотиков – производных хинолона [199], метанефринов и катехоламинов [165], производных амфетамина [162], опиатов и в частности – героина [229, 230], ранитидина [167], рибофлавина [168].

Для определения метилэфедрина, целипролола, соталола и индерамида применяли метод изотахофореза с амперометрическим детектированием, который был использован для анализа образцов мочи [189]. С помощью капиллярного электрофореза возможно определение и метаболитов различных лекарственных веществ в моче: метаболитов кофеина [164], бупивикаина и его метаболитов [163], омепразола и его метаболита 5-гидроксиомепразола [172], кетамина и его метаболитов [173], суммарный анализ кокаина и его производных [222, 223], энрофлоксацина и его метаболита ципрофлоксацина [240], антипсихотических лекарственных средств (клозапин, локсапин) и их метаболитов [213], лоразепама и его 3-О-глюкуронида [147], офлоксацина и его метаболитов дезметилофлоксацина и офлоксацина N-оксида [191]. Для определения демитендена и его метаболита N-деметилдиметиндена применялся приём стекинга с использованием в качестве хиральной добавки β-циклодекстрина, что позволило определить очень низкие концентрации [188]. Также, капиллярный электрофорез широко используется при исследовании

содержания лекарственных веществ в плазме крови для определения цефазолина [226]; морфина без предварительной пробоподготовки [166, 207]; 5-фторурацила [216]; карнитинов [117]; этамбутола и метоксифенамина [192]; сульфаметоксазола и триметоприма [225]; циметидина [201]; аминотиолов [190]; креатина и креатинина [146]; гистидина, 1-метилгистидина и 3-метилгистидина [214]; в сыворотке крови был определён ламивудин [176] и трициклические антидепрессанты [169].

Приём стекинга был использован при разработке методики определения клозапина и его метаболитов в биологической жидкости (плазме крови) больных шизофренией. Определяемые вещества экстрагировали смесью этилацетата – н-гексана - изопропанола 8:1:1 из 0,2 мл плазмы. Затем центрифугировали и упаривали. Для определения – растворяли в воде. Рабочим электролитом являлся фосфатный буферный раствор pH 3,0, содержащий 50% этиленгликоля. Анализ проводили при напряжении 25 кВ, длина волны детектирования составляла 214 нм [177].

С использованием неводного КЭ и УФ – и МС – детектированием проведено определение лидокаина и его производных в плазме [236]. Применение разделительного метода анализа позволяет осуществлять стандартизацию лекарственных препаратов сложного состава. Проведена сравнительная оценка фармакокинетических параметров, противогрибковой активности и мукоадгезивных свойств бутоконазола нитрата. Методика использована для изучения накопления бутоконазола в сыворотке [57].

Использование электрохемилюминисцентного детектирования позволило изучить фармакокинетику для эноксацина и офлоксацина [198]; метилэфедрина и псевдоэфедрина [220].

Сравнительная оценка фармакокинетических параметров для метопролола в крови и плазме кроликов была проведена на КЭ с лазерно-флюоресцентным детектированием [155, 156].

Для мониторинга мочи на содержание морфина, опиоидов и их глюкуронидов использовался тандем КЭ/масс-спектрометрия и КЭ/электроспрей ионизация масс-спектрометрия [241].

Следует отметить роль плоского ЭОП в капиллярном электрофорезе, который объясняет высокую эффективность и разделительную способность метода [6, 17, 182]. Из всех вариантов капиллярного электрофореза наибольшее применение для решения конкретных задач фармацевтического анализа находят: капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и мицелярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ). Это подчёркивается в ряде сообщений разных лет [66, 152, 153, 227, 228]. Среди отечественных работ за последние 5 лет по применению капиллярного электрофореза в анализе лекарственных средств в биологических объектах можно выделить: исследования Сенченко С.П. по разработке методологических подходов анализа лекарственных средств, с использованием капиллярного электрофореза. При этом, автором детально изучены оптимальные условия анализа лекарственных средств кислотного, нейтрального и слабоосновного характера в условиях подавления ионизации (МЭКХ) [101].

Совместные исследования Фомина А.Н. и Хомова Ю.А. по определению доксициклина [124], артикаина [37, 78, 92] в моче капиллярным электрофорезом [131].

Работы группы авторов под руководством Карцевой Л.А. по электрофоретическому определению катехоламинов, метанефрина и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови [103], стероидов в биологических жидкостях [40].

С целью системного анализа азотсодержащих соединений основного характера (АССОХ) в биологических объектах на базе электрофореза на бумаге и капиллярного электрофореза посвящены исследования Фомина А.Н. Показана возможность ЭФС – идентификации АССОХ в жидких средах и внутренних органах экспериментальных животных в экспертном материале с использованием электрофоретических методов [119]. Смирновой А.В.

разработаны эффективные электрофоретические методики идентификации и количественного определения бупивикаина в биологических жидкостях, тканях внутренних органов на базе отечественной системы для капиллярного электрофореза («Капель – 105») УФ – детектирование, 200 нм [106].

Таким образом, в связи с высокой разрешающей способностью, капиллярный электрофорез широко используется для идентификации и определения лекарственных средств и их метаболитов в биологических субстратах. При этом, недостаток чувствительности может компенсироваться применением высокочувствительных спектрофлуоресцентных, электрохимических и МС – детекторов, а также концентрированием аналитов непосредственно в капилляре в процессе электрофореза (приём «стекинга») [39, 187].

Выводы по главе 1

1. Представленные выше литературные данные свидетельствуют о широком применении цефоперазона в медицинской практике, но, при определённых условиях этот препарат, может вызывать осложнения и аллергические реакции.

2. Для успешной терапии с использованием цефоперазона, широко применяющегося в хирургической и пульмонологической практике, требуется мониторинг его концентрации в биосредах человека.

3. Внедрение новых эффективных физико-химических методов в практику ненаправленного судебно-химического анализа, клинического лабораторного анализа цефоперазона является актуальным.

4. Большой интерес вызывает использование в качестве подтверждающего метода капиллярного электрофореза (КЭ). КЭ обладает рядом достоинств: производит разделение смеси на компоненты с высокой эффективностью, сочетает качественную и количественную детекцию разделяемых компонентов при исследовании одной и той же пробы (объем вводимой пробы составляет примерно 2 нл), характеризуется высокой чувствительностью, а также программным обеспечением хода анализа и расчета результатов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В эксперименте были использованы объекты исследования:

цефоперазона натриевая соль (Орхид Кемикалз энд Фармасьютикалз Лтд), цефазолина натриевая соль (ЗАО Фармацевтическая фирма «Лекко»), цефтриаксона натриевая соль (ЗАО Фармацевтическая фирма «Лекко»), цефотаксима натриевая соль (ОАО «Красфарма»), цефуроксима натриевая соль (ООО «АБОЛмед»), отвечающие требованиям НТД [72, 73, 128, 129, 130].

- модельные смеси биологических материалов (моча, кровь, печень), с различной концентрацией антибиотиков.
- клинические биологические жидкости (моча, кровь); ткани, взятые с операционного поля у пациентов, при проведении оперативных вмешательств, с использованием антибиотикотерапии.

В работе использованы следующие химические реактивы и органические растворители: кислота борная (ГФ XII), кислота хлороводородная концентрирванная (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).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Условия проведения анализа цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге

Исследование проводилось на приборе ПВЭФ–1 с камерой для горизонтального электрофореза при напряжении 400 В. Носитель – хроматографическая бумага марки «С» - средней впитываемости. Скорость впитывания воды составляет 70 ± 5мм за 10 минут. В качестве рабочего электролита использовали буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 9.0, который готовили смешиванием равных объёмов 0,04 М растворов фосфорной, уксусной и борной кислот [60].

2.2.1.1. Пропитывание полосок бумаги электролитом

Полосу хроматографической бумаги марки «С» с нанесёнными образцами опускали в раствор электролита, оставляя несмоченным участок не менее 1 см до линии старта. Затем ЭФГ помещали на фильтровальную бумагу для удаления остатка электролита.

2.2.1.2. Выбор рабочих стандартов

В качестве рабочих стандартов использовали цефалоспориновые антибиотики, отвечающие требованиям НТД (п. 2.1.). С целью проверки чистоты рабочих стандартов был проведён электрофорез на бумаге; 10 мкг стандарта наносили на линию старта хроматографической бумаги марки «С» и подвергали электрофорезу на приборе ПВЭФ–1 (400 В, 1 час). В качестве электролитов использовались: буферный раствор Бриттона-Робинсона со следующими значениями pH: 1,8; 2,3; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0. Детекцию веществ на ЭФГ осуществляли в УФ – свете и парами йода. В ре-

зультате электрофореза на каждой из ЭФГ была обнаружена только одна зона исследуемого вещества. Результаты анализа позволили принять исследуемые образцы за рабочие стандарты, которые были использованы в дальнейшем.

2.2.1.3. Нанесение исследуемых образцов и метчиков

На линию старта полосы хроматографической бумаги (15×27см), расположенную на расстоянии 6 см от анодного конца, микродозатором Biohit наносили методом наслаивания (по 1 мкл) аликвоты исследуемых образцов и эталонных растворов. Расстояние между точками нанесения составляло не менее 2 см. Новую порцию раствора наносили после испарения предыдущей. Обозначения на ЭФГ делали мягким графитным карандашом.

2.2.1.4. Подготовка прибора и проведение электрофореза

Описание приведено применительно к прибору ПВЭФ-1.

В ячейки электродных сосудов наливали по 220 мл электролита (буферный раствор Бриттона-Робинсона pH 2,3, 20° С). В электрофоретическую камеру наливали электролит, по 50 мл в обе секции камеры. Пропитанную электролитом полосу переносили в камеру, укладывали горизонтально, погружая концы полосы в ячейки для электродных сосудов. Камеру закрывали крышкой и после пропитывания полосы электролитом, подключали к источнику питания. Электрофорез проводили в течение 1 ч при напряжении 400 В. ЭФГ сушили при комнатной температуре, положив на горизонтальную поверхность.

2.2.1.5. Обнаружение зон антибиотиков на электрофореграмме

Сухие электрофореграммы (ЭФГ) обрабатывали парами йода в герметичной камере. После проявления зон отмечали их границы и измеряли

величины ДПФ см (длина пути фореза – расстояние от линии старта до переднего края детектируемой зоны), с точностью до 0,1 см.

2.2.2. Условия проведения исследования цефоперазона методом капиллярного электрофореза

Исследования проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель – 105М».

2.2.2.1. Общая характеристика системы капиллярного электрофореза «Капель – 105М»

Электрофоретическое исследование цефоперазона осуществляли на приборе «Капель – 105М» («Люмекс», г Санкт-Петербург, Россия). Использовался вариант зонного капиллярного электрофореза (миграция исследуемого аналита осуществлялась в анионной форме).

В состав прибора «Капель – 105М» (рисунок 2.1.) входят два сменных источника высокого напряжения (1 – 25 кВ): положительной (анализ катионов) и отрицательный (анализ анионов) полярности, а также гибкий кварцевый капилляр с внешним полиамидным покрытием. Размеры капилляра: общая длина составляет 60 см, внутренний диаметр 0,075 мм. Регистрация компонентов осуществляется с помощью встроенного фотометрического детектора с изменяемой длиной волны от 190 до 380 нм.

Запись и обработка результатов анализа производится с использованием программного обеспечения «Эльфоран для Windows», 2012 г.

Рисунок 2.1 - Система капиллярного электрофореза «Капель – 105М»

Капиллярный электрофорез (КЭ) является новым и интенсивно развивающимся методом разделения сложных смесей, позволяющим анализировать ионогенные и нейтральные соединения различной природы с высокой экспрессностью и уникальной эффективностью. Важным является сочетание разделения смеси на компоненты, с последующим их обнаружением, идентификацией и количественным определением непосредственно в кварцевом капилляре. Анализ соединений происходит под действием приложенного электрического поля постоянного тока. При этом, на границе раздела кварц – водный раствор электролита формируется так называемый «двойной электрический слой», благодаря которому образуется электроосмотический поток (ЭОП), осуществляющий пассивный перенос раствора внутри капилляра. Общая подвижность разделяемого иона ($\mu_{общ}$) в капиллярном электрофорезе определяется как электрофоретической подвижностью самого иона ($\mu_{эфф}$), зависящей от величины заряда и ионного радиуса, так и подвижностью электроосмотического потока (течение жидкости в капилляре под действием электрического поля – $\mu_{эоп}$), уравнение 1:

(1) $\mu_{общ} = \mu_{эфф} + \mu_{эоп}$

В свою очередь, $\mu_{эфф}$ зависит от следующих факторов (уравнение 2):

(2) $\mu_{эфф} = q / 6\pi\eta r$

где: q – заряд иона;

η – вязкость раствора;

r – радиус иона.

Подвижность ЭОП характеризуется следующими параметрами (уравнение 3)

(3) $\mu_{эоп} = \varepsilon\zeta / \eta$

где: ε – диэлектрическая константа;

ζ – величина дзета-потенциала (заряд поверхности капилляра).

Сложный характер происходящих при электрофорезе явлений ставит перед исследователями задачу выбора оптимальных условий в зависимости от физической и химической природы изучаемых веществ.

2.2.2.2. Выбор рабочего стандарта

В качестве рабочего стандарта использовали цефоперазон (в виде натриевой соли), отвечающий требованиям НТД [72].

С целью проверки чистоты стандарта был проведён электрофорез с использованием эталонного раствора (20 мкг/мл) в приборе «Капель-105М» (напряжение: +20 кВ, 15 мин). В качестве рабочего электролита (РЭ) использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона со значением pH 9,0. Растворитель пробы (РП) – РЭ, разбавленный в 10 раз водой. Ввод пробы осуществляли давлением (30 мбар * 15 сек). Детектирование – в УФ-области спектра при длине волны 230 нм.

В результате электрофореза, на каждой из электрофореграмм (ЭФГ) был обнаружен только один пик исследуемого вещества.

Результаты анализа позволили принять исследуемый образец за рабочий стандарт, который был использован в дальнейшем (рис. 2.2.).

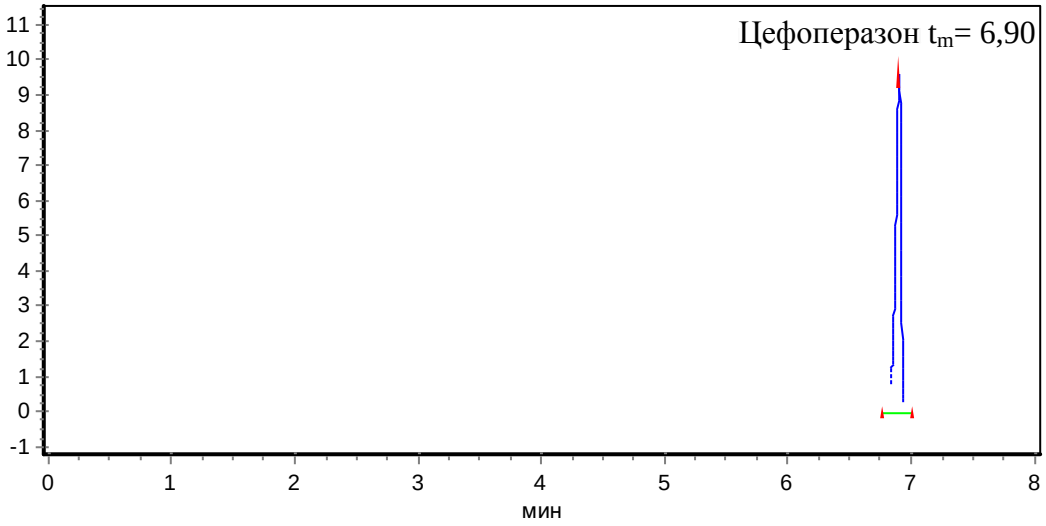


Рисунок 2.2 – Электрофореграмма цефоперазона, 20 мкг/мл («Капель – 105М»).

РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0.

Ввод пробы давлением (30мБар, 15 сек).

Рабочее напряжение – 20 кВ.

Детектирование – УФ – область спектра 230 нм.

2.2.2.3. Подготовка капилляра

При последовательных анализах для сохранения постоянства времен миграции необходимо подбирать условия промывки. С этой целью были разработаны оптимальные условия промывки капилляра между анализами цефоперазона, позволившие получить электрофоретические параметры исследуемого вещества, характеризующиеся наименьшими коэффициентами вариации.

2.2.2.3.1. Условия подготовки нового капилляра

Новый капилляр (диаметр – 0,075 мм, общая длина – 60 см) последовательно промывали под давлением 1 бар следующими растворами:

1. 0,5 М раствором хлороводородной кислоты – 10 минут.

2. Водой очищенной – 30 минут.
3. Рабочим электролитом (РЭ) – 10 минут.
4. Холостой электрофорез – 10 минут.

Условия проведения холостого электрофореза: положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: +20 Кв.

2.2.2.3.2. Условия подготовки капилляра между анализами

Промывка капилляра между третьим и четвёртым анализами проводилась по полной схеме:

1. 0,5 М раствором хлороводородной кислоты – 10 минут.
2. Водой очищенной – 10 минут.
3. 0,5 М раствором натрия гидроксида – 10 минут.
4. Водой очищенной – 10 минут.
5. РЭ – 10 минут.
6. Холостой электрофорез – 10 минут: положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: +20 Кв.

Промывка капилляра между первым, вторым и третьим анализами включала следующую короткую схему:

1. РЭ – 10 минут.
2. Холостой электрофорез – 10 минут (положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: +20 Кв).

При проведении серии анализов цефоперазона, промывка капилляра осуществлялась путём последовательного повторения разработанных схем (полной и короткой).

2.2.2.4. Рабочий электролит

Ведущий электролит должен иметь такую концентрацию, при которой электрическое сопротивление раствора в капилляре будет достаточно велико.

В зависимости от концентрации электролитов в растворе пробы поведение компонентов при разделении может несколько различаться. Если электропроводности ведущего электролита и пробы одинаковы, то падение напряжения на всей длине капилляра равномерно, и компоненты пробы равномерно перемещаются каждый с присущей ему скоростью. В этом случае на выходе капилляра ширина пика будет приблизительно равна ширине зоны пробы. Следовательно, эффективное разделение может быть достигнуто при введении возможно меньшего объема пробы, но для обеспечения необходимой чувствительности концентрация определяемых компонентов в пробе должна быть, возможно, выше.

В качестве рабочего электролита был выбран буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 9,0. Буферный раствор Бриттона – Робинсона готовился путем смешивания уксусной, борной и орто-фосфорной кислот в определенных соотношениях [60]. При этом pH исходного раствора составляет 1,8, а достижение необходимого значения pH 9,0 проводилось путем добавления 0,2м раствора натрия гидроксида.

Выбор приведенного выше буферного раствора обусловлен тем, что цефоперазон обладает кислотными свойствами за счет фенольного гидроксила, следовательно, в щелочной среде он будет находиться в ионизированном состоянии.

2.2.2.5. Растворитель пробы

При анализе цефоперазона осуществляли концентрирование пробы на приборе в начальной стадии электрофоретического анализа. Для этого нами применялся метод «прямого стекинга». Этот метод основан на том, что проба вводится в капилляр в буферном растворе, имеющем электропроводность в 10 раз меньше, чем рабочий электролит (за счет понижения ионной силы). В таком растворителе как электрофоретическая, так и электроосмотическая подвижность увеличивается, и зона анализируемого вещества сужается.

Применение стекинга в процессе анализа пробы (растворитель пробы – РЭ, разбавленный в 10 раз водой), позволило сконцентрировать исследуемое вещество в процессе электрофореза непосредственно в капилляре и в значительной степени повысить эффективность электрофоретического исследования (таблица 2.1., рисунок 2.3.).

Таблица 2.1 – Эффективность электрофоретического исследования цефоперазона (20 мкг/мл) в зависимости от кратности разбавления РП водой очищенной

№ п/п	Кратность разведения РП	Цефоперазона в пробе, мкг/мл	Ширина пика на половине высоты, сек.	Высота пика, mAU	Площадь пика, mAU×сек	Эффективность (N) ТТ
1	0	20	0,20	1,25	152,40	8080
2	2	20	0,11	2,31	150,30	29793
3	3	20	0,07	3,15	151,00	62890
4	4	20	0,06	3,61	143,20	79665
5	5	20	0,06	3,93	146,20	99162
6	6	20	0,06	3,99	157,40	105591
7	7	20	0,06	3,93	160,60	103896
8	8	20	0,06	4,10	155,20	118630
9	9	20	0,05	4,70	144,30	129498
10	10	20	0,04	4,72	144,20	140328

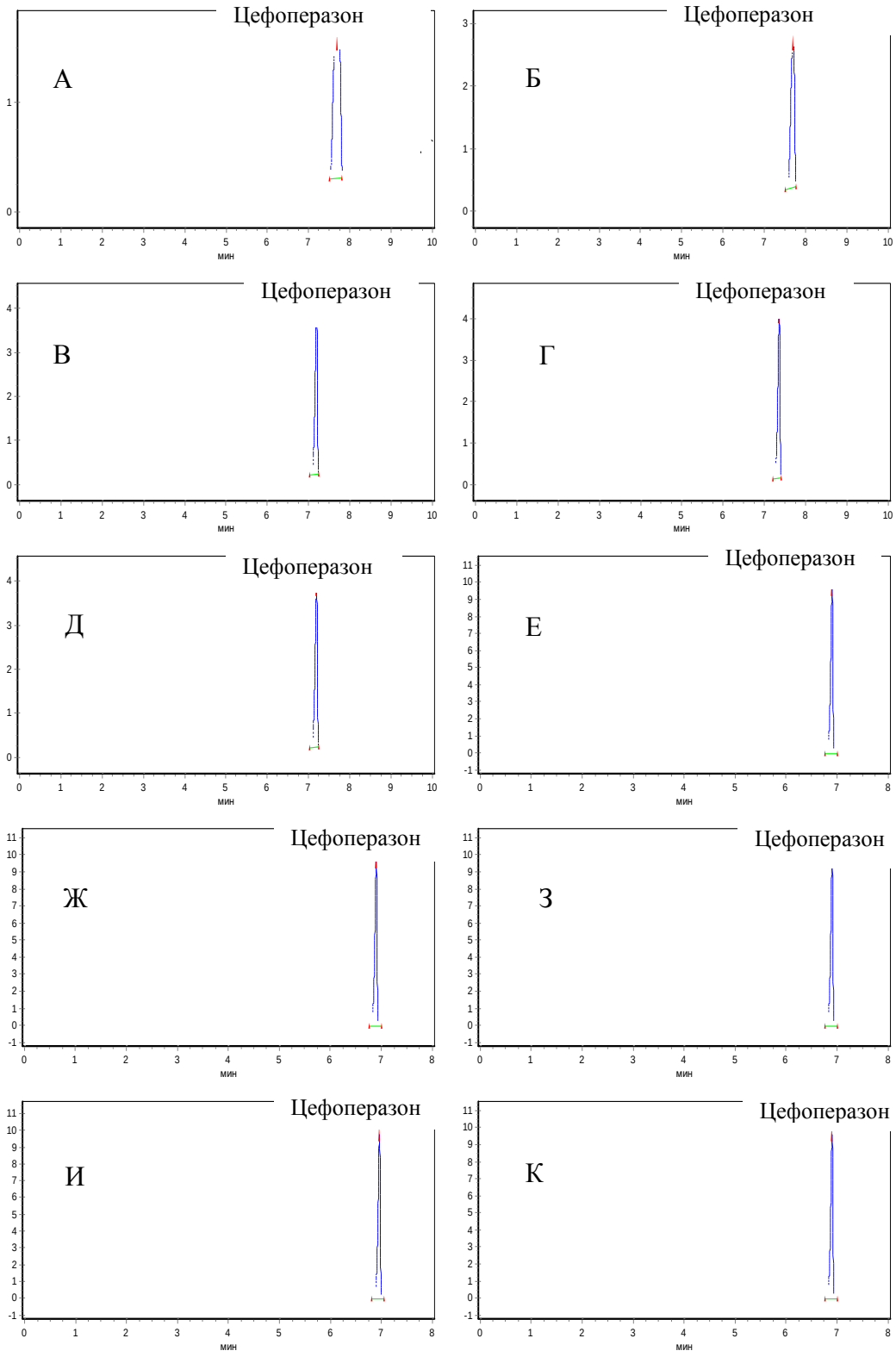


Рисунок 2.3 – ЭФГ цефоперазона (20 мкг/мл) в зависимости от кратности разбавления РП водой: без разбавления (А), 2-х кратное разбавление (Б), 3-х кратное разбавление (В), 4-х кратное разбавление (Г), 5-ти кратное разбавление (Д), 6-ти кратное разбавление (Е), 7-ми кратное разбавление (Ж),

8-ми кратное разбавление (З), 9-ти кратное разбавление (И), 10-ти кратное разбавление (К)

2.2.2.6. Изучение УФ – спектра цефоперазона

Выбирая оптимальную длину волны поглощения, можно существенным образом повысить селективность и чувствительность определения. Поэтому для оптимизации электрофоретического анализа был изучен УФ – спектр раствора цефоперазона 0,001% концентрации в диапазоне 200 – 300 нм (20 мкг/мл). В качестве раствора сравнения использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0, разбавленный в 10 раз водой очищенной, а также буферный раствор, состоящий из смеси 0,02М раствора фосфорной кислоты и 0,02М раствора натрия гидроксида pH 9,0, разбавленный водой очищенной в 10 раз.

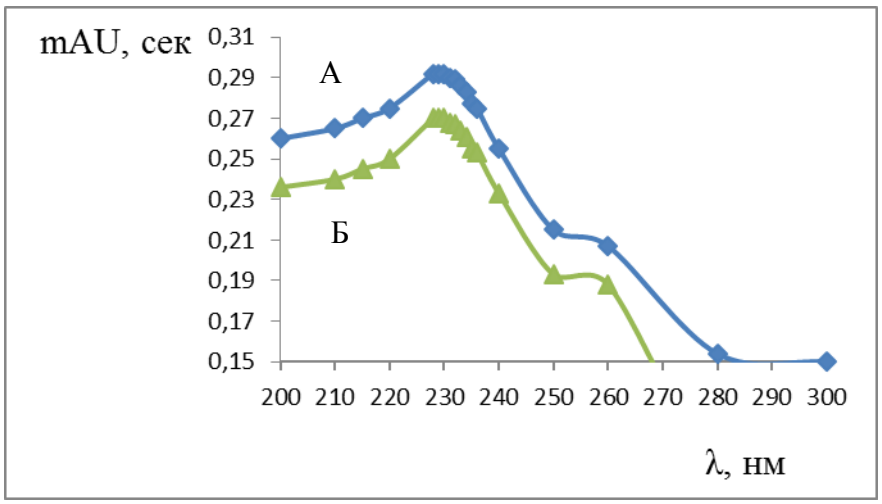


Рисунок 2.4 - УФ спектр 0,001% раствора цефоперазона: растворитель пробы – буферный раствор Бриттона – Робинсона pH 9,0, разбавленный в10 раз водой очищенной (А); Смесь 0,02 М раствора фосфорной кислоты и 0,02 М раствора натрия гидроксида pH 9,0,разбавленная в 10 раз водой очищенной (Б)

УФ-спектр снимали на приборе «Капель – 105М» в диапазоне 200 –300 нм.

Результаты измерений показывают, что при длине волны 230 нм в селективной области УФ – спектра, наблюдается наибольшая оптическая

плотность, поэтому длина волны 230 нм была использована при детектировании в дальнейших исследованиях цефоперазона методом капиллярного электрофореза.

Таблица 2.2 - Зависимость фотометрического сигнала от длины волны УФ – области спектра

Длина волны, нм	Оптическая плотность D ($\bar{x}$; n = 3)	
	Буферный раствор Бриттона-Робинсона pH 9,0, разбавленный водой очищенной в 10 раз	Смесь 0,02 М раствора фосфорной кислоты и 0,02 М раствора натрия гидроксида pH 9,0,разбавленная в 10 раз водой очищенной
200	0,260	0,236
210	0,265	0,240
215	0,270	0,245
220	0,275	0,250
228	0,292	0,270
229	0,292	0,270
230	0,292	0,270
231	0,290	0,268
232	0,289	0,267
233	0,286	0,264
234	0,283	0,261
235	0,277	0,255
236	0,275	0,253
240	0,255	0,233
250	0,215	0,193
260	0,207	0,188
280	0,154	0,098
300	0,150	0,090

2.2.3. Условия электрофоретического исследования цефоперазона методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»)

На основании проведённых исследований были разработаны следующие оптимальные условия электрофореза в системе капиллярного электрофореза «Капель - 105М»:

1. РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0.
2. РП – РЭ, разбавленный в 10 раз водой.
3. Ввод пробы – давлением (30 мбар × 15 сек).
4. Положительный электрод со стороны введения РЭ (+20 кВ).
5. Последовательная промывка капилляра между анализами по полной и короткой схемам (п. 2.2.2.3.1; 2.2.2.3.2).
6. Обработку ЭФГ осуществляли с помощью компьютерной программы «Эльфоран для Windows» 2012г.

2.3. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы MS Excel в соответствии с требованиями ГФ XI [24] . При статистической обработке оценивались следующие параметры:

- среднее выборки $(x_{cp}): x = \frac{\sum_{1}^{n} x_i}{n}$, где n – объём выборки, x_i – отдельные значения вариант;

- дисперсия $(s^2): s^2 = \frac{\sum_{1}^{n} x_i^2 - n x_{cp}^2}{f}$, где f – число независимых вариант $f = n - 1$;

- стандартное отклонение $(s): s = \sqrt{s^2}$;

- доверительный интервал $(\Delta x): \Delta x = \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}}$, где $t(P, f)$ - табличное значение критерия Стьюдента;

- относительная погрешность $(\varepsilon): \varepsilon = \frac{\Delta x}{x_{ср}} \cdot 100\%$.

Для решения вопроса о наличии или отсутствии систематической ошибки вычисляли критерий Стьюдента $(t): t = \frac{|\mu - x_{ср}| \cdot \sqrt{m}}{s}$, где μ - результат анализа образца с известным содержанием вещества. Если рассчитанный коэффициент Стьюдента был больше табличного значения, то полученные результаты содержат систематическую ошибку, относительная величина которой (δ) рассчитывается по формуле: $\delta = \frac{x_{ср} - \mu}{\mu} \cdot 100\%$.

Валидацию разработанных электрофоретических методик проводили в соответствии с нормативно-технической документацией: общей фармакопейной статьей в USP, ОФС РФ «Валидация фармакопейных методов», ГОСТ РФ «Точность (правильность и прецизионность методов и результатов измерений)», ГОСТ РИСО 5725-1-2002, IUPAK (Международный союз фундаментальной и прикладной химии), документы ICH – Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для человека в странах ЕС и США по основным параметрам: правильность (accuracy), прецизионность (precision), специфичность (specificity), предел обнаружения или чувствительности (detection limit), предел количественного определения (quantitation limit), линейность (linearity)[21, 22, 23, 24, 185, 186].

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ СКРИНИНГОВОГО ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦЕФОПЕРАЗОНА В ГРУППЕ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

При ненаправленном химико-токсикологическом анализе токсикантов в биологических образцах необходимо использование скрининговых аналитических программ.

В настоящее время при системном исследовании цефоперазона в группе близких по строению цефалоспориновых антибиотиков, возникает необходимость разработки методики скринингового обнаружения и идентификации исследуемого соединения в биологических объектах, позволяющей сократить время проведения экспертиз и обеспечивающей более эффективное решение химико-токсикологических задач.

Вызывает интерес, для решения данной задачи, применить планарный электромиграционный метод – электрофорез на бумаге, характеризующийся доступностью, высокой степенью очистки исследуемых соединений от со-экстрактивных веществ, сочетающийся с предварительным их обнаружением и идентификацией на электрофореграмме (ЭФГ).

При этом, на первом этапе электрофореза-скрининга (группового анализа), с использованием электрофореза на бумаге, произвести разделение совокупности ряда цефалоспориновых антибиотиков на электрофоретические группы по величинам длины пути фореза (ДПФ см – расстояние, пройденное веществом от линии старта, до переднего края детектируемой зоны на ЭФГ, выраженное в сантиметрах).

На втором этапе электрофореза – скрининга (внутригрупповой идентификации соединений) необходимо использовать более селективные тесты: электрофоретические спектры (ЭФС – графические зависимости величины

ДПФ см от pH электролита), а также их количественные характеристики: $ДПФ_{мин}$, $ДПФ_{макс}$, P_i (proportio intern – внутренний коэффициент). При этом, расчёт P_i исследуемых соединений, осуществляется путём нахождения кратного отношения величины $ДПФ_{мин}$ к величине $ДПФ_{макс}$ увеличенное в 10 раз:

$$P_i = \frac{ДПФмин}{ДПФмакс} \times 10$$

Существенное влияние на электрофоретическую подвижность аналита, помимо внутреннего строения вещества, оказывает и ряд внешних факторов. К наиболее важным из них относят: pH и температура электролита, напряжение, природа извлекателей и биологического материала.

С целью обоснования и разработки методики электрофореза - скрининга цефоперазона в группе представителей цефалоспориновых антибиотиков нами были проведены следующие исследования.

3.1. Условия предварительного (скринингового) обнаружения цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге

3.1.1. Прибор и режим работы

Использовали прибор ПВЭФ-1 с камерой для горизонтального электрофореза без охлаждения полос бумаги. Электрофорез проводили при напряжении 400 В в течение 1 ч.

3.1.2. Носитель

При электрофорезе в качестве носителя была использована бумага марки «С» средней впитываемости. Скорость впитывания воды составляет за 10 мин - 70±5 мм.

3.1.3. Электролиты

В качестве электролитов использовали: буферный раствор Бриттона-Робинсона со значением pH 1,8. Буферный раствор (pH 1,8) готовили смешиванием равных объёмов 0,04 М растворов фосфорной, уксусной и борной кислот [60]. При значении pH электролита 1,8, наблюдается наибольшая наблюдаемая положительная электрофоретическая подвижность (ДПФ см) всех исследуемых антибиотиков.

3.1.4. Изучение чувствительности проявления зон цефалоспориновых антибиотиков на электрофореграмме

Для изучения чувствительности проявления зон цефалоспорииновых антибиотиков на линию старта полосы хроматографической бумаги марки «С» размером 15×27 см микродозатором «Biohit» наносили методом наслаивания (по 1 мкл) различные аликвоты 0,1% стандартных растворов антибиотиков. Линию старта располагали в камере для электрофореза вблизи отрицательно заряженного электрода. В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 1,8. Электрофорез проводили на приборе «ПВЭФ–1», в течение 60 минут при напряжении 400 В. Детекцию зон исследуемого соединения осуществляли в УФ – свете и в парах йода. Результаты исследования приведены в таблице 3.1

Таблица 3.1 - Чувствительность обнаружения цефалоспориновых антибиотиков на электрофореграммах (ЭФГ)

№ п/п	Соединение	Открываемый минимум на ЭФГ, мкг/проба ($\bar{x}$; n = 3)	
		УФ - свет	Пары йода
1	Цефоперазон	12,0	1,0
2	Цефтриаксон	12,0	1,0
3	Цефотаксим	12,0	2,0
4	Цефазолин	14,0	3,0

Примечание: исследования проводили в трёх повторностях.

Результаты исследования показали, что чувствительность обнаружения цефалоспориновых антибиотиков на ЭФГ значительно выше при использовании паров йода (для цефоперазона – 1 мкг в пробе).

3.1.5. Предварительное (групповое) обнаружение цефоперазона в присутствии антибиотиков цефалоспоринового ряда методом электрофореза на бумаге

С целью изучения групповой разделительной способности электролита, проводили электрофоретическое исследование цефоперазона, цефтриаксона, цефотаксима и цефазолина методом электрофореза на бумаге.

На линию старта полосы хроматографической бумаги марки «С» размером 15×27 см микродозатором методом наслаивания наносили аликвоты стандартных растворов цефалоспориновых антибиотиков, содержащих по 30 мкг вещества в пробе. Линию старта располагали на середине полосы расстояние между точками нанесения составляло 2 см. Электрофорез проводили при напряжении 400 В, в течении 60 минут.

В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 1,8. Детекцию исследуемых веществ осуществляли парами йода. На ЭФГ рассчитывали наблюдаемые электрофоретические подвижности исследуемых соединений, ДПФ см.

Проверку однородности полученных выборок проводили по Q (5;95%) критерию. Определяли доверительный интервал по критерию Стъюдента P (4;95%). Средние арифметические значения ДПФ см цефалоспориновых антибиотиков и их доверительные интервалы использовали для расположения в соответствующие электрофоретические группы, диапазон которых составил 2 см. Граничные величины ДПФ см относили к соответствующей электрофоретической группе с учётом их доверительных интервалов (таблица 3.2.).

Таблица 3.2 - Электрофоретические группы цефалоспориновых антибиотиков (ЦФА) – стандартов. Электролит – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 1,8

Антибиотик, 30 мкг/проба	ДПФ см ($\overline{X} \pm \Delta X$)	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)

Примечание: электрофоретическое исследование проводили в пяти повторностях.

Таким образом, результаты предварительного обнаружения ЦФА – стандартов (цефоперазона, цефтриаксона, цефотаксима, цефазолина) методом электрофореза – скрининга показали, что наблюдаемые электрофоретические подвижности исследуемых соединений характеризуются достаточно широким диапазоном величин ДПФ см, что позволило выделить (с интервалом 2 см) три электрофоретические группы (электролит – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 1,8). Цефоперазон располагается в третьей электрофоретической группе.

3.2. Внутригрупповая идентификация цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге с помощью электрофоретических спектров (ЭФС)

Количество вещества в пробах и присутствие в них соэкстрактивных веществ оказывает влияние на форму и величину зоны на ЭФГ. При наличии значительных количеств примесей отмечается образование зон аномальной формы, «хвостов» и может привести к задержке идентифицируемого вещества на линии старта, уменьшению скорости его миграции, по сравнению с таковой метчика. Поэтому даже на одной и той же ЭФГ может наблюдаться значительное варьирование величин электрофоретической подвижности, что и является причиной затруднения идентификации путём сравнения локализации зон идентифицируемых веществ и метчиков по ДПФ см.

Если допустить, что скорость миграции на всех участках пути одинакова, несмотря на влияние различных факторов, то ДПФ см будет пропорциональна времени, прошедшему с начала миграции вещества с линии старта до окончания электрофореза. Исходя из этого, было предложено устанавливать наблюдаемую электрофоретическую подвижность по «внутреннему коэффициенту» - P_i – (proportio intern) Величина P_i находится как частное соотношение данного значения ДПФ см к большему его значению $ДПФ_{макс}$, установленному исследованием одной и той же пробы при различных значениях pH электролита, увеличенное в 10 раз.

