

УДК 543.068.8

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

© 2022 г. А. В. Тумская^а, *, И. В. Косырева^а

^аСаратовский национальный (исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского)
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: marakaeva_anastasiya@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2021 г.

После доработки 29.08.2021 г.

Принята к публикации 30.08.2021 г.

Разработаны экспресс-методики определения антибактериальных соединений группы β-лактамов амоксициллина и цефалексина на основе визуально-колориметрической и цветометрической оценки с применением камеры смартфона. В качестве индикаторной выбрана реакция нингидрина с аминогруппами антибиотиков. Оценено взаимодействие иммобилизованного нингидрина с гентамицином на поверхности твердой матрицы с помощью метода спектроскопии диффузного отражения. Исследована стабильность, а также влияние температуры и времени нагревания тест-средств на ход реакции. Получены цветовые шкалы для визуально-колориметрического определения амоксициллина и цефалексина. Построены линейные зависимости интенсивностей цветового канала Green цветовой модели RGB от логарифма концентрации антибиотика. Разработанные методики применены для анализа образцов лекарственных препаратов.

Ключевые слова: экспресс-определение, индикаторные бумаги, цветометрия, цефалексин, амоксициллин.

DOI: 10.31857/S0044450222080175

Антибиотики β-лактамного ряда (пенициллины и цефалоспорины) – одни из наиболее распространенных препаратов, обладающих широким спектром антибактериальной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2]. Цефалоспорины, подобно пенициллинам, ингибируют транспептидазу белковой молекулы, участвующей в формировании структуры клеточной мембраны патогенных бактерий. Большинство препаратов данного класса соединений входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения [3]. Объектами настоящего исследования являются β-лактамы цефалексин (**Ceph**, I поколение) и амоксициллин (**Amox**, II поколение).

Для определения антибиотиков в различных объектах (биологических средах, лекарственных препаратах, пищевых продуктах) в основном используют спектрофотометрические, хроматографические, потенциометрические и иммуноферментные методы анализа [4, 5]. Для испытания на подлинность фармакопеи России Европейская и

Британская фармакопеи рекомендуют методы ВЭЖХ- и ИК-спектроскопии.

В нашей стране существует более 150 зарубежных и отечественных аналогов препарата амоксициллина (в виде таблеток, капсул, суспензий и порошков для приготовления растворов), поэтому быстрый и дешевый скрининг лекарственных препаратов на предмет наличия фальсификатов и для оценки содержания основного вещества является актуальной задачей. Информация о тест-средствах для визуально-колориметрического и цветометрического определения амоксициллина и цефалексина в литературе отсутствует.

Цель настоящей работы состояла в разработке методики экспресс-определения амоксициллина и цефалексина с помощью индикаторных бумаг на основе иммобилизованного нингидрина. Широко распространен способ регистрации аналитического сигнала с помощью различных цифровых устройств: фото- и видеокамер, камер смартфонов [6, 7]. К преимуществам такого подхода можно отнести экономичность и простоту выполнения, возможность сохранения информации в электронном формате, а также возможность

анализа жидких и твердых образцов. В настоящем исследовании показана перспективность регистрации аналитического сигнала камерой смартфона для полуколичественного определения некоторых бета-лактамовых антибиотиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Применяли антибиотики β -лактамового ряда цефалексин и амоксициллин (Sigma Aldrich, США). Исходные растворы антибиотиков с концентрацией 8 и 16 мг/мл готовили растворением навески препарата в фосфатном буферном растворе (рН 7.4). Рабочие растворы готовили в день проведения эксперимента разбавлением исходного раствора.

Определяли содержание антибиотиков в лекарственных препаратах амоксициллина (форма выпуска – таблетки “АВВА Рус”, Россия, 250 мг) и цефалексина (форма выпуска – капсулы “Немофарм”, Сербия, 500 мг). Для приготовления раствора с концентрацией 1 мг/мл навеску препарата растворяли в 25 мл дистиллированной воды, отделяли от нерастворимых компонентов фильтрованием.

