

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФТРИАКСОНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

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

Кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии  
Курского государственного медицинского университета, КурскE-mail: [R-WLADIMIR@yandex.ru](mailto:R-WLADIMIR@yandex.ru)

Рассмотрена возможность определения цефтриаксона методом ИК-спектроскопии в биологическом материале, а также возможность доказательства подлинности рабочего образца анализируемого антибиотика при сравнении со стандартным образцом. Исследования проводили на модельных смесях аналита с тканью трупной печени, не имевших признаков гнилостного изменения. Установлено совпадение ИК-спектров рабочего и эталонного образца по характерным полосам поглощения, что доказывает возможность применения рабочего образца для дальнейшего исследования с целью экономической выгоды. Обоснована возможность применения метода ИК-спектроскопии для идентификации цефтриаксона в извлечениях из биологического материала. Применена в практике методика изолирования и очистки цефтриаксона, извлеченного из биологического материала.

**Ключевые слова:** цефтриаксон, определение в биологическом материале, метод ИК-спектроскопии.

## DETERMINATION OF CEFTRIAXONE IN BIOLOGICAL MATERIAL

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

Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk

The possibility of ceftriaxone determination by IR spectroscopy in biological material is studied, as well as the possibility of proving the authenticity of a functional sample of the antibiotic analyzed in comparison with a standard sample. The studies were carried out on the prototyping mixtures of the analyte with the tissue of the cadaveric liver, which had no signs of a putrefactive change. The IR spectra of the functional and reference samples were found to coincide with characteristic absorption bands that prove the possibility of using a functional sample for further research with a view to economic benefit. The possibility of applying IR spectroscopy for the identification of ceftriaxone in extracts from biological material is substantiated. The practice of isolation and purification of ceftriaxone extracted from biological material has been applied in practice.

**Keywords:** ceftriaxone, determination in a biological material, method of IR.

Цефтриаксон – бактерицидное лекарственное средство из группы цефалоспориновых антибиотиков III поколения, угнетающее синтез клеточной мембраны и подавляющее *in vitro* рост многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [8-10].

Цефтриаксон – (6R,7R)7-[[2Z)-(2-минотиазол-4-ил(метоксиимино)ацетил)амино]-3-[[2-метил-6-оксидо-5-оксо-2,5-дигидро-1,2,4-триазин-3-ил)сульфанил]метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат 3,5 гидрат динатриевая соль – кристаллический порошок от белого до желтовато-оранжевого цвета, гигроскопичен, легко растворимый в воде, умеренно – в метаноле, очень слабо – в этаноле. pH 1% водного раствора около 6,7. Брутто-формула  $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3 \cdot 3\frac{1}{2} H_2O$ . Молекулярная масса 661,61 [4]. Структурная формула изображена в соответствии с рис. 1.

Цефтриаксон, хорошо проникающий в ткани и жидкости организма, включая спинномозговую жидкость, применяется для лечения инфекций центральной нервной системы [1, 3]. Средний объем распределения у взрослых составляет 5,8-13,5 литра [1]. 33-67% цефтриаксона выделяется у больных с почечной недостаточностью как неиз-

менный препарат, но при почечной недостаточности не требуется корректировка дозы, когда она не превышает 2 г в день [1]. Остальное количество лекарственного средства, трансформируясь в печени и кишечнике, выделяется вместе с желчью в виде неактивных соединений [1, 6, 7].

LD<sub>50</sub> для цефтриаксона при пероральном введении мышам и крысам составляет больше 10000 мг/кг. При внутривенном введении крысам LD<sub>50</sub> для цефтриаксона составляет 1900 мг/кг.

Широкое использование данного антибиотика, наличие случаев смертельного исхода от аллергической реакции является определяющим моментом в необходимости проведения химико-токсикологических исследований цефтриаксона. Вопрос идентификации цефтриаксона в извлечениях из биологических жидкостей и тканей трупных органов в настоящее время остается актуальным и недостаточно изученным. При создании схем химико-токсикологического анализа существует необходимость разработки высокотехнологичных методик идентификации исследуемого соединения. Одним из селективных методов, применяющихся в практике химико-фармацевтического и судебно-химического анализа для идентификации биологически активных веществ в

субстанциях и биоматериале, является метод ИК-спектроскопии [2, 5].

Целью данного исследования явилась разработка схемы доказательства подлинности рабочего образца исследуемого лекарственного вещества в сравнении с его стандартным образцом, а также изучение особенности идентификации цефтриаксона, извлеченного из биологического материала, методом ИК-спектроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явился стандартный образец цефтриаксона динатриевой соли (Ceftriaxone Disodium, Reference Standard) фирмы Roche Diagnostics GmbH с содержанием основного вещества 90,9%.