При незначительном количестве анализируемого образца и с целью увеличения экспрессности методики электрофоретического исследования, для вычисления величины P_i достаточно провести электрофорез при двух значениях pH электролита, одно из которых - не менее 2,3.

В связи с изложенным выше, была поставлена задача по установлению возможности внутригрупповой ЭФС – идентификации на втором этапе электрофореза – скрининга ряда антибиотиков, относящихся как к одним, так

и к разным электрофоретическим группам (ЭГ): цефазолин (первая ЭГ), цефтриаксон, цефотаксим (вторая ЭГ), цефоперазон (третья ЭГ).

Также, вызывает интерес изучение возможности идентификации антибиотиков (в том числе и цефоперазона) по количественным характеристикам ЭФС: $ДПФ_{макс}$, $ДПФ_{мин}$, P_i. При этом расчёт P_i исследуемых антибиотиков предлагается осуществлять путём нахождения кратного отношения величины $ДПФ_{мин}$ к величине $ДПФ_{макс}$, увеличенное в 10 раз:

$$P_i = \frac{ДПФмин}{ДПФмакс} \times 10$$

С этой целью, на линию старта хроматографической бумаги марки «С» (15×27 см) микродозатором наносили аликвоты исследуемых растворов антибиотиков, содержащих по 30 мкг вещества в пробах, и проводили электрофорез в приборе ПВЭФ – 1 в описанных выше условиях (п. 3.1.5.)

В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона - Робинсона с величинами pH: 1,8; 2,3; 4,0; 6,0; 8,0. Проверку однородности полученных выборок величин ДПФ см антибиотиков при всех значениях pH электролита проводили по Q (5; 95%)критерию. Определяли доверительный интервал по критерию Стьюдента P (4; 95). Средние арифметические значения величин ДПФ см антибиотиков (таблица 3.3.) использовали для построения ЭФС (рисунок 3.1.).

Таблица 3.3 – ДПФ см антибиотиков в зависимости от pH электролита

Антибиотик, 30 мкг/проба	ЭГ	ДПФ см ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$); n = 5				
		pH электролита				
		1,8	2,3	4,0	6,0	8,0
Цефазолин	1	3,53±0,07	3,73±0,12	4,60±0,07	2,78±0,07	-5,97±0,07
Цефтриаксон Цефотаксим	2	5,43±0,12 6,0±0,12	4,07±0,07 5,30±0,12	2,40±0,12 2,17±0,07	2,07±0,07 2,63±0,07	-6,90±0,12 -6,0±0,12
Цефоперазон	3	6,77±0,07	4,40±0,12	2,23±0,07	2,15±0,07	-5,57±0,07

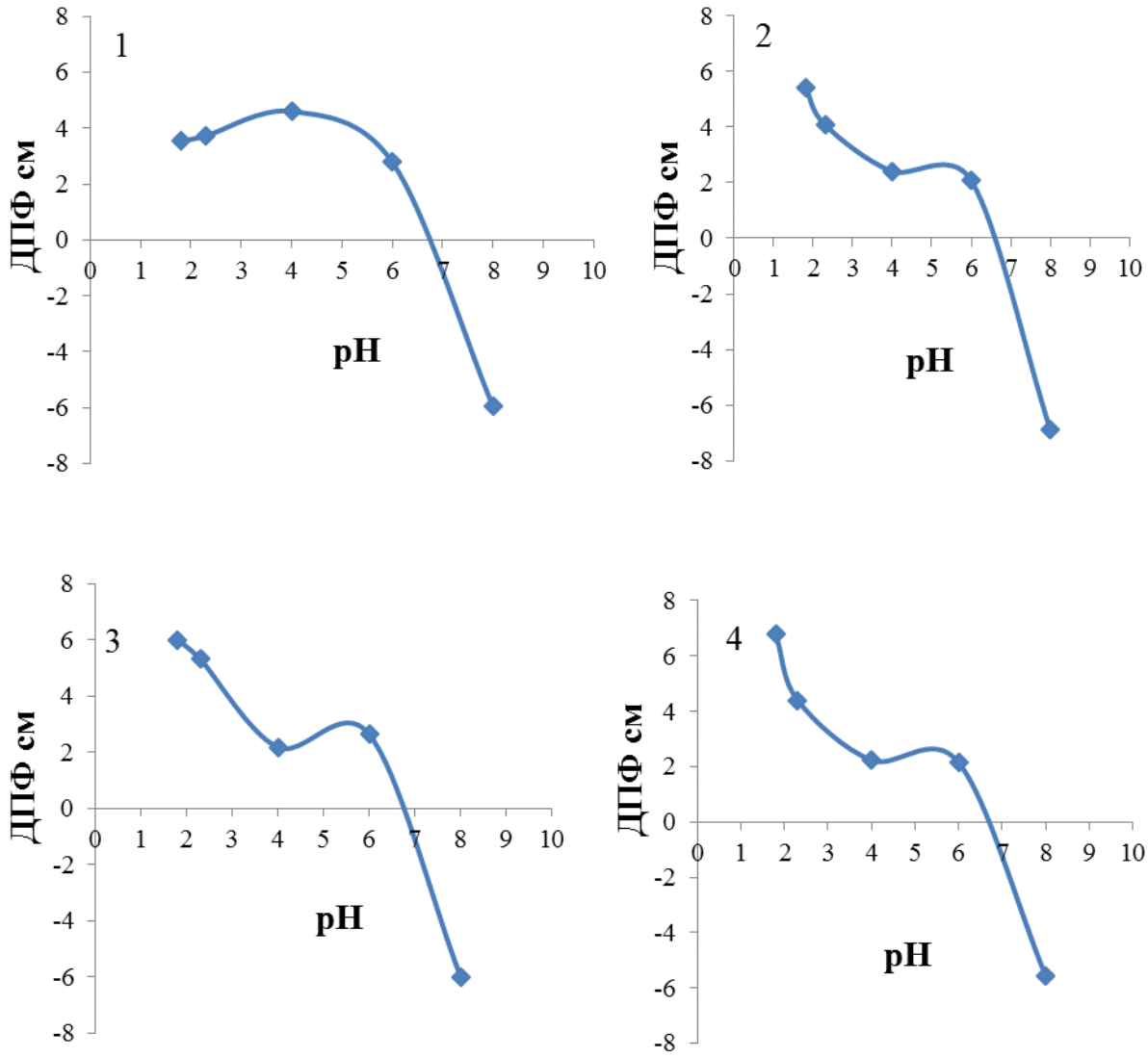


Рисунок 3.1 – ЭФС по ДПФ см антибиотиков (стандартов):
цефазолина (1), цефтриаксона (2), цефотаксима (3), цефоперазона (4)

Исследования показали, что профили ЭФС антибиотиков, (как внутри, так и в составе других электрофоретических групп) различны, не совпадают по форме и высоте. При этом надёжность внутригрупповой ЭФС - идентификации значительно повышается с введением их количественных характеристик (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – 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 (pH 2,3)	2,78±0,07 (pH 6,0)	1,65±0,07
Цефтриаксон	2	5,43±0,12 (pH 1,8)	2,07±0,07 (pH 6,0)	2,63±0,12
Цефотаксим		6,00±0,12 (pH 1,8)	2,17±0,07 (pH 6,0)	2,28±0,08
Цефоперазон	3	6,77±0,07 (pH 1,8)	2,15±0,07 (pH 6,0)	3,12±0,07

Полученные результаты по разработке условий электрофореза - скрининга антибиотиков стандартов позволили сделать следующие выводы:

1. Разработаны оптимальные условия предварительного этапа электрофореза – скрининга ряда цефалоспориновых антибиотиков с использованием электрофореза на бумаге («ПВЭФ–1»). Установлено, что универсальным и эффективным электролитом является буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,8. Что позволило выделить в максимально широком диапазоне ДПФ см 3 электрофоретические группы. При этом наблюдается в целом, равномерное распределение значений ДПФ см по электрофоретическим группам.

2. Предложенная методика внутригрупповой ЭФС – идентификации антибиотиков на втором этапе электрофореза – скрининга («ПВЭФ–1», 400 В, 1 час, электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона с pH: 1,8; 2,3; 4,0; 6,0; 8,0) показала, что профили ЭФС исследуемых соединений (как внутри, так и в составе других электрофоретических групп) различны, не совпадают по форме и высоте, и могут быть использованы для идентификации антибиотиков (в том числе и цефоперазона) после группового разделения их электрофорезом на бумаге.

3. Надёжность ЭФС – идентификации исследуемых антибиотиков значительно увеличивается с использованием их количественных характеристик

($ДПФ_{макс}$, $ДПФ_{мин}$, P_i) и позволяет получить дополнительную индивидуальную информацию о наблюдаемой электрофоретической подвижности соединений в зависимости от pH электролита.

Таким образом, впервые разработана скрининговая аналитическая программа ряда цефалоспориновых антибиотиков на базе электрофореза на бумаге («ПВЭФ – 1»), характеризующаяся доступностью в приборном отношении, универсальностью электролита (буферный раствор Бриттона - Робинсона, pH 1,8 - 8,0) для группового обнаружения антибиотиков и внутригрупповой ЭФС – идентификацией. Чувствительность обнаружения исследуемых антибиотиков составила от 1,0 до 3,0 мкг вещества на ЭФГ.

3.3. Изучение влияния соэкстрактивных веществ в составе биологических объектов на условия скринингового обнаружения цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге

На электрофоретическую подвижность ионизированных частиц оказывает существенное влияние, помимо внутреннего строения аналита, также и ряд внешних факторов: pH и температура электролита, напряжение, природа экстрагента и характер биологического материала.

3.3.1. Электрофорез – скрининг антибиотиков в модельных биологических смесях

Для изучения возможности электрофореза-скрининга представителей группы цефалоспориновых антибиотиков (в том числе и цефоперазона) в присутствии веществ, соэкстрагируемых из биологических объектов (моча, ткани печени, почки), ставились опыты на модельных смесях.

Для исследования брали мочу лиц, не принимавших лекарственных средств в течение месяца, а также печень и почки людей, погибших от травм и подвергнутых судебно-медицинскому вскрытию.

При этом представляет интерес применение в качестве экстрагента соэкстрактивных веществ из тканей печени, почек использовать водный раствор натрия гидроксида, pH 9,0, поскольку в этих условиях планируется проводить экстрагирование цефоперазона, обладающего амфотерными свойствами (содержит свободную карбоксильную группу в структуре молекулы).

3.3.1.1. Исследование мочи

Исследование мочи осуществляли по следующей методике:

В центрифужный стакан вносили 5 мл мочи, добавляли 20 мл буферного раствора Бриттона-Робинсона, pH 2,0, и проводили экстрагирование (5мл×2) системой органических растворителей (хлороформ – изобутанол, 3:1). Смесь встряхивали в течение 10 минут.

Образовавшуюся эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин) в течение 10 минут. Хлороформный слой отделяли с помощью делительной воронки через бумажный складчатый фильтр, предварительно смоченный системой органических растворителей, затем добавляли 5мл буферного раствора Бриттона-Робинсона, pH 9,0 и проводили реэкстракцию в течение 10 минут (5мл×2). Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Реэкстракт отделяли с помощью делительной воронки через бумажный складчатый фильтр, предварительно смоченный буферным раствором Бриттона-Робинсона, pH 9,0, в пробирку на 10 мл.

Реэкстракт использовали для приготовления модельной биологической смеси.

3.3.1.2. Исследование ткани биологического материала (печени, почки)

Исследование ткани печени (почки) проводили по следующей методике: в центрифужный стакан вносили 5,0 г измельчённой ткани печени (почки), добавляли 45 мл водного раствора натрия гидроксида, pH 9,0 и оставляли при комнатной температуре в защищённом от света месте (при периодическом перемешивании) на 30 минут.

Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Надосадочную жидкость отделяли в стеклянный флакон, ёмкостью 100 мл, доводили уровень pH до 2,0 путём добавления по каплям концентрированной хлороводородной кислоты. Затем проводили экстрагирование (5мл×2) системой растворителей (хлороформ – изобутанол, 3:1).

Органический слой отделяли через бумажный складчатый фильтр и подвергали реэкстрагированию буферным раствором Бриттона-Робинсона pH 9,0 (5мл×2). Реэкстракт отделяли и использовали для приготовления модельной смеси и последующего электрофоретического анализа.

3.3.1.3. Приготовление модельной биологической смеси

К 1 мл 10% стандартных растворов цефалоспориновых антибиотиков добавляли реэкстракты, полученные после исследования мочи, печени и почки, до общего объёма 10 мл.

3.3.1.4. Предварительное (групповое) обнаружение ряда цефалоспориновых антибиотиков в составе модельных биологических смесей методом электрофореза на бумаге

Предварительное обнаружение (первый этап) антибиотиков в составе модельных биологических смесей, проводили в соответствии с описанными

выше этапами электрофореза – скрининга антибиотиков стандартов (п. 3.1.). С этой целью, на линию старта хроматографической бумаги марки «С» (15×27 см) расположенную на расстоянии 6 см от анодного конца, наносили микродозатором, методом наслаивания (по 1 мкл) аликвоты: исследуемых модельных смесей антибиотиков и стандартные растворы свидетелей (цефазолина, цефтриаксона, цефотаксима, цефоперазона), содержащих по 30 мкг соответствующего вещества в пробах. Расстояния между точками нанесения составляли не менее 2 см. Каждую новую порцию раствора наносили после испарения предыдущей. Электрофорез проводили при напряжении 400 В в течении 1 ч в приборе «ПВЭФ – 1». В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,8. Высушенные ЭФГ обрабатывали парами йода. На ЭФГ рассчитывали величины ДПФ см исследуемых антибиотиков в составе модельных биологических смесей. Проверку однородности полученных выборок проводили по Q (5; 95%) критерию. Определяли доверительный интервал по критерию Стьюдента P (4; 95). Средние арифметические значения ДПФ см антибиотиков в составе модельных биологических смесей использовали для расположения в соответствующие электрофоретические группы (таблица 3.5).

Таблица 3.5 - 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

Результаты исследования показывают, что независимо от характера биологического материала, цефазолин располагается в 1-й, цефтриаксон и цефотаксим во 2-й, а цефоперазон в 3-й электрофоретических группах, что соответствует расположению исследуемых антибиотиков - стандартов при электрофорезе – скрининге в разработанных условиях.

3.3.1.5. Внутригрупповая ЭФС – идентификация (второй этап электрофореза – скрининга) антибиотиков в составе модельных биологических смесей методом электрофореза на бумаге

Внутригрупповую ЭФС – идентификацию (второй этап электрофореза – скрининга) антибиотиков в составе модельных биологических смесей методом электрофореза на бумаге проводили в соответствии с описанными выше этапами электрофореза – скрининга антибиотиков (стандартов) (п. 3.2.) С целью изучения возможностей ЭФС – идентификации ряда цефалоспориновых антибиотиков (в том числе и цефоперазона), в присутствии соэкстрактивных веществ, на втором этапе электрофореза – скрининга использовали модельные смеси, полученные после исследования мочи, печени, почки (п.п 3.3.1.1,3.3.1.2,3.3.1.3).

На линию старта хроматографической бумаги марки «С» (15×27 см), расположенную по середине полосы, наносили микродозатором, методом наслаивания (по 1 мкл) аликвоты модельных биологических смесей антибиотиков и стандартные растворы свидетелей (цефазолина, цефтриаксона, цефотаксима, цефоперазона), содержащих по 30 мкг соответствующего вещества в пробах. Расстояние между точками нанесения составляли не менее 2-х см. Электрофорез проводили под напряжением 400 В в течении 1 ч в приборе «ПВЭФ–1». В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона - Робинсона с величинами pH: 1,8; 2,3; 4,0; 6,0; 8,0. Высушенные ЭФГ обрабатывали парами йода.

На ЭФГ рассчитывали величины ДПФ см исследуемых антибиотиков в составе модельных биологических смесей. Проверку однородности полученных выборок осуществляли по Q (5; 95%) критерию. Доверительный интервал определяли по критерию Стьюдента P (4; 95). Средние арифметические значения ДПФ см антибиотиков в составе модельных биологических смесей, при соответствующих значениях pH электролита (таблица 3.6) использовали для построения электрофоретических спектров

антибиотиков (рисунок 3.2; 3.3; 3.4; 3.5) и расчёта на их основе количественных характеристик – внутренних коэффициентов (P_i).

Таблица 3.6 - ДПФ см цефалоспориновых антибиотиков в составе модельных биологических смесей (МБС) в зависимости от pH электролита

pH электро-лита	ДПФ см ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$; n = 3)			
	Цефоперазон	Цефтриаксон	Цефотаксим	Цефазолин
	МБС – моча			
1,8	6,10±0,07	4,53±0,07	5,07±0,07	2,43±0,12
2,3	3,43±0,07	3,03±0,07	3,57±0,07	3,10±0,12
4,0	1,73±0,07	1,67±0,10	1,47±0,07	4,03±0,07
6,0	1,67±0,07	1,73±0,07	2,03±0,07	2,03±0,07
8,0	-4,97±0,07	-5,90±0,12	-4,0±0,12	-5,07±0,07
	МБС – печень			
1,8	6,07±0,07	4,63±0,07	5,0±0,12	2,37±0,07
2,3	3,63±0,07	3,23±0,12	3,63±0,12	3,23±0,07
4,0	1,73±0,07	1,83±0,07	1,47±0,07	4,20±0,12
6,0	1,67±0,07	1,73±0,07	2,13±0,07	2,37±0,07
8,0	-5,10±0,12	-5,90±0,12	-4,10±0,12	-5,70±0,07
	МБС – почка			
1,8	6,0±0,12	4,83±0,07	4,90±0,12	2,33±0,07
2,3	3,53±0,07	3,07±0,07	3,60±0,12	2,80±0,07
4,0	2,13±0,07	2,23±0,07	2,03±0,07	3,50±0,12
6,0	2,03±0,07	2,03±0,07	2,23±0,07	2,13±0,07
8,0	-4,80±0,12	-5,40±0,12	-4,0±0,12	-4,60±0,07

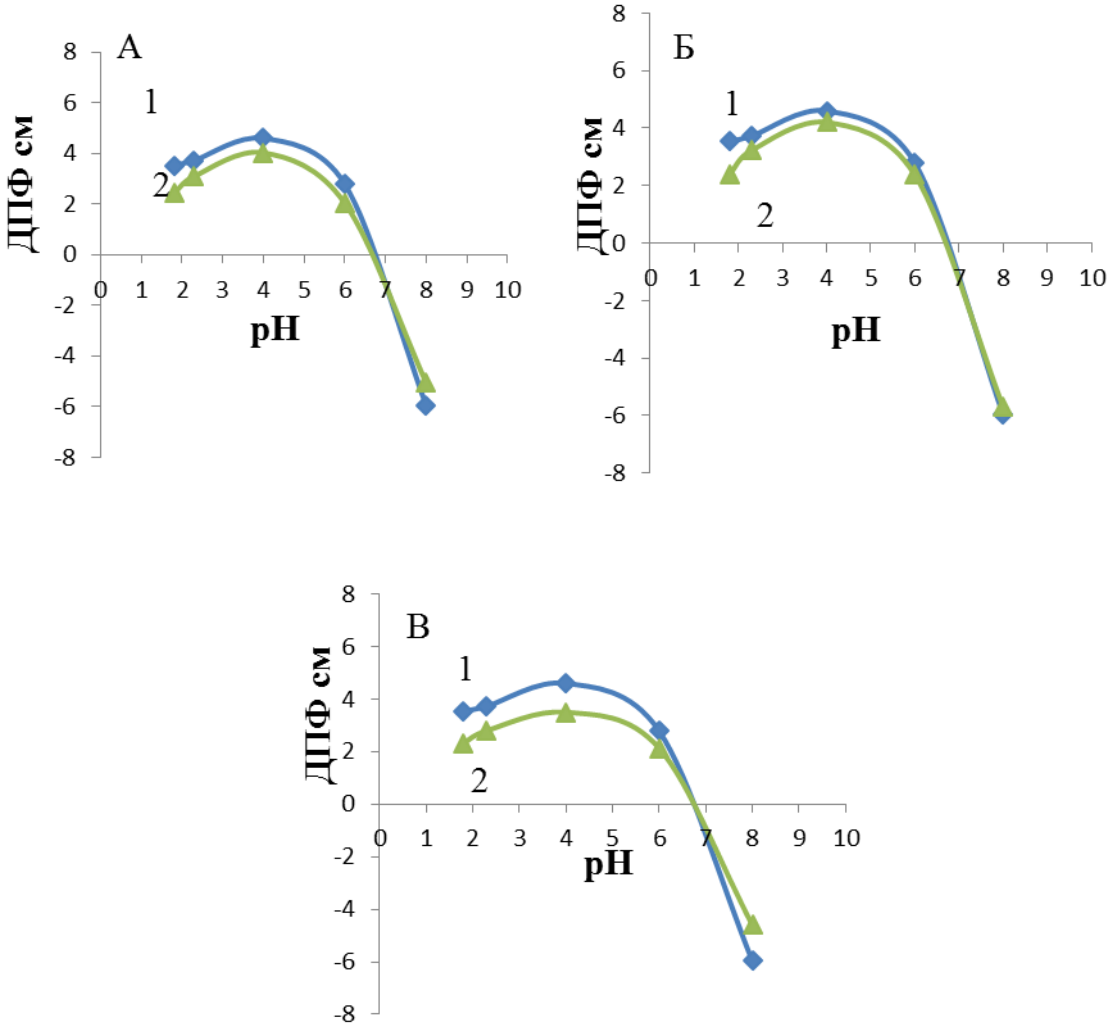


Рисунок 3.2 – ЭФС по ДПФ см цефазолина – стандарта (1) и цефазолина в составе МБС (2): мочи (А), печени (Б), почки (В)

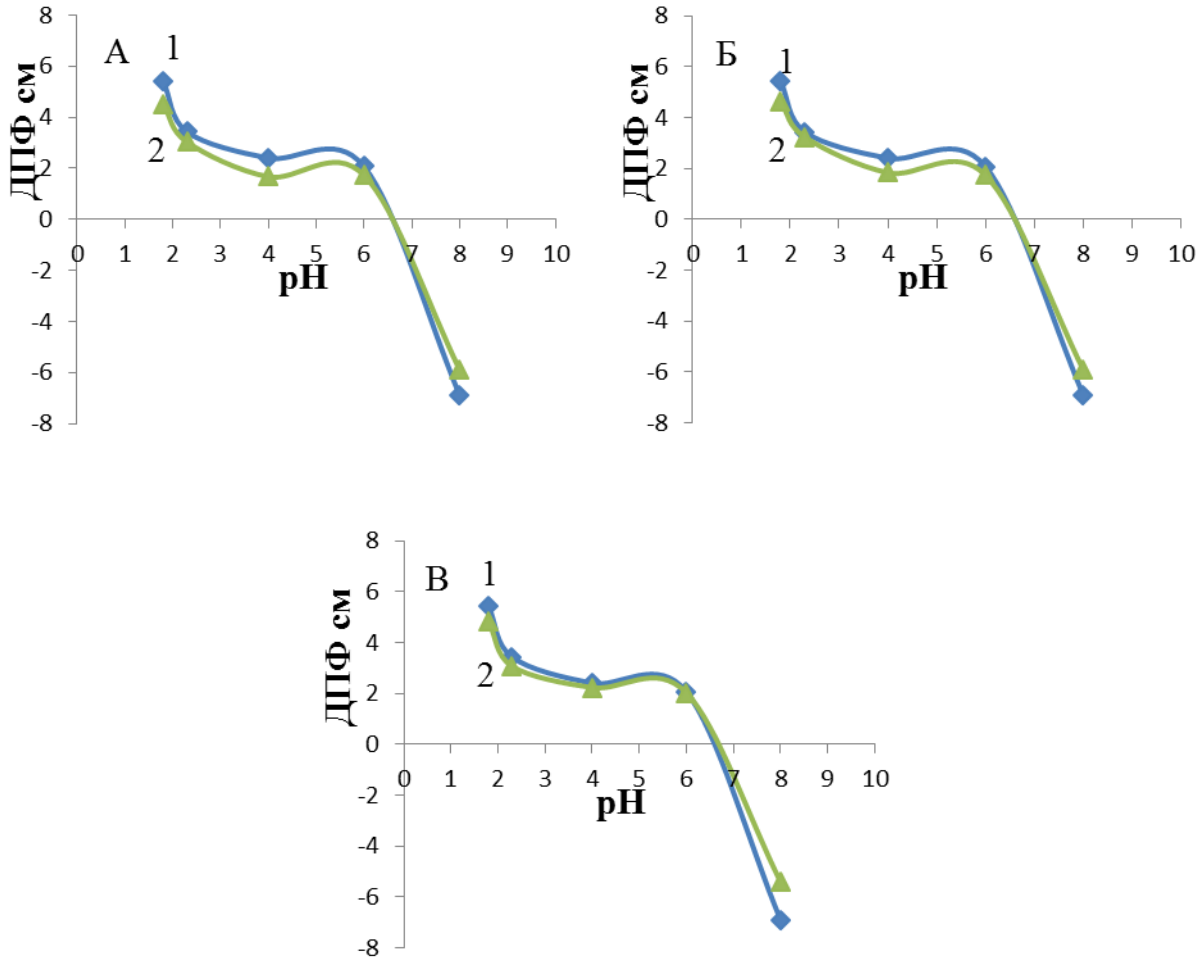


Рисунок 3.3 - ЭФС по ДПФ см цефтриаксона – стандарта (1) и цефтриаксона в составе МБС (2): мочи (А), печени (Б), почки (В)

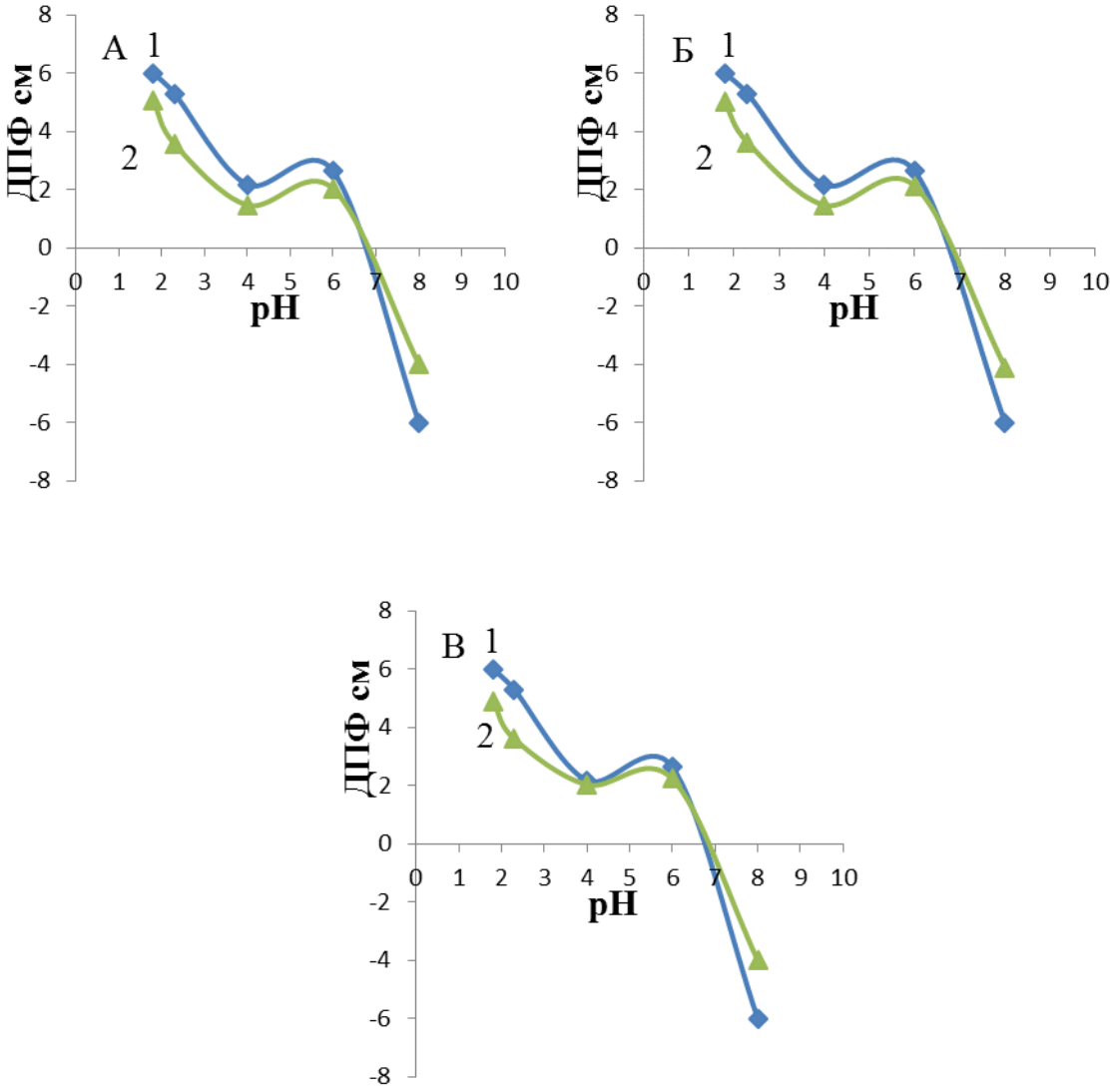


Рисунок 3.4 - ЭФС по ДПФ см цефотаксима – стандарта (1) и цефотаксима в составе МБС (2): мочи (А), печени (Б), почки (В)

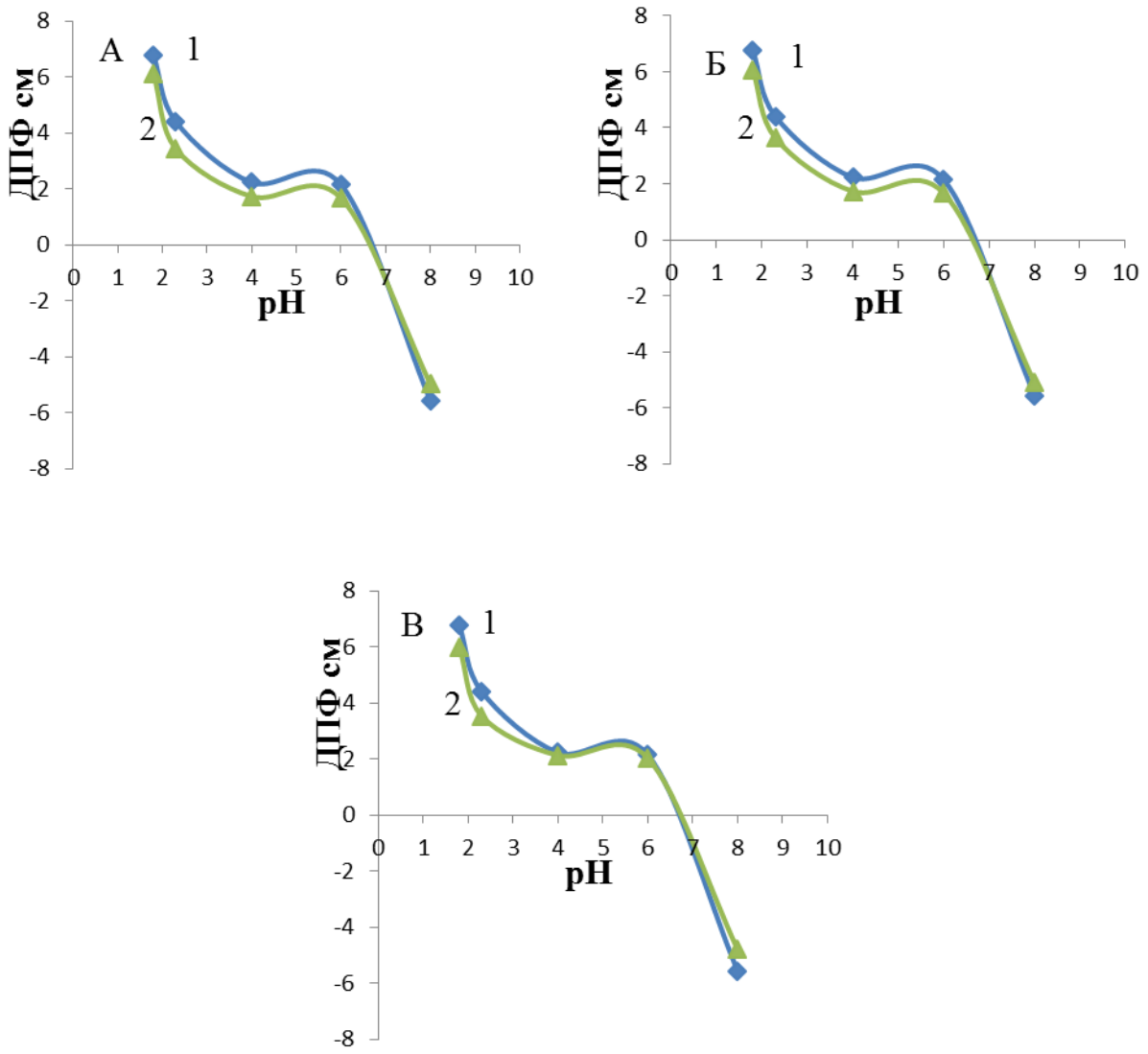


Рисунок 3.5 - ЭФС по ДПФ см цефоперазона – стандарта (1) и цефоперазона в составе МБС (2): мочи (А), печени (Б), почки (В)

Таблица 3.7 – Идентификация цефалоспориновых антибиотиков в составе модельной биологической смеси (почка) по ЭФС (количественные характеристики)

ЭФС по ДПФсм							
Цефазолин, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}; n=3)$		Цефтриаксон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}; n=3)$		Цефтриаксон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}; n=3)$		Цефоперазон, $P_i(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}; n=3)$	
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

Полученные результаты исследования показали, что конфигурации ЭФС по ДПФ см антибиотиков – стандартов и антибиотиков в составе модельных смесей (моча, печень, почка) аналогичны.

При этом величины внутренних коэффициентов (P_i) антибиотиков в составе модельных биологических смесей сопоставимы с соответствующими величинами антибиотиков стандартов. В качестве примера (таблица 3.7) показана ЭФС – идентификация по количественным характеристикам (P_i) исследуемых антибиотиков на примере модельной биологической смеси (почки): цефазолина, цефотаксима, цефтриаксона и цефоперазона.

Выводы по главе 3

Изучена возможность скринингового обнаружения и идентификации цефоперазона в группе антибиотиков цефалоспоринового ряда методом электрофореза на бумаге.

При этом:

1. Разработаны оптимальные условия предварительного этапа электрофореза-скрининга ряда цефалоспориновых антибиотиков – стандартов с использованием электрофореза на бумаге. Установлено, что универсальным, доступным, эффективным электролитом является буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 1,8. Цефоперазон располагается в третьей электрофоретической группе.

2. Подтверждающие исследования (на втором этапе электрофореза – скрининга) по профилям ЭФС и их количественным характеристикам (ДПФ макс., ДПФ мин., Pi) позволили надёжно осуществить идентификацию цефоперазона в присутствии цефтриаксона, цефотаксима, цефазолина.

3. Предложенные этапы электрофореза – скрининга цефалоспориновых антибиотиков – стандартов успешно использованы при анализе исследуемых соединений в составе модельных биологических смесей на предварительном этапе и ЭФС – идентификации (по P_i величинам). При этом показано, что электрофоретическая группа и профили ЭФС цефоперазона в составе модельных биологических смесей аналогичны электрофоретической группе и профилям цефоперазона – стандарта.

4. Разработанный способ доказательства цефоперазона методом электрофореза – скрининга может найти применение при ненаправленном химико-токсикологическом (судебно-химическом) анализе цефалоспориновых антибиотиков, а также в клинической лабораторной практике при проведении антибиотикотерапии.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕФОПЕРАЗОНА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

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

Одним из современных, высокоэффективных и селективных методов аналитической детекции лекарственных средств в биологических субстратах является капиллярный электрофорез. Метод позволяет сочетать в автоматическом режиме процессы разделения анализируемой пробы на ингредиенты, их идентификацию и количественное определение, при исследовании одной и той же пробы, с одновременным концентрированием соединения непосредственно в капилляре.

Нами проведено изучение возможности анализа цефоперазона капиллярным электрофорезом, с использованием отечественной системы «Капель – 105М» (производитель – ООО «Люмекс», г. Санкт-Петербург). При этом был выбран наиболее распространённый в аналитической практике вариант – капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и поставлена задача по изучению электрофоретических параметров цефоперазона в виде отрицательно заряженного аналита (анионной формы).

4.1. Изучение основных электрофоретических параметров цефоперазона

4.1.1. Влияние природы и pH рабочего электролита (РЭ) на качественные параметры цефоперазона на ЭФГ

С целью подбора оптимального РЭ и значения его pH, при электрофорезе цефоперазона в анионной форме, нами проведены исследования с использованием в качестве РЭ: буферного раствора Бриттона – Робинсона со значением pH от 8.0 до 10.0 и смеси 20 мМ раствора фосфорной кислоты с 0,2 М раствором натрия гидроксида с теми же значениями pH.

Использовался стандартный раствор цефоперазона (10 мкг/мл.). Электрофорез антибиотика проводили на приборе «Капель – 105М», в условиях, описанных в главе 2. (п. 2.2.). На ЭФГ, с помощью программы «Эльфоран для Windows» 2012г, рассчитывали следующие электрофоретические параметры аналита: коэффициент асимметрии пика (Т), эффективность (N), время миграции (t_m), площадь пика (S).

Условия электрофоретического анализа считаются пригодными, если они удовлетворяют следующим критериям:

- Относительное стандартное отклонение площадей пиков вещества и времени миграции (RSD,%), рассчитанное по 5 ЭФГ раствора стандартного образца, составляет не более 5%;
- Эффективность электрофоретической системы составляет не менее 100000 «теоретических тарелок»;
- Коэффициент асимметрии пика не более 1,5.

Результаты исследования, приведённые в таблицах 4.1 и 4.2, показывают, что в наибольшей степени, условия удовлетворяют всем заявленным критериям приемлемости (по относительному стандартному отклонению площади пиков, времени миграции, эффективности электрофоретической

системы и коэффициенту асимметрии пика цефоперазона на ЭФГ) при использовании в качестве рабочего электролита буферного раствора Бриттона – Робинсона со значением pH 9,0.