Реактивы и материалы. Спиртовой 0.05 М раствор нингидрина (Реахим, Россия) готовили растворением навески препарата в этаноле.

В качестве матрицы для создания тест-средств применяли целлюлозную бумагу (фильтры обеззоленные “синяя лента”, ТУ 2642-001-13927158-2003). Для получения индикаторных бумаг фильтр размером 5 × 5 см погружали на 3 мин в свежеприготовленный спиртовой раствор нингидрина, высушивали на воздухе. Полученная индикаторная бумага имела белый цвет.

Оборудование и методы исследования. Спектры диффузного отражения регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония), диапазон измерения 200–800 нм, прибор укомплектован приставкой зеркального отражения. Измеренные значения диффузного отражения (R) пересчитывали в функцию Гуревича–Кубелки–Мунка (F) по формуле: $F = (1 - R)^2 / (2R)$.

Спектры поглощения регистрировали на двухлучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония), диапазон измерения 200–800 нм, интервал измерения 1 нм. Использовали рН-метр рН-150МА (Россия).

Методики. Для определения оптимальной температуры проведения тест-реакции готовили серию индикаторных бумаг, на которые наносили определяемый антибиотик с концентрацией 7 мг/мл, помещали на 10 мин в сушильный шкаф (SNOL 58/350, Литва) при температуре от 60 до 110°C. Далее тест-средство помещали в бокс размером 22 × 23 × 24 см с двумя полосками светоди-

одного освещения (5 V, 1 A), фотографировали 13-мегапиксельной камерой смартфона Redmi 6A.

Цветометрическую обработку изображений тест-средств осуществляли в программе Adobe Photoshop®. Для этого часть изображения усредняли с помощью фильтра “Average” и определяли интенсивность цветовых каналов.

Интервал ненадежности и предел обнаружения определяли по методике [8]: готовили три тест-шкалы с концентрациями антибиотика от 0.1 до 1.4 мг/мл с шагом $\Delta c = 0.1$ мг/мл. Присутствие аналита визуально оценивали 15 наблюдателей ($n = 45$). Определяли вероятность обнаружения антибиотика по формуле: $P(c_i) = n_i / N_i$, где $P(c_i)$ – вероятность обнаружения антибиотика, n_i – число положительных ответов наблюдателей о появлении фиолетовой окраски тест-средства, N_i – общее число ответов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие амоксициллина и цефалексина с нингидрином на поверхности бумаги. Выбор оптимальных условий экспресс-определения. Для качественной реакции на амоксициллин и цефалексин при создании тест-средств выбрали взаимодействие антибиотиков с нингидрином (Схема 1). Нингидрин (трикетогидринденгидрат) широко применяют при определении аминов, аминокислот и тиофена [9]. Маккалдин предположил [10], что реакции нингидрина с аминами, аминокислотами и иминокислотами протекают по одному и тому же механизму с образованием дикетогидриндилиден–дикетогидриндамина или пурпура Руэманна. Схема 1 иллюстрирует предполагаемый ход реакции амоксициллина и цефалексина с нингидрином, включающий окислительное дезаминирование первичной аминогруппы с последующей конденсацией восстановленного нингидрина с образованием окрашенного продукта реакции пурпурного цвета с λ_{\max} 560–570 нм.

Для исследования реакции на поверхности твердой матрицы применяли метод спектроскопии диффузного отражения. На рис. 1 представлены спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка (F) для систем амоксициллин/цефалексин–иммобилизованный нингидрин. Как видно, в спектрах изучаемых систем появляется полоса при 410–420 нм и широкая полоса с максимумом при 560–570 нм, что согласуется с данными [11, 12] для аналогичных систем.