Таблица 4.1 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона

РЭ – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 8,0 ÷ 10,0

№п/п	Цефоперазон стандарт мкг/мл	Асиммет-рия пика (T)	Эффективность (N)	Время миграции (t_m)	Площадь пика (S)
1	2	3	4	5	6
РЭ – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 8,0					
1	10,0	0,4	153510	7,21	135,9
2	10,0	0,4	164506	7,18	134,9
3	10,0	0,4	154861	7,25	136,7
4	10,0	0,4	154292	7,23	136,8
5	10,0	0,5	153227	7,21	138,2
$\bar{x}$		0,42	156100	7,22	136,5
RSD,%		10,65	3,05	0,35	0,89
Рабочий электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 9,0					
1	10,0	0,4	156576	6,64	165,80
2	10,0	0,5	138051	6,67	172,00
3	10,0	0,5	153684	6,72	171,80
4	10,0	0,5	157189	6,71	172,40
5	10,0	0,5	149849	6,76	174,80
$\bar{x}$		0,48	151100	6,70	171,36
RSD,%		9,35	5,19	0,69	1,94
Рабочий электролит – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 10,0					
1	10,0	0,7	253240	9,20	106,00
2	10,0	0,7	262911	9,44	113,00
3	10,0	0,7	249251	9,55	107,10
4	10,0	0,7	283636	9,81	103,50
5	10 ,0	0,6	283539	9,80	99,38
$\bar{x}$		0,68	266520	9,56	105,8
RSD,%		6,58	6,14	2,69	4,73

Таблица 4.2 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона.

РЭ – смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 8,0 ÷ 10,0

№п/п	Цефоперазон стандарт мкг/мл	Асимметрия пика (T)	Эффективность (N)	Время миграции (t_m)	Площадь пика (S)
1	2	3	4	5	6
электролит – смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 8,0					
1	10,0	0,2	144794	4,85	85,50
2	10,0	0,4	108363	4,89	89,86
3	10,0	0,4	107887	4,65	84,99
4	10,0	0,3	120693	4,92	90,80
5	10,0	0,4	122126	4,70	86,89
$\bar{x}$		0,34	120800	4,80	87,61
RSD,%		26,31	12,41	2,50	2,97
Рабочий электролит – смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 9,0					
1	10,0	0,3	126504	4,53	83,96
2	10,0	0,3	130440	4,60	86,10
3	10,0	0,3	108126	4,43	82,45
4	10,0	0,3	107850	4,42	83,13
5	10,0	0,2	119374	4,65	88,17
$\bar{x}$		0,28	118500	4,53	84,76
RSD,%		15,97	8,74	2,25	2,77
Рабочий электролит – смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 10,0					
1	10,0	0,3	125614	4,77	85,66
2	10,0	0,3	113444	4,770	85,95
3	10,0	0,3	118172	4,86	87,47
4	10,0	0,4	114081	4,78	86,62
5	10,0	0,3	122087	4,95	91,61
$\bar{x}$		0,32	118700	4,83	87,46
RSD,%		13,98	4,39	1,64	2,77

4.1.2. Определение специфичности методики анализа цефоперазона методом капиллярного электрофореза

Под специфичностью методики понимают способность достоверно определять исследуемый аналит в присутствии других компонентов образца, других лекарственных веществ и примесей, включая потенциально возможные [70].

Специфичность электрофоретической методики определения цефоперазона изучали в присутствии близких по химическому строению антибиотиков цефалоспоринового ряда: цефуроксима и цефтриаксона. При этом специфичность предложенной методики подтверждается набором электрофореграмм:

а) растворов стандартных образцов антибиотиков (цефоперазона, цефуроксима и цефтриаксона отдельно по 10 мкг/мл);

б) испытуемых растворов в смеси антибиотиков с концентрацией 10 мкг/мл;

в) растворителя образца (РП).

Критерии приемлемости:

- Времена миграции (t_m) анализируемых стандартных образцов антибиотиков должны совпадать с таковыми величинами испытуемых растворов (смеси антибиотиков).
- На ЭФГ растворителя образца (РП) – не должны наблюдаться пики в диапазоне времени выхода пиков анализируемых веществ

Из представленных на рисунке ЭФГ (4.1) видно, что время миграции нейтральных компонентов не совпадает со временем выхода анализируемых веществ. Помимо этого, времена миграции (t_m) анализируемых компонентов на ЭФГ в составе стандартных образцов, соответствуют таковым в составе смеси антибиотиков.

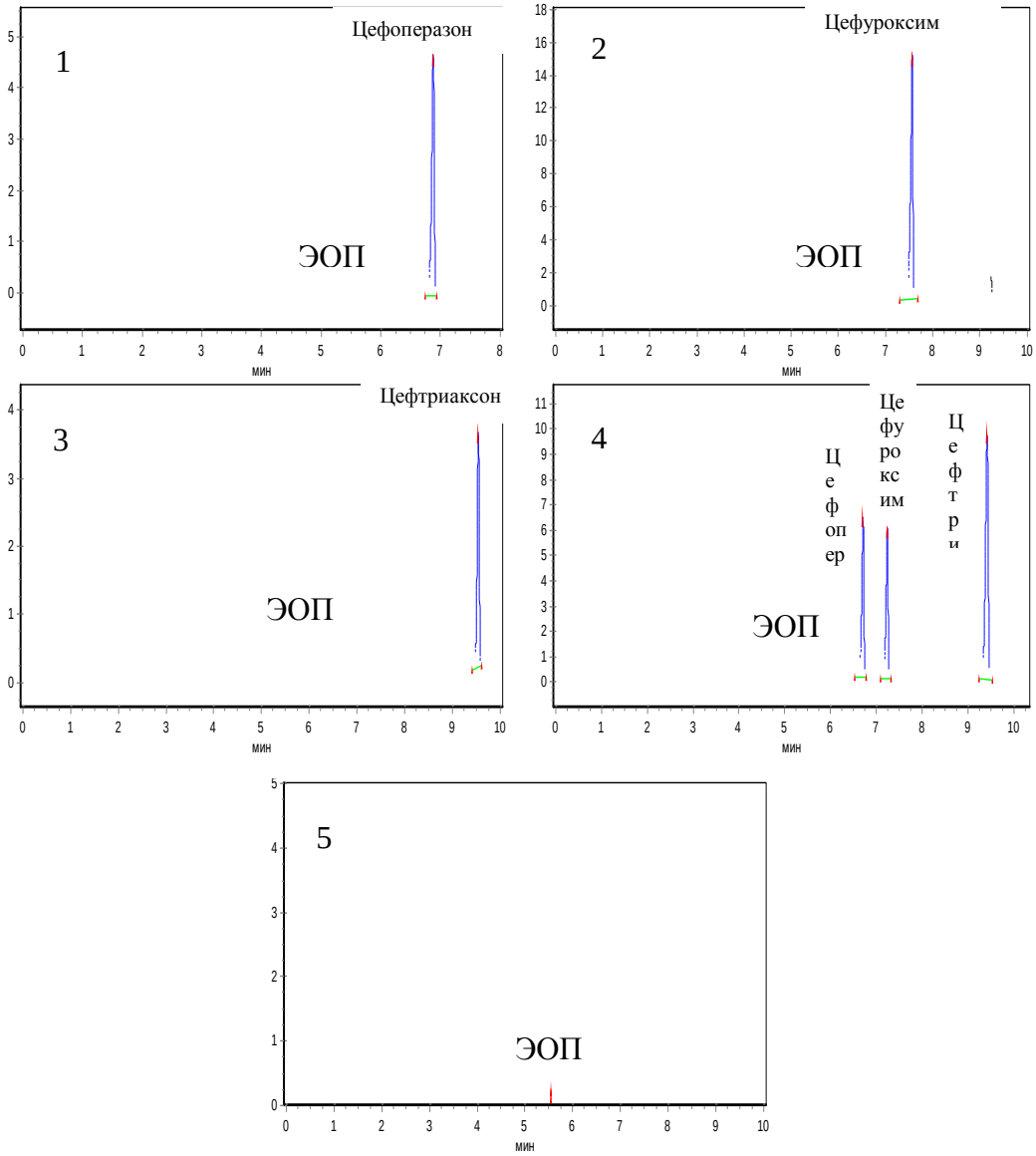


Рисунок 4.1 - ЭФГ стандартных растворов антибиотиков цефалоспоринового ряда: цефоперазон, 10 мкг/мл (1); цефуроксим, 10 мкг/мл (2); цефтриаксон, 10 мкг/мл (3); смеси антибиотиков (4) по 10 мкг/мл и ЭФГ растворителя пробы – (5)

Значения величин (t_m) всех компонентов рабочих стандартных образцов, и в составе смеси антибиотиков, были статистически обработаны. Полученные результаты представлены в таблице 4.3

Таблица 4.3 - Результаты статистической обработки величин t_m цефоперазона, цефуроксима и цефтриаксона (стандартов) и в составе смеси антибиотиков

№п/п	Антибиотик стандарт, 10 мкг/мл	Метрологические характеристики	Смесь стандартов антибиотиков, по 10 мкг/мл	Метрологические характеристики
	t_m цефоперазона			
1.	6,65	$\bar{x}$ = 6,64 SD = 0,04 RSD,% = 0,60	6,64	$\bar{x}$ = 6,70 SD = 0,05 RSD,% = 0,69
2.	6,63		6,67	
3.	6,70		6,72	
4.	6,60		6,71	
5.	6,61		6,76	
	t_m цефуроксима			
1.	7,58	$\bar{x}$ = 7,51 SD = 0,06 RSD,% = 0,83	7,42	$\bar{x}$ = 7,38 SD = 0,04 RSD,% = 0,52
2.	7,43		7,36	
3.	7,46		7,32	
4.	7,52		7,38	
5.	7,55		7,40	
	t_m цефтриаксона			
1.	9,55	$\bar{x}$ = 9,57 SD = 0,04 RSD,% = 0,37	9,29	$\bar{x}$ = 9,40 SD = 0,09 RSD,% = 0,98
2.	9,59		9,34	
3.	9,52		9,43	
4.	9,61		9,42	
5.	9,56		9,53	

Полученные результаты показывают, что специфичность электрофоретической методики помимо сходимости величины t_m, также подтверждается разделительной способностью смеси цефалоспориновых антибиотиков (цефоперазон, цефуроксим, цефтриаксон).

Разрешение пика цефоперазона от пика нейтрального ЭОП, пика цефуроксима от пика цефоперазона, пика цефтриаксона от пика цефуроксима составляет значительно более 1,5, что соответствует валидационным критериям (таблица 4.4).

Таблица 4.4 - 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

Таким образом, можно сделать заключение, что методика специфична и может использоваться для определения цефоперазона в присутствии других, близких по химическому строению антибиотиков.

4.2. Количественное определение цефоперазона методом капиллярного электрофореза. Валидационная оценка

При разработке методики количественного определения цефоперазона основывались на изученных условиях, предложенных для его идентификации (п. 4.1). Электрофоретическая методика анализа цефоперазона разработана впервые, в соответствии с этим она была подвергнута валидационной оценке в соответствии с требованиями, предъявляемыми к методикам количественного анализа, не имеющим аналога [4, 25, 70, 237]. При этом, в соответствии с требованиями валидационной оценки, необходимо охарактеризовать методику по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, диапазон применения и предел количественного определения. Оценка специфичности – важного валидационного параметра, изучена и приводится выше (п. 4.1).

4.2.1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика 10 мг субстанции цефоперазона (точная навеска) растворяли в растворе Бриттона-Робинсона pH 9,0, разбавленном в 10 раз водой очищенной в мерной колбе объемом 100

мл и доводили объем колбы РП до метки. Для приготовления градуировочных растворов в ряд мерных колб объемом 100 мл вносили 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 мл 0,01% стандартного раствора цефоперазона в буферном растворе Бриттона-Робинсона pH 9,0, разбавленного в 10 раз водой очищенной и доводили объем колбы РП до метки. Электрофорез полученных растворов цефоперазона проводили в следующих условиях:

1. РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0.
2. РП – РЭ, разбавленный в 10 раз водой.
3. Ввод пробы – давлением (30 мбар х 15 сек).
4. Положительный электрод со стороны введения РЭ (+20 кВ).
5. Детектирование при длине волны 230 нм.
6. Последовательная промывка капилляра между анализами по полной и короткой схемам (п.2.2.2.3).

Запись и обработку полученных электрофореграмм (ЭФГ) (рисунок 4.2) осуществляли с помощью программного обеспечения Эльфоран для Windows.

Фотометрические сигналы (площади пиков) использовали для построения калибровочного графика (табл. 4.5; рисунок 4.3).

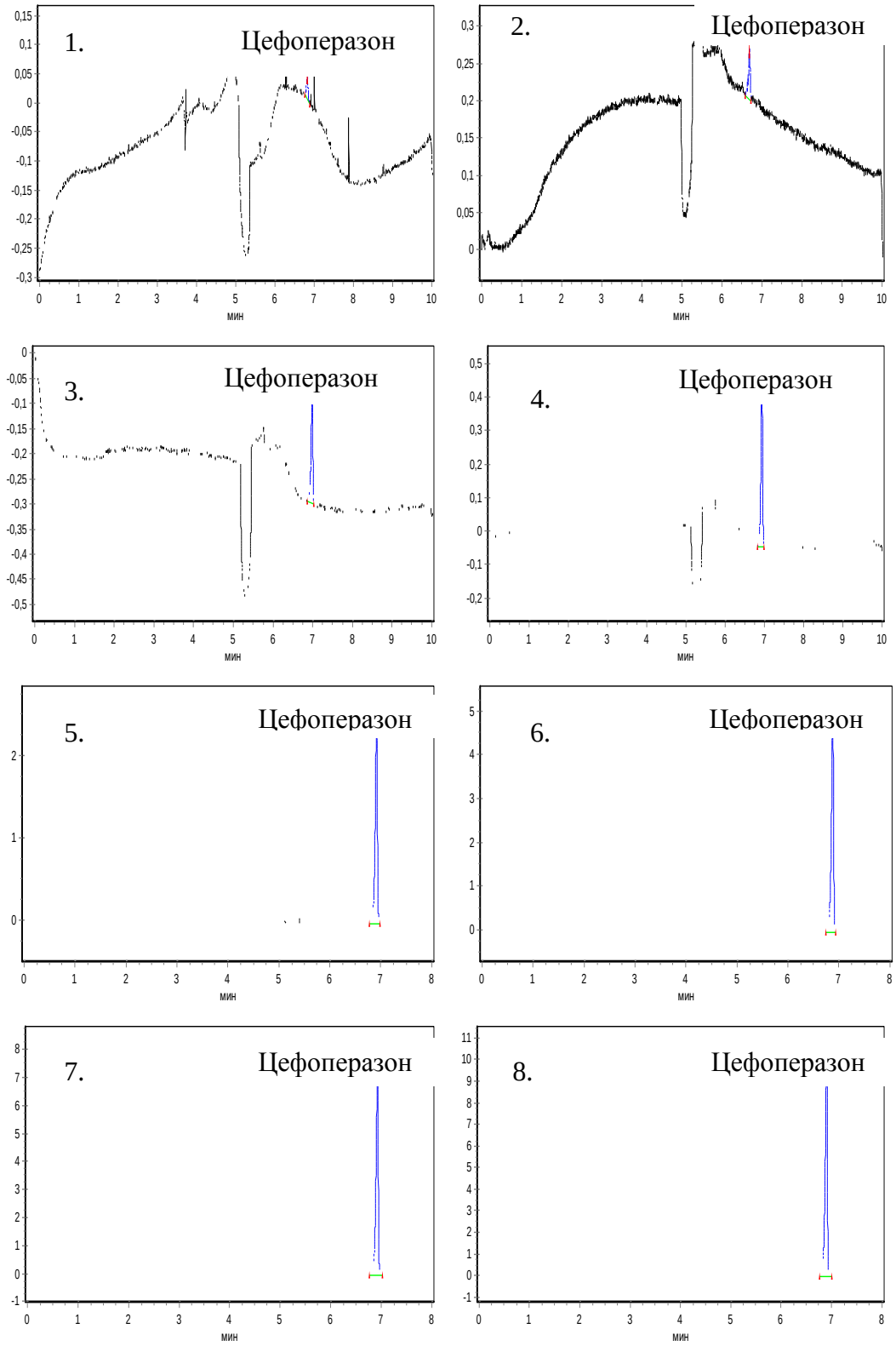


Рисунок 4.2 - ЭФГ цефоперазона с концентрацией: 0,05 мкг/мл (1); 0,1 мкг/мл (2); 0,5 мкг/мл (3); 1 мкг/мл (4); 5 мкг/мл (5); 10 мкг/мл (6); 15 мкг/мл (7); 20 мкг/мл (8) «Капель105М»

Таблица 4.5 - Зависимость величины фотометрического сигнала (площади пика) от концентрации цефоперазона («Капель 105М», РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0)

№ п/п	Цефоперазон, мкг/мл	mAU*сек$_1$	mAU*сек$_2$	mAU*сек$_3$	mAU*сек$_{ср}$
1	0,1	1,33	1,21	1,27	1,27
2	0,5	7,33	7,22	7,25	7,27
3	1,0	14,76	14,62	14,70	14,69
4	5,0	72,86	73,27	72,98	73,03
5	10,0	144,30	144,20	144,20	144,23
6	15,0	231,60	227,60	229,60	229,60
7	20,0	300,30	301,80	300,90	301,00

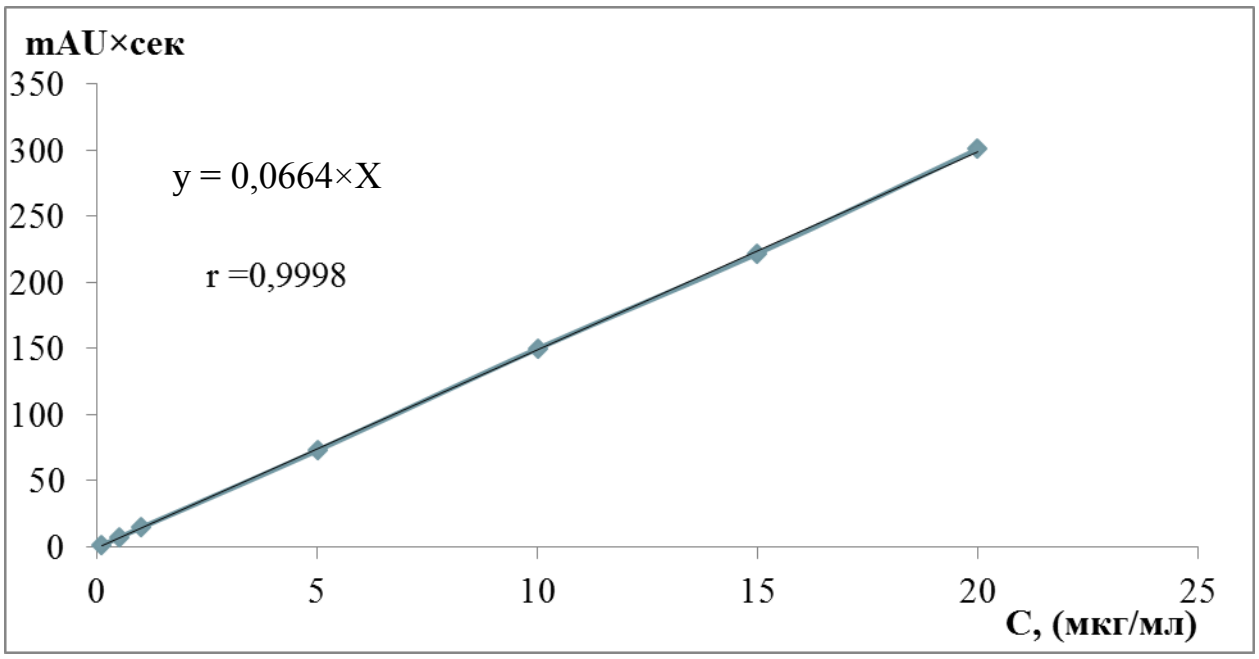


Рисунок 4.3 – Калибровочный график для количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза («Капель 105М»)

При этом установлено, что в диапазоне концентраций цефоперазона от 0,1 мкг/мл до 20 мкг/мл наблюдается линейная зависимость величины фотомет-

рического сигнала от концентрации антибиотика и аппроксимируется уравнением y =0,0664 × X, с коэффициентом корреляции r = 0,9998.

Отклонение концентрации калибровочных растворов, рассчитанное по уравнению линейной зависимости от фактических значений, приведено в таблице 4.6.

Таблица 4.6 - Отклонение концентрации калибровочных растворов от фактических значений

Фактическая концентрация мкг/мл	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Концентрация, рассчитанная по уравнению калибровочного графика, мкг/мл	0,09	0,49	0,98	4,87	9,58	15,11	19,94
ε,%	11,30	2,50	1,80	2,60	3,60	0,90	0,20
Норма%, не более	15	15	15	15	15	15	15

Полученные значения отклонения соответствуют нормам FDA, EMA [185, 186] (не более 20% для нижнего предела, и не более 15% для остальных точек).

Таким образом, результаты испытания (линейность) соответствуют критериям, что подтверждает пригодность методики при определении исследуемых концентраций.

4.2.2. Определение прецизионности и правильности методики

Прецизионность методики

Следующим этапом валидационной оценки является установление прецизионности на уровне сходимости величины стандартного отклонения результатов серии параллельных определений. Прецизионность (воспроизводимость) – это характеристика случайного рассеяния, т. е. мера случайных погрешностей.

Прецизионность характеризуется тремя уровнями:

– повторяемость (сходимость)

  внутрилабораторная воспроизводимость

  межлабораторная воспроизводимость

Прецизионность устанавливают по серии анализов, при этом, рассчитывают стандартное отклонение (SD) и относительное стандартное отклонение (RSD%).

Вычисление проводят с помощью следующих формул:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\overline{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\overline{x}} \times 100\%$$

Однако достаточно чётких нормативов по прецизионности методики нет, так как многие факторы могут оказать влияние на неё, такие как: особенности аналитического метода, условия пробоподготовки, содержание аналита в образце и др.

Наиболее оптимальными можно считать нормативы, рекомендуемые американской ассоциацией аналитической химии [2].

Правильность методики. Правильность аналитической методики характеризуется степенью близости результатов к истинному или опорному значению по всей области измерений. Правильность включает общие и систематические погрешности. Главный вклад вносит систематическая погрешность [22, 238, 239]. В качестве критерия правильности, помимо относительной погрешности, используется расчёт значений открываемости, который вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\text{найдено аналита}}{\text{взято аналита}} \times 100\%$$

На открываемость оказывает влияние метод анализа, содержание определяемого компонента, особенностей пробоподготовки и характера самого анализируемого соединения.

Наиболее приемлемым является применение рекомендаций американской ассоциации аналитической химии [2].

С целью оценки прецизионности и правильности методики определения цефоперазона в водном растворе проводили пять параллельных исследований антибиотика на трёх уровнях концентрации: 0,1; 1,0; 20,0 мкг/мл в приведённых выше условиях (п. 4.2.1).

На электрофореграммах определяли площади пиков, и по уравнению калибровочного графика рассчитывали концентрацию цефоперазона в течении 1-го и 2-го дней.

Для полученных значений концентрации были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD,%), открываемости R,% и относительной погрешности (ε,%). Результаты приведены в таблицах 4.7, 4.8.

Представленные результаты показывают, что величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD%), открываемости ($\overline{R},\%$) и относительной погрешности ε,%, соответствуют нормам FDA и EMA [185, 186] (не более 20% для минимальной и 15% для остальных концентраций).

Таблица 4.7 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона (день первый)

№п/п	Цефоперазона в пробе, мкг/мл	Определено цефоперазона		Метрологические характеристики (n = 5)
		мкг	%	
1	20,0	20,07	100,35	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 98,59 ± 1,89 SD = 1,52 RSD,% = 1,55 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,92 $\bar{R}$, % = 98,59
2		19,99	99,95	
3		19,34	96,70	
4		19,58	97,90	
5		19,61	98,05	
6	1,0	0,99	99,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 99,80 ± 1,84 SD = 1,48 RSD,% = 1,49 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,85 $\bar{R}$, % = 99,80
7		1,00	100,00	
8		0,98	98,00	
9		1,02	102,00	
10		1,00	100,00	
11	0,1	0,09	90,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 106 ± 14,18 SD = 11,40 RSD,% = 10,76 $\bar{\varepsilon}$,% = 13,37 $\bar{R}$, % = 106,00
12		0,11	110,00	
13		0,10	100,00	
14		0,11	110,00	
15		0,12	120,00	
16	0,05	+	-	-
17		+	-	
18		+	-	
19		+	-	
20		+	-	

Таблица 4.7 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона (день второй)

№п/п	Цефоперазона в пробе, мкг/мл	Определено цефоперазона		Метрологические характеристики (n = 5)
		мкг	%	
1	20,0	20,12	100,60	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 100 ± 0,59 SD = 0,47 RSD,% = 0,47 $\bar{\varepsilon}$,% = 0,59 $\bar{R}$, % = 100,00
2		19,89	99,45	
3		19,92	99,60	
4		20,05	100,25	
5		20,02	100,10	
6	1,0	0,98	98,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 100,20 ± 2,39 SD = 1,92 RSD,% = 1,92 $\bar{\varepsilon}$,% = 2,39 $\bar{R}$, % = 100,20
7		0,99	99,00	
8		1,03	103,00	
9		1,01	101,00	
10		1,00	100,00	
11	0,1	0,11	110,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$= 104 ± 16,68 SD = 13,42 RSD,% = 12,90 $\bar{\varepsilon}$,% = 16,04 $\bar{R}$, % = 104,00
12		0,11	110,00	
13		0,12	120,00	
14		0,09	90,00	
15		0,09	90,00	
16	0,05	+	-	-
17		+	-	
18		+	-	
19		+	-	
20		+	-	

4.2.3. Определение диапазона применения методики. Предел количественного определения

Диапазоном применения аналитической методики является интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количеством) анализируемого вещества в образце, для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую прецизионность, правильность и линейность. Полученные результаты исследования показывают, что электрофоретическая методика определения цефоперазона в интервале концентраций от 0,1 до 20 мкг/мл отвечает вышеприведённым валидационным требованиям.

За нижний предел количественного определения (нПКО), принимается минимальная концентрация цефоперазона в образце, для которой возможно его количественное определение со значениями RSD% и ε% не более 20% в диапазоне линейной зависимости, а соотношение сигнал/шум составляет не менее 10/1. Таким образом, предел количественного определения цефоперазона составил 0,1 мкг/мл, а предел обнаружения 0,05мкг/мл.

Электрофореграммы характеризующие нПКО и нПО методики приведены на рисунке 4.4.

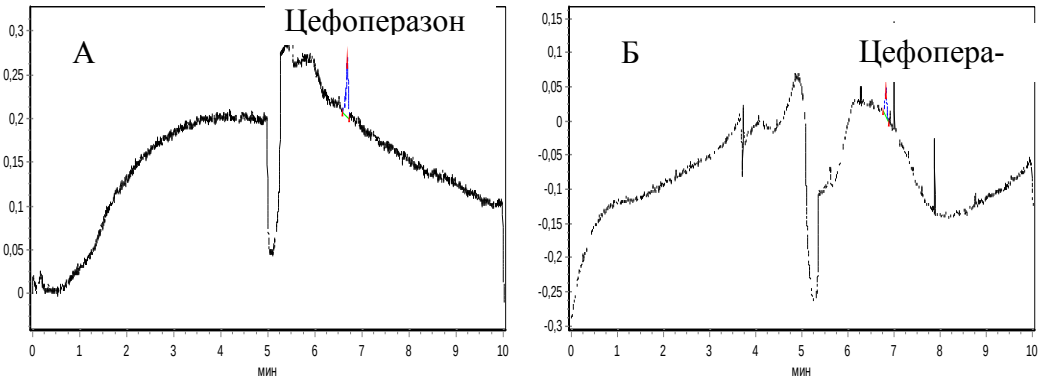


Рисунок 4.4 - ЭФГ цефоперазона на уровне нПКО (0,1 мкг/мл) А, и ЭФГ цефоперазона на уровне нПО (0,05 мкг/мл) Б. «Капель – 105М»

Выводы по главе 4

1. Изучено влияние pH и природы рабочего электролита (РЭ) на качественные параметры.

При этом валидационным критериям приемлимости (по относительному стандартному отклонению (RSD, %), площади пиков (S) и времени миграции (t_m), а также эффективности (N) и коэффициенту ассиметрии (T) цефоперазона на ЭФГ в наибольшей степени удовлетворяет в качестве РЭ буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0.

2. Разработана методика идентификации цефоперазона, показана специфичность и соответствующее валидационным требованиям разрешение пика цефоперазонаи в присутствии близких по строению представителей группы цефалоспориновых антибиотиков.

3. Разработана методика количественного определения цефоперазона с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель – 105М», характеризующаяся высокой чувствительностью, селективностью и экспрес-сностью, требующая минимальных затрат растворов и реагентов.

4. Проведена валидационная оценка методики количественного определения при исследовании цефоперазона. Полученные результаты находятся в пределах критериев приемлемости.

ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФОПЕРАЗОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ (МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ) МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Эффективное решение вопросов определения химических веществ в биологических объектах во многом зависит от важного этапа пробоподготовки (изолирования из объектов, очистки и концентрирования исследуемых соединений).

Методики электрофоретического анализа цефалоспориновых антибиотиков в биологических объектах не разработаны, не изучены вопросы методологии и условия пробоподготовки. При разработке методик идентификации и количественного определения цефоперазона в биологических объектах (моча, кровь, печень) с использованием системы капиллярного электрофореза («Капель 105М»), учитывая условия клинического лабораторного анализа ткани операционного поля в хирургической практике и химико-токсикологического исследования биологических жидкостей при острых отравлениях, а также – большую лабильность цефоперазона при длительном процессе пробоподготовки и содержание значительного количества соэкстрактивных веществ в исследуемых пробах, было предпринято уменьшение объёма биологических жидкостей (до 0,1 мл) и веса ткани (до 0,1 г). Жидкостно-жидкостное концентрирование проводили в экспрессных условиях, исключая процессы упаривания полученного экстракта, с последующей дополнительной очисткой путём реэкстрагирования исследуемого компонента в рабочий электролит, разбавленный в 10 раз водой очищенной (РП). При этом перевод исследуемых соединений в РП позволяет в процессе электрофореза, в кварцевом капилляре осуществить концентрирование пробы за счёт приёма

«стекинга». Концентрирование образца происходит в тот момент, когда заряженные аналиты пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора (РП) от высокой – ведущего электролита (РЭ). Заряженные аналиты внутри зоны образца двигаются с более высокой скоростью за счёт относительно более высокого электрического поля, и замедляясь на границе с зоной РЭ концентрируются.

5.1. Выбор оптимальных условий экстракции цефоперазона из водных растворов

Поскольку жидкостно-жидкостное концентрирование легло в основу методик пробоподготовки биологического субстрата при исследовании цефоперазона, необходимо, прежде всего изучить ряд важных параметров процесса: влияние pH среды и природы органического растворителя, кратность экстрагирования и объём экстрагента на степень экстракции антибиотика из водных растворов.

5.1.1. Влияние pH среды и природы органического растворителя на степень экстракции цефоперазона из водных растворов

Для создания необходимого значения pH использовали универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона в диапазоне pH 1,8 ÷ 6,0 и 0,2н раствор натрия гидроксида.

В качестве экстрагентов изучали: хлороформ, смесь хлороформа и изобутанола в соотношении 3:1, эфир диэтиловый, этилацетат.

Исследование проводилось по следующей методике:

В ряд центрифужных пробирок вносили 0,1 мл стандартного раствора, содержащего 20 мкг цефоперазона, прибавляли по 0,2 мл буферного раствора Бриттона-Робинсона с определённым значением pH и 1 мл одного из выше перечисленных органических растворителей и проводили трехкратную

экстракцию («шейкер», 10мин). С целью разрушения эмульсий, смеси подвергали центрифугированию (6000 об/мин, 10 мин). Органическую фазу отделяли через складчатый фильтр, смоченный растворителем, добавляли 1,0 мл РП и проводили реэкстракцию («шейкер», 10 мин). Реэкстракты отбирали, центрифугировали в пробирках типа «эппендорф» в мини-центрифуге «Mini Spin plus» (10000 об/мин, 5 мин) и проводили электрофоретическое исследование по разработанной ранее методике (п. 4.2.1).
Результаты представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Зависимость степени экстракции цефоперазона от pH среды и природы органического растворителя

pH среды	Цефоперазон 20 мкг/0,1мл							
	Хлороформ		Этилацетат		Эфир		Хлороформ – изобутанол, 3:1	
	Извлечено цефоперазона							
	мкг	%	мкг	%	мкг	%	мкг	%
1,8	0,11	0,56	7,26	36,28	+	-	7,50	37,52
2,0	0,07	0,35	7,44	37,20	+	-	9,65	48,23
3,0	+	-	2,83	14,16	+	-	6,75	33,75
4,0	+	-	0,75	3,74	+	-	2,93	14,66
5,0	+	-	0,1	0,50	+	-	0,54	2,69
6,0	+	-	0,1	0,50	+	-	0,19	0,95

Из данных представленных в таблице 5.1. следует, что максимальное количество цефоперазона экстрагируется смесью органических растворителей (хлороформ - изобутанол 3:1) при pH 2,0 (48,23%).

5.1.2. Влияние кратности экстрагирования и объёма экстрагента на степень экстракции цефоперазона из водных растворов

Для изучения влияния объема экстрагента и кратности экстрагирования на степень извлечения цефоперазона из водного раствора проводили электрофоретическое исследование по следующей методике:

К 0,1 мл водного раствора содержащего 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0. К смеси добавляли определенное количество экстрагента (от 0,5 до 5,0 мл органической системы) и проводили экстрагирование, варьируя кратность от 1 до 4. Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин 10 минут). Органическую фазу отделяли, добавляли 1 мл РП (буферный раствор Бриттона – Робинсона, разбавленный водой в 10 раз).

Количественное определение проводили в соответствии с разработанной методикой (п. 4.2.1). Результаты представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 - Влияние объема экстрагента и кратности экстрагирования на степень экстракции цефоперазона из водных растворов, pH 2,0 органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1)

№ п\п	Число опытов	Количество экстрагента (мл)	Кратность экстрагирования	Цефоперазон, 20 мкг/0,1мл	
				Определено цефоперазона ($\overline{X}$, n = 2)	
				мкг	%
1.	2	0,5	1	9,90	49,70
2.	2	1,0	1	10,80	54,20
3.	2	2,0	1	7,70	38,30
4.	2	3,0	1	6,90	34,50
5.	2	4,0	1	9,20	46,20
6.	2	5,0	1	9,70	48,50
7.	2	0,5	2	10,90	54,90
8.	2	1,0	2	10,60	52,90
9.	2	0,5	3	12,30	61,50
10.	2	1,0	3	13,90	69,80
11.	2	1,0	4	11,30	56,50

Результаты исследования показали, что наибольшее количество цефоперазона определяется из водных растворов (pH 2,0) при 3-х кратном экстрагировании антибиотика органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1), в соотношении водной к органической фазе 3:10.

5.2. Идентификация и количественное определение цефоперазона в моче. Валидационная характеристика методики

При разработке методики количественного определения цефоперазона в моче основывались на изученных условиях, предложенных для его идентификации (п. 4.1). Электрофоретическая методика анализа цефоперазона разработана впервые, в соответствии с этим она была подвергнута валидационной оценке в соответствии с требованиями, предъявляемыми к методикам количественного анализа, не имеющим аналога [4, 25, 70, 237]. При этом в соответствии с требованиями валидационной оценки, необходимо охарактеризовать методику по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, диапазон применения и предел количественного определения. Оценка специфичности – важного валидационного параметра, изучена и приводится выше (п. 4.1.2).

Для приготовления модельных биологических смесей использовали интактную мочу здоровых добровольцев, не принимавших лекарственных препаратов в течение месяца до отбора проб. Проводили идентификацию и количественное определение цефоперазона методом капиллярного электрофореза в разработанных ранее условиях (п. 4.2.1).

Идентификацию цефоперазона на электрофореграммах осуществляли по времени миграции t_m (рис.5.1).

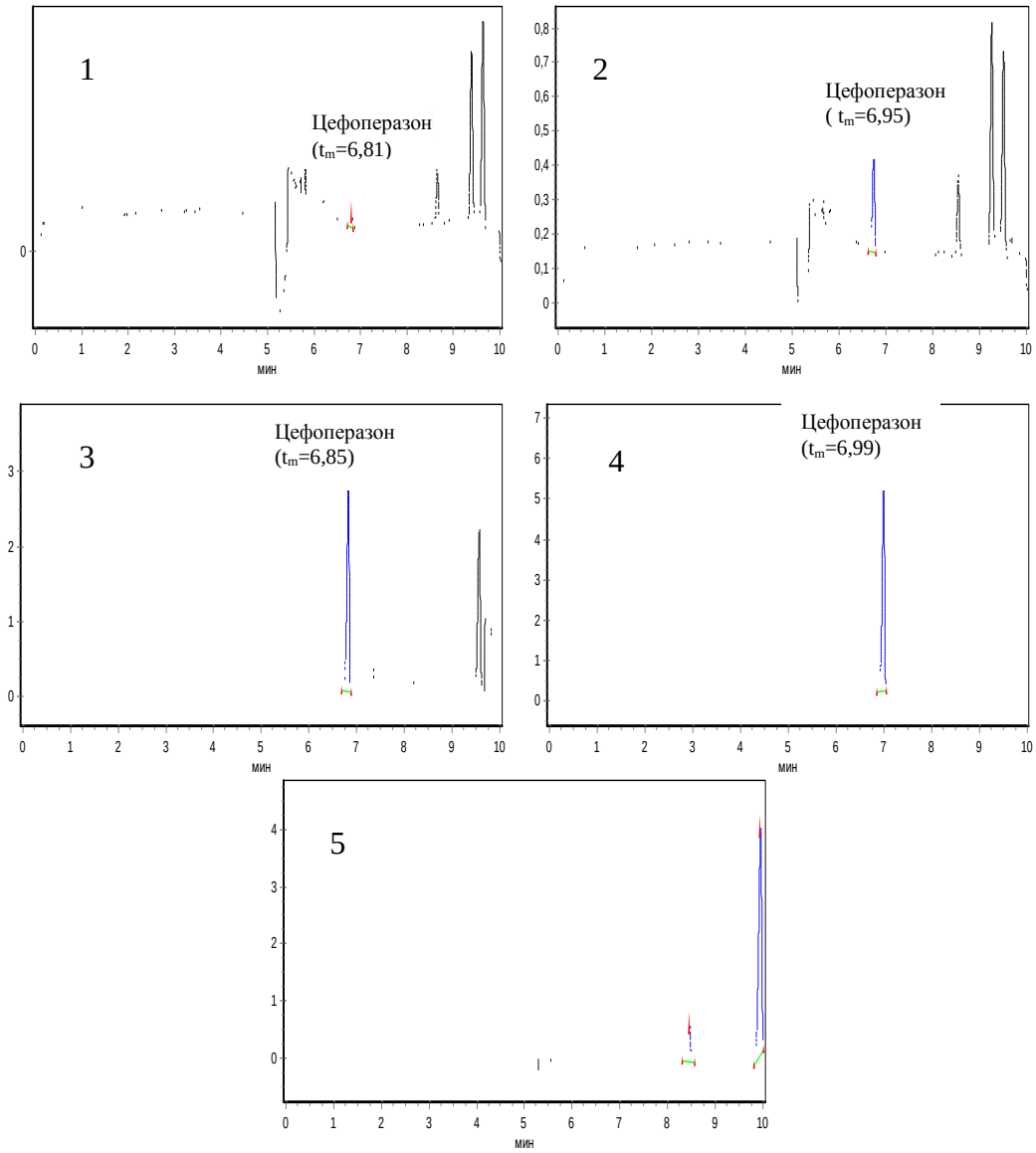


Рисунок 5.1 - ЭФГ цефоперазона в составе мочи: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0 мкг/0,1 мл (2); 10,0 мкг/0,1 мл (3); 20,0 мкг/0,1 мл (4); ЭФГ 0,1 мл интактной мочи (5). «Капель – 105М»

При этом на ЭФГ интактной мочи (без добавления антибиотика) не наблюдается пиков со временем миграции, соответствующим времени миграции цефоперазона.

Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ показывают, что относительное стандартное отклонение площадей пиков вещества и времени миграции (RSD,%) на четырёх уровнях концентрации, представленные в таблице 5.3, отражают сходимость результатов и

соответствие нормам валидации. Эффективность электрофоретической системы составляет не менее 100000 теоретических тарелок, а коэффициент асимметрии пика не более 1,5 единиц.

Таблица 5.3 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ в составе мочи на четырёх уровнях концентрации («Капель – 105М»)

№ п/п	Цефоперазона в моче, мкг/0,1мл	Асимметрия (A_s)	Эффективность (N)	Площадь пика (S)	Время миграции (t_m)
1	2	2	3	4	5
1	20,0	0,4	155320	207,75	7,29
2	20,0	0,5	130244	207,32	7,52
3	20,0	0,6	130226	207,43	7,53
4	20,0	0,5	142157	207,36	6,99
5	20,0	0,5	156647	206,95	6,86
$\bar{x}$		0,5	142920	207,56	7,24
RSD,%		14,14	9,02	0,13	4,21
1	10,0	0,5	127536	100,90	6,82
2	10,0	0,6	110675	96,58	7,24
3	10,0	0,4	136502	103,25	7,11
4	10,0	0,6	128456	101,56	7,21
5	10,0	0,5	154861	100,23	6,85
$\bar{x}$		0,52	131610	100,50	7,05
RSD,%		16,09	12,19	2,45	2,82
1	1,0	0,7	144358	10,60	6,95
2	1,0	0,9	195142	10,65	7,25
3	1,0	0,8	142144	10,64	7,42
4	1,0	0,6	182654	10,55	7,33
5	1,0	0,9	168124	10,59	7,05
$\bar{x}$		0,78	166480	10,61	7,20
RSD,%		16,72	13,98	0,38	2,71
1	0,1	0,6	142416	0,51	6,81
2	0,1	1,4	173041	0,60	6,95
3	0,1	1,3	164600	0,59	7,19
4	0,1	0,6	167156	0,57	7,22
5	0,1	0,4	173222	0,55	7,05
$\bar{x}$		0,86	164090	0,56	7,04
RSD,%		53,03	7,73	6,34	2,42

5.2.1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика готовили ряд градуировочных растворов. В 0,9 мл интактной мочи вносили 0,1 мл раствора цефоперазона, содержащего соответствующее количество вещества, для каждой концентрации. Из этого количества, после настаивания и перемешивания, отбиралась проба 0,1 мл. Пробоподготовка осуществлялась по следующей методике: к 0,1 мл мочи, содержащей определенное количество цефоперазона, добавляли: 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0, и подвергали экстракции органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1), (1мл х 3). Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин), органическую фазу отделяли и осуществляли реэкстрагирование 1 мл РП в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 минут). Реэкстракт отделяли и осуществляли дегазацию с использованием центрифуги («Mini Spin plus», 10000 об/мин, 5 минут).

Запись и обработку полученных электрофореграмм (ЭФГ) (рисунок 5.2) осуществляли с помощью программного обеспечения Эльфоран для Windows.

Фотометрические сигналы (площади пиков) использовали для построения калибровочного графика (таблица 5.4; рисунок 5.3).

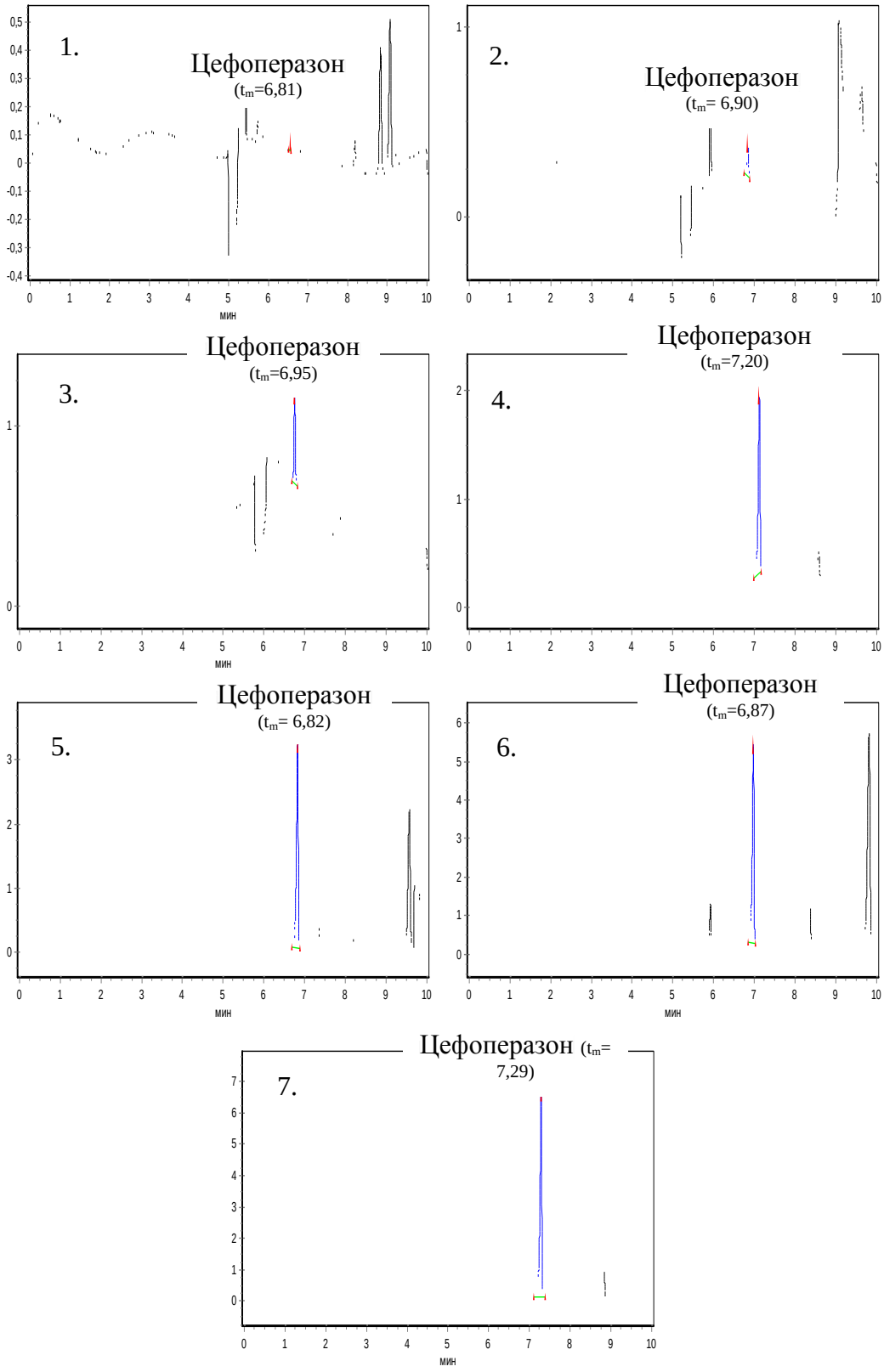


Рисунок 5.2 - ЭФГ цефоперазона в составе модельной смеси (моча 0,1 мл) с концентрацией: 0,1 мкг (1); 0,5 мкг (2); 1 мкг (3); 5 мкг (4); 10 мкг (5); 15 мкг (6); 20 мкг (7) «Капель105М»

Таблица 5.4 Зависимость величины фотометрического сигнала (площади пика) от концентрации цефоперазона в моче («Капель-105М», РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0)

№ п/п	Цефоперазон, мкг/0,1мл	mAU*сек$_1$	mAU*сек$_2$	mAU*сек$_3$	mAU*сек$_{ср}$
1	0,1	0,59	0,60	0,59	0,59
2	0,5	4,74	4,78	4,79	4,77
3	1,0	10,60	10,65	10,64	10,63
4	5,0	50,80	51,24	51,01	51,02
5	10,0	100,55	100,72	101,42	100,90
6	15,0	154,10	153,50	154,11	153,90
7	20,0	207,75	207,32	207,43	207,50

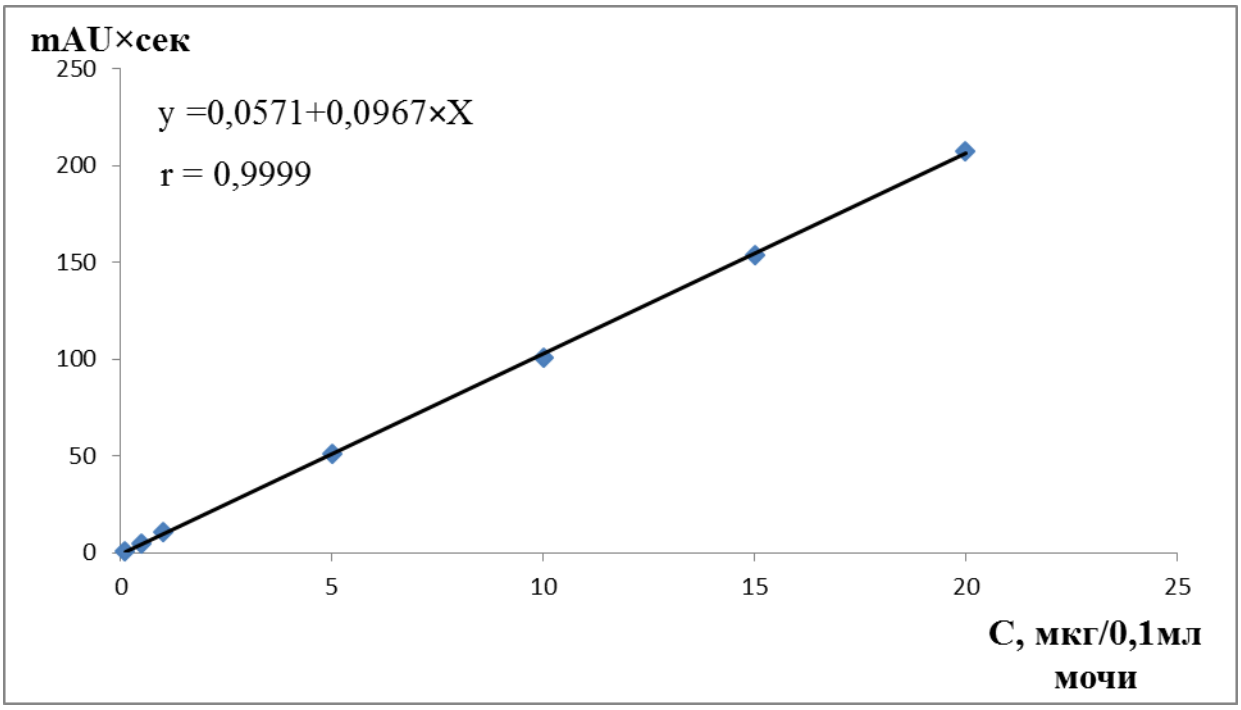


Рисунок 5.3 - Калибровочный график для количественного определения цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»)

При этом установлено, что в диапазоне концентраций цефоперазона от 0,1 мкг/0,1мл до 20 мкг/0,1мл наблюдается линейная зависимость величины фотометрического сигнала от концентрации антибиотика и

аппроксимируется уравнением y = 0,0571+0,0967×X, с коэффициентом корреляции r = 0,9999.

Отклонение концентрации калибровочных растворов, рассчитанное по уравнению линейной зависимости от фактических значений, приведено в таблице

Таблица 5.5 - Отклонение концентрации калибровочных растворов от фактических значений

Фактическая концентрация мкг/0,1мл	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Концентрация, рассчитанная по уравнению калибровочного графика, мкг/0,1мл	0,11	0,52	1,09	4,99	9,81	14,94	20,12
ε,%	10	4	9	0,2	1,9	0,4	0,6
Норма%, не более	20	15	15	15	15	15	15

Полученные значения отклонения соответствуют нормам FDA, EMA [185, 186] (не более 20% для нижнего предела, и не более 15% для остальных точек).

Таким образом, результаты испытания (линейность) соответствуют критериям, что подтверждает пригодность методики при определении исследуемых концентраций.

Результаты количественного определения цефоперазона в моче на четырёх уровнях концентрации и валидационные параметры методики определения (правильность, прецизионность) представлены в таблице 5.6,5.7.

Таблица 5.6 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в моче (день первый)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл мочи (мкг)	Взято на анализ мочи (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл мочи		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	19,48	194,80	97,40	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 199,20 ± 7,05 SD = 5,67 RSD,% = 2,85 $\bar{\varepsilon}$,% = 3,54 R,% = 0,40
2			20,56	205,60	102,80	
3			19,72	197,20	98,60	
4	100,0	0,1	9,85	98,50	98,50	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 98,33 ± 1,07 SD = 0,86 RSD,% = 0,88 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,09 R,% = 1,67
5			9,91	99,10	99,10	
6			9,74	97,40	97,40	
7	10,0	0,1	1,02	10,20	102,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,93 ± 0,31 SD = 0,25 RSD,% = 2,53 $\bar{\varepsilon}$,% = 3,15 R,% = 0,70
8			0,99	9,90	99,00	
9			0,97	9,70	97,00	
10	1,0	0,1	0,117	1,17	117,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 1,01 ± 0,17 SD = 0,14 RSD,% = 13,47 $\bar{\varepsilon}$,% = 16,75 R,% = 2,00
11			0,092	0,92	92,00	
12			0,095	0,95	95,00	

Таблица 5.7 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в моче (день второй)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл мочи (мкг)	Взято на анализ мочи (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл мочи		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	19,45	194,50	97,25	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 194,47 ± 1,06 SD = 0,85 RSD,% = 0,44 $\bar{\varepsilon}$,% = 0,54 R,% = 2,77
2			19,53	195,30	97,65	
3			19,36	193,60	96,80	
4	100,0	0,1	9,06	90,60	90,60	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 94,63 ± 5,04 SD = 4,05 RSD,% = 4,28 $\bar{\varepsilon}$,% = 5,32 R,% = 5,37
5			9,87	98,70	98,70	
6			9,46	94,60	94,60	
7	10,0	0,1	1,06	10,60	106,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,93 ± 0,73 SD = 0,59 RSD,% = 5,90 $\bar{\varepsilon}$,% = 7,33 R,% = 0,70
8			0,95	9,50	95,00	
9			0,97	9,70	97,00	
10	1,0	0,1	0,11	1,10	110,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,97 ± 0,14 SD = 0,12 RSD,% = 11,95 $\bar{\varepsilon}$,% = 14,85 R,% = 3,00
11			0,09	0,90	90,00	
12			0,09	0,90	90,00	

Полученные результаты показывают, что величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения (SD, RSD,%) соответствуют нормам FDA и EMA [185, 186] (не более 20% для минимальной концентрации, не более 15% для остальных). При этом нижний предел определения и обнаружения цефоперазона составил 0,1 мкг антибиотика в 0,1 мл мочи.

5.3. Идентификация и количественное определение цефоперазона в крови. Валидация методики

Определение лекарственных веществ в биожидкости – крови, представляет собой сложную и актуальную задачу, решение которой необходимо при проведении судебно-химических (химико-токсикологических) экспертиз и клинических лабораторных анализов. Сложность объясняется, прежде всего, влиянием белковых и ряда других компонентов эндогенного характера на процесс выделения искомых соединений из биосубстрата.

5.3.1. Оптимизация условий пробоподготовки при определении цефоперазона в крови методом капиллярного электрофореза

5.3.1.1. Влияние природы осадителей на степень экстрагирования цефоперазона из крови, плазмы, сыворотки

Нами были проведены исследования с целью изучения влияния осадителей белковых веществ на степень экстракции цефоперазона из крови.
Для осаждения белковых веществ использовали: водные растворы ряда органических и неорганических кислот, органические осадители, а также проводили прямое экстрагирование цефоперазона из биосубстрата органической системой (хлороформ - изобутанол, 3:1) без предварительного осаждения белковых веществ.

При проведении исследований, использовали кровь здоровых добровольцев, не принимавших лекарственных препаратов в течение одного

месяца до отбора проб и стабилизированную цитратным антикоагулянтом. В 0,9 мл интактной крови (плазмы, сыворотки) вносили 0,1 мл раствора цефоперазона, содержащего соответствующее количество вещества, для каждой концентрации. Приготовленные модельные смеси выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем отбирали 0,1 мл и исследовали по следующим методикам:

Методика 1 (прямое экстрагирование цефоперазона органической системой без добавления осадителя).

К 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки), содержащему 20 мкг цефоперазона в пробе, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0; и проводили экстрагирование органической системой (1 мл × 3) в течение 10 минут. Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин 10 минут). Органическую фазу отделяли, добавляли 1 мл РП и реэкстрагировали в течение 10 минут. Эмульсию разрушали центрифугированием. Реэкстракт отделяли, проводили дегазацию и последующее электрофоретическое определение в условиях приведённых выше (п. 4.2.1).

Методика 2 (осадитель аммония сульфат).

К 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки), содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,1 мл воды и 0,1 г аммония сульфата. Оставляли на 15 минут, затем центрифугировали (6000 об/мин 10 минут). Надосадочную жидкость отделяют, добавляют 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0. Экстрагирование органической системой, реэкстрагирование и определение проводили в соответствии с определением цефоперазона в моче (п. 5.2.).

Методика 3 (осадитель ацетонитрил).

К 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки), содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,4 мл ацетонитрила. Оставляли на 15 минут, затем центрифугировали (6000 об/мин 10 минут). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0. Подвергали экстрагированию. Дальнейшее исследование и определение проводили так, как описано при определении цефоперазона в моче (п. 5.2.).

Методика 4 (осадитель трихлоруксусная кислота).

К 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки), содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,4 мл трихлоруксусной кислоты, pH 2,0. Оставляли на 20 минут, смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость отделяли. Экстрагирование органической системой, реэкстрагирование и определение проводили так, как при исследовании мочи (п. 5.2).

Результаты исследования представлены в таблицах 5.8, 5.9, 5.10.

Таблица 5.8 - Влияние осадителей белковых веществ на степень экстракции цефоперазона из крови, (n = 2)

№п/п	Осадители	Цефоперазон, 20 мкг/0,1 мл крови	
		Извлечено цефоперазона	
		мкг	%
1	Прямое концентрирование экстрагентом	1,18	7,17
2	Аммония сульфат	5,80	28,90
3	Ацетонитрил	5,20	25,70
4	Раствор трихлоруксусной кислоты, pH 2,0	0,54	2,80

Таблица 5.9 - Влияние осадителей белковых веществ на степень экстракции цефоперазона из сыворотки, (n = 2)

№п/п	Осадители	Цефоперазон, 20 мкг/0,1 мл сыворотки	
		Извлечено цефоперазона	
		мкг	%
1	Прямое концентрирование экстрагентом	1,42	7,12
2	Аммония сульфат	5,60	27,20
3	Ацетонитрил	5,20	26,10
4	Раствор трихлоруксусной кислоты, pH 2,0	- -	- -

Таблица 5.10 - Влияние осадителей белковых веществ на степень экстракции цефоперазона из плазмы, (n = 2)

№ п/п	Осадители	Цефоперазона 20 мкг/0,1 мл плазмы	
		Извлечено цефоперазона	
		мкг	%
1	Прямое концентрирование экстрагентом	7,10	35,40
2	Аммония сульфат	8,92	44,90
3	Ацетонитрил	8,90	44,50
4	Раствор трихлоруксусной кислоты, pH 2,0	4,80	24,10

Полученные результаты показали, что наибольшая степень экстракции цефоперазона наблюдается при добавлении осадителя белковых веществ раствора аммония сульфата из плазмы крови (44,90%). Добавление других осадителей к плазме, таких как: 5% раствор трихлоруксусной кислоты, pH 1,0, ацетонитрил, и прямое экстрагирование системой (хлороформ – изобутанол, 3:1), позволяет определить значительные количества исследуемого препарата и составляет 24,10%, 44,50% и 35,40% соответственно.

5.3.2. Валидационная характеристика методики идентификации и количественного определения цефоперазона в плазме крови (на четырёх уровнях концентрации) методом капиллярного электрофореза

С целью валидации способа идентификации и количественного определения цефоперазона в плазме крови проводились исследования по следующей методике:

К 0,1 мл плазмы крови, содержащей определённое количество цефоперазона (0,1; 1,0; 10,0; 20,0 мкг вещества соответственно) добавляли 0,1 мл воды и 0,1 г аммония сульфата. Оставляли на 15 минут, затем центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0 и проводили экстрагирование органической системой (1 мл × 3) в течение 10 мин. Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). органическую фазу отделяли, и добавляли 1 мл РП и реэкстрагировали в течении 10 мин. С целью разрушения эмульсии, проводили центрифугирование (6000 об/мин, 10 мин). Реэкстракт отделяли, проводили дегазацию и последующее электрофоретическое определение в описанных выше условиях (п. 4.2.1).

Идентификацию цефоперазона, выделенного из плазмы крови на электрофореграммах осуществляли по времени миграции (t_m) (рисунок 5.4).

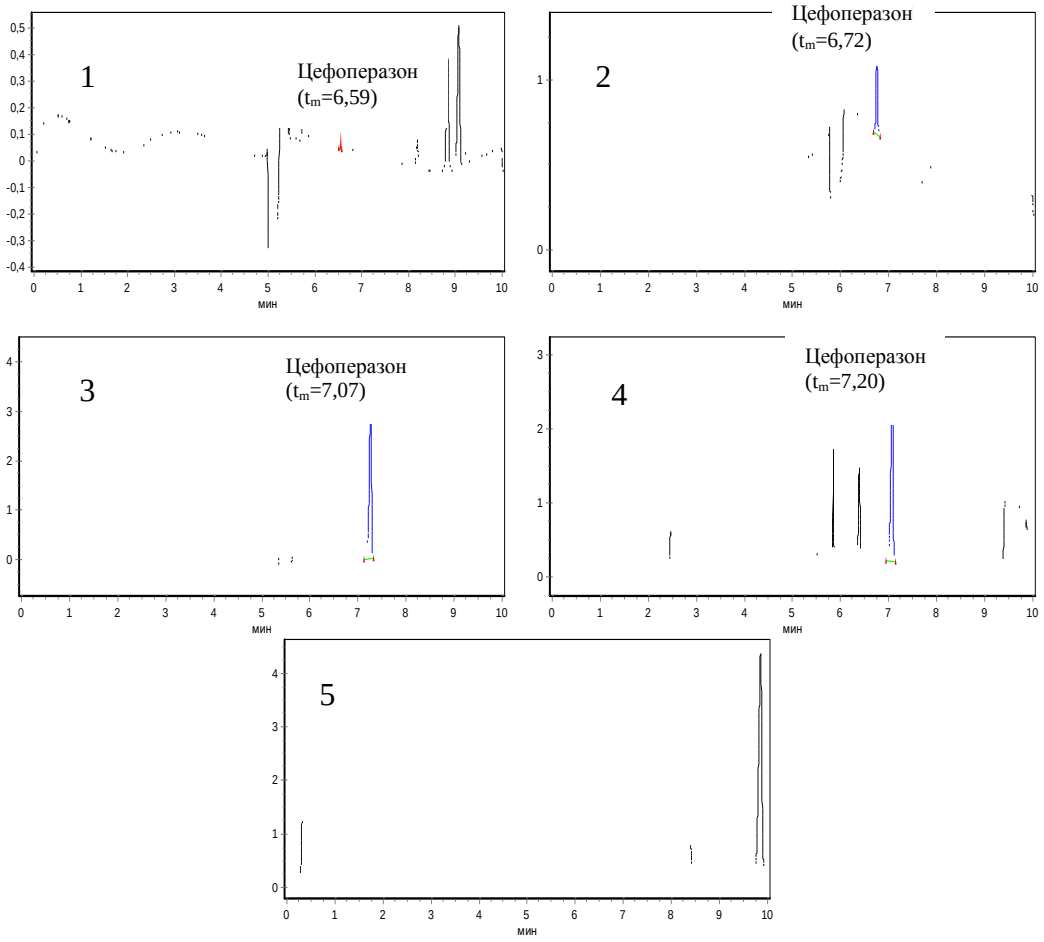


Рисунок 5.4 - ЭФГ цефоперазона в составе плазмы: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0мкг/0,1 мл (2); 10,0 мкг/0,1 мл (3); 20,0 мкг/0,1 мл (4); ЭФГ 0,1 мл интактной плазмы (5). «Капель – 105М»

При этом на ЭФГ интактной плазмы (без добавления антибиотика) не наблюдается пиков со временем миграции, соответствующим времени миграции цефоперазона.

Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ показывают, что относительное стандартное отклонение площадей пиков вещества и времени миграции (RSD,%) на четырёх уровнях концентраций, представленные в таблице 5.11, отражают сходимость результатов и соответствие нормам валидации. Эффективность электрофоретической системы составляет не менее 100000 теоретических тарелок, а коэффициент асимметрии пика не более 1,5 единиц. При этом нижний предел

количественного определения и обнаружения цефоперазона составляет 0,1 мкг антибиотика в 0,1 мл плазмы.

Таблица 5.11 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ в составе плазмы на четырёх уровнях концентрации («Капель – 105М»)

№п/п	Цефоперазона в плазме, мкг/0,1мл	Асимметрия (A_s)	Эффективность (N)	Площадь пика (S)	Время миграции (t_m)
1	2	2	3	4	5
1	20,0	1,2	105229	176,60	7,26
2	20,0	1,1	110352	182,36	6,98
3	20,0	1,3	115445	173,45	7,14
4	20,0	1,2	111920	165,22	7,08
5	20,0	1,1	108321	168,31	7,22
$\bar{x}$		1,18	110250	173,19	7,14
RSD,%		7,09	3,48	3,91	1,57
1	10,0	1,3	136878	78,30	7,07
2	10,0	1,2	140452	76,58	6,93
3	10,0	0,9	132286	76,27	7,03
4	10,0	1,1	145628	79,48	6,95
5	10,0	1,2	141259	77,23	6,98
$\bar{x}$		1,14	139300	77,57	6,99
RSD,%		13,30	3,59	1,70	0,82
1	1,0	1,3	184314	9,14	7,60
2	1,0	1,1	176032	8,82	7,45
3	1,0	1,0	182108	8,94	7,32
4	1,0	1,2	185338	9,02	7,45
5	1,0	1,2	180292	8,78	7,35
$\bar{x}$		1,16	181620	8,94	7,43
RSD,%		9,83	2,03	1,64	1,48
1	0,1	0,9	544083	0,42	6,79
2	0,1	0,8	458137	0,44	6,84
3	0,1	1,1	476242	0,47	6,92
4	0,1	0,8	434381	0,45	6,85
5	0,1	1,2	452443	0,43	6,84
$\bar{x}$		0,96	473060	0,44	6,85
RSD,%		18,92	8,97	4,35	0,68

5.3.2.1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика готовили ряд градуировочных растворов. В 0,9 мл интактной плазмы крови вносили 0,1 мл раствора цефоперазона, содержащего соответствующее количество вещества, для каждой концентрации. Из этого количества, после настаивания и перемешивания, отбиралась проба 0,1 мл. Затем добавляли 0,1 мл воды и 0,1 г аммония сульфата. Оставляли на 15 минут и центрифугировали (6000 об/мин 10 минут). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0. Экстрагирование органической системой, реэкстрагирование и определение проводили в соответствии с ранее разработанной методикой.

Запись и обработку полученных электрофореграмм (ЭФГ) (рисунок 5.5) осуществляли с помощью программного обеспечения Эльфоран для Windows.

Фотометрические сигналы (площади пиков) использовали для построения калибровочного графика (таблица 5.12; рисунок 5.6).

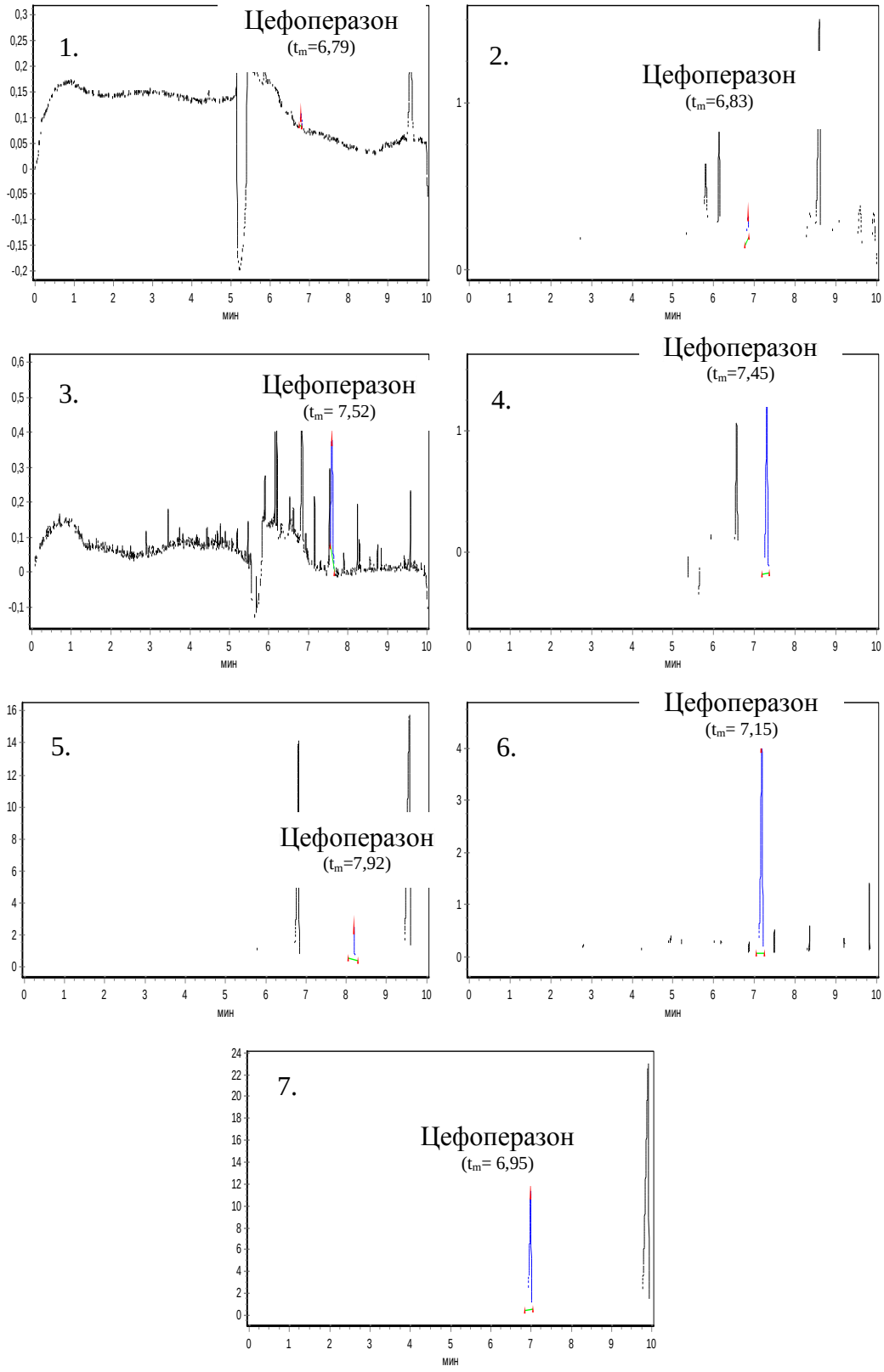


Рисунок 5.5 - ЭФГ цефоперазона в составе модельной смеси (плазма 0,1 мл) с концентрацией: 0,1 мкг (1); 0,5 мкг (2); 1 мкг (3); 5 мкг (4); 10 мкг (5); 15 мкг (6); 20 мкг (7) «Капель105М»

Таблица 5.12 - Зависимость величины фотометрического сигнала (площади пика) от концентрации цефоперазона в плазме крови («Капель-105М», РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0)

№ п/п	Цефоперазон, мкг/0,1мл	mAU*сек$_1$	mAU*сек$_2$	mAU*сек$_3$	mAU*сек$_{ср}$
1	0,1	0,4152	0,4148	0,4151	0,4150
2	0,5	4,47	4,52	4,50	4,495
3	1,0	9,14	9,14	9,13	9,138
4	5,0	43,85	43,93	43,92	43,90
5	10,0	85,75	85,68	85,67	85,70
6	15,0	127,08	127,15	127,06	127,1
7	20,0	176,54	176,61	176,65	176,6

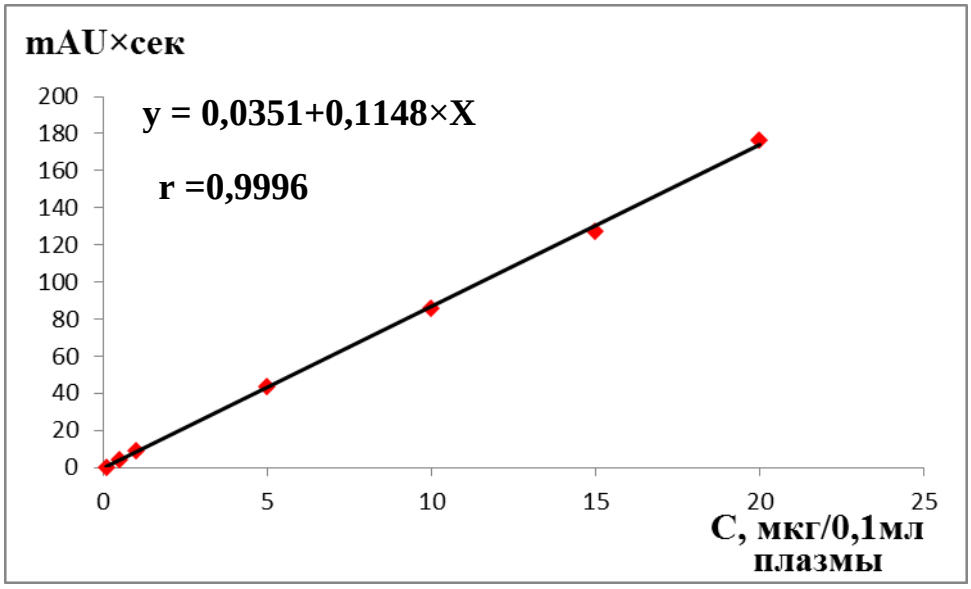


Рисунок 5.6 - Калибровочный график для количественного определения цефоперазона в плазме крови методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»)

При этом установлено, что в диапазоне концентраций цефоперазона от 0,1 мкг/0,1мл до 20 мкг/0,1мл наблюдается линейная зависимость величины фотометрического сигнала от концентрации антибиотика и аппроксимируется уравнением y = 0,0351+0,1148×X, с коэффициентом корреляции r = 0,9996.

Отклонение концентрации калибровочных растворов, рассчитанное по уравнению линейной зависимости от фактических значений, приведено в таблице 5.13

Таблица 5.13 - Отклонение концентрации калибровочных растворов от фактических значений

Фактическая концентрация мкг/0,1мл	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Концентрация, рассчитанная по уравнению калибровочного графика, мкг/0,1мл	0,083	0,55	1,08	5,08	9,87	14,63	20,31
ε,%	17,00	10,00	8,00	1,60	1,30	2,47	1,55
Норма%, не более	20	15	15	15	15	15	15

Полученные значения отклонения соответствуют нормам FDA, EMA [185, 186] (не более 20% для нижнего предела, и не более 15% для остальных точек).

Таким образом, результаты испытания (линейность) соответствуют критериям, что подтверждает пригодность методики при определении исследуемых концентраций.

Результаты количественного определения цефоперазона на четырёх уровнях концентрации и валидационные параметры методики определения (правильность, прецизионность) представлены в таблице 5.14,5.15.

Таблица 5.14 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в плазме крови (день первый)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл плазмы (мкг)	Взято на анализ плазмы (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл плазмы		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	20,31	203,10	101,55	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 200,60 ± 2,70 SD = 2,17 RSD,% = 1,08 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,35 R,% = 0,3
2			19,92	199,20	99,60	
3			19,95	199,50	99,75	
4	100,0	0,1	9,02	90,20	90,20	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 89,7 ± 2,0 SD = 1,61 RSD,% = 1,79 $\bar{\varepsilon}$,% = 2,23 R,% = 10,30
5			8,79	87,90	87,90	
6			9,10	91,00	91,00	
7	10,0	0,1	1,02	10,20	102,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,97 ± 0,73 SD = 0,59 RSD,% = 5,88 $\bar{\varepsilon}$,% = 7,31 R,% = 0,30
8			1,04	10,40	104,00	
9			0,93	9,30	93,00	
10	1,0	0,1	0,085	0,85	85,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,87±0,03 SD = 0,03 RSD,% = 2,88 $\bar{\varepsilon}$,% = 3,58 R,% = 13,00
11			0,087	0,87	87,00	
12			0,090	0,90	90,00	

Таблица 5.15 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в плазме крови (день второй)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл плазмы (мкг)	Взято на анализ плазмы (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл плазмы		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	19,36	193,60	96,80	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 195,07± 2,01 SD = 1,62 RSD,% = 0,83 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,03 R,% = 2,15
2			19,48	194,80	97,40	
3			19,68	196,80	98,40	
4	100,0	0,1	9,01	90,10	90,10	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 89,1± 1,19 SD =0,95 RSD,% =1,07 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,33 R,% = 10,90
5			8,82	88,20	88,20	
6			8,90	89,00	89,00	
7	10,0	0,1	1,04	10,40	104,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 10,23±0,19 SD = 0,15 RSD,% = 1,49 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,86 R,% = 2,30
8			1,02	10,20	102,00	
9			1,01	10,10	101,00	
10	1,0	0,1	0,086	0,86	86,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,87 ±0,02 SD =0,02 RSD,% =1,75 $\bar{\varepsilon}$,% = 2,17 R,% = 13,00
11			0,089	0,89	89,00	
12			0,087	0,87	87,00	

Полученные результаты показывают, что величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения (SD, RSD,%) соответствуют нормам FDA и EMA [185, 186] (не более 20% для минимальной концентрации, не более 15% для остальных). При этом нижний предел определения и обнаружения цефоперазона составил 0,1 мкг антибиотика в 0,1 мл плазмы.

5.4. Идентификация и количественное определение цефоперазона в печени. Валидация методики

5.4.1. Сравнительная характеристика методов выделения цефоперазона из печени

С целью разработки экспрессной методики идентификации и количественного определения цефоперазона в биологическом материале (ткани печени), с использованием современной эффективной системы для капиллярного электрофореза, было проведено сравнительное изучение влияния природы экстрагента на степень экстрагирования антибиотика (ацетонитрил; водный раствор натрия гидроксида, pH 9,0; буферный раствор Бриттона - Робинсона, pH 9,0). В качестве модельных смесей использовали ткани печени людей, погибших от травм, и подвергнутых судебно-медицинскому вскрытию.

Методика1 (экстрагент – водный раствор натрия гидроксида, pH 9,0).

К 0,1 г измельчённой ткани печени содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляют 0,4 мл водного раствора натрия гидроксида pH 9,0. Перемешивали, и оставляли в защищённом от света месте, при периодическом встряхивании, в течении 30 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли по каплям 10% раствор хлороводородной кислоты до pH 2,0 (по универсальной индикаторной бумаге) и проводили экстракцию органической системой растворителей (хлороформ - изобутанол, 3:1), (1мл×3) в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). К объединённым экстрактам добавляли 1 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 9,0, разбавленного водой в 10 раз и проводили реэкстрагирование в течении 10 минут. Для разрушения эмульсии смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Реэкстракт отделяли, дегазировали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 минут (центрифуга «Mini Spin Plus»), и использовали для идентификации и

количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»), согласно разработанной нами методике (п. 4.2.1).

Методика 2 (экстрагент – буферный раствор Бриттона – Робинсона pH 9,0).

К 0,1 г измельчённой ткани печени, содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,4 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 9,0. Перемешивали, и оставляли в защищённом от света месте, при периодическом встряхивании, в течение 30 минут. Смесь центрифугировали (6000 **Ошибка! ,** 5 минут). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли по каплям 10% раствор хлороводородной кислоты до pH 2,0 (по универсальной индикаторной бумаге) и дальнейшие процессы экстрагирования, реэкстрагирования и электрофоретического исследования цефоперазона проводили как описано в методике 1.

Методика 3 (экстрагент – ацетонитрил).

К 0,1 г измельчённой ткани печени, содержащей 20 мкг цефоперазона, добавляли 0,4 мл ацетонитрила и встряхивали в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0 (по универсальной индикаторной бумаге) и дальнейшие процессы экстрагирования, реэкстрагирования и электрофоретического исследования цефоперазона проводили, как описано в методике 1.

Результаты исследования представлены в таблице 5.16.

Таблица 5.16 – Сравнительная оценка методов экстрагирования цефоперазона из ткани печени

№ п/п	Экстрагент	Цефоперазон, (20 мкг/0,1г печени)		RSD,%
		Определено цефоперазона ($\bar{x}$; n=3)		
		мкг	%	
1.	Водный раствор натрия гидроксида, pH 9,0	13,12	65,60	1,96
2.	Буферный раствор Бриттона - Робинсона, pH 9,0	9,40	47,03	3,74
3.	Ацетонитрил	9,33	46,65	2,48

Сравнительное изучение методов экстрагирования цефоперазона из печени показало, что наибольшее количество антибиотика определяется при использовании в качестве экстрагента раствора натрия гидроксида, pH 9,0 (65,60%).

5.4.2. Валидационная характеристика методики идентификации и количественного определения цефоперазона в печени методом капиллярного электрофореза

При разработке методики количественного определения цефоперазона в тканях печени основывались на изученных условиях, предложенных для его идентификации (п. 4.1). Электрофоретическая методика анализа цефоперазона разработана впервые, в соответствии с этим она была подвергнута валидационной оценке в соответствии с требованиями, предъявляемыми к методикам количественного анализа, не имеющим аналога [4, 25, 70, 237]. При этом в соответствии с требованиями валидационной оценки, необходимо охарактеризовать методику по следующим показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, диапазон применения и предел количественного определения. Оценка специфичности – важного валидационного параметра, изучена и приводится выше (п. 4.1).

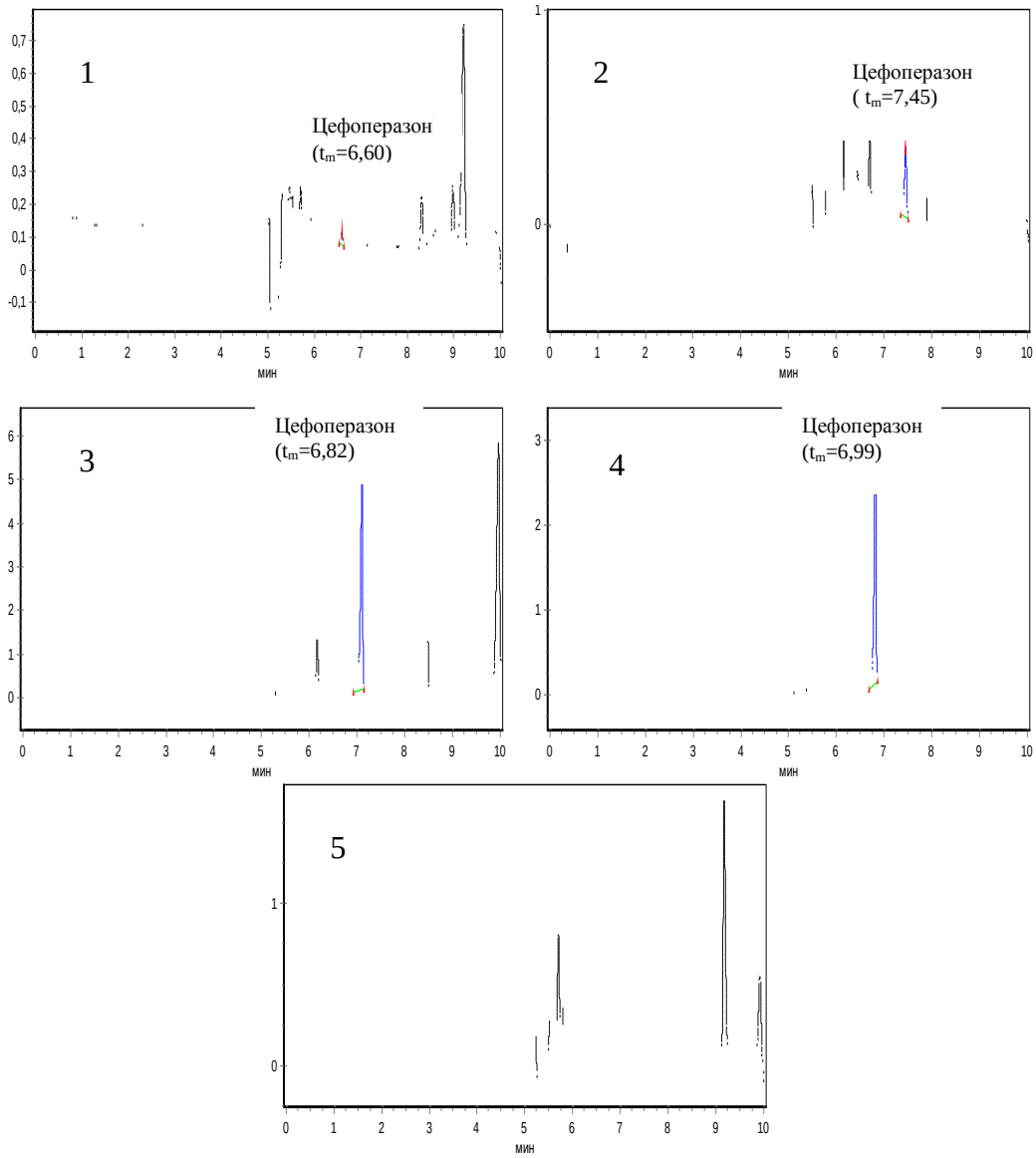


Рисунок 5.7 - ЭФГ цефоперазона в составе ткани печени: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0мкг/0,1 мл (2); 10,0 мкг/0,1 мл (3); 20,0 мкг/0,1 мл (4); ЭФГ 0,1 мл интактной печени (5). «Капель – 105М»

При этом на ЭФГ интактной печени (без добавления антибиотика) не наблюдается пиков со временем миграции, соответствующим времени миграции цефоперазона.

Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ (Рисунок 5.7) показывают, что относительное стандартное отклонение площадей пиков вещества и времени миграции (RSD,%) на четырёх уровнях концентрации, представленные в таблице 5.17, отражают сходимость

результатов и соответствие нормам валидации. При этом предел количественного определения и обнаружения цефоперазона составляет 0,1 мкг антибиотика в 0,1 г печени.

Таблица 5.17 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ в составе ткани печени на четырёх уровнях концентрации («Капель – 105М»)

№п/п	Цефоперазона в печени, мкг/0,1г	Асимметрия (A_s)	Эффективность (N)	Площадь пика (S)	Время миграции (t_m)
1	2	2	3	4	5
1	20,0	0,5	161011	159,05	7,10
2	20,0	0,4	142154	157,69	7,05
3	20,0	0,7	157622	158,16	7,07
4	20,0	0,4	155234	157,23	6,85
5	20,0	0,6	143687	158,12	6,83
$\bar{x}$		0,52	151940	158,05	6,98
RSD,%		25,07	5,60	0,43	1,85
1	10,0	0,5	160813	76,88	6,82
2	10,0	0,5	154236	77,91	7,15
3	10,0	0,4	158412	77,51	7,09
4	10,0	0,6	147522	76,72	6,82
5	10,0	0,5	154561	77,43	7,12
$\bar{x}$		0,5	155110	77,29	7,00
RSD,%		14,14	3,26	0,63	2,37
1	1,0	0,6	138801	7,48	7,38
2	1,0	0,8	142318	7,54	7,22
3	1,0	0,9	142144	7,53	7,10
4	1,0	0,6	165284	7,46	7,03
5	1,0	0,8	152638	7,52	6,95
$\bar{x}$		0,74	148240	7,51	7,14
RSD,%		18,13	7,32	0,46	2,36
1	0,1	1,2	132326	0,83	7,25
2	0,1	1,3	123241	0,89	6,91
3	0,1	1,3	135605	0,85	7,15
4	0,1	0,9	127557	0,86	6,83
5	0,1	0,7	123452	0,85	7,01
$\bar{x}$		1,08	128440	0,86	7,03
RSD,%		24,85	4,25	2,56	2,44

5.4.2.1. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика готовили ряд градуировочных объектов. К 0,9 г измельчённой ткани интактной печени добавляли 0,1 мл раствора цефоперазона, содержащего соответствующее количество вещества, для каждой концентрации. Приготовленные модельные смеси выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. К 0,1 г приготовленной смеси добавляли 0,4 мл водного раствора натрия гидроксида, pH 9,0, перемешивали и оставляли в защищённом от света месте, при периодическом встряхивании, в течение 30 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли по каплям 10% раствор хлороводородной кислоты до pH 2,0 (по универсальной индикаторной бумаге) и проводили экстракцию органической системой растворителей (хлороформ - изобутанол, 3:1), (1мл×3) в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). К объединённым экстрактам добавляли 1 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 9,0, разбавленного водой в 10 раз и проводили реэкстрагирование в течение 10 минут. Для разрушения эмульсии смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Реэкстракт отделяли, дегазировали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 минут (центрифуга «Mini Spin Plus»), и использовали для идентификации и количественного определения цефоперазона методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»), согласно разработанной нами методике (п. 4.2.1).

Запись и обработку полученных электрофореграмм (ЭФГ) (рисунок) осуществляли с помощью программного обеспечения Эльфоран для Windows.

Фотометрические сигналы (площади пиков) использовали для построения калибровочного графика (таблица 5.18; рисунок 5.8,5.9).

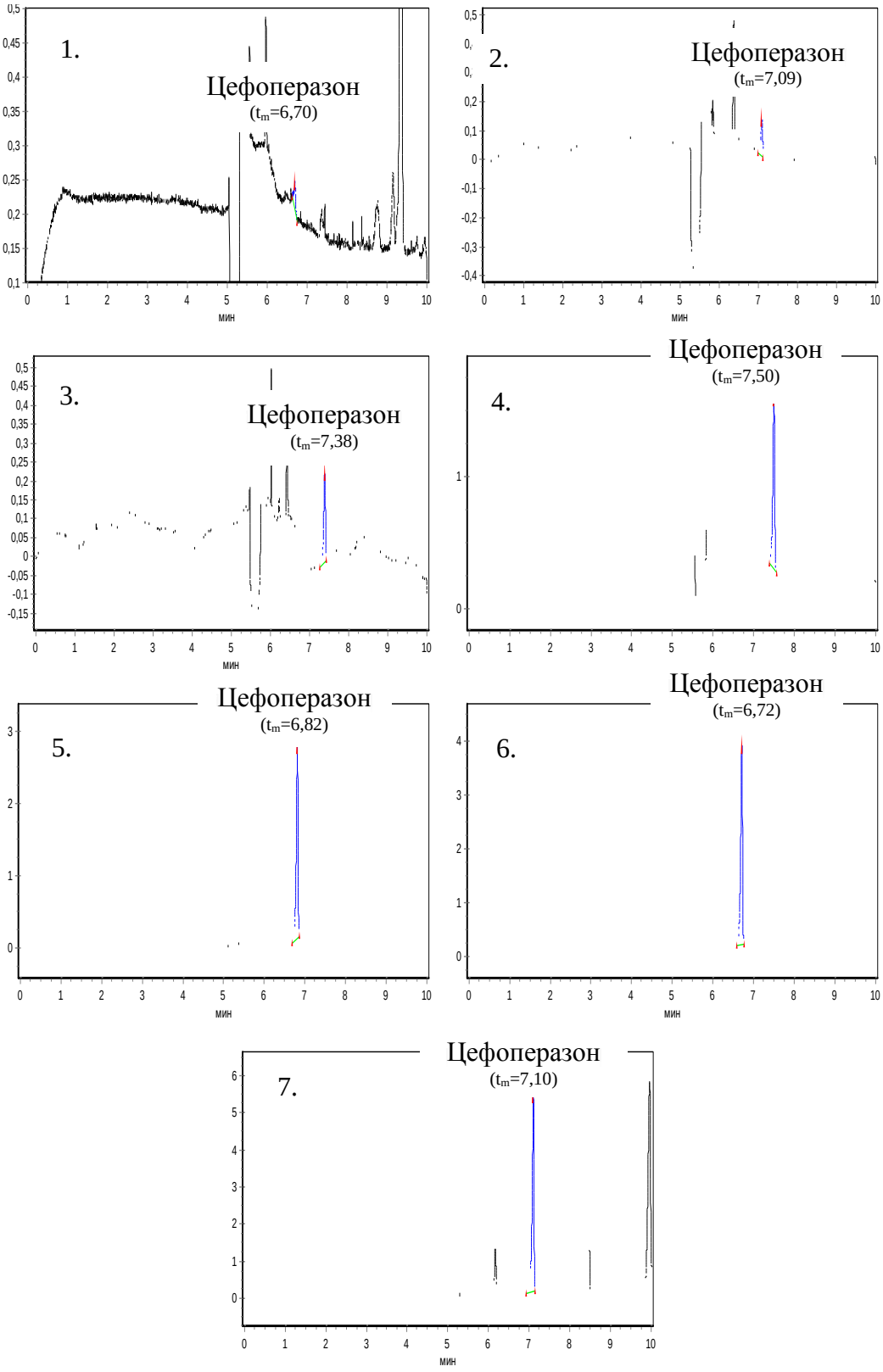


Рисунок 5.8 - ЭФГ цефоперазона в составе модельной смеси (печень 0,1 г) с концентрацией: 0,1 мкг (1); 0,5 мкг (2); 1 мкг (3); 5 мкг (4); 10 мкг (5); 15 мкг (6); 20 мкг (7) «Капель105М»

Таблица 5.18 - Зависимость величины фотометрического сигнала (площади пика) от концентрации цефоперазона в модельной смеси («Капель-105М», РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0)

№ п/п	Цефоперазон, мкг/0,1г	mAU*сек$_1$	mAU*сек$_2$	mAU*сек$_3$	mAU*сек$_{ср}$
1	0,1	0,83	0,89	0,85	0,86
2	0,5	3,87	3,95	3,93	3,92
3	1,0	7,48	7,54	7,53	7,52
4	5,0	41,65	41,82	41,71	41,73
5	10,0	76,88	77,91	77,51	77,43
6	15,0	115,29	114,25	114,57	114,70
7	20,0	159,05	157,69	158,16	158,3

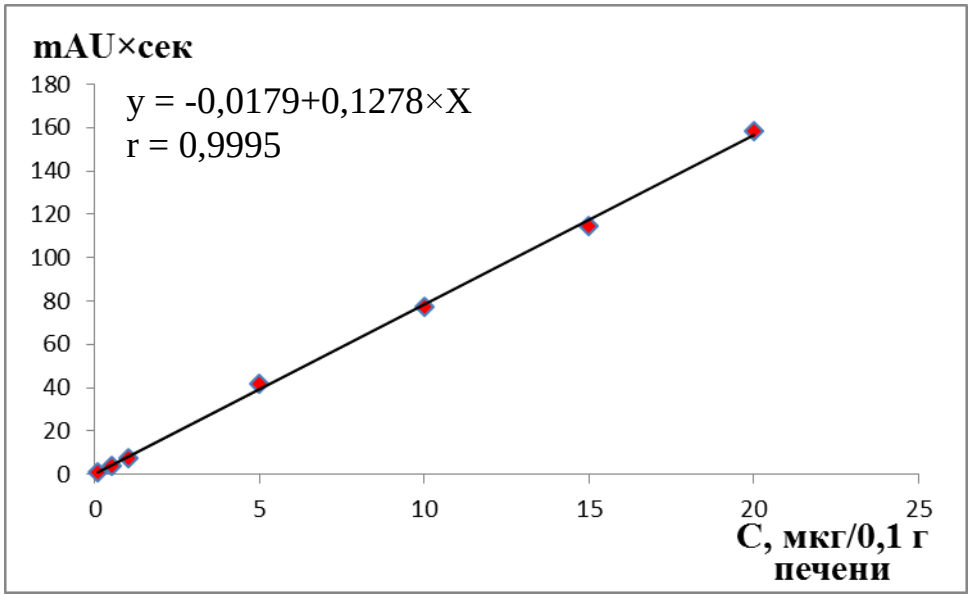


Рисунок 5.9 - Калибровочный график для количественного определения цефоперазона в тканях печени методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М»)

При этом установлено, что в диапазоне концентраций цефоперазона от 0,1 мкг/г до 20 мкг/г наблюдается линейная зависимость величины фотометрического сигнала от концентрации антибиотика и аппроксимируется уравнением y = -0,0179+0,1278×X, с коэффициентом корреляции r = 0,9995.

Отклонение концентрации калибровочных растворов, рассчитанное по уравнению линейной зависимости от фактических значений, приведено в таблице 5.19.

Таблица 5.19 - Отклонение концентрации калибровочных растворов от фактических значений

Фактическая концентрация мкг/г	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Концентрация, рассчитанная по уравнению калибровочного графика, мкг/г	0,09	0,48	0,94	5,31	9,88	14,64	20,21
ε,%	10	4	6	6,2	1,2	2,4	1,05
Норма%, не более	20	15	15	15	15	15	15

Полученные значения отклонения соответствуют нормам FDA, EMA [185, 186] (не более 20% для нижнего предела, и не более 15% для остальных точек).

Таким образом, результаты испытания (линейность) соответствуют критериям, что подтверждает пригодность методики при определении исследуемых концентраций.

Результаты количественного определения цефоперазона на четырёх уровнях концентрации и валидационные параметры методики определения (правильность, прецизионность) представлены в таблице 5.20,5.21.

Таблица 5.20 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в тканях печени (день первый)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 г печени (мкг)	Взято на печени (г)	Определено цефоперазона, мкг/0,1г	Цефоперазона в пересчёте на 1 г печени		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	20,13	201,30	100,65	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 200,60 ± 1,00 SD = 0,08 RSD,% = 0,41 $\bar{\varepsilon}$,% = 0,51 R,% = 0,30
2			19,97	199,70	99,85	
3			20,08	200,80	100,40	
4	100,0	0,1	9,94	99,40	99,40	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 99,83 ± 1,50 SD = 1,21 RSD,% = 1,21 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,51 R,% = 0,17
5			9,89	98,90	98,90	
6			10,12	101,2	101,20	
7	10,0	0,1	0,94	9,40	94,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,47 ± 1,44 SD = 0,12 RSD,% = 1,22 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,52 R,% = 5,30
8			0,96	9,60	96,00	
9			0,94	9,40	94,00	
10	1,0	0,1	0,094	0,94	94,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,94 ± 0,04 SD = 0,04 RSD,% = 3,72 $\bar{\varepsilon}$,% = 4,63 R,% = 6,00
11			0,091	0,91	91,00	
12			0,098	0,98	98,00	

Таблица 5.21 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в тканях печени (день второй)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 г печени (мкг)	Взято на анализ печени (г)	Определено цефоперазона, мкг/0,1г	Цефоперазона в пересчёте на 1г печени		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	20,18	201,80	100,90	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 200,57 ± 1,40 SD = 1,12 RSD,% = 0,56 $\bar{\varepsilon}$,% = 0,70 R,% = 0,29
2			20,03	200,30	100,15	
3			19,96	199,60	99,80	
4	100,0	0,1	9,85	98,50	98,50	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 99,20 ± 1,20 SD = 0,96 RSD,% = 0,97 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,21 R,% = 0,8
5			9,88	98,80	98,80	
6			10,03	100,30	100,30	
7	10,0	0,1	0,98	9,80	98,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,90 ± 0,69 SD = 0,56 RSD,% = 5,62 $\bar{\varepsilon}$,% = 6,99 R,% = 1,00
8			1,05	10,50	105,00	
9			0,94	9,40	94,00	
10	1,0	0,1	0,092	0,92	92,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,98 ± 0,07 SD = 0,06 RSD,% = 6,17 $\bar{\varepsilon}$,% = 7,67 R,% = 2,00
11			0,104	1,04	104,00	
12			0,097	0,97	97,00	

Полученные результаты показывают, что величины стандартного (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD,%) соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20% для минимальной концентрации, не более 15% для остальных). При этом нижний предел определения и обнаружения цефоперазона составил 0,1 мкг антибиотика в 0,1 г печени.

Выводы по главе 5

1. Разработаны экспрессные методики пробоподготовки, идентификации и количественного определения цефоперазона в биологических объектах (моча, кровь, печень) на базе отечественной электрофоретической системы («Капель – 105М»). При этом, предложенные условия экстрагирования цефоперазона из биологических объектов, дополнительного концентрирования антибиотика непосредственно в капилляре (приём «стекинга»), позволили уменьшить объём биологических жидкостей (до 0,1мл) и веса ткани (до 0,1г).

2. Проведена сравнительная характеристика методик экстрагирования цефоперазона из ткани печени. Показано, что наибольшая степень экстрагирования цефоперазона наблюдается при использовании в качестве экстрагента – водного раствора натрия гидроксида, pH 9,0 (65,60%, при внесении 20 мкг вещества в 0,1г печени).

3. Методики идентификации и количественного определения цефоперазона в моче, плазме крови, печени являются доступными, специфичными и валидными по критериям сходимости, правильности результатов измерений в пределах рекомендуемых аналитических областей. Нижняя граница обнаружения и определения цефоперазона составляет 0,1 мкг вещества в 0,1 мл мочи (плазмы крови) и в 0,1г печени.

Глава 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ, И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФОПЕРАЗОНА В КЛИНИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ (ТКАНЯХ ОПЕРАЦИОННОГО ПОЛЯ) МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Среди актуальных вопросов плановой абдоминальной хирургии одно из ведущих мест занимает профилактика раневой инфекции [28, 19]. Перечень хирургических вмешательств, которые выполняются на органах брюшной полости, обширен. При этом довольно часто проводят оперативное лечение грыжи передней брюшной стенки [7, 114, 243, 196, 144, 157, 171].

В качестве современной методики грыжесечения фигурирует эндопротезирование с использованием сетчатого материала, изготовленного из синтетических тканей. В результате внедряемый в ткани брюшной стенки аллопластический материал, являясь инородным телом, поддерживает и усиливает воспалительную реакцию. По понятным причинам это существенно повышает риск развития инфекционно-воспалительных осложнений со стороны раны. Именно это обстоятельство определяет необходимость проведения мероприятий, направленных на их профилактику [27, 35, 47, 50, 56, 67, 69].

На протяжении ряда десятилетий наиболее популярным методом предупреждения раневой инфекции является использование антибактериальных средств, включая антибиотики [32, 90]. Примечательно, что в настоящее время клиницисты считают обязательным проведение так называемой периоперационной антибиотикопрофилактики, эффективность которой зависит от многих обстоятельств. Среди них определяющее значение имеют фармакокинетические особенности применяемого антибактериального средства. К сожалению, в этом отношении в качестве единственного регламентирующего документа служит инструкция по применению препарата. Она составляет основу для определения режимов дозиро-

вания, когда базовым ориентирующим фактом становится период полувыведения антибиотика и время достижения максимальной его концентрации в крови [96, 100, 149].С практических позиций более важной являются сведения о содержании практикуемого антибиотика в тканях раневой зоны [55]. В клинических условиях подобные исследования не проводятся, главным образом, в силу отсутствия доступных в плане технической реализации, чувствительных и точных методик, которые позволили бы учитывать особенности фармакокинетики и фармакодинамики антибиотика и должным образом корригировать действия, направленные на рационализацию превентивных мер [52]. В связи с этим разработанные нами экспрессные методики определения, в частности, цефоперазона в биологических объектах позволили решить сложную задачу, связанную с научно обоснованной и доказательной оптимизацией использования антибактериальных средств для профилактики раневой инфекции [46].

Исследование проводилось на базе ГБКУЗ ЯО «Городская больница им. Н.А. Семашко», г. Ярославль, совместно с сотрудниками кафедры общей хирургии Ярославского государственного медицинского университета (заведующий – д.м.н., профессор Ларичев А.Б.). Больным, которые планово оперированы по поводу грыжи живота, однократно внутривенно вводили 1 г цефоперазона за 20 минут до начала вмешательства. Отбор тканей из зоны хирургической операции и биологических жидкостей (кровь и моча) осуществляли через определённые промежутки времени. Исследуемая навеска не превышала 0,1 г ткани и 0,1 мл жидкости. Последующую пробоподготовку, идентификацию и количественное определение проводили в условиях межкафедральной лаборатории аналитических методов исследования согласно методикам, разработанным на модельных биологических смесях.

6.1. Идентификация антибиотика в тканях операционного поля

Идентификацию цефоперазона, выделенного из биологических жидкостей и тканей зоны оперативного вмешательства через 20 минут после внут-

ривенного введения 1 г антибиотика, осуществляли на электрофореграмме по времени миграции аналита (t_m) в минутах (рис. 6.1 – 6.7).

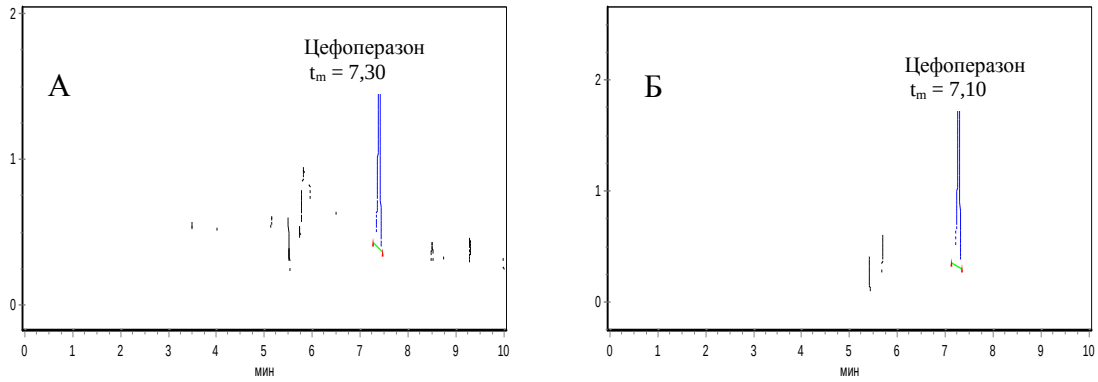


Рис. 6.1. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного
(А) из крови через 20 мин после в/в введения 1 г препарата
(Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

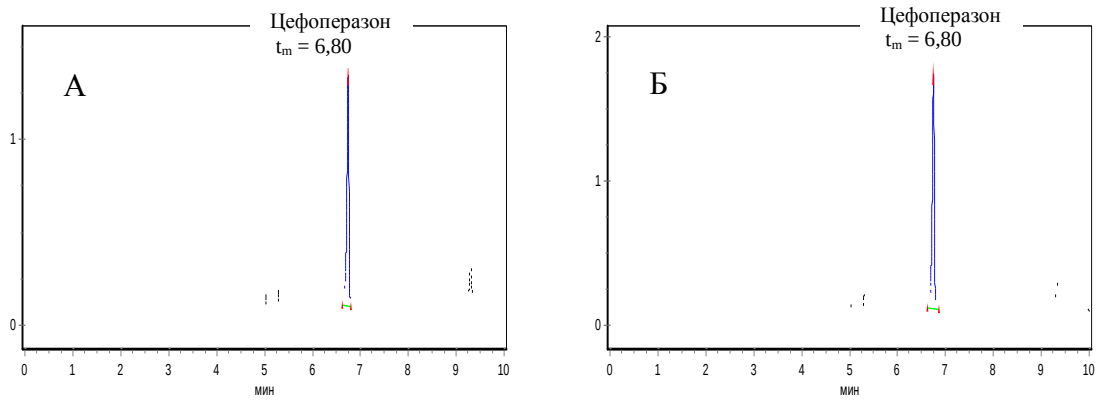


Рис. 6.2. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного
(А) из мочи через 20 мин после в/в введения 1 г препарата
(Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

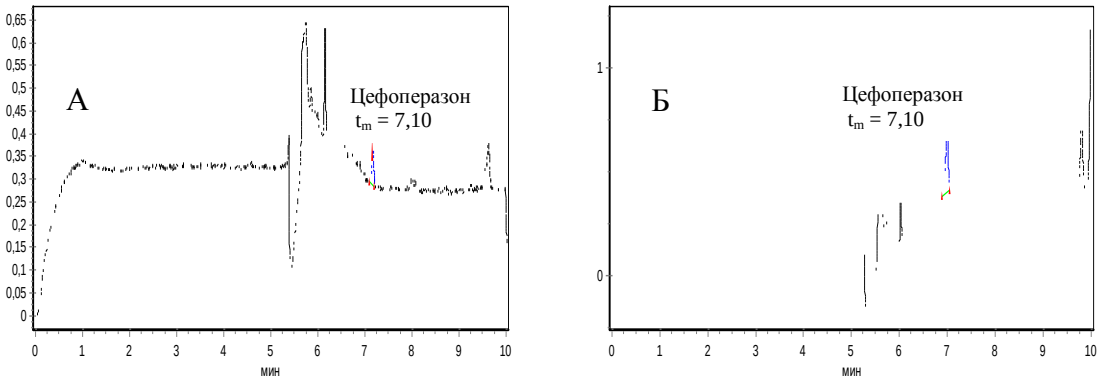


Рис. 6.3. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного (А) из подкожной клетчатки через 20 мин после в/в введения 1 г препарата (Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

Для повторного анализа тканевого извлечения добавляли 1 мкг цефоперазона, и на электрофореграмме наблюдали рост пика, который соответствует данному антибиотику.

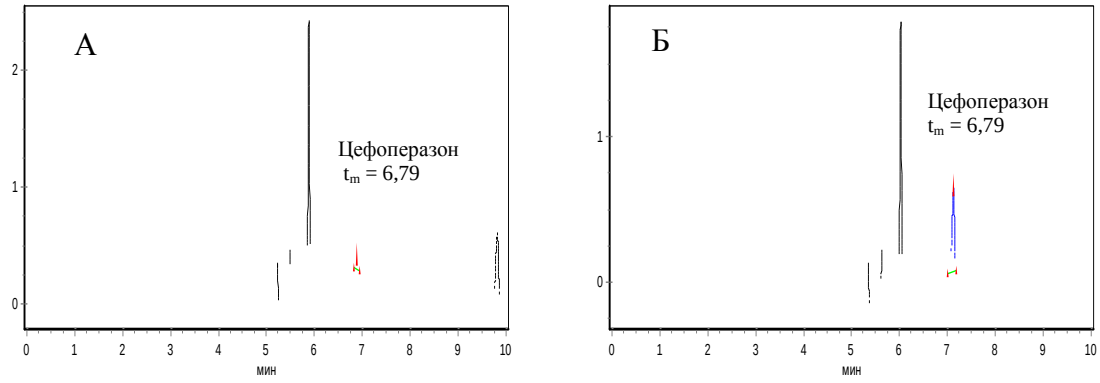


Рис. 6.4. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного (А) из мышцы через 20 мин после в/в введения 1 г препарата (Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

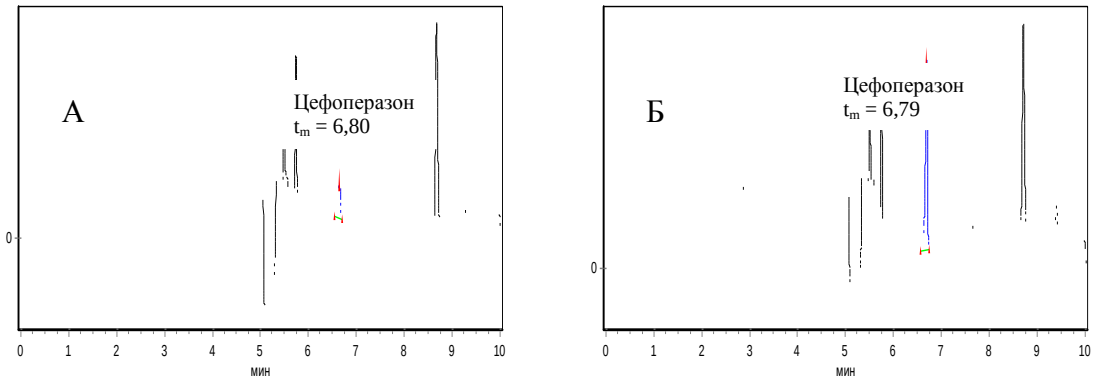


Рис. 6.5. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного
(А) из кожи через 20 мин после в/в введения 1 г препарата
(Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

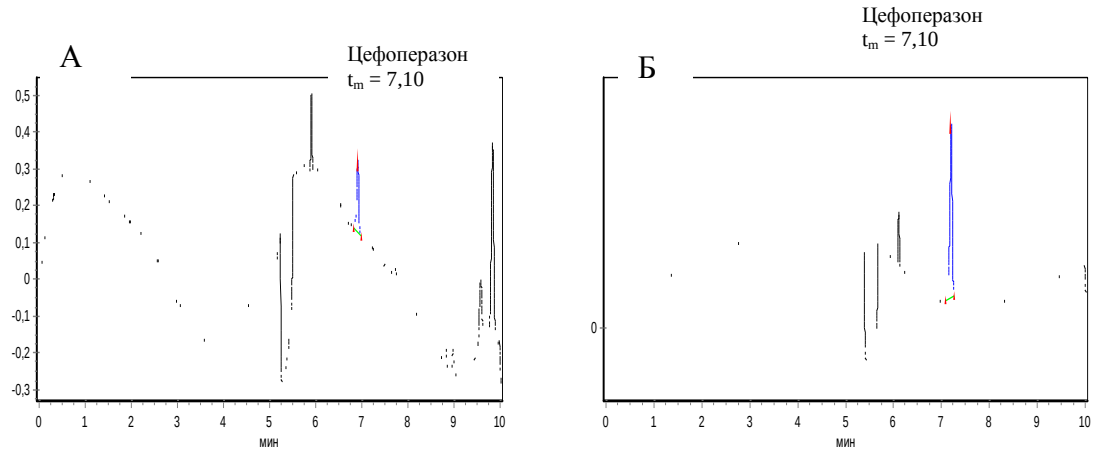


Рис. 6.6. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного
(А) из апоневроза через 20 мин после в/в введения 1 г препарата
(Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

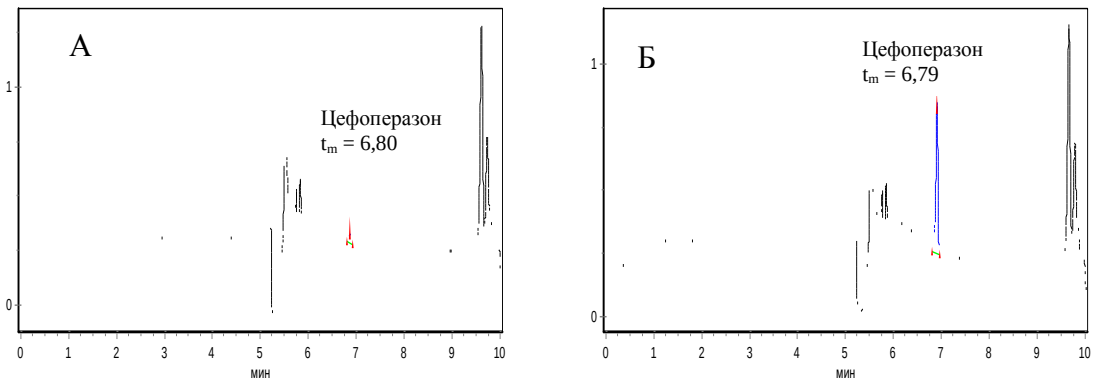


Рис. 6.7. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного
(А) из брюшины через 20 мин после в/в введения 1 г препарата
(Б) с введением в пробу 1 мкг цефоперазона – стандарта

Представленные результаты показывают, что идентификация цефоперазона осуществляется в селективных условиях. При этом исследуется минимальное количество объекта, позволяя уменьшить количество соэкстрактивных веществ в пробах, что в сочетании с приёмом стекинга при электрофорезе обеспечивает высокую чувствительность методики.