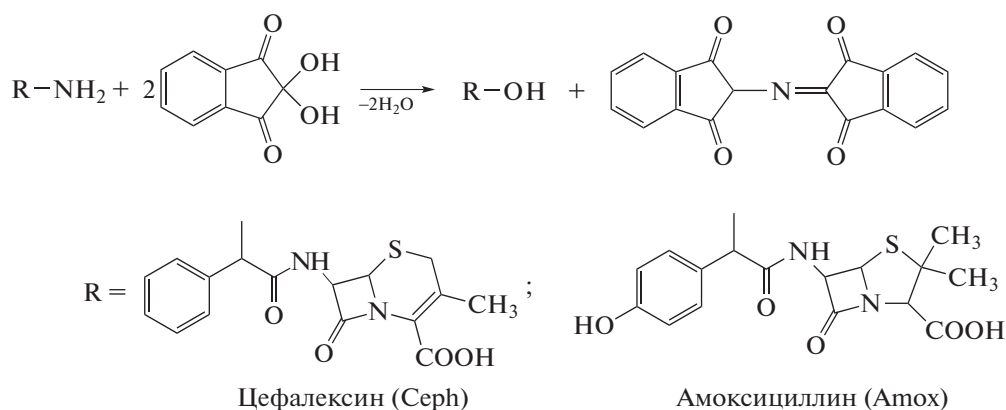


Схема 1. Схема взаимодействия антибиотиков с нингидрином.

При подборе оптимальных условий экспресс-определения на поверхности целлюлозной матрицы исследовали влияние температуры и времени проведения реакции (рис. 2а, 2б). Для выбора оптимальной температуры проведения тест-реакции строили зависимость изменения интенсивностей цветового канала Green (ΔG_{Green}) от температуры нагревания индикаторных бумаг по сравнению с контрольным образцом (рис. 2а). Как видно, с увеличением температуры нагревания от 60 до 100°C значения ΔG_{Green} увеличиваются и при 100–110°C принимают максимальные значения. Зависимость изменения интенсивностей канала Green от времени нагревания тест-средств (рис. 2б) показала, что через 15–20 мин их значения достигают максимума, и окраска при этом максимальна.

Визуально-колориметрическое определение.

При тест-определении анализируемый раствор антибиотика наносили на индикаторную бумагу с иммобилизованным нингидрином, высушивали при $100 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Наблюдали появление фиолетового окрашивания, интенсивность которого увеличивалась с увеличением концентрации антибиотика. Концентрации антибиотиков для приготовления цветовой шкалы подбирали таким образом, чтобы ширина шага шкалы позволяла визуально распознавать изменение окраски двух ближайших концентраций и не приводила к большей погрешности определения. В результате выбрали оптимальный шаг, при котором каждая последующая концентрация отличается от предыдущей в два раза.

Предел обнаружения (ПО) определяли как правую границу интервала ненадежности (ИН) при вероятности обнаружения 99%. При определении интервала ненадежности строили зависимости вероятностей обнаружения (Рс) антибиотика от его концентрации (рис. 3). Для проверки гипотезы о законе распределения экспериментальных данных проанализировали зависимости функций нормального, логнормального, экспо-

ненциального распределений и распределения экстремального значения первого рода (Вейбулла) от концентрации антибиотиков. Полученные значения коэффициентов корреляции уравнений прямых составляли ≥ 0.93 , что подтверждает согласованность экспериментальных данных с функциями распределения и правильность выбранного диапазона ИН. Некоторые метрологические характеристики (диапазон определяемых содержаний (ДОС), ИН, ПО) разработанной методики визуальной оценки представлены в табл. 1.

Цветометрическое определение. Цветометрическую обработку изображений тест-средств осуществляли в программе Adobe Photoshop®, для этого часть изображения усредняли с помощью фильтра “Average” и определяли интенсивность каналов модели RGB (Red-Green-Blue). Получили линейные зависимости интенсивностей каналов Red, Green и Blue от I_{gc} и c (рис. 4).