6.2. Количественное определение цефоперазона и динамика его распределения в тканях операционного поля

Количественное определение цефоперазона, содержащегося в извлечениях из клинических объектов, осуществляли по уравнению калибровочного графика (п. 4.2.1). Нами осуществлена оценка динамики изменений концентрации цефоперазона в тканях передней брюшной стенки (кожа, подкожная клетчатка, апоневроз, мышца, брюшина), крови и моче.

Как свидетельствуют наши данные, через 20 минут после введения цефоперазона его концентрация в крови составляла 3,09±0,59 мкг / 0,1 мл. В моче содержание антибиотика оказалось более высоким (в 56 раз). В свою очередь в тканях той области, где выполнялось оперативное вмешательство – грыжесечение с сетчатым эндопротезированием, распределение исследуемого антибактериального препарата было относительно равномерным и чаще носило недостоверный характер. Концентрация цефоперазона в подкожной жировой клетчатке – в пределах 2,95±0,65 мкг / 0,1 г, максимально приближалась к его содержанию в крови.

Таблица 6.1 Динамика измененияконцентрации цефоперазона в биологических объектах (в мкг / 0,1 г; x±Δx)

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 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, в остальных случаях – p>0,05

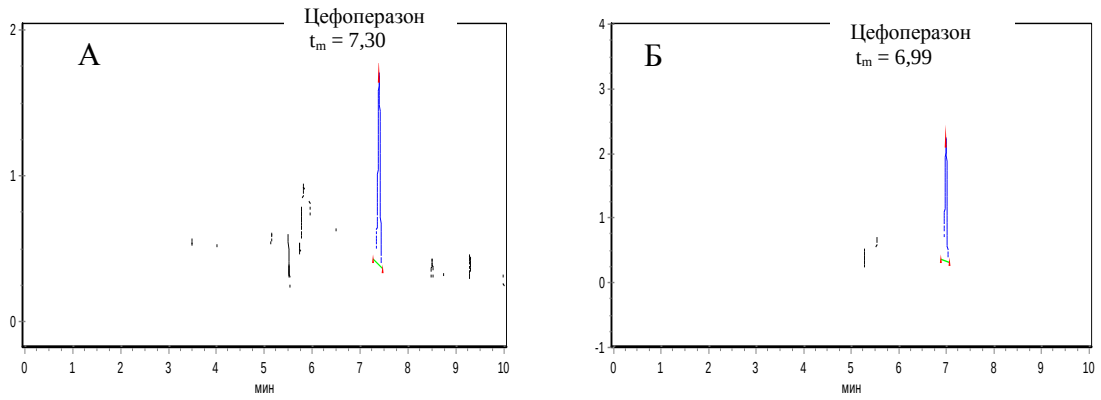


Рис. 6.8. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из крови через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 2,34±0,56 мкг / 0,1 мл (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

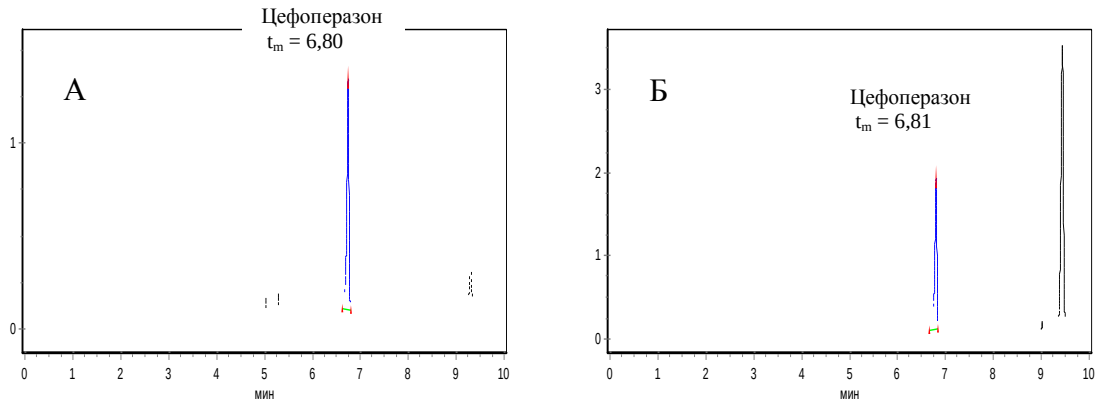


Рис. 6.9. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из мочи через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 319,4±50,16 мкг / 0,1 мл (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

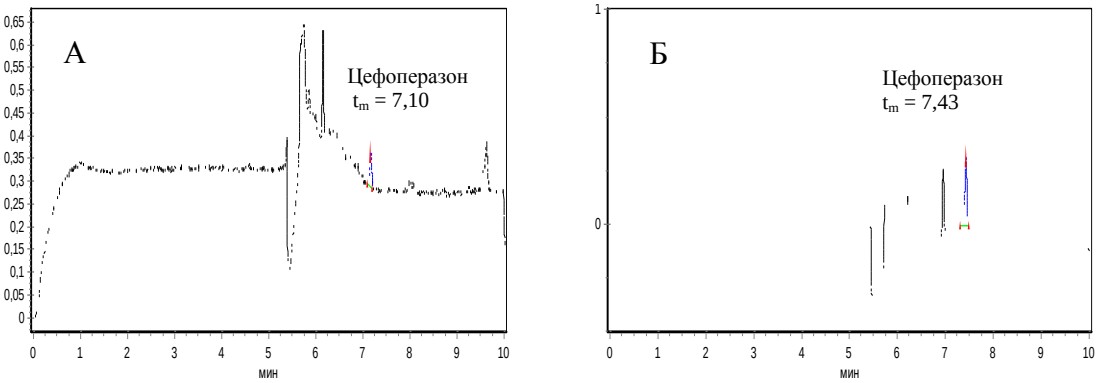


Рис. 6.10. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из клетчатки через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 2,95±0,65 мкг / 0,1 г (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

Несколько выше уровень исследуемого антибиотика отмечался в мышце, коже и апоневрозе. К тому же его значения не имели статистически значимых отличий от аналогичных гемических параметров ($p>0,05$).

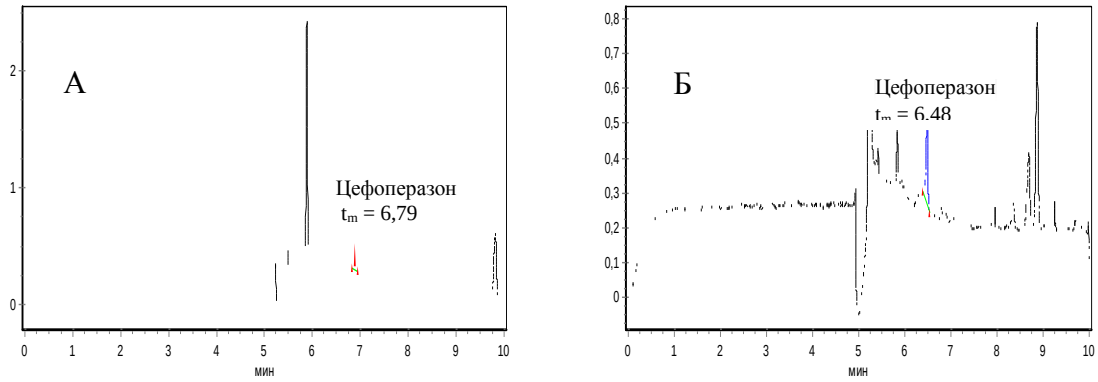


Рис. 6.11. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из мышцы через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 3,47±1,25 мкг / 0,1 г (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

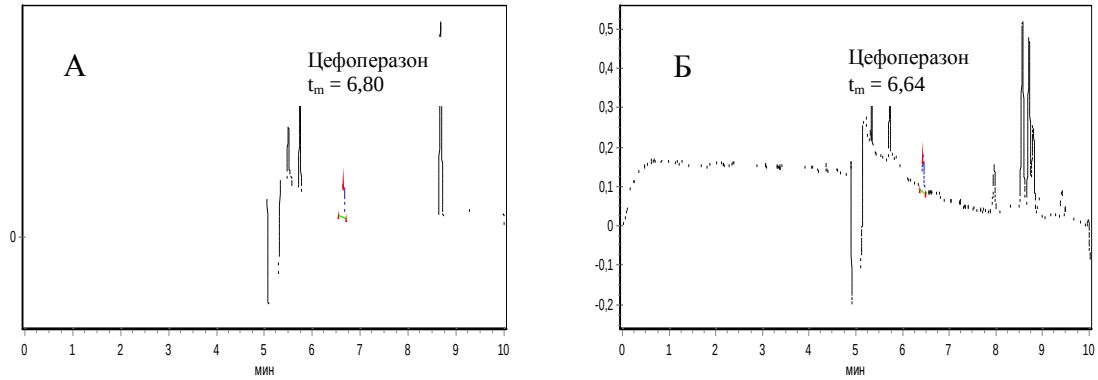


Рис. 6.12. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из кожи через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 15,31±0,75 мкг / 0,1 г (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

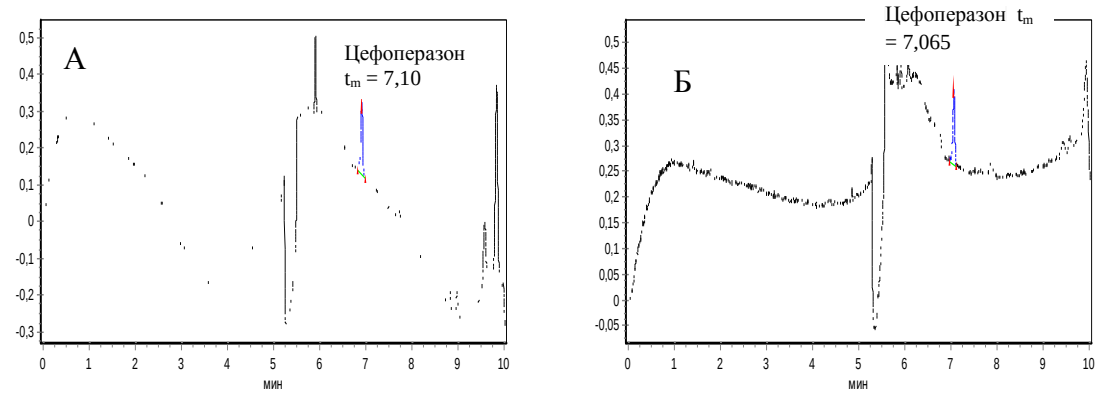


Рис. 6.13. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из апоневроза через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 28,68±4,23 мкг / 0,1 г (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

Из подобного единообразия отличительные черты имели цифровые показатели, касающиеся содержания цефоперазона в брюшине. В этом случае проникающая его способность изначально была в 2-3 раза выше – 9,96±1,48 мкг / 0,1 г ($p<0,05$), чем в других пробах тканей, взятых в начале оперативного вмешательства (табл.).

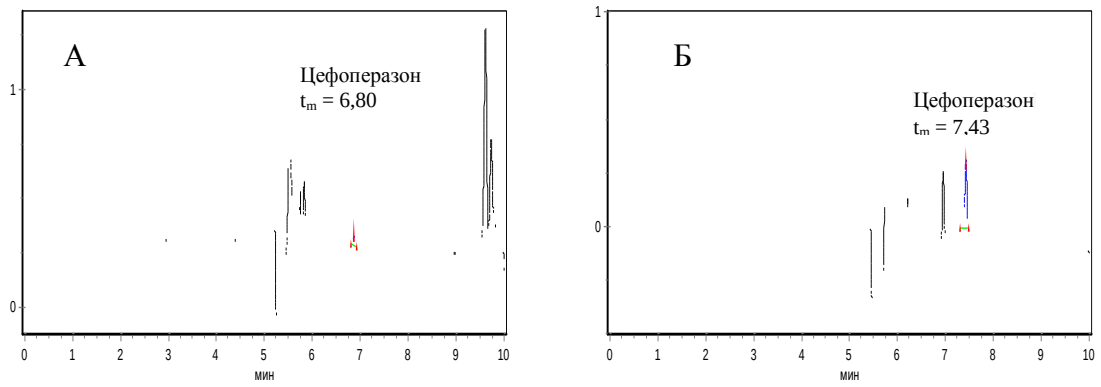


Рис. 6.14. Электрофореграммы цефоперазона, выделенного из брюшины через 20 мин. (А) и через 60 мин. – 16,74±2,46 мкг / 0,1 г (Б) после внутривенного введения 1 г препарата

На следующем этапе исследования, т.е. через 20 минут от начала операции или к 40 минуте от момента введения цефоперазона, его содержание в биологических объектах имело разную направленность. Дело в том, что в крови уровень исследуемого антибиотика снижался – до 2,63±0,34 мкг / 0,1 мл. Так же менялась концентрация цефоперазона в подкожной клетчатке, хотя она и не имела статистической значимости ($p>0,05$). В других биологических объектах её уровень, наоборот, возрастал. В апоневрозе это было лишь в виде тенденции ($p>0,05$), а в коже содержание антибиотика значимо повышалась – до 6,02±0,41 мкг / 0,1 г ($p<0,05$). Более значимые его величины определялись в мышце – в 3 раза, и в брюшине – в 2 раза (табл.).

К концу операции – на третьем этапе исследования – происходило дальнейшее сокращение содержания цефоперазона в крови, правда, не имевшее статистической достоверности ($p>0,05$). Аналогичной была и динамика концентрации антибиотика в подкожной жировой клетчатке. Как свидетельствуют наши данные, в этой ткани отмечалось наиболее устойчивое

его содержание (p>0,05). Справедливости ради стоит заметить, что оно было минимальным по сравнению с другими тканевыми структурами из зоны оперативного вмешательства. В отличие от этого концентрация цефоперазона в мышце уменьшалась трёхкратно – до 3,47±1,25 мкг / 0,1 г (p<0,05), достигая изначальных (на момент инициации оперативного вмешательства) значений. Сокращалось содержание антибиотика в брюшине, хотя и недостоверно, однако количество цефоперазона всё ещё оставалось на высоком уровне – 16,74±2,46 мкг / 0,1 г (p>0,05). На этом фоне концентрация антибиотика в моче достигала максимума – 319,4±50,16 мкг / 0,1 мл (p<0,05; табл.).

6.3. Особенности течения раневого процесса и клиническая результативность антибиотикопрофилактики

В условиях использованной в клинике методики периоперационной антибиотикопрофилактики, основу которой составляет болюсное внутривенное введение 1 г цефоперазона за 20 минут до выполнения оперативного вмешательства, у всех больных в ближайшее время после операции общее состояние из-за непродолжительности выполнения хирургического пособия оставалось удовлетворительным. В большинстве наблюдений (97%) основной жалобой была умеренная ноющая боль в области раны, которую купировали введением ненаркотических анальгетиков. У многих (88%) температуры тела соответствовала 37,1–37,3°C, у остальных пациентов она была несколько выше – 37,5–37,8°C, и нередко сопровождалась ознобом. Местно в эти сроки после оперативного вмешательства отмечалась незначительная гиперемия кожи и отёк тканей раневой зоны (92%).

На 3-5 сутки боль в ране значительно уменьшилась, позитивно менялись и другие признаки локальной реакции на воспаление. Благополучной была динамика системных проявлений воспаления, в том числе ближайшие сутки после операции число лейкоцитов в периферической крови снижалось с $[8,63\pm0,39]\times10^9$ в 1 л до $[7,57\pm0,24]\times10^9$/л с нейтрофильным

сдвигом влево до 6,11±0,8% палочкоядерных клеточных форм. В соответствии с этим уменьшался лейкоцитарный индекс интоксикации по Кальф-Калифу до 1,48±0,25, и повышалась СОЭ до 14,2±1,0 мм/час.

Подобные события завершились удовлетворительным результатом заживления раны. Осложнения встретились у 9 больных (1,95%), и большая их часть имела неинфекционный характер, в том числе гематома (3 случая – 0,65%), при лечении паховой грыжи у 3 пациентов сформировалась водянка оболочек яичка (0,65%). Только в 2 наблюдениях (0,44%) развилась так называемая серома, которую можно расценивать как имевшую отношение к воспалительному процессу в тканях раны.

Таким образом, оценивая особенности распределения в различных биологических средах цефоперазона, который используется в качестве средства периоперационной антибиотикопрофилактики при хирургическом лечении вентральной грыжи, выявляется содержание антибиотика в подкожно-жировой клетчатке, максимально приближенное к его концентрации в крови. В брюшине его количество было в 2-3 раза выше. В дальнейшем он распределяется так, что на 60 минуте исследования отмечается его снижение ($p<0,05$), и минимальная концентрация антибиотика сохраняется в клетчатке, которая, как известно, является «инкубатором» микрофлоры. Выявленный характер фармакокинетических особенностей динамики цефоперазона объясняет вероятность инфекционно-воспалительных осложнений именно в области подкожной клетчатки как в наиболее «слабом» месте раны. В то же время именно в этой ткани передней брюшной стенки его содержание наиболее устойчиво, что с высокой долей вероятности определяет хорошую клиническую результативность заживления раны, при которой развитие раневой инфекции сводится к минимуму – 0,44%. Логичен и другой вывод, в конечном счёте, можно констатировать, что разработанный метод капиллярного электрофореза позволяет объективно контролировать содержание цефоперазона в биологических объектах. Полученная же информация объясняет превентивную

ценность использования этого антибиотика в качестве средства периоперационной антибиотикопрофилактики при оперативном лечении вентральной грыжи.

Выводы по главе 6

1. Проведённые исследования показали, что применение периоперационной антибиотикопрофилактики путём болюсного внутривенного введения антибиотика цефалоспоринового ряда III поколения, позволяет минимизировать послеоперационные раневые осложнения.

2. С помощью разработанной нами методики анализа цефоперазона на базе системы для капиллярного электрофореза («Капель 105М») доказано, что внутривенно введённый за 20 минут до операции антибиотик, эффективно пенетрирует во все ткани операционного поля и определяется спустя 60 минут. Наибольшая концентрация цефоперазона определяется в коже, апоневрозе и брюшине и статистически достоверно увеличивается в течение исследованного нами временного интервала

3. 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 противоинфекционной профилактики и лечения гнойных хирургических инфекций.

ОБЩИЕ 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 расходованием 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. Разработаные 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 противоинфекционной 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».

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева, А.В. Возможности лигандообменного капиллярного электрофореза при определении биологически активных веществ / А.В.Алексеева, Л.А.Карцова // Журнал аналитической химии – 2011. – Т. 66, № 7. – С. 764-772.

2. Американская ассоциация аналитической химии Guidelines for standart method perfomans requirement. – [электронный ресурс] режим доступа lttp: www. Aoak. Org/imis 1s_prad/AOAK Does/standarts Development/come appendix. – f.pdf

3. Арзамасцев, А.П. Аверьянова, Н.С., Зрелова, Л.В. – XII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тезисы докладов [Текст]/ РЦ Фармединфо. – М.: 2005. – 846 с.

4. Арзамасцев, А.П. Валидация фармакопейных методов Ведомости научного центра экспертизы и госконтроля лекарственных средств. – 1993. - №3. – с. 28 – 31.

5. Афанасьев, Б.В. Опыт применения цефоперазона у онкологических больных после трансплантации костного мозга. Антибиотики и химиотерапия [Текст] / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаревская, А.В. Шмидт // 1992. - №37 (8).- С.14-15.

6. Беленький, Б.Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез/Б.Г. Беленький – СПб,:Наука, 2009. – 320с.

7. Белоконев В.И., Ковалёва З.В., Вавилов А.В., Пушкин С.Ю., Пономарёва Ю.В. Комплексное лечение больных с послеоперационной вентральной грыжей. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2008; 2: 42-47.

8. Биткин, И. А. Исследование доксициклина в биологических объектах методом электрофореза [Текст]: Автореф. дисс. канд. фарм. наук. – М., 2003. – 26 с.

9. Блатун, Л.В. Сульперазон при осложненном течении инфекционного процесса [Текст] // Врач. – 2002. - №4. – С.36-39.

10. Богданов, М.Б. Микробиологическая оценка эффективности аминопенициллинов, цефалоспоринов и карбопенемов в стационаре [Текст]/ М.Б. Богданов, Т.В. Черненькая // Клиническая фармакология и терапия.- 2004. Т.13. - №2. – С.42-46.

11. Богданов, М.Б. Микробиологическая оценка различий между цефалоспоринами второй и третей генерации в многопрофильном стационаре [Текст]/ М.Б. Богданов, Т.В. Черненькая// Антибиотики и химиотерапия.- 2003. Т.48. -№1. – С.27-30.

12. Богомолова, Н.С. Цефоперазон в многопрофильной хирургической клинике [Текст]/ Н.С.Богомолова, Л.К. Бронская, В.И. Сорокина // Антибиотики и химиотерапия.- 1992. - №37 т. 8. – С.6-9.

13. Бойков, С.Г., Мануйлов, К.К., Цинзерлинг, В.Ф. Клинической, микробиологическое и фармакологической исследование цефоперазона у новорожденных - Всесоюзная конференция "Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций" [Текст]/ Тезисы докладов// РЦ Фармединфо. - М.: 1991. – С.68-70.

14. Большаков, Л.В. Цефоперазон в многопрофильной хирургической практике [Текст]/ Л.В. Большаков, Л.Н. Виноградова, В.И. Сорокина// [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1994. - №8 т.37. – С.6-9.

15. Вергейчик, Т.Х. Определение 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-ДУ) в объектах токсикологического анализа [Текст] / Т.Х. Вергейчик, Е.А. Грязнова // Сборн. труд. V Всесоюзн. конферен. суд. медиков. – Ленинград: Медицина, 1969 – С. 52.

16. Весторaль, Н.И. Электрофорез и его применение в медицине [Текст] // Аптечное дело. – 1996. - № 1. – С. 80-86.

17. Волощук, А.М. Руководство по капиллярному элктрофорезу /под ред. А.М. Волощука – М.:Научный совет РАН по хроматографии, 1995.-111с.

18. Волощук, А.М. Руководство по капиллярному элктрофорезу [Текст]: практическое руководство / М., 1996. – 231 с.

19. Гостищев В.К., Дибиров М.Д., Хачатрян Н.Н. и др. Новые возможности профилактики послеоперационных осложнений в абдоминальной хирургии. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2011; 5: 56-60.

20. Гостищев В.К., Евсеев М.А., Изотова Г.Н., Балабекова Х.Ш. Антибиотикопрофилактика послеоперационных раневых осложнений в абдоминальной хирургии (к обоснованию метода). Русский медицинский журнал. 2006; 4: 3.

21. ГОСТ Р-53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартинформ, 2010. – 16 с.

22. ГОСТ РИСО 5725 – 6 – 2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений, использование значений точности на практике. – М.,Гостстандарт России, 2002. – 4.6. 55с.

23. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII изд. / «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2010. - Ч. 2. - 480 с.

24. Государственная Фармакопея СССР. XI изд. [Текст]/ вып.1. – М.: Медицина.- 1987. – 336с. ISBN 5-225-00382-6

25. Давлетбаева, Л.В. Валидация аналитических методов исследования // Медицинские иммунобиологические препараты в 21 веке: разработка, производство и применение: Материалы Всероссийской конференции. 1 – Уфа, 2005. – с. – 34 - 37.

26. Давыдов Ю.А., Абрамов А.Ю., Ларичев А.Б. Вакуум-терапия в предупреждении послеоперационной раневой инфекции. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 1991; 7-8: 91.

27. Давыдов Ю.А., Абрамов А.Ю., Ларичев А.Б. Регуляция раневого процесса у больных пожилого и старческого возраста методом вакуум-терапии. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 1994; 9: 7.

28. Давыдов Ю.А., Ларичев А.Б. Вакуум-терапия и раневой процесс. Ярославль, 1995. 144 с.

29. Давыдов Ю.А., Ларичев А.Б. Вакуум-терапия ран и раневой процесс. –М.: Медицина, 1999. 160 с.

30. Деллинджер Э.П. Профилактическое применение антибиотиков. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001; 3: 260-265.

31. Дмитриева, Н.В. Цефоперазон в комбинации с метронидазолом при профилактике послеоперационных инфекционных осложнений у онкологических больных [Текст]/ Н.В. Дмитриева, И.Н. Петухова, О.М. Дронова // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. - №37 т.8. – С.11-13.

32. Доброквашин С.В., Волков Д.Е. Периоперационная антибиотикопрофилактика в хирургии. Казанский медицинский журнал. 2004; 5: 323-27.

33. Долинкин А.О. Хроматографическое и электрофоретическое определение тиоамидов-тиреостатиков на основе пиридина, пиримидина и пурина: Автореф. дис. канд. хим. наук. - Краснодар, 2010. – 18 с.

34. Евтихов, Р.М. Аспекты хирургической инфекции [Текст]/ справочник// Иваново, Мик. – 2004. Т.12. – 87с.

35. Егиев В.Н. Ненатяжная герниопластика. М: Медпрактика-М. 2002; 148 с.

36. Инструкция по применению препарата Цефоперазон.

37. Капиллярный электрофорез как метод объективной оценки артикаина при проводниковой анестезии у больных с хирургической инфекцией / А.Н.Фомин [и др.] // Матер. VII науч. - практ. конф. хирургов Федерального управления «Медбиоэкстрем». Саров, 2004. - С. 178-179.

38. Карпов, И.А. Медоцеф (цефоперазон) – антибиотик широкого спектра действия [Текст]// Рецепт. – 2000. - №5. – С. 135-136.

39. Карцева Л.А. Методы концентрирования в капиллярном электрофорезе / Карцева Л.А., Бессонова Е.А. // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, № 4. – С. 340- 351.

40. Карцева, Л.А. Влияние организованных сред на хроматографическое и электрофоретическое определение лекарственных препаратов в биологических объектах/ Л.А. Карцева, Е.Г. Стрельникова// Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, №2. – С. 172 – 179.

41. Козырев, В.Н. Клинические аспекты фармакокинетики цефоперазона [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1992. - №8 т.37. – С.3-6.

42. К объективной оценке уровня концентрации доксициклина и артикаина в клинических объектах методом электрофореза [Электронный ресурс] А.Н. Фомин [и др.] // Современные проблемы науки и образования: электронный научный журнал. - 2012. - № 4. - Режим доступа: http: // www. science-education. ru 104-6545.

43. Количественное определение рифампицина в присутствии изониазида методом капиллярного зонного электрофореза с ультрафиолетовым детектированием / Л.П.Овчаренко [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2006. - № 3. - С. 27-29.

44. Комарова, Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза / Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. - «КАПЕЛЬ» - СПб.: ООО «Веда», 2006. - 212 с.

45. Кречикова, О.И. Применение цефоперазона в клинической практике [Текст]/ О.И.Кречикова, Л.И.Якушева, А.Ю.Новикова // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. - №8т.37. – С. 19-21.

46. Крючков В.Б., Фомин А.Н., Смирнова А.В., Ларичев А.Б. Экспрессный вариант определения цефоперазона в тканях операционного поля капиллярным электрофорезом. Успехи современного естествознания. 2016; 8-0: 31-35.

47. Кукош М.В., Власов А.В., Гомозов Г.И. Профилактика ранних послеоперационных осложнений при эндопротезировании вентральных грыж. Новости хирургии. 2012; 5: 32-37.

48. Кулешов, С.Е. Сравнительная активность in vitro ампицилина, цефоперазона, их комбинаций с сульбактамом, а также других антибиотиков в

отношении анаэробных грамотрицательных микроорганизмов [Текст]/ С.Е. Кулешов, С.М. Навашин, С.В. Буданов // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. - №11 т.39. – С.10-20.

49. Лайпанов, А.Х. К определению клофелина в моче при химико-токсикологических исследованиях [Текст] / А.Х. Лайпанов, А.Н. Фомин, Л.Ю. Тихомирова // Сборн. научн. трудов Ярослав. госуд. мед. академии. – Ярославль, 1996. – Вып.2. – С.34.

50. Ларичев А.Б. Вакуум в медицинской практике. Российский медицинский журнал. 2004; 5: 54.

51. Ларичев, А.Б. Патогенетические аспекты эффективности вакуум-терапии в комплексном лечении острой хирургической инфекции мягких тканей [Текст] / А.Б. Ларичев, А.Н. Фомин, И.А. Биткин // Буковинський медичний вісник. – Чернівці, 2001. – №3. – С.153-155.

52. Ларичев А.Б. Поэзия ран, или грусть и вдохновение хирургии. Ярославль, 2009. 50 с.

53. Ларичев А.Б., Клочихин А.Л., Мовергоз С.В., Чистяков А.Л. Эффективность амбипора в комплексной профилактике раневых инфекционных осложнений после операций на верхних дыхательных путях. Российский медицинский журнал. 2005 (6): 19-23.

54. Ларичев А.Б., Лисовский А.В., Кодина Т.В. Исследование концентрации цефоперазона (цефобита) в крови и тканях экспериментальных животных и в крови хирургических больных. Вестник лимфологии. 2009; 1: 40-43.

55. Ларичев А.Б., Фомин А.Н., Хомов Ю.А., Кузьмин В.С., Джурко Ю.А. К объективной оценке уровня концентрации доксициклина и артикаина в клинических объектах методом электрофореза. Современные проблемы науки и образования. 2012; 4: 302.

56. Ларичев А.Б., Шишло В.К., Лисовский А.В., Чистяков А.Л. Возможности экзогенного монооксида азота в предупреждении

послеоперационной раневой инфекции. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2011; 7: 31-35.

57. Ларская К. С. Разработка способов анализа бутоконазола нитрата в лекарственном препарате и биологических жидкостях: Автореф. дис. канд. фарм. наук. - Пятигорск, 2012. - 23 с.

58. Ларский, Э.Г. Современные методы электрофореза [Текст] // Аптечное дело. – 1990. - № 9. – С.4-12.

59. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клиническая фармакология. М.: Медицина, 1993. Т.1. 640 с.

60. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия,1989. – 448с.

61. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: В 2т. – Т.2 – 14-е изд. - М.: Новая волна.- 2000. – 434с.

62. Мельников И.О. Разработка микрометодов анализа аминокислот, коротких пептидов и олигонуклеотидов с использованием ОФ ВЭЖХ и капиллярного электрофореза: Автореф.дис. канд. хим. наук. Москва, 2006.– 24 с.

63. Михно, В.В. Выделение и количественное определение галантамина и секуринина в судебно-химическом анализе [Текст]: Автореф. дисс. канд. фарм. наук. – Львов, 1967. – 20 с.

64. Михно, В.В. Исследование алкалоидов в судебно-химическом анализе при помощи электрофореза на бумаге [Текст] // Сборн. труд. IV Всесоюзн. конфер. судебных медиков. – Рига, 1962. – С. 536.

65. Михно, В.В. Применение электрофореза на бумаге для обнаружения пахикарпина в биологическом материале [Текст] // Матер. II науч. конфер. (Укр. науч. фарм. общество). – Запорожье, 1963. – С. 60.

66. Морзунова, Т.Г. Капиллярный электрофорез в фармацевтическом анализе (обзор)/Т.Г. Морзунова//Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – С. 39 – 52.

67. Москаленко В.И., Лисовский А.В., Ларичев А.Б., Шишло В.К. Применение монооксида азота для профилактики послеоперационных осложнений в плановой хирургии. Военно-медицинский журнал. 2009; 12: 44.

68. Назаров, А.Д. Макрокалориметрическое изучение кинетики эффекта цефалоспоринов III поколения [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1997. - №9 т.36. – С. 16-19.

69. Нарезкин Д.В., Алибегов Р.А., Игнатьев С.В., Борсуков А.В., Сергеев О.А., Маркова Я.А. Ненатяжная пластика ущемленных грыж. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2011; 1: 61-62.

70. П. Насырев [и др.] [Валидация аналитических методик // // Ремедиум – 2003. - №11. – с. 62 – 64].

71. Нашин, Ю.Д. Опыт применения сульперазона (цефоперазон/сульбактам) в комплексном лечении больных с ожоговой инфекцией [Текст]/ Ю.Д. Нашин, И.А. Гришина, Г.Н. Изотова // Антибиотики и химиотерапия. – 1995.- №5т.40. – С.38-41.

72. НД 42 – 11758 – 01 Препарат Цефоперазона натриевая соль стерильная в лекарственной форме субстанция Фирма производитель Орхид Кемикалз энд фармасьютикалз ЛТД Страна Индия.

73. НД 42 – 13025 – 04 Препарат Цефуроксим натрия Фирма производитель Бардиафарма С.п.А. Страна Италия.

74. Немченко, В.И. Профилактика и терапия цефоперазоном послеоперационных гнойных осложнений в кардиохирургии [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 2002. - №37 т.8. - С.9-11.

75. Немченко, В.И. Профилактика и лечение цефоперазоном послеоперационных гнойных осложнений в кардиохирургии [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. // 1992. - №8 т.37. – С.9-11.

76. Никитина, Л.И. Лечение цефоперазоном пневмонии у пожилых людей [Текст]/ Л.И. Никитина, П.В. Алиханов, Ю.В. Конев // Клинич. Фармакология и терапия. – 1995. - №1 т.4. – С.53-56.

77. Ныс, П.С. Физико – химические свойства 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты [Текст]/ П.С. Ныс, Э.В. Кольцова, Н.Н. Шелленберг // Антибиотики. – 1976. - №5 т.21. – С.391-396.

78. Объективная оценка концентрации артикаина методом капиллярного электрофореза у хирургических больных / А.Н.Фомин [и др.] // Достижения и проблемы клинической и экспериментальной хирургии: Матер.конф. хирургов России, посвящённой 100-летию со дня рождения проф. В.С.Семёнова. – Тверь, 2004. – С. 58-60.

79. Песахович, Л.В. 1,3,5-тринитробензол як індикатор електроосмосу і реофорезу при визначенні електрофоретичних спектрів [Текст] // Фармацивтичний журн. – 1983. – №6. – С. 64-65.

80. Песахович, Л.В. Вплив локалізації лінії старту на конфігурацію електрофоретичних спектрів [Текст] // Фармацивтичний журн. – 1986. – то №3. – С. 74-76.

81. Песахович, Л.В. Идентификация азотсодержащих оснований по ЭФС (электрофоретическим спектрам) в жидких средах и тканях человека и животных [Текст] // Компл. сб. изобр. и рац. предл. мед. ВУЗов и НИИ РСФСР. – Москва-Иваново, 1973. – С.217.

82. Песахович, Л.В. Изолирование, обнаружение и определение резерпина при исследовании биологического материала [Текст] // Сборн. труд. IV Всесоюзн. конфер. судебных медиков. – Рига, 1962. – С. 543.

83. Песахович, Л.В. Использование электрофореза на бумаге для изолирования и обнаружения резерпина и резерпиноподобных продуктов его превращения [Текст] // Сборн. труд. республиканского бюро суд.-мед. эксперт. и кафед. суд. мед. Тадж. госуд. мед. инсти-тут. – Душанбе, 1967. – Вып.9. – С. 74-78.

84. Песахович, Л.В. Резерпин в химико-токсикологическом отношении. Использование электрофореза в химико-токсикологическом анализе [Текст]: Автореф. дисс. канд. фарм. наук.– Душанбе,1963. – 18 с.

85. Песахович, Л.В. ЭФС-идентификация азотсодержащих оснований [Текст] // IV Всесоюзная конференция по аналитической химии органических веществ. – М.: Наука, 1980. – С. 124-125.

86. Песахович, Л.В. Исследование азотсодержащих оснований методом электрофореза на бумаге [Текст] / Л.В. Песахович, Г.С. Карташова, Е.Ю. Бабенышева и др. // Хим - фармац. журн. – 1984. – Т.18, №6. – С.755-756.

87. Песахович, Л.В. Определение мезидина (метаболита тримекаина) в биологических жидкостях [Текст] / Л.В. Песахович, А.Н. Фомин // Матер. межобл. кон-фер. хирургов. – Пермь, 1972. – С.401-402.

88. Песахович, Л.В. Определение тримекаина в биологических жидкостях [Текст] / Л.В. Песахович, А.Н. Фомин // Тез. докл. I научн. конфер. фармацевтов Урала и Сибири. – Тюмень, 1974. – С.17-18.

89. Пинчук, А.А. Микробиологическое обоснование применения цефалоспоринов при сепсисе [Текст]// Здоровье Украины. – 2002. - №2.- С.21-26.

90. Плешков В.Г., Голуб А.В., Москалев А.П., Галкин Д.В., Козлов Р.С. Антибактериальная профилактика и качество ее проведения в абдоминальной хирургии. Инфекции в хирургии. 2007; 2: 21.

91. Пучкова, Л.С. Применение комбинации цефоперазона с сульбактамом для лечения больных с раневой инфекцией [Текст]/ Л.С. Пучкова, А.М. Светухин, В.П. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. - №12 т.32. – С.31-34.

92. Разработка и валидация методики определения артикаина в моче капиллярным электрофорезом («Капель – 105») [электронный ресурс]/А.Н. Фомин, Ю.А. Хомов, Ю.А. Джурко// Современные проблемы науки и образования. – 2012. - №5. – Режим доступа: http://www. science – education. ru p. 105 – 6757.

93. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. -М., 2007. - С. 163 – 164.

94. Резван, С.П. Сравнительная активность in vitro ампицилина, цефоперазона, их комбинаций с сульбактамом, а также других антибиотиков в отношении анаэробных микроогранизмов [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1995. - №3 т.4. – С.25-29.

95. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. Быковского С.Н., проф., д.х.н. Василенко И.А., к.м.н. Харченко М.И., к.фарм.н. Белова А.Б., к.фарм.н. Шохина И.Е., к.п.н. Дориной Е.А. – М. Изд-во Перо, 2014, - С.216-226.

96. Самарцев В.А. Аллопластика и абдоминопластика в хирургии послеоперационных вентральных грыж. Герниология. 2008; 1: 32.

97. Сахарова, А.Е. Применение цефобида в лечении гнойного эндобронхита у детей [Текст]/ А.Е. Сахарова, Г.А. Зиновьева, Е.В. Климанская //Педиатрия. – 1991. - №3.- С.74 – 78.

98. Савко, В.Н. Фармакологические свойства и клиническое применение цефоперазона [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1998. - №12 т.35. – С.31-34.

99. Саудек, Ф. Фармакокинетика цефоперазона у здоровых добровольцев [Текст] // Чехословатская медицина. – 1986. - №9. –С.164-168.

100. Седов В.М. Сетчатые имплантанты из полинилиденфторида в лечении грыж брюшной полости. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2008; 2: 16–21.

101. Сенченко, С.П. Разработка методологических подходов анализа лекарственных средств с использованием капиллярного электрофореза: автореф. дисс. д. фарм. наук: 14.04.02./Сенченко Сергей Николаевич. – Пятигорск, 2016. – 52 с.

102. Сидоренко, С.В. Цефоперазон и другие цефалоспорины III поколения [Текст]// Антибиотики и химиотерапия.- 1992. - №10 т.37. – С.52-54.

103. Сидорова, А.А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4 – дигидроксифенилаланина

в моче и плазме крови/ А.А. Сидорова, Л.А.Карцева// Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, вып. 4. – с. 533 – 542.

104. Синопальников, А.И. Внебольничная пневмония: стандарты эмпирической антибактериальной терапии [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1999. - №5. – С.22-28.

105. Система капиллярного электрофореза. Основы метода. Аппаратура. Примеры использования систем капиллярного электрофореза «Капель – 103, 104, 105». Составитель – Комаров Н.В..- СПб.: Петрополис, - 2001. - 65с.

106. Смирнова А.В. Применение капиллярного электрофореза при исследовании бупивикаина в биологических объектах: автореф. дисс. …канд. фармац. наук: 14.04.02./Смирнова Анна Владимировна, Москва, 2014. – 25с.

107. Смолянская, А.З. Исследование in vitro активности хирургических шовных материалов, содержащих цефалоспориновые антибиотики [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1994. - №5 т.39. – С.45-48.

108. Соколова. Л.И. Определение антибиотиков цефалоспоринового ряда в биологических объектах методом обращено – фазовой ВЭЖХ [Текст]/ Л.И. Соколова, А.П. Черняев // Химико – фармацевтический журнал. – 2002. - №5 т.36. – С.39-45.

109. Соколова, Л.И. – VII конференция «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» [Текст]/ тезисы докладов // РЦ Фарминфо. – М. – 2003. – 256с.

110. Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях интенсивной терапии [Текст]/ Межведомственный совет по внутрибольничным инфекциям при РАМН и МЗ РФ// Информационное письмо. – 1998. – С. 3-7.

111. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России [Текст]/ под ред. Толмачева // 12-е изд. – М.: АстраФармСервис. – 2006. – 1632с. ISBN 978-5-9527-0133-5

112. Справочник лекарственных средств Формулярного комитета [Текст]/ под ред. Воробьева П.А.// М.: Ньюдиамед. – 2005. – 544с.

113. Страчунский, Л. С. Антибактериальная терапия [Текст]/Практическое руководство// М.: РЦ Фарммединфо. - 2000. – 87с.

114. Тимошин А.Д., Юрасов А.В., Шестаков А.Л. Хирургическое лечение паховых и послеоперационных грыж брюшной стенки. М: Триада-Х. 2003; 144 с.

115. Усов С.А., Носов В.Г. Проблема инфекционных осложнений аллопластики инцизионных грыж брюшной стенки: обзор зарубежной литературы последнего столетия. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2006; 6: 221-24.

116. Фармакология [Текст]/ учебник // под ред. Р.Н. Аляутдина. – М.: Гэотар-Мед, 2004. – 592с., ил. . ISBN 9-322-00765-8.

117. Фармакология [Текст]/ учебник // под ред. А.Д. Харкевич. – М.: Гэотар-Мед, 2000. – 664С.

118. Фармакопея США: USP29; Национальный формуляр: NF 24: в 2 т: пер. в англ. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - Т. 2. - С. 2002-2004.

119. Фармацевтическая химия [Текст]/ учебное пособие// под ред. А.П. Арзамасцева. – Гэотар-Мед, 2004. – 640с. ISBN 5-411-00632-2.

120. Фомин А.Н. Исследования по применению электрофореза на бумаге и капиллярного электрофореза при анализе азотсодержащих соединений основного характера в биологических объектах: автореф. дисс. …д-ра фарм. наук: 14.04.02/Фомин Анатолий Николаевич. – Пермь, 2012. – 43с.

121. Фомин, А.Н. К применению электрофореза на бумаге при химико-токсикологических исследованиях клофелина в биологическом материале [Текст] / А.Н. Фомин, Н.В. Кошечкина // Сборн. научн. трудов Ярослав. госуд. мед. академии. – Ярославль, 1996. – Вып.2. – С.35.

122. Фомин, А.Н. Сравнительная оценка методов изолирования клофелина из биологического материала [Текст] / А.Н. Фомин, С.Ю. Лихачева // Матер. научн. – практ. конферен. Ярослав. госуд. мед. академии. – Ярос-лавль, 1997. – С.97.

123. Фомин, А.Н. Тримекаин и его метаболит – мезидин в химико-токсикологическом отношении [Текст]: Автореф. дисс. канд. фарм. наук.– М.,1977. – 21 с.

124. Фомин А.Н. Экспрессный вариант определения доксициклина в моче методом капиллярного электрофореза [электронный ресурс]/А.Н. Фомин, Ю.А. Хомов//Современные проблемы науки и образования. – 2012. - №4. – Режим доступа: http: // www. science – education. ru/ 104 – 6464.

125. Фомин А.Н., Ларичев А.Б., Биткин И.А., Кузьмин В.С., Виноградов М.А., Губанова О.Е. Электрофорезо-спектрофотометрия доксициклина, как метод объективной оценки эффективности вакуум-терапии в комплексном лечении острой хирургической инфекции мягких тканей. Буковинський медичний вісник. Чернівці. 2001. N3. С.153-155.

126.

127. Фомина, И.П. Цефоперазон (Медоцеф) в современной терапии тяжелых форм бактериальных инфекций [Текст] // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. - №10 т.46. – С.35-41.

128. ФСП 42 – 0382588004 Цефазолин порошок для приготовления раствора для внутримышечного и внутривенного введения0,5г и 1,0г

129. ФСП 42 – 0382514304 Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного и внутривенного введения 0,5г и 1,0г.

130. ФСП 42 – 0088298102 Цефотаксима натриевая соль, порошок для приготовления раствора для инъекций 0,5г и 1,0г.

131. Хомов, Ю.А., Фомин, А.Н. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный аналитический метод (обзор литературы) [Электронный ресурс] / Ю.А. Хомов, А.Н. Фомин // Современные проблемы науки и образования: электронный научный журнал. – 2012. – № 5.- Режим доступа: http://www.scienceeducation.ru/ru/article/ view?id=6775.

132. Хомов Ю.А. Электрофорез в анализе лекарственных азотсодержащих соединений основного характера /Ю.А.Хомов, А.Н.Фомин: Монография, - Пермь: ГБОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2012. – С. 36-38 с.

133. Цвигун, Е.А. Сравнительная активность in vitro ампицилина, цефоперазона, их комбинаций с сульбактамом, и других антибиотиков в отношении стафилококков и пневмококков [Текст]/ Е.А. Цвигун, Л.Е. Ансолис, С.В. Буданов // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. - №3 т.40. – С.22-27.

134. Цверов И.А., Базаев А.В. Оценка основных способов аллопластики с целью оптимизации лечения больных с послеоперационными вентральными грыжами. Современные технологии в медицине. 2011; 2: 73-76.

135. Шмидт, А.В. Опыт применения цефоперазона у онкологических больных после трансплантации костного мозга [Текст]/ А.В. Шмидт, Т.С. Забелина, Б.В. Афанасьев //Антибиотики и химиотерапия. – 1997. - №8 т.37. – С.14-15.

136. Яковлев, В.П. Анализ 10-ти летнего применения цефоперазона в России [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1999. - №4 т.44. – с.31-34.

137. Яковлев, В.П. Клиническая фармакология комбинированного β-лактамного антибиотика – цефоперазона / сульбактама [Текст]/ В.П. Яковлев, Д.Л. Щавелев // Клиническая фармакология и терапия. – 2003. - №2. – с. 47-53.

138. Яковлев, В.П. Комбинированные антибактериальные препараты: ампициллин + сульбактам (уназин) и цефоперазон + сульбактам (сульперазон) Фармакология [Текст]/ В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // М.: Pfizer, 1997. – 162С.

139. Яковлев, В.П. Опыт применения цефобида (цефоперазона) при лечении инфекций кожи и мягких тканей [Текст]/ В.П. Яковлев, Л.А. Блатун, М.Г. Крутиков [и др.]// Антибиотики и химиотерапия. - 1994.- №2 т.39.- с.57-60.

140. Яковлев, В.П. Сульперазон – комбинированная форма цефоперазона с сульбактамом [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 1995. -№2 т.40. – с.55-71.

141. Яковлев, В.П. Цефоперазон. Антибактериальная активность, фармакокинетические свойства, клиническое применение. Фармакология [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. - 1994. - №8 т.39.- с.48-61.

142. Яковлев, С.В. Современное значение цефалоспориновых антибиотиков при лечении инфекций в стационаре [Текст]// Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – №9 т.46.- с.4-11.

143. Яковлев, С.В. Школа по антимикробным средствам для провизора [Текст]// Фармкружок: антимикробные средства. – 2001. - №2. – С.28- 33.

144. Agnew S.P., Small W.Jr., Wang E., Smith L.J., Hadad I., Dumanian G.A. Prospective measurements of intra-abdominal volume and pulmonary function after repair of massive ventral hernias with the components separation technique. Ann Surg. 2010; 251 (5): 981-8.

145. Aquoes and non-aquoes capillary electrophoresis of pharmaceutical amines / G.Annabel [et al. // Pharm.and Pharmacol. Commun. - 1998. - №4. - P. 189-192.

146. Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection / A.Zinellu[et al.] // J. Separation Science. - 2006. - Vol.29, №5. - P. 704-708.

147. Baldacci A. Analysis of lorazepam and its 3O-glucuronide in human urine by capillary electrophoresis: Evidence for the formation of two distinct diastereoisomeric glucuronides / A. Baldacci, W. Thormann // J. Separation Science. - 2006. - Vol. 29, № 1. - P.153–163.

148. Borner, K. Determination of Apalcillin and its Metabolites in Human Body Fluids by High-Pressure Liquid Chromatography [Текст]// Antimicrobial agents and chemotherapy. – Dec. 1982. - №6. – p. 949-953.

149. Bringman S., Wollert S., Osterberg J., Smedberg S., Granlund H., Fellander G. et al. One year results of a randomised controlled multi-centre study comparing Prolene and Vypro II mesh in Lichtenstein hernioplasty. Hernia 2005; 9: 233-7.

150. Bytzek1, Anna K., Hartinger, Christian G. Capillary electrophoretic methods in the development of metal-based therapeutics and diagnostics: New methodology and applications [Электронный ресурс] / Bytzek1 Anna K., Hartinger Christian G. // Electrophoresis.- 2012.- № 33.- Режим доступа: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002 /elps.201100402/epdf.

151. Capillary electrophoresis: A powerfullmicroanalitical technique for biologically active molecules //J.P.Landers [et al.] // Biotechniques. - 1993. - Vol. 14, № 1. - P. 98-111.

152. Capillary electrophoresis for pharmaceutical analysis/A.Marsh [et al.]//Methods Mol. Biol. – 2008. - Vol. 384. – p. 45 – 205.

153. Capillary electrophoresis for pharmaceutical analysis/L.A. Holland [et al.]//Pharm. Res. – 1997. - Vol. 14, №4. – p. 372 – 87.

154. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs. /A.J. Arranz [et al.] // J. Chromatography A. - 2000. - Vol. 25, №871 № 1-2. - P.399-402.

155. Chen Y. Determination of metoprolol in rabbit blood using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / Y.Chen, W.Yang, Z.Zhang // Chinese Chemical Letters. – 2011. –Vol. 22, № 3. – P. 350-353.

156. ChenY. Pharmacokinetic study of metoprolol in rabbit plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection /Y.Chen, W.Yang // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67, № 6. – С. 632- 636.

157. Choi J.J., Palaniappa N.C., Dallas K.B., Rudich T.B., Colon M.J., Divino C.M. Use of mesh during ventral hernia repair in clean-contaminated and contaminated cases: outcomes of 33,832 cases. Ann Surg. 2012; 255 (1): 176-80.

158. Christian G. Hartinger, Andrei R. Timerbaev, Bernhard K. Keppler Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: Advances and future challenges [Электронный ресурс] / Christian G. Hartinger, Andrei R. Timerbaev, Bernhard K. Keppler // Electrophoresis.- 2003.- Режим доступа: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.20 0305452/full.

159. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations / I.Velikinac [et al.] // Farmaco. – 2004. – Vol. 59, № 5. – P. 419-424.

160. Credo A. L. Optimization of the separate of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis/ A. L. Credo, M. L. Marina, J. L. Lavandera// J. of Chromatography A. - 2001. -Vol. 917, № 1-2. - P. 337-345.

161. Demainl, A.L. The β-lactam antibiotics: past, present and future [Текст]// Antonie van Leeuwenhoek/ - 1999. - №75. – p.5-19.

162. Determination of amphetamine-derived designer drugs in human urine by SPE extraction and capillary electrophoresis with mass spectrometry detection / Gianpiero Boatto [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2005. – Vol. 814, № 1. – P. 93-98.

163. Determination of bupivacaine and metabolites in rat urine using capillary electrophoresis with mass spectrometry detection / R.M.Krisko [et al.] // Electrophoresis. 2003. - Vol.24, №14. - P. 2340-2347.

164. Determination of caffeine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-mass spectrometry /U.L.Peri-Okonny [et al.] // Electrophoresis. - 2005. - Vol.26, №13. - P. 2652-2663.

165. Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization–time-of-flight mass spectrometry / Z.D.Peterson[et al.] // Journal of Chromatography B. – 2002. -Vol. 776, № 2. – P. 221-229.

166. Determination of morphine by capillary electrophoresis immunoassay in thermally reversible hydrogel-modified buffer and laser-induced fluorescence detection / X. Zhang [et al.] // Journal of Chromatography A, 2000. - Vol. 895. - № 1-2. - P. 1-7.

167. Determination of ranitidine in urine by capillary electrophoresiselectro-chemiluminescent detection / Y. Gao [et al.] // Journal of Chromatography B, 2006. - Vol. 832. - Issue 2. - P. 236–240.

168. Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection / L. Hu [et al.] // Journal of Chromatography B, 2007. - Vol. 856. - Issues 1-2. - P. 237– 251.

169. Development of a non-aqueous electrophoresis method for the simultaneous determination of tricyclic antidepressants in human serum / M. Valenzuela [et al.] // Electrophoresis. - 2009. - Vol. 30, № 6. - P. 1052-1058.

170. E.P. Dlinger/ Prophylactic antibiotics in surgery/ Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия №3, Том 3, 2001. Стр.260 – 265

171. Elstner K.E., Read J.W., Rodriguez-Acevedo O. et al. Preoperative progressive pneumoperitoneum complementing chemical component relaxation in complex ventral hernia repair. Surg Endosc. 2017; 31: 1914-22.

172. Enantiomeric separation of omeprazole and its metabolite 5-hydroxyomeprazole using non-aqueous capillary electrophoresis / J.Olsson[et al.] // Journal of Chromatography A. – 2006. –Vol. 1129, № 2. - P. 291-295.

173. Enantioselective analysis of ketamine and its metabolites in equine plasma and urine by CE with multiple isomer sulfated β-CD / R.Theurillat [et al.] // Electrophoresis. - 2007. - Vol. 28, № 15. - P. 2748-2757.

174. European Pharmacopeia – supplement 6.6 to the 6th edition. Published 1July 2009. Capillary electrophoresis.: p. 5047 – 5052.

175. Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of β-agonists / O.Anurukvorakun[et al.] // Journal of Chromatography A – 2006. – Vol. 1134, № 1–2. – P. 326-332.

176. Fan B. Determination of lamivudine (didanosine)saquinavir in human serum using capillary zone electrophoresis // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. - 2002. - №2. - P. 241-249.

177. Field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of clozapine, clozapine N-oxide, and desmethylclozapine in schizophrenics' plasma / Y.Ho[et al.] // Journal of Chromatography B. - 2004. - Vol. 809, № 1, - P. 111-116.

178. Flurer C.L. Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis// Electrophoresis. - 2003. - Vol. 24, № 22-23. - P. 4116-1427.

179. Gaetano, B. Antibiotic prescription in community paediatrics: a one year analysis of an Italian local health unit [Электронный ресурс] / B. Gaetano // Acta Medica Mediterranea.- 2010.- № 26.- Режим доступа: http://www.actamedicamediterranea.com/medica/2010/ med2010_pag-107.pdf.

180. Gámiz-Gracia L Lara FJ del Olmo Iruela M Cruces-Blanco C. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. Analytical And Bioanalytical Chemistry [Anal Bioanal Chem] 2009 Oct; Vol. 395 (4), pp. 967-86. Date of Electronic Publication: 2009 Jun 17.

181. García-Campaña AM Cruces-Blanco C del Olmo Iruela M. Trace determination of beta-lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. Journal Of Chromatography. A [J Chromatogr A] 2008 Mar 28; Vol. 1185 (2), pp. 273-80. Date of Electronic Publication: 2008 Jan 12.

182. Ghosal, S. Electrokinetic flow and dispersion in capillary electrophoresis/ S. Ghosal//Annual Review of Fluid Mechanics. – 2006. – Vol. 38. – P. 309 – 338.

183. Goldbaum L.P., Kazyak L. The determination of morfine in urine using paper ionoforesis and ultrafiolet spectrofotometric analysis [Текст] // J. Farmacol. Exper. Therap. – 1952. – v.106. – p388.

184. Gong X.Y. Determination of different classes of amines with capillary zone electrophoresis and contactless conductivity detection /X.Y.Gong, P.C.Hauser // Electrophoresis. - 2007. - Vol.27, №2. - P. 468-473.

185. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. Washington, DC. 2001.

186. Guidance on validation of bioanalytical methods (draft). London. 2009.

187. Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking / F Tagliaro [et al.] // Forensic Science International. - 1998, Vol. 92, № 2–3. – P. 201-211.

188. Heuermann M. Simultaneous enantioselective determination and quantification of dimethindene and its metabolite N-demethyl-dimethindene in human urine using cyclodextrins as chiral additives in capillary electrophoresis / M.Heuermann, G.Blaschke // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1994. –Vol. 12, № 6. – P. 753-760.

189. Highly sensitive transient isotachophoresis sample stacking coupling with capillary electrophoresis-amperometric detection for analysis of doping substances / L.Zheng [et al.] // Talanta. – 2010. – Vol. 81, № 4–5. – P. 1288-1294.

190. High-throughput capillary electrophoretic method for determination of total aminothiols in plasma and urine / P.Lochman [et al.] // Electrophoresis. 2003. - Vol. 24, № 7-8. - P. 1200-1207.

191. Horstkötter C. Stereoselective determination of ofloxacin and its metabolites in human urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection / C.Horstkötter, G.Blaschke // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 2001. –Vol. 754, № 1. – P. 169-178.

192. Hsieh Y. Analysis of ethambutol and methoxyphenamine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection / Y.Hsieh, C.Whang // Journal of Chromatography A. – 2006. –Vol. 1122, № 1–2. – P. 279-282.

193. Imran Ali. Ashanul Haque Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review [Электронный ресурс] / Imran Ali. Ashanul Haque // Biomedical Chromatography.- 2013.- Режим доступа: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.2953/full.

194. Jia YX Tian W. Determination of quinolone antibiotics in urine by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. Journal Of Separation Science [J Sep Sci] 2008 Dec; Vol. 31 (21), pp. 3765-71.

195. Kang J. Use of macrocyclic antibiotics as the chiral selectors in capillary electrophoresis. Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.) [Methods Mol Biol] 2013; Vol. 970, pp. 307-17.

196. Kingsnorth A.N. Hernia Surgery: From Guidelines to Clinical Practice. Ann R Coll Surg Engl. 2009; 91: 273-79.

197. Li J. Rapid and sensitive determination of strychnine and brucine in human urine by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking / J.Li, Y.Jiang // Biomedical Chromatography. - 2010. - Vol. 24, № 2. – P. 186–194.

198. Liu Y. Determination of enoxacin and ofloxacin by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection in biofluids and drugs and its application

to pharmacokinetics / Y.Liu, Y.Shi, Z.Liu // Biomedical Chromatography. - 2010. - Vol. 24, № 9. – P. 941–947.

199. Liu Y.Determination of quinolone antibiotics in urine by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection / Y.Liu, Y.Jia, W.Tian // J. Separation Science. – 2008. - Vol. 31, № 21. - P. 3765-3771.

200. Liu Y. Simultaneous determination of methylephedrine and pseudoephedrine in human urine by CE with electrochemiluminescence detection and its application to pharmacokeinetics / Y.Liu,Y.-M.Liu, W.Tian // Biomedical Chromatography. - 2009. - Vol. 23, № 12. – P. 1138–1144.

201. Lukša J. Determination of cimetidine in human plasma by free capillary zone electrophoresis / J.Lukša, D.Josić // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1995. –Vol. 667, № 2. – P. 321-327.

202. Marina ML. Recent advances in the analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. : Electrophoresis [Electrophoresis] 2006 Jan; Vol. 27 (1), pp. 266-82.

203. Muder, R.R. Determination of Cefaperazone Concentration in Serum and Muscle Tissue with a Versatile High-Pressure Liquid Chromatographic Method [Текст]// Antimicrobical agents and chemotherapy. – Dec. 1992. - №6. – p. 1076-1078.

204. Muder, R.R. Penetration of Cefoperazone into Surgical Wound [Текст]// Antimicrobical agents and chemotherapy. – Nov. 1994. - №4. – p.473-475.

205. Nabi, S.A. Selective separation and determination of cefalosporins by TLC on Stannic oxide layers // Acta Chromatographica. – 2004. - №14. – p. 92- 101.

206. navi by. by/article/20170123/1485184283-inogda-lekarstva-ubivaut-antibiotik-ili-anestetik-chto-stalo-prichinoy

207. On the perspectives of capillary electrophoresis modes for the determination of morphine in human plasma without sample pretreatment /S.Emara [et al.] // Biomedical Chromatography. - 2004. - Vol. 18, № 1. – P. 21–27.

208. Pajchel G., Tyski S., Adaptation of capillary electrophoresis to the determination of selected cefalosporins for injection // Jornal of Chromatography A. – May 2000. – p.27-31.

209. Pandeeswaran M. Electronic, Raman and FT-IR spectral investigations of the charge transfer interactions between ketoconazole and povidone drugs with iodine / M. Pandeeswaran, K.P. Elango // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – Vol. 72, № 4. – P. 789-795.

210. Pesek J.J. Etched chemically modified capillaries: Novel separation media for electrophoretic analyses / J.J. Pesek, M.T.Matyska // J. Separation Science. - 2004. – Vol. 27, №15-16. - P. 1285–1291.

211. Potential of capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry as diagnostic tools / K.P. Elgstoen[et al.] // Journal of Chromatography A. – 2001. –Vol. 914, № 1–2. – P. 265-275.

212. Pucci V. Determination of valproic acid (2-propylpentanoic acid) in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection / V.Pucci, R.Mandrioli, M.A.Raggi. // Electrophoresis. - 2003. - Vol. 24, №12-13. - P. 2076-2083.

213. Pucci V. Separation of antipsychotic drugs (clozapine, loxapine) and their metabolites by capillary zone electrophoresis / V.Pucci, M.Raggi, E.Kenndler // Journal of Chromatography A. – 1999. - Vol. 853, № 1–2. – P. 461-468.

214. Quantification of histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection / A.Zinellu [et al.] // J. Separation Science. - 2010. - Vol. 33, №23-24. - P. 3781-3785.

215. Quantitative bioanalysis of enantiomeric drugs using capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry / E.K.Kindt[et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2003. - Vol. 31, № 5. – P. 893-904.

216. Rapid determination of 5-fluorouracil in plasma using capillary electrophoresis / H.J.Lu [et al.] // J. Chromatogr. B. - 2003. - Vol.788, №2.-P. 291-296.

217. Rapid determination of short chain carnitines in human plasma by electrospray ionisation-ion trap mass spectrometry using capillary electrophoresis in-

strument as sampler /C.Desiderio [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2007. – Vol. 1150, № 1–2.–P. 320-326.

218. Selakca, C.M. Analysis of penicillins and cefoperazone by HPLC photolysis- electrochemical detection // J. Pharm.Biomed.Anal. – 1996. - №1. – p. 83-93.

219. Sentellas S. Chemometrics in capillary electrophoresis. Part B: Methods for data analysis / S.Sentellas, J.Saurina// J. Separation Science. - 2003. - Vol.26, №15-16. - P. 1395–1402.

220. Separation and Determination of Ephedrine and Pseudoephedrine by Combination of Flow Injection with Capillary Electrophoresis / H.Chen [et al.] // J. Chromatogr. Sci. – 2003. Vol. 41, №1. – P. 1-5.

221. Shamsi S.A. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: Recent advances to the analysis of small achiral and chiral solutes / S.A. Shamsi, B.E.Miller // Electrophoresis. - 2004. - Vol. 25, № 23-24. - P. 3927-3961.

222. Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS / CostaJ. [et al.] // Electrophoresis. - 2009. - Vol.30, №12. - P. 2238-2244.

223. Simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry using a pressurized liquid junction nanoflow interface / V.Hezinová[et al.] // Electrophoresis. 2012. - Vol.33, №4. - P. 653-660.

224. Simultaneous Determination of Penicillin and Cefoperazone Antibiotic in Serum by Gradirnt Liquid Chromatography / T. Annesley, K. Wilkerson // Clin.Chem. – 1998. - №6. – p. 908-910.

225. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis / D.Teshima [et al.] // Biomedical Chromatography. - 2004. - Vol. 18, № 1. – P. 51–54.

226. Strategies for the determination of cefazolin in plasma and microdialysis samples by short-end capillary zone electrophoresis /B.X.Mayer [et al.] // Electrophoresis. - 2003. - Vol.24, №7-8. -P. 1215-1220.

227. Suntornsuk, L. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis: a survey on recent applications/ L. Suntornsuk//Chromatogr. Sci. – 2007/ - Vol. 45 №9. – p.77 – 559.

228. Suntornsuk, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis/ L. Suntornsuk// Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 398, №1 – p. 29 – 52.

229. Taylor R.B. Determination of opiates in urine by capillary electrophoresis/ R.B. Taylor, A.S. Low, R.G. Reid // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, - 1996. - Vol. 675, № 2. - P. 213-223.

230. Taylor R.B. Heroin: liquid chromatography and capillary electrophoresis / R.B.Taylor, A.S. Low, R.G. Reid // Encyclopedia of Separation Science. – 2000. - P. 3010-3017.

231. The British Pharmacopeia Commission, The Stationery Office, Norwich, Great Britain. – 2011. – p. 154-155.

232. The importance of capillary electrophoresis, capillary electro chromatography, and ion chromatography in separations of inorganic ions / V.Pacakova [et al.] // Electrophoresis. - 2003. - Vol.24, №12-13. - P. 1883-1891.

233. Thorman, W. Progress of capillary electrophoresis in therapeutic drug monitoring and clinical and forensic toxicology // Ther. Drug Monit. – 2002. - №2. – p. 222-231.

234. Toothaker, R.D. Recent Analytical Methods for Cefalosporins in Biological Fluids // Antimicrobial agents and chemotherapy. – Aug. 1997/ - №8.- p. 1157-1163.

235. United States Pharmacopoeia, 29th revision (2008).

236. Utility of nonaqueosus capillary electrophoresis for the determination of lidocaine and its metabolites in human plasma: a comparison of UV and MS detection / M.S.Anderson [et al.] // Rapid commun. mass spectrum. – 2004. - №18. – P. 2612-2618.

237. Validation and application of capillary electrophoresis for the analysis of lidocaine in a skin tape stripping study / Z. Chik [et al.] // Biomedical Chromatography. - 2007. - Vol. 21, № 8. – P. 775–779.

238. [Validation of analytical Conference for the registration of pharmaceuticals for Humanuse Geneva. 1996. – 75p.].

239. Validation of analytical procedures: Metodology. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: htt://www fda. gov|downloads|Animal Veteri – nary|Guidance ComplianceEn – forcement| Guidanceforindustry|ИСМ052379.paf.

240. Wang L. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection / L.Wang, X.Wu, Z.Xie // J. Separation Science. - 2005. - Vol.28, №11. - P. 1143–1148.

241. Wey A.B. Capillary electrophoresis–electrospray ionization ion trap mass spectrometry for analysis and confirmation testing of morphine and related compounds in urine / A.B.Wey, W.Thormann // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. - 916, № 1–2. – P. 225-238.

242. Whitt J.T. Capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a porous junction / J.T.Whitt, M.Moini // Analytical Chemistry. - 2003. - Vol. 75, №9. - P. 2188-2191.

243. Wong S.Y., Kingsnorth A.N. Prevention and surgical management of incisional hernias. Int J Surg Invest. 2001; 3: 407–14.

244. Zhuo Huang, Andrei R. Timerbaev Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques [Электронный ресурс] / Zhuo Huang, Andrei R. Timerbaev // Journal of Chromatography A.- 2006.- Режим доступа: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305018480.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный врач ГБУЗ ЯО
«Ярославская областная клиническая
наркологическая больница»
_____А.В.Волков
23 сентября 2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика электрофореза-скрининга группы цефалоспориновых антибиотиков (цефоперазон, цефтриаксон, цефазолин, цефотаксим) в биологическом материале с помощью электрофореза на бумаге («ПВЭФ – 1»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Место внедрения: Россия, г. Ярославль, ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», главный врач А.В.Волков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий химико-токсикологической лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» М.Б.Ершов.

Результаты внедрения: предложенная методика электрофореза-скрининга цефалоспориновых антибиотиков в биологических материалах была апробирована и была признана пригодной для анализа в химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница».

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ответственный за внедрение:
Заведующий химико-токсикологической
лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская
областная клиническая наркологическая
больница» М.Б.Ершов

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный врач ГБУЗ ЯО
«Ярославская областная клиническая
наркологическая больница»
_____А.В.Волков
___10 ноября____2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в моче с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Место внедрения: Россия, г. Ярославль, ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», главный врач А.В.Волков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий химико-токсикологической лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» М.Б.Ершов.

Результаты внедрения: предложенная методика анализа цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза («Капель – 105М») была успешно апробирована и внедрена в сентябре 2016 года в химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная областная клиническая наркологическая больница». Разработанная методика анализа цефоперазона в моче может быть использована в практике химико-токсикологической лаборатории, так как является эффективной, экспрессной, обладает высокой селективностью, доступна в приборном отношении и не требует больших затрат реактивов.

Ответственный за внедрение:
Заведующий химико-токсикологической
лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская
областная клиническая
наркологическая больница» М.Б.Ершов

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный врач ГБУЗ ЯО
«Ярославская областная клиническая
наркологическая больница»
_____А.В.Волков
13 октября 2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в плазме крови с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Место внедрения: Россия, г. Ярославль, ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», главный врач А.В.Волков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий химико-токсикологической лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» М.Б.Ершов.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в плазме крови была апробирована в химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница». Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа и может быть использована в работе химико-токсикологической лаборатории, так как является эффективной, экспрессной, обладает высокой селективностью, доступна в приборном отношении и не требует больших затрат реактивов.

Ответственный за внедрение:
Заведующий химико-токсикологической
лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская
областная клиническая
наркологическая больница» М.Б.Ершов

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный врач ГБУЗ ЯО
«Ярославская областная клиническая
наркологическая больница»
__А.В.Волков
5 декабря 2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в ткани печени с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Место внедрения: Россия, г. Ярославль, ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», главный врач А.В.Волков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий химико-токсикологической лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» М.Б.Ершов.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница». Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа и может быть использована в работе химико-токсикологической лаборатории, так как является эффективной, экспрессной, обладает высокой селективностью, доступна в приборном отношении и не требует больших затрат реактивов.

Ответственный за внедрение:
Заведующий химико-токсикологической
лабораторией ГБУЗ ЯО «Ярославская
областная клиническая
наркологическая больница» М.Б.Ершов

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник ГУЗ ЯО

«Ярославское областное бюро

судебно-медицинской экспертизы»

_____Н.В.Малахов

___14 сентября____2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика электрофореза-скрининга группы цефалоспориновых антибиотиков (цефоперазон, цефтриаксон, цефазолин, цефотаксим) в биологическом материале с помощью электрофореза на бумаге («ПВЭФ – 1»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Ярославль, ГУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт Н.В.Забродина.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением Н.В.Забродина.

Результаты внедрения: предложенная методика электрофореза-скрининга цефалоспориновых антибиотиков в биологических материалах была апробирована и была признана пригодной для химико-токсикологического анализа в судебно-химическом отделении ГУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий

судебно-химическим отделением Н.В.Забродина

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник ГУЗ ЯО
«Ярославское областное бюро
судебно-медицинской экспертизы»
_____Н.В.Малахов
___13 октября____2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в моче с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Ярославль, ГУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт Н.В.Забродина.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением Н.В.Забродина.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в биологической жидкости (моче), была апробирована в судебно-химическом отделении Ярославского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна,экспрессна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением Н.В.Забродина

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник ГУЗ ЯО
«Ярославское областное бюро
судебно-медицинской экспертизы»
_____Н.В.Малахов
___10 октября____2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в плазме крови с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Ярославль, ГУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт Н.В.Забродина.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением Н.В.Забродина.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в плазме крови была апробирована в судебно-химическом отделении Ярославского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий судебно-химическим
отделением Н.В.Забродина

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник ГУЗ ЯО

«Ярославское областное бюро

судебно-медицинской экспертизы»

_____Н.В.Малахов

___10 ноября____2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в тканях печени с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВПО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Ярославль, ГУЗ ЯО «Ярославское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт Н.В.Забродина.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением Н.В.Забродина.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в судебно-химическом отделении Ярославского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением Н.В.Забродина

Начальник ГБУЗ

Владимирской области

Бюро судебно-медицинской экспертизы»

_____А.С. Семёнов

___8 февраля____2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в тканях печени с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Владимир, ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт А.В. Снятков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением А.В. Снятков.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в судебно-химическом отделении ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы» . Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением А.В Снятков

Начальник ГБУЗ

Владимирской области

Бюро судебно-медицинской экспертизы»

_____А.С. Семёнов

___8 февраля____2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в плазме крови с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Владимир, ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт А.В. Снятков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением А.В. Снятков.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в судебно-химическом отделении ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы». Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением А.В Снятков

Начальник ГБУЗ

Владимирской области

Бюро судебно-медицинской экспертизы»

_____А.С. Семёнов

___8 февраля____2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика анализа цефоперазона в моче с применением капиллярного электрофореза («Капель – 105М»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Владимир, ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт А.В. Снятков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением А.В. Снятков.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в судебно-химическом отделении ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы» . Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением А.В Снятков

Начальник ГБУЗ

Владимирской области

Бюро судебно-медицинской экспертизы»

_____А.С. Семёнов

___8 февраля____2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика электрфореза-скрининга группы цефалоспориновых антибиотиков (цефоперазон, цефтриаксон, цефазолин, цефотаксим) в биологическом материале с помощью электрофореза на бумаге («ПВЭФ – 1»).

Кем предложена: старшим лаборантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования МЗ РФ Ярославского государственного медицинского университета В.Б.Крючковым и доктором фармацевтических наук, доцентом кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ЯГМУ МЗ РФ А.Н.Фоминым

Где и кем внедрено: Россия, г. Владимир, ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы», судебно-химическое отделение, врач, судебно-медицинский эксперт А.В. Снятков.

Цель внедрения: апробация методики с последующим внедрением её в практику.

Ответственный за внедрение: заведующий судебно-химическим отделением А.В. Снятков.

Результаты внедрения: разработанная методика электрофоретического определения цефоперазона в тканях печени была апробирована в судебно-химическом отделении ГБУЗ ВО «бюро судмедэкспертизы» . Результаты апробации показали, что она обладает необходимой чувствительностью и надежностью и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методам в практике судебно-химического анализа.

Эффективность внедрения: методика доступна, имеет хорошую воспризводимость, не требует значительных затрат реактивов и может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Заведующий
судебно-химическим
отделением А.В Снятков

Проект

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО
«Химико-токсикологический анализ цефоперазона в моче капиллярным электрофорезом»

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ …… 2
ВВЕДЕНИЕ ……..…… 3
Объект исследования ……..…… 4
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ …… 4
Изолирование цефоперазона из мочи ……..……. 6
Идентификация цефоперазона методом капиллярного электрофореза ….. 8
Количественное определение цефоперазона капиллярным электрофорезом («Капель – 105М») ……..… 15
ВЫВОДЫ ……...…. 20
ЛИТЕРАТУРА ……...…. 21
Оборудование, реактивы ……...… 23

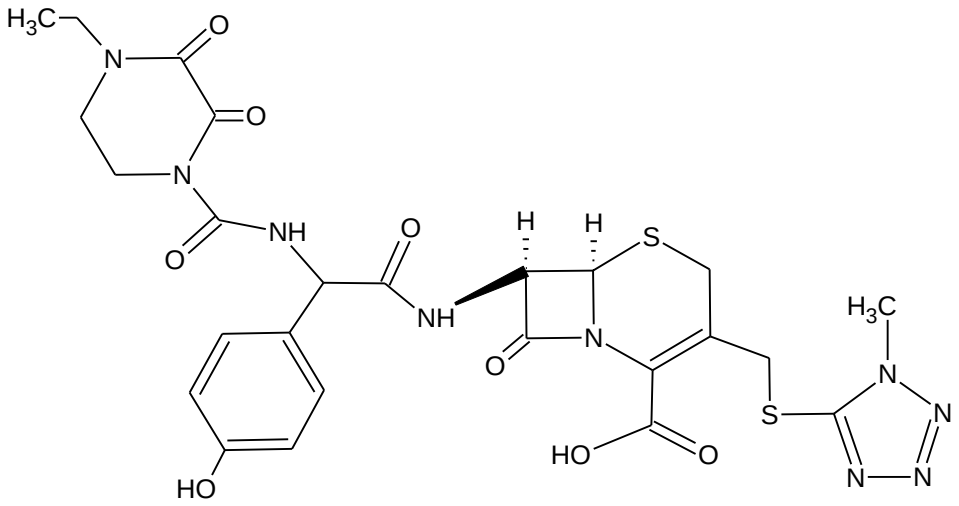
ВВЕДЕНИЕ

В современной медицинской практике находит широкое применение представитель антибиотиков цефалоспоринового ряда – цефоперазон, в том числе, при лечении заболеваний дыхательных путей, кожи, мягких тканей, суставов, а также для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений (2, 6, 8, 10, 20).