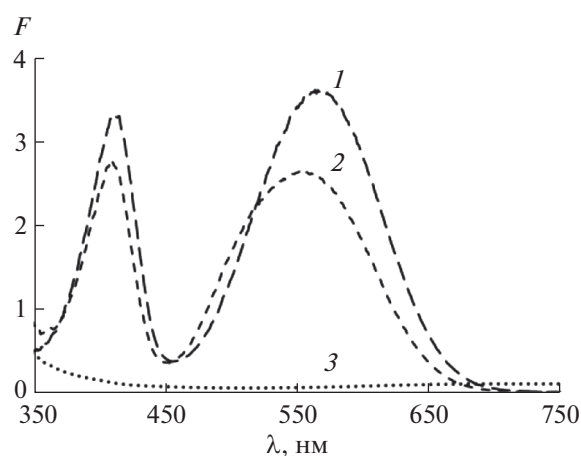


Рис. 1. Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка для систем цефалексин–иммобилизованный нингидрин (1), амоксициллин–иммобилизованный нингидрин (2), иммобилизованный нингидрин (3) ($c_{\text{Amox}} = c_{\text{Ceph}} = 8 \text{ мг/мл}$, 90°C, 20 мин).

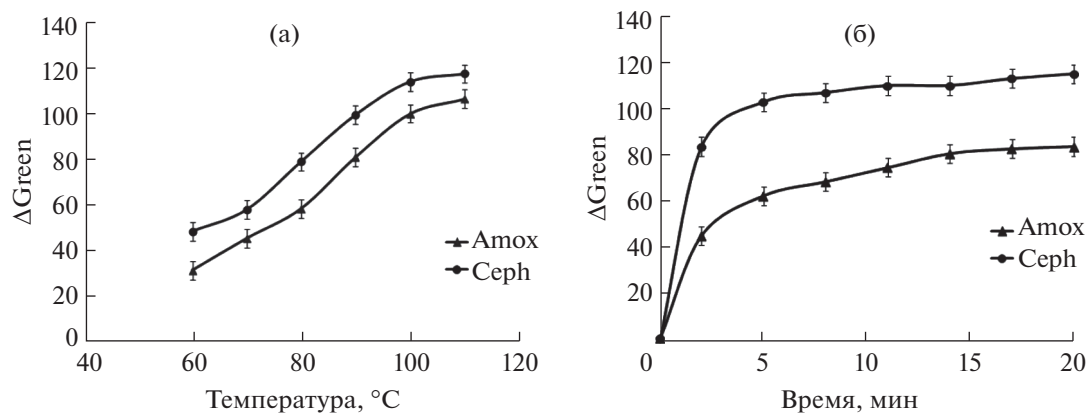


Рис. 2. Зависимости изменения интенсивностей цветового канала Green от температуры (а) и от времени нагревания (б) тест-средств: 1 – цефалексин, 2 – амоксициллин ($c_{Amox} = c_{Ceph} = 7$ мг/мл, pH 7.4).

Для цефалексина зависимости интенсивностей цветовых каналов от $\lg c$ линейны в области 0.5–8 мг/мл и 0.125–1 мг/мл для зависимостей $\Delta I - \lg c$ (рис. 4а, 4в). Для амоксициллина зависимости $\Delta I - \lg c$ линейны в области 1–16 мг/мл (0.5–16 мг/мл для канала Green) и 0.125–2 мг/мл для зависимостей $\Delta I - \lg c$ (рис. 4б, 4г). В качестве оптимального (по чувствительности и коэффициенту регрессии) выбрали канал Green при определении Ceph и Amox. Предел обнаружения цефалексина составил 0.08 мг/мл, амоксициллина – 0.09 мг/мл.

По полученным цветовым шкалам строили профили лепестковых диаграмм (ЛД) в координатах цветовых каналов моделей RGB, CMYK, HSV (рис. 5а, 5б). Рассчитывали периметр (P) и площадь (S) профилей ЛД в MS Excel по формулам: $P = \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cos(ab)}$, $S = a + b \sin(ab)$, где a, b – стороны треугольника, $\cos(ab)$ – косинус

угла между сторонами a, b , $\sin(ab)$ – синус угла между сторонами a, b .

Получили линейные зависимости периметра ($y = -292x + 748, r^2 = 0.98$ и $y = -291x + 837, r^2 = 0.98$) и площади ($y = -39496x + 56166, r^2 = 0.98$ и $y = -39849x + 67814, r^2 = 0.98$) от $\lg c(Ceph)$ и $\lg c(Amox)$ соответственно. Данные могут быть применены при полуколичественном определении антибиотиков с пониженным пределом обнаружения 0.04 и 0.09 (0.10) мг/мл для зависимостей периметра и площади ЛД и с погрешностью определения, не превышающей 20%.

Определение антибиотиков в лекарственных препаратах. Разработанные варианты экспресс-определения антибиотиков апробированы для оценки их содержания в лекарственных препаратах (“Амоксициллин” таблетки, “Цефалексин” капсулы). Согласно фармакопейной статье (ФС “Цефалексин, капсулы”) содержание антибиотика должно находиться в пределах не менее 90.0% и не более 110.0% от заявленного количества цефалексина, т.е. 500 ± 50 мг; и не менее 90.0% и не более 110.0% амоксициллина, т.е. 250 ± 25 мг (ФС “Амоксициллин, таблетки”). При тест-определении содержания антибиотика каплю анализируемого раствора наносили на индикаторную бумагу, нагревают до 100°C и оценивали содержание антибиотика с помощью разработанных методик визуального и цветометрического определения, а также независимого спектрофотометрическим методом (СФМ) (табл. 3). При спектрофотометрическом определении применяли градуировочную зависимость оптической плотности при 262 нм от концентрации цефалексина и при 275 нм для амоксициллина.

Найденные в препаратах содержания амоксициллина и цефалексина согласуются с заявленными интервалами содержаний определяемых компонентов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработан-

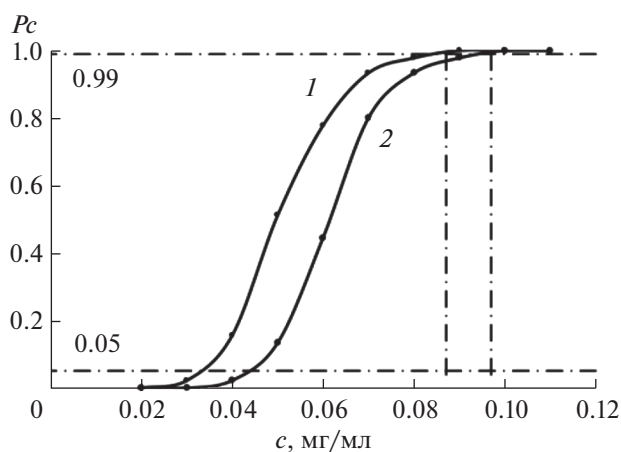


Рис. 3. Вероятности обнаружения цефалексина (1) и амоксициллина (2).

Таблица 1. Некоторые метрологические характеристики разработанных методик визуального определения цефалексина и амоксициллина

| Метрологическая характеристика, мг/мл | Антибиотик | |
|--|-------------|-------------|
| | Ceph | Амох |
| ДОС | 0.125–8 | 0.125–16 |
| Интервал ненадежности (ИН) | 0.033–0.087 | 0.043–0.097 |
| Предел обнаружения (ПО) | 0.087 | 0.097 |

Таблица 2. Уравнения, коэффициенты регрессии и диапазон линейности зависимостей изменения интенсивности цветных каналов модели RGB от $\lg c/c$

| Антибиотик | Зависимость | Диапазон линейности, мг/мл | Уравнение | Коэффициент регрессии |
|------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Ceph | Канал Red– $\lg c$ | 0.5–8 | $y = 91x + 39$ | 0.999 |
| | Канал Blue– $\lg c$ | 0.5–8 | $y = 81x + 34$ | 0.998 |
| | Канал Green–$\lg c$ | 0.5–8 | $y = 92x + 63$ | 0.992 |
| | Канал Red– c | 0.125–1 | $y = 40x - 4.6$ | 0.983 |
| | Канал Blue– c | 0.125–1 | $y = 35x - 4.3$ | 0.981 |
| | Канал Green–c | 0.125–1 | $y = 69x - 4.5$ | 0.999 |
| Амох | Канал Red– $\lg c$ | 1–16 | $y = 84x + 14$ | 0.992 |
| | Канал Blue– $\lg c$ | 1–16 | $y = 82x + 12$ | 0.990 |
| | Канал Green–$\lg c$ | 0.5–16 | $y = 90x + 41$ | 0.992 |
| | Канал Red– c | 0.125–2 | $y = 20x - 2.7$ | 0.999 |
| | Канал Blue– c | 0.125–2 | $y = 18x - 3.3$ | 0.998 |
| | Канал Green–c | 0.125–2 | $y = 33x - 1.2$ | 0.992 |