При определённых условиях (индивидуальная непереносимость, патологии внутренних органов) цефоперазон может вызывать острые отравления [24]. Решающее значение в диагностике острых отравлений приобретают результаты исследований с использованием высокочувствительных, экспрессных современных физико-химических методов. В то же время в процессе проведения эффективной антибиотикотерапии в хирургической практике, возникает необходимость в контроле за процессами распределения и экскреции антибиотика из организма. В литературе имеются отдельные сведения об использовании в анализе цефоперазона хроматографических методов (ТСХ, ВЭЖХ) (1, 7, 14, 23). Однако отсутствуют системно проработанные методы его выделения, изолирования и очистки, идентификации и количественного определения с использованием нового, эффективного электромиграционного метода – капиллярного электрофореза. Данный метод характеризуется высокой экспрессностью, чувствительностью, разделительной способностью в условиях кварцевого капилляра, и позволяет снизить объём анализируемой биологической жидкости (мочи) до 0,1 мл. Немаловажное значение имеет в современных условиях доступность приборного обеспечения для современных лабораторий. В настоящее время, эффективные сепарационные системы капиллярного электрофореза, не уступающие импортной продукции, выпускает отечественное НПО «Люмекс» («Капель – 105», «Капель – 105М»). Учитывая достоинства капиллярного электрофореза нами, предложены методики изолирования, идентификации и количественного определения цефоперазона

в моче, с использованием современной отечественной системы капиллярного электрофореза – «Капель – 105М».

Объект исследования



Цефоперазон (Cefoperazone) [6R-[6альфа,7бета(R*)]]-7-[[[[(4-Этил-2,3-диоксо-1-пиперазинил)карбонил]амино](4-гидроксифенил)ацетил]амино]-3-[[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)тио]метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота (и в виде натриевой соли).

Синонимы: Cefobid, Dardum, Lorizone, Medocef, Cefoperabol, Lorizon, Cefapizon, Цефоперазон КМП [5, 11, 12].

Цефалоспориновый антибиотик III поколения для парентерального применения. Цефоперазон натрия — белый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, плохо растворим в спирте, практически не растворим в эфире и хлороформе. Легко растворим в разбавленных минеральных кислотах и растворах щелочей. Константа диссоциации (pKa) – 5,2. Насыщенный раствор при 20°С имеет значение pH 4,5 – 6,5. Молекулярная масса 667,66 [9].

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

Капиллярный электрофорез (КЭ) является новым и развивающимся методом разделения сложных смесей, позволяющий анализировать соединения различной природы, в том числе, и лекарственные средства, с

высокой эффективностью и экспрессностью, программным обеспечением хода анализа и расчёта результатов [16, 17, 18, 19].

Важными вопросами при количественном определении лекарственных веществ в биологических объектах (в том числе и в моче) методом капиллярного электрофореза являются вопросы пробоподготовки (изолирование из объектов и концентрирование исследуемых соединений). В экстрактах из биообъектов на стадии изолирования в той или иной мере присутствуют различные эндогенные компоненты, на фоне которых затрудняется или делается невозможным детектирование искомых веществ в микрограммовых количествах. Кроме того, фотометрическое детектирование разделённых компонентов происходит непосредственно в капилляре, вследствие этого, чувствительность детекции ограничена малой длиной оптического пути, равного внутреннему диаметру капилляра.

При разработке методики количественного определения цефоперазона в моче с использованием отечественной системы капиллярного электрофореза «Капель-105М», эти проблемы решали тем, что на этапе пробоподготовки для получения в достаточной степени очищенной и сконцентрированной пробы, использовали жидкость-жидкостную экстракцию смесью органических растворителей, с последующим реэкстрагированием в рабочий электролит, разбавленный водой в 10 раз. Что позволило в процессе электрофореза в кварцевом капилляре дополнительно осуществить концентрирование пробы за счёт явления «стекинга». Концентрирование образца происходит в тот момент, когда заряженные аналиты пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора (РП) от высокой – ведущего электролита (РЭ). Заряженные аналиты внутри зоны образца двигаются с более высокой скоростью за счёт относительно более высокого электрического поля, и замедляясь на границе с зоной РЭ концентрируются. Кроме того, с учётом уменьшения объёма биологической жидкости (мочи) до 0,1 мл и введения в процесс пробоподготовки дополнительной очистки це-

фоперазона, путём его реэкстрагирования в РП, позволило в значительной степени уменьшить количество соэкстрактивных веществ и осуществить чёткую детекцию антибиотика в следовых количествах.

Изолирование цефоперазона из мочи

При разработке методики изолирования цефоперазона из мочи предварительно были изучены условия экстракции исследуемого вещества органическими растворителями из водных растворов. Впервые было изучено влияние природы органического растворителя, pH среды. В качестве экстрагентов применяли: хлороформ, смесь хлороформа и изобутанола в соотношении 3:1, эфир диэтиловый, этилацетат.

Для создания необходимого значения pH использовали универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона в диапазоне pH 1,8÷6,0. К полученному экстракту добавляли 1,0 мл буферного раствора Бриттона-Робинсона pH 9,0 разбавленного в 10 раз водой (РП) и проводили реэкстракцию («шейкер», 10 мин). Реэкстракты отбирали, центрифугировали в пробирках типа «эппендорф» в мини-центрифуге «Mini Spin plus» (10000 об/мин, 5 мин) и проводили электрофоретическое исследование на приборе «Капель – 105М» в ранее изученных условиях в целях его идентификации [4].

В результате проведённых исследований (таблица 1) установлено, что максимальное количество цефоперазона экстрагируется смесью органических растворителей (хлороформ - изобутанол 3:1) при pH 2,0.

Таблица 1 – Зависимость степени экстракции цефоперазона от pH среды и природы органического растворителя

pH среды	Цефоперазон 20 мкг/0,1мл							
	Хлороформ		Этилацетат		Эфир		Хлороформ – изобутанол, 3:1	
	Извлечено цефоперазона							
	мкг	%	мкг	%	мкг	%	мкг	%
1,8	0,11	0,56	7,26	36,28	+	-	7,50	37,52
2,0	0,07	0,35	7,44	37,20	+	-	9,65	48,23
3,0	+	-	2,83	14,16	+	-	6,75	33,75
4,0	+	-	0,75	3,74	+	-	2,93	14,66
5,0	+	-	0,1	0,50	+	-	0,54	2,69
6,0	+	-	0,1	0,50	+	-	0,19	0,95

При этом установлено, что на степень экстракции цефоперазона из водных растворов оказывает существенное влияние кратность экстрагирования и объём экстрагента. Оптимальными условиями являются:

Трёхкратная экстракция цефоперазона органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1) в объёме 1 мл и соотношении водной и органической фазы 3:10 (таблица 2).

Таблица 2 - Влияние объема экстрагента и кратности экстрагирования на степень экстракции цефоперазона из водных растворов, pH 2,0 органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1)

№ п\п	Число опытов	Количество экстрагента (мл)	Кратность экстрагирования	Цефоперазон, 20 мкг/0,1мл	
				Определено цефоперазона ($\overline{X}$, n = 2)	
				мкг	%
1.	2	0,5	1	9,90	49,70
2.	2	1,0	1	10,80	54,20
3.	2	2,0	1	7,70	38,30
4.	2	3,0	1	6,90	34,50
5.	2	4,0	1	9,20	46,20
6.	2	5,0	1	9,70	48,50
7.	2	0,5	2	10,90	54,90
8.	2	1,0	2	10,60	52,90
9.	2	0,5	3	12,30	61,50
10.	2	1,0	3	13,90	69,80
11.	2	1,0	4	11,30	56,50

На основании проведённого эксперимента нами предложены следующие условия изолирования цефоперазона из мочи.

Методика изолирования. К 0,1 мл мочи, содержащей определенное количество цефоперазона, добавляли: 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0, и подвергали экстракции органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1), (1мл х 3). Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин), органическую фазу отделяли и осуществляли реэкстрагирование 1 мл РП в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин 10 минут). Реэкстракт отделяли и осуществляли дегазацию с использованием центрифуги («Mini Spin plus», 10000 об/мин, 5 минут).

Проводили идентификацию и количественное определение цефоперазона методом капиллярного электрофореза в разработанных ранее условиях [4, 15].

Идентификация цефоперазона методом капиллярного электрофореза.

Для идентификации и количественного определения цефоперазона в реэкстракте, полученном при изолировании исследуемого вещества из мочи, использовали систему капиллярного электрофореза («Капель – 105М») [3, 4, 15].

На основании проведённых исследований оптимальными условиями электрофореза являются[3, 4, 15]:

1. Рабочий электролит (РЭ) – буферный раствор Бриттона – Робинсона pH, 9,0.

2. Растворитель пробы (РП) – РЭ, разбавленный водой очищенной в 10 раз.

3. Ввод пробы давлением 30 мБар × 15 сек.

4. Положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: + 20кВ.

5. Детектирование – встроенный УФ-фотометрический детектор 230 нм.

6. Последовательная промывка капилляра между анализами:

а) по полной схеме (перед 1-м и 4-м анализами)

0,5 н хлороводородная кислота – 10 минут, вода очищенная 10 минут, 0,5н раствор натрия гидроксида 10 минут, вода очищенная 10 минут, РЭ – 10 минут. Проведение холостого электрофореза 10 минут. Положительный электрод со стороны введения РЭ, напряжение: + 20 кВ;

б) по короткой схеме (перед 2-м и 3-м анализами):

РЭ – 10 минут. Проведение холостого электрофореза в тех же условиях как и по полной схеме.

7. Запись и обработка полученных электрофореграмм проводилась с помощью программного обеспечения «Эльфоран для Windows», 2012г.

На электрофореграммах (ЭФГ) рассчитывались электрофоретические параметры исследуемого иона (общее наблюдаемое время миграции t_m), при этом,

предварительно было установлено, что в наибольшей степени условия электрофореза цефоперазона удовлетворяют всем основным критериям приемлемости по относительному стандартному отклонению (RSD,%) площади пиков (S), времени миграции (tm), эффективности (N), асимметрии пика (As) при использовании в качестве рабочего электролита буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 9,0 (таблица 3).

Таблица 3 – Основные электрофоретические параметры цефоперазона (РЭ – смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 9,0; РЭ – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 9,0)

Цефоперазон, мкг/мл	Смесь 20 мМ раствора фосфорной кислоты и 0,2 М раствора натрия гидроксида, pH 9,0				Буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 9,0			
	S	t_m	N	As	S	t_m	N	As
10,0	83,96	4,53	126504	0,3	165,80	6,64	156576	0,4
10,0	86,10	4,60	130440	0,3	172,00	6,67	138051	0,5
10,0	82,45	4,43	108126	0,3	171,80	6,72	153684	0,5
10,0	83,13	4,42	107850	0,3	172,40	6,71	157189	0,5
10,0	88,17	4,65	119374	0,2	174,80	6,76	149849	0,5
RSD,%	2,77	2,25	8,74	15,97	1,94	0,69	5,19	9,35

При этом специфичность предложенной методики подтверждается набором электрофореграмм цефоперазона и близких по химическому строению антибиотиков (цефуроксим, цефтриаксон) (рисунок 1), статистической обработкой величин времени миграции антибиотиков

(стандартов) и их смесей (таблица 4), а также разделительной способностью смеси антибиотиков (таблица 5).

Таблица 4 - Результаты статистической обработки величин t_m цефоперазона, цефуроксима и цефтриаксона (стандартов) и в составе смеси антибиотиков

№п/п	Антибиотик стандарт, 10 мкг/мл	Метрологические характеристики	Смесь стандартов антибиотиков, по 10 мкг/мл	Метрологические характеристики
	t_m цефоперазона			
1.	6,65	$\bar{x}$ = 6,64 SD = 0,04 RSD,% = 0,60	6,64	$\bar{x}$ = 6,70 SD = 0,05 RSD,% = 0,69
2.	6,63		6,67	
3.	6,70		6,72	
4.	6,60		6,71	
5.	6,61		6,76	
	t_m цефуроксима			
1.	7,58	$\bar{x}$ = 7,51 SD = 0,06 RSD,% = 0,83	7,42	$\bar{x}$ = 7,38 SD = 0,04 RSD,% = 0,52
2.	7,43		7,36	
3.	7,46		7,32	
4.	7,52		7,38	
5.	7,55		7,40	
	t_m цефтриаксона			
1.	9,55	$\bar{x}$ = 9,57 SD = 0,04 RSD,% = 0,37	9,29	$\bar{x}$ = 9,40 SD = 0,09 RSD,% = 0,98
2.	9,59		9,34	
3.	9,52		9,43	
4.	9,61		9,42	
5.	9,56		9,53	

Таблица 5 - 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

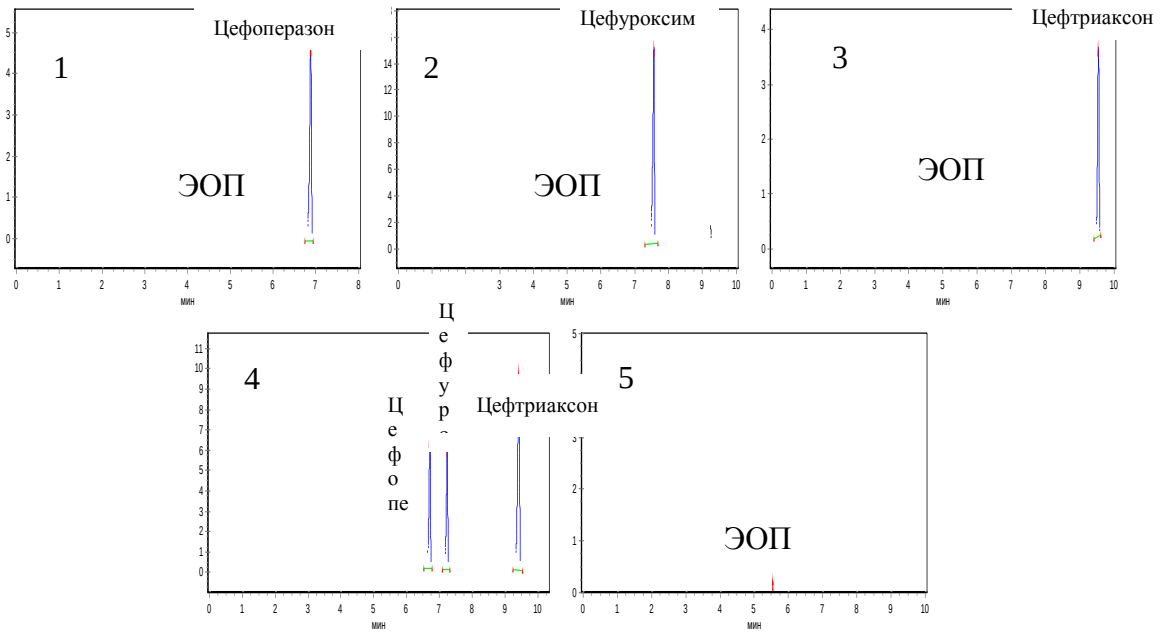


Рисунок 1 - ЭФГ стандартных растворов антибиотиков цефалоспоринового ряда: цефоперазон, 10 мкг/мл (1); цефуроксим, 10 мкг/мл (2); цефтриаксон, 10 мкг/мл (3); смеси антибиотиков (4) по 10 мкг/мл и ЭФГ растворителя пробы – (5)

Идентификация цефоперазона, изолированного из мочи, осуществлялась по времени миграции (t_m) (рисунок 2).

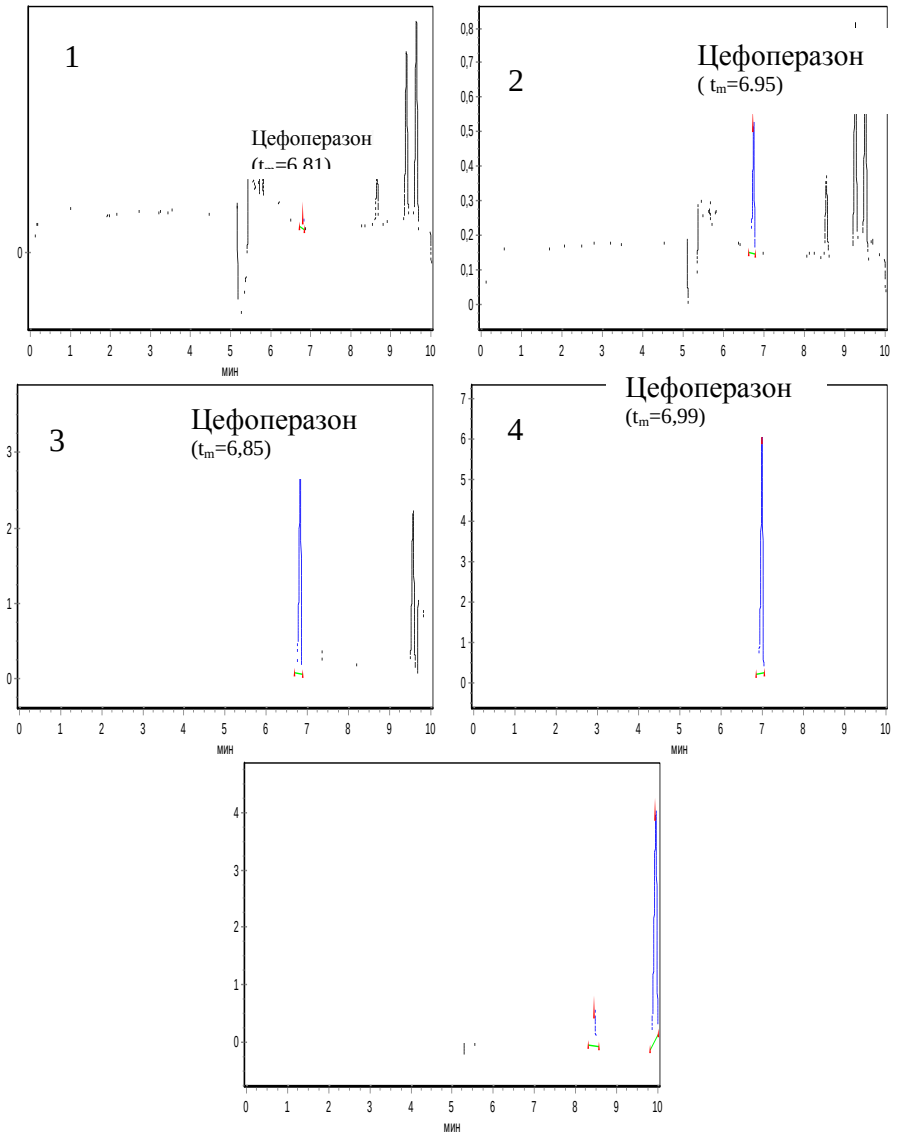


Рисунок 2 - ЭФГ цефоперазона в составе мочи: 0,1 мкг/0,1 мл (1); 1,0мкг/0,1 мл (2); 10,0 мкг/0,1 мл (3); 20,0 мкг/0,1 мл (4); ЭФГ 0,1 мл интактной мочи (5). «Капель – 105М»

При этом на ЭФГ интактной мочи (без добавления антибиотика) не наблюдается пиков, соответствующих цефоперазону по времени миграции t_m.

Валидационные характеристики методики по основным электрофоретическим параметрам (t_m, S пика, N, As) на четырёх уровнях концентрации представлены в таблице 6, показывают сходимость результатов по величинам SD и RSD%соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20% для минимальной концентрации и не более 15% для остальных уровней)[21, 22]. Предел обнаружения цефоперазона составляет 0,1 мкг антибиотика в 0,1мл мочи.

Таблица 6 - Основные электрофоретические параметры цефоперазона на ЭФГ в составе мочи на четырёх уровнях концентрации («Капель – 105М»)

№ п/п	Цефоперазона в моче, мкг/0,1мл	Ассиметрия (A_s)	Эффективность (N)	Площадь пика (S)	Время миграции (t_m)
1	2	3	4	5	6
1	20,0	0,6	158320	212,50	8,21
2	20,0	0,5	125422	195,60	8,96
3	20,0	0,4	154848	214,70	7,52
4	20,0	0,5	156647	207,50	7,29
5	20,0	0,5	130252	203,78	6,86
$\bar{x}$		0,50	145100	206,82	7,53
RSD,%		14,14	10,96	3,67	4,28
1	10,0	0,5	127536	100,90	6,82
2	10,0	0,6	110675	96,58	7,24
3	10,0	0,4	136502	103,25	7,11
4	10,0	0,6	128456	101,56	7,21
5	10,0	0,5	154861	100,23	6,85
$\bar{x}$		0,52	131610	100,50	7,05
RSD,%		16,09	12,19	2,45	2,82
1	1,0	0,7	144358	11,67	6,99
2	1,0	0,9	195142	10,62	7,42
3	1,0	0,8	142124	10,42	7,33
4	1,0	0,6	134157	11,49	6,74
5	1,0	0,9	182654	10,95	6,78
$\bar{x}$		0,78	159690	11,03	7,05
RSD,%		16,72	17,09	4,90	4,42
1	0,1	0,6	174930	1,31	6,81
2	0,1	1,4	173222	0,97	6,77
3	0,1	1,4	165041	1,29	7,19
4	0,1	1,4	142416	1,39	7,22
5	0,1	0,6	167498	1,20	7,25
$\bar{x}$		1,08	164600	1,23	7,05
RSD,%		40,57	7,93	13,21	3,36

Количественное определение цефоперазона капиллярным электрофорезом («Капель-105М»)

При разработке методики количественного определения цефоперазона в моче капиллярным электрофорезом предварительно строили график зависимости фотометрических сигналов (площади пиков) от концентрации цефоперазона в модельных смесях на 7 уровнях. Для этого готовили ряд градуировочных растворов. В 0,9 мл интактной мочи вносили 0,1 мл раствора цефоперазона, содержащего соответствующее количество вещества, для каждой концентрации. Из этого количества, после настаивания и перемешивания, отбиралась проба 0,1 мл. Пробоподготовка осуществлялась по следующей методике: к 0,1 мл мочи, содержащей определенное количество цефоперазона, добавляли: 0,2 мл буферного раствора Бриттона – Робинсона, pH 2,0, и подвергали экстракции органической системой (хлороформ – изобутанол, 3:1), (1мл х 3). Эмульсию разрушали центрифугированием (6000 об/мин), органическую фазу отделяли и осуществляли реэкстрагирование 1 мл РП в течение 10 минут. Смесь центрифугировали (6000 об/мин, 10 минут). Реэкстракт отделяли и осуществляли дегазацию с использованием центрифуги («Mini Spin plus», 10000 об/мин, 5 минут).

Запись и обработку полученных электрофореграмм (ЭФГ) осуществляли с помощью программного обеспечения «Эльфоран для Windows»2012г. Электрофореграмма цефоперазона с концентрацией 15 мкг/0,1мл мочи представлена на рисунке 3.

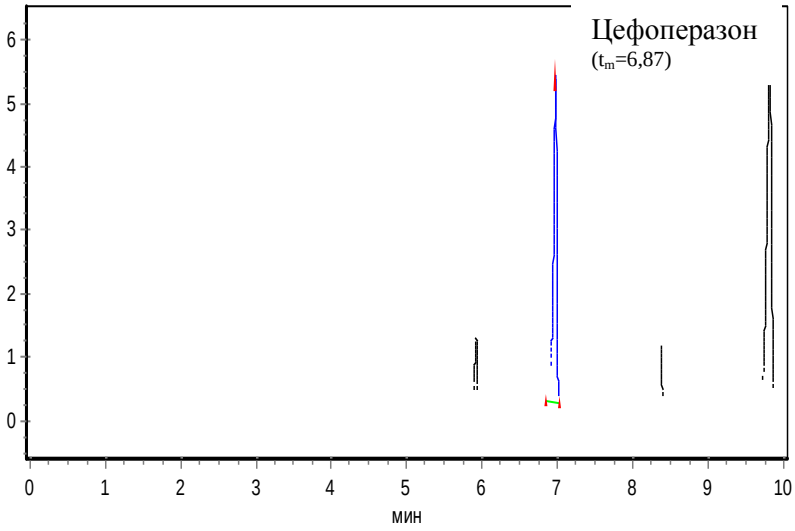


Рисунок 3 - Электрофореграмма цефоперазона (15 мкг/0,1мл мочи)

РЭ – буферный раствор Бриттона-Робинсона, pH 9,0;

Ввод пробы: давлением – 30 мбар × 15 сек;

Рабочее напряжение: + 20 кВ;

Детектирование: в УФ-области спектра при длине волны 230 нм.

(«Капель-105М»)

Линейная зависимость фотометрического сигнала от концентрации цефоперазона наблюдаемая в диапазоне концентраций от 0,1 до 20 мкг/мл была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов. Полученное уравнение имеет вид:

$$y = 0{,}0571+0{,}0967\times X$$

Критерием приемлемости линейности является и коэффициент корреляции, который составил 0,9999. Его величина близка к 1 и совокупность данных описывается прямой линией, что видно из рисунка 4.

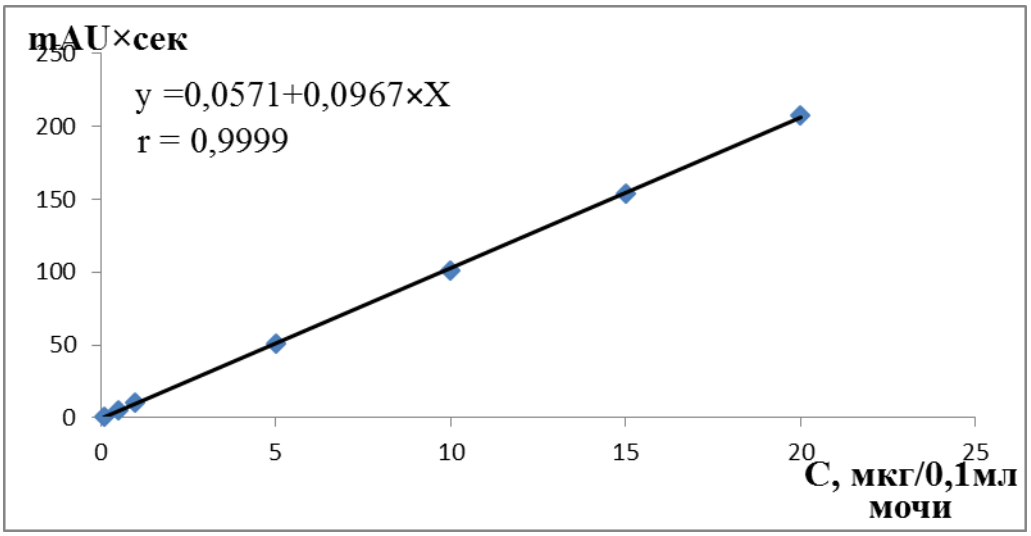


Рисунок 4 - Калибровочный график для количественного определения цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза («Капель-105М»)

Отклонения концентрации калибровочных растворов рассчитаны по уравнению калибровочного графика и приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Отклонение концентрации калибровочных растворов от фактических значений

Фактическая концентрация мкг/мл	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Концентрация, рассчитанная по уравнению калибровочного графика, мкг/мл	0,11	0,52	1,09	4,99	9,81	14,94	20,12
ε,%	10	4	9	0,2	1,9	0,4	0,6
Норма%, не более	20	15	15	15	15	15	15

Полученные отклонения соответствуют нормам FDA и EMA (не более 20% для наименьшей концентрации, и не более 15% для остальных). Таким образом, методика приемлема по критерию линейности в данном интервале концентраций и обеспечивает определение с требуемой правильностью.

Результаты количественного определения цефоперазона на 4-х уровнях концентрации и валидационные параметры методики, представленные в таблицах 8 и 9, показывают, что величины относительного стандартного отклонения (RSD%), относительной погрешности (ε%) соответствуют нормам FDA и EMA [21, 22].

Таблица 8 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в моче (день первый)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл мочи (мкг)	Взято на анализ мочи (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл мочи		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	19,48	194,80	97,40	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 199,20 ± 7,05 SD = 5,67 RSD,% = 2,85 $\bar{\varepsilon}$,% = 3,54 R,% = 0,40
2			20,56	205,60	102,80	
3			19,72	197,20	98,60	
4	100,0	0,1	9,85	98,50	98,50	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 98,33 ± 1,07 SD = 0,86 RSD,% = 0,88 $\bar{\varepsilon}$,% = 1,09 R,% = 1,67
5			9,91	99,10	99,10	
6			9,74	97,40	97,40	
7	10,0	0,1	1,02	10,20	102,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,93 ± 0,31 SD = 0,25 RSD,% = 2,53 $\bar{\varepsilon}$,% = 3,15 R,% = 0,70
8			0,99	9,90	99,00	
9			0,97	9,70	97,00	
10	1,0	0,1	0,117	1,17	117,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 1,01 ± 0,17 SD = 0,14 RSD,% = 13,47 $\bar{\varepsilon}$,% = 16,75 R,% = 2,00
11			0,092	0,92	92,00	
12			0,095	0,95	95,00	

Таблица 9 - Оценка правильности и прецизионности методики определения цефоперазона в моче (день второй)

№ п/п	Цефоперазона, в 1 мл мочи (мкг)	Взято на анализ мочи (мл)	Определено цефоперазона, мкг/0,1мл	Цефоперазона в пересчёте на 1 мл мочи		Метрологические характеристики (n = 3)
				мкг	%	
1	200,0	0,1	19,45	194,50	97,25	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 194,47 ± 1,06 SD = 0,85 RSD,% = 0,44 $\bar{\varepsilon}$,% = 0,54 R,% = 2,77
2			19,53	195,30	97,65	
3			19,36	193,60	96,80	
4	100,0	0,1	9,06	90,60	90,60	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 94,63 ± 5,04 SD = 4,05 RSD,% = 4,28 $\bar{\varepsilon}$,% = 5,32 R,% = 5,37
5			9,87	98,70	98,70	
6			9,46	94,60	94,60	
7	10,0	0,1	1,06	10,60	106,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 9,93 ± 0,73 SD = 0,59 RSD,% = 5,90 $\bar{\varepsilon}$,% = 7,33 R,% = 0,70
8			0,95	9,50	95,00	
9			0,97	9,70	97,00	
10	1,0	0,1	0,11	1,10	110,00	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 0,97 ± 0,14 SD = 0,12 RSD,% = 11,95 $\bar{\varepsilon}$,% = 14,85 R,% = 3,00
11			0,09	0,90	90,00	
12			0,09	0,90	90,00	

При этом нижний предел обнаружения и количественного определения цефоперазона в моче составляет 0,1 мкг в 0,1 мл модельной смеси.

Разработанные методики изолирования, идентификации и количественного определения цефоперазона в моче с использованием отечественной системы капиллярного электрофореза «Капель – 105М» были применены в клинике кафедры общей хирургии ЯГМУ (заведующий Ларичев А.Б. доктор медицинских наук, профессор) находящейся на базе клинической

больницы им. Семашко, г. Ярославля при проведении лабораторных анализов (биологической жидкости – мочи), взятой от оперируемых больных (n=6), которым было в/в введено 1г цефоперазона [3, 14].

Во всех случаях при анализе мочи был обнаружен цефоперазон в диапазоне концентраций от 169,8 мкг/мл и до 319,4 мкг/мл, через 20 и 60 минут после внутривенного введения 1 г цефоперазона, что подтверждает возможность использования данного объекта с целью установления факта приёма исследуемого препарата.

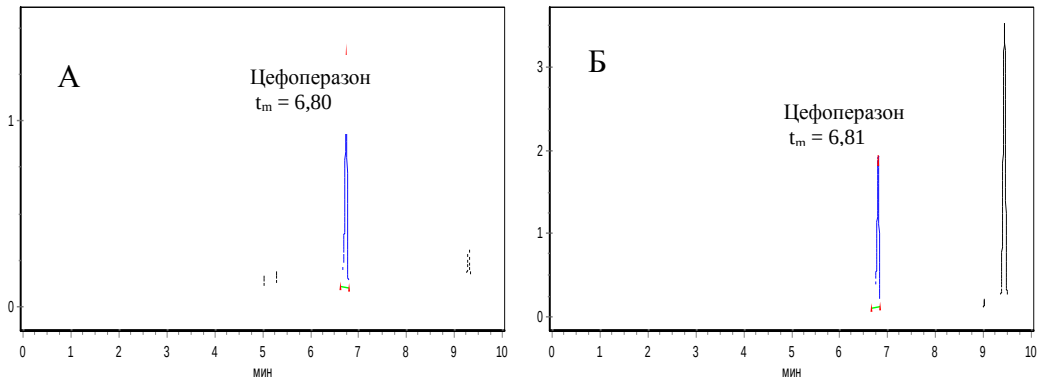


Рис 5 - ЭФГ клинического объекта (мочи), взятого от оперируемого больного через 20 (А) и 60 (Б) минут после введения препарата.

ВЫВОДЫ

Предложенные в информационном письме методики просты, и позволяют проводить изолирование, идентификацию и количественное определение цефоперазона с высокой степенью достоверности.

Они могут быть применены в практике врачами клинической лабораторной диагностики, а также бюро судебно-химической экспертизы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев, А.П. Аверьянова, Н.С., Зрелова, Л.В. – XII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тезисы докладов [Текст]/ РЦ Фармединфо. – М.: 2005. – 846 с.
2. В.К. Гостищев, М.А. Евсеева, Г.Н. Изотова, Х.Ш. Балабекова. Антибиотикопрофилактика послеоперационных раневых осложнений в абдоминальной хирургии. Регулярные выпуски «РМЖ»№4 от 23.02.2006 стр. 295.
3. Крючков В.Б., Фомин А.Н., Ларичев А.Б., Смирнова А.В. Экспрессный вариант определения цефоперазона в тканях операционного поля капиллярным электрофорезом // Успехи современного естествознания. – 2016. - №8. – С. 31 – 35.
4. Крючков В.Б., Фомин А.Н., Смирнова А.В., Каджоян Л.В. Экспрессный вариант определения цефоперазона в моче капиллярным электрофорезом // Современные проблемы науки и образования. – 2015. № 2; URL: 18http://www.science-education/ru/129-22952 (дата обращения: 05.11.2015). (№ 1816 рец.ж. перечня ВАК)
5. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: В 2т. – Т.2 – 14-е изд. - М.: Новая волна.- 2000. – 434с.
6. Нашин, Ю.Д. Опыт применения сульперазона (цефоперазон/сульбактам) в комплексном лечении больных с ожоговой инфекцией [Текст]/ Ю.Д. Нашин, И.А. Гришина, Г.Н. Изотова // Антибиотики и химиотерапия. – 1995.- №5т.40. – С.38-41.
7. НД 42 – 11758 – 01.
8. Никитина, Л.И. Лечение цефоперазоном пневмонии у пожилых людей [Текст]/ Л.И. Никитина, П.В. Алиханов, Ю.В. Конев // Клинич. Фармакология и терапия. – 1995. - №1 т.4. – С.53-56.
9. Ныс, П.С. Физико – химические свойства 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты [Текст]/ П.С. Ныс, Э.В. Кольцова, Н.Н. Шелленберг // Антибиотики. – 1976. - №5 т.21. – С.391-396.

10. Пучкова, Л.С. Применение комбинации цефоперазона с сульбактамом для лечения больных с раневой инфекцией [Текст]/ Л.С. Пучкова, А.М. Светухин, В.П. Яковлев // Антибиотики и химиотерапия. – 1994. - №12 т.32. – С.31-34.
11. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России [Текст]/ под ред. Толмачева // 12-е изд. – М.: АстраФармСервис. – 2006. – 1632с. ISBN 978-5-9527-0133-5
12. Справочник лекарственных средств Формулярного комитета [Текст]/ под ред. Воробьева П.А.// М.: Ньюдиамед. – 2005. – 544с.
13. Фармакопея США: USP29; Национальный формуляр: NF 24: в 2 т: пер. в англ. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - Т. 2. - С. 2002-2004.
14. Фомин А.Н., Крючков В.Б., Василенко Н.А. Разработка и применение электрофоретических методик экспресс-диагностики цефоперазона в биологических субстратах для мониторинга уровней концентраций в клинической лабораторной практике // 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.
15. Фомин А.Н. Крючков В.Б. Добротина С.В. К разработке оптимальных условий выделения цефоперазона из мочи.//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.
16. Хомов Ю.А. Электрофорез в анализе лекарственных азотсодержащих соединений основного характера /Ю.А.Хомов, А.Н.Фомин: Монография, - Пермь: ГБОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2012. – С. 36-38 с.

17. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs. /A.J. Arranz [et al.] // J. Chromatography A. - 2000. - Vol. 25, №871 № 1-2. - P.399-402.
18. Christian G. Hartinger, Andrei R. Timerbaev, Bernhard K. Keppler Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: Advances and future challenges [Электронный ресурс] / Christian G. Hartinger, Andrei R. Timerbaev, Bernhard K. Keppler // Electrophoresis.- 2003.- Режим доступа: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.20 0305452/full.
19. Credo A. L. Optimization of the separate of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis/ A. L. Credo, M. L. Marina, J. L. Lavandera// J. of Chromatography A. - 2001. -Vol. 917, № 1-2. - P. 337-345.
20. E.P. Dlinger/ Prophylactic antibiotics in surgery/ Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия №3, Том 3, 2001. Стр.260 – 265.
21. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. Washington, DC. 2001.
22. Guidance on validation of bioanalytical methods (draft). London. 2009.
23. Muder, R.R. Determination of Cefaperazone Concentration in Serum and Muscle Tissue with a Versatile High-Pressure Liquid Chromatographic Method [Текст]// Antimicrobical agents and chemotherapy. – Dec. 1992. - №6. – p. 1076-1078.
24. navi by. by/article/20170123/1485184283-inogda-lekarstva-ubivaut-antibiotik-ili-anestetik-chto-stalo-prichinoy

Оборудование и реактивы

Оборудование

1. Система капиллярного электрофореза «Капель – 105М» (ЗАО «Люмекс», г. Санкт-Петербург);
2. Центрифуга «ЦЛН – 16»;
3. Центрифуга «MiniSpinplus»;
4. pH метр «И – 510»;
5. Весы аналитические «AUW 120» (SHIMADZU);

Посуда

1. Колбы мерные (ГОСТ);
2. Пипетки градуированные (ГОСТ);
3. Пробирка «Эппендорф» 2, 1,5мл
4. Флаконы пенициллиновые на 20 мл.

Реактивы

1. Ацетон (осч);
2. Кислота борная (ГФ XII);
3. Кислота ортофосфорная концентрированная (ГФ XII);
4. Кислота уксусная ледяная (ГФ XII);
5. Натрия гидроксид (чда);
6. Спирт изобутиловый (чда);
7. Универсальная индикаторная бумага pH 0 – 12;
8. Хлороформ (чда);
9. Этилацетат (хч).