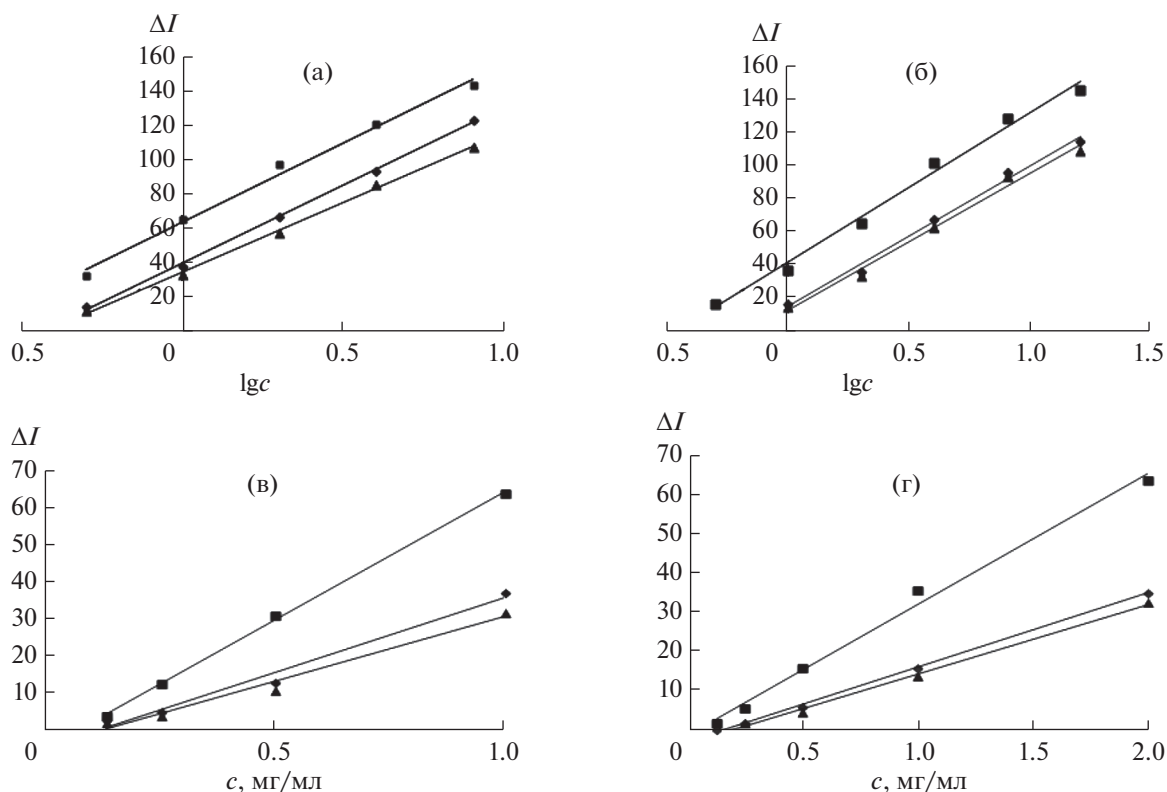
**Рис. 4.** Зависимости изменения интенсивности (ΔI) цветных каналов Red (◆) Green (■), Blue (▲) от $\lg c$ цефалексина (а) и амоксициллина (б); от c (мг/мл) цефалексина (в) и амоксициллина (г).

Таблица 3. Результаты (мг/мл) определения содержания антибиотиков в лекарственных препаратах (таблетки “Амоксициллин” и капсулы “Цефалексин”) разработанными экспресс-способами и спектрофотометрическим методом ($n = 5$, $P = 0.95$)

| Заявлено в препарате, мг | Визуальная оценка | Цветометрическая оценка | | | | | | СФМ | s_f |
|---------------------------|-------------------|-------------------------|-------|------------|-------|-------------|-------|----------|-------|
| | | по каналу Green | s_f | площадь ЛД | s_f | периметр ЛД | s_f | | |
| Амоксициллин, 250 ± 25 мг | 250 ± 50 | 225 ± 30 | 0.09 | 225 ± 25 | 0.08 | 220 ± 30 | 0.08 | 245 ± 10 | 0.04 |
| Цефалексин, 500 ± 50 | 500 ± 50 | 525 ± 25 | 0.04 | 515 ± 50 | 0.10 | 525 ± 50 | 0.08 | 480 ± 20 | 0.05 |

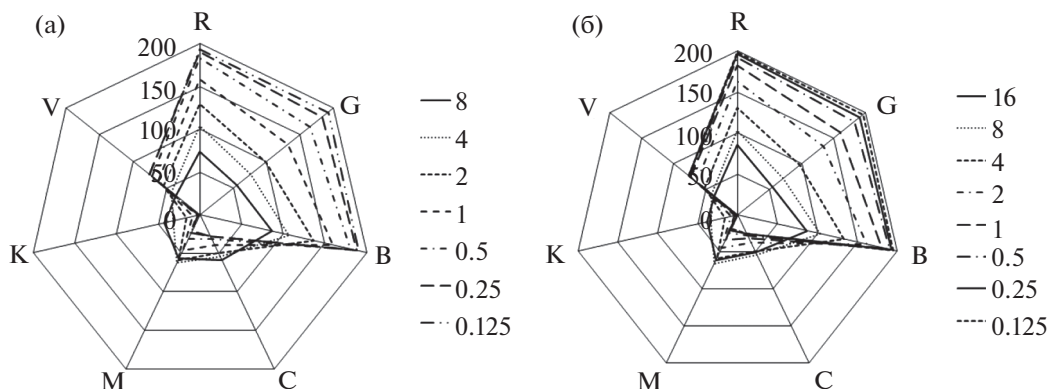


Рис. 5. Профили лепестковых диаграмм в координатах цветовых каналов R, G, B, C, M, K, V систем цефалексин (а), амоксициллин (б) – иммобилизованный нингидрин (с, мг/мл).

ные экспресс-методики можно применять для полуколичественного определения цефалексина и амоксициллина.

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках гранта РФФИ (научный проект № 20-33-90020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 640 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
- Распоряжение правительства РФ от 23 октября 2017 г. № 2323-р “Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2018 г.”.
- Kahsay G., Song H., Van Schepdael A., Cabooter D., Adams E. Hydrophilic interaction chromatography (HIL-IC) in the analysis of antibiotics // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 87. P. 142.
- Кулапина Е.Г., Баринова О.В., Кулапина О.И., Утц И.А., Снесарев С.В. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54. №. 9–10. С. 53.
- Martinkova P., Brtnicky M., Kynicky J., Pohanka M. Fast and simple glucose assay based on filter paper as enzymes carrier using phone camera detection // Chem. Papers. 2018. V. 72. №. 11. P. 2719.
- García A., Erenas M.M., Marinetto E.D., Abad C.A., de Orbe-Paya I., Palma A.J., Capitán-Vallvey L.F. Mobile phone platform as portable chemical analyzer // Sens. Actuators B: Chem. 2011. V. 156. №. 1. P. 350.
- Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логинова Л.П. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом. Х.: Тимченко, 2008. 128 с.
- Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Госхимиздат, 1962. 836 с.
- McCaldin D.J. The chemistry of ninhydrin // Chem. Rev. 1960. V. 60. №. 1. P. 39.
- Frutos P., Torrado S., Perez-Lorenzo M.E., Frutos G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. V. 21. № 6. P. 1149.
- Raza A., Ijaz A.S., Ahmad S. Development and application of spectrophotometric method for the determination of cefaclor in pharmaceutical formulations // Química Nova. 2009. V. 32. №. 5. P. 1180.