Наряду со стандартным образцом исследованию подвергали рабочий образец исследуемого лекарственного средства, в качестве которого рассматривали порошок цефтриаксона для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения производства РУП «Белмедпрепараты» (соответствует нормативному документу ЛП 000937-181011). Перед измерениями несколько миллиграммов рабочего образца цефтриаксона растирают с безводным бромидом калия (использовали калий бромид 99,00% для спектроскопии фирмы «Panreac (ITW Reagents)» Испания). Смесь тщательно перетирают, прессуют в диск и измеряют пропускание в интервале частот 4000-400 см<sup>-1</sup>.

Исследования проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре VARIAN, модель 670IR, изготовитель: VARIAN, Австралия, 2010 г.

В ИК-спектрах цефтриаксона определяли характерные полосы поглощения и устанавливали соответствие полос определенным типам колебаний атомов и групп атомов в молекуле.

В качестве биологических объектов, содержащих цефтриаксон, использовали модельные смеси ананта с тканью трупной печени, не имевшей признаков гнилостных изменений.

Для этого готовили смеси цефтриаксона динатриевой соли (размер частиц 5-50 мкм) и мелкоизмельченной (размер частиц 0,2-0,5 мм) труп-

ной печени без следов гнилостных изменений с содержанием 0,05 г основного вещества в 25 г биоматериала, которые выдерживали при 18-20 °С после приготовления в течение получаса. Проводили двукратное изолирование цефтриаксона из приготовленных модельных смесей системой ацетонитрил-вода (5:5 по объему) при соотношении изолирующего агента и биологической матрицы 2:1 (по массе). Продолжительность каждого настаивания составляла 45 минут. Первое и второе извлечения из каждой модельной смеси объединяли, пропускали через беззольный бумажный фильтр, предварительно смоченный смесью ацетонитрил-вода (5:5). 4 мл объединенного извлечения вносили в хроматографическую колонку размерами 150×10 мм, заполненную сорбентом Silasorb C8 и элюировали ацетоном. Элюат собирали фракциями по 2 мл каждая. Фракции с 4 по 8 объединяли и испаряли элюент в токе воздуха при комнатной температуре. Сухой остаток перемешивали с безводным бромидом калия и поступали далее по вышеописанной схеме.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты изучения ИК-спектра цефтриаксона представлены на рисунках 2-4 и в таблице. Как свидетельствуют полученные данные, изучение особенностей поглощения электромагнитного излучения эталонного стандарта и рабочего образца цефтриаксона в интервале частот 4000-400 см<sup>-1</sup> показывает присутствие в данной области спектра целой группы характеристических полос поглощения, обусловленных различными видами колебательных движений атомов и групп атомов в молекуле рассматриваемого соединения.

В частности, здесь обнаруживаются валентные колебания C=O в интервале частот 1741,1-1649,5 см<sup>-1</sup>, колебания CO<sub>2</sub> (2249,4 см<sup>-1</sup>), деформационные колебания N-H (1537,8-1500,4 см<sup>-1</sup>), а также колебания вторичной аминогруппы (1285,8 см<sup>-1</sup>), валентные колебания связанной NH<sub>2</sub> в интервале частот 3439,4-3257,1 см<sup>-1</sup>, валентные колебания C=O в β-кетоксидах (1608,2 см<sup>-1</sup>).

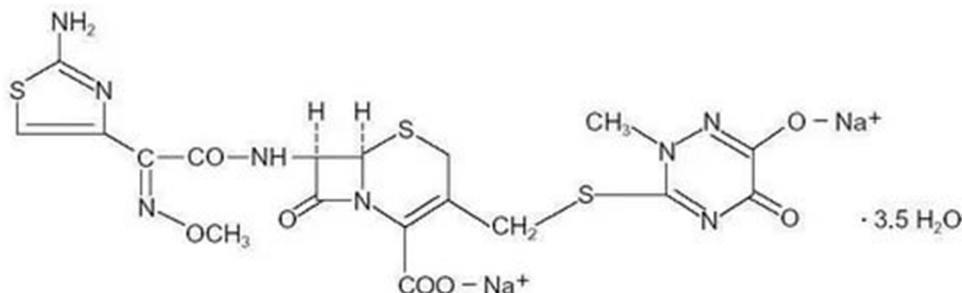


Рис. 1. Структурная формула цефтриаксона динатриевой соли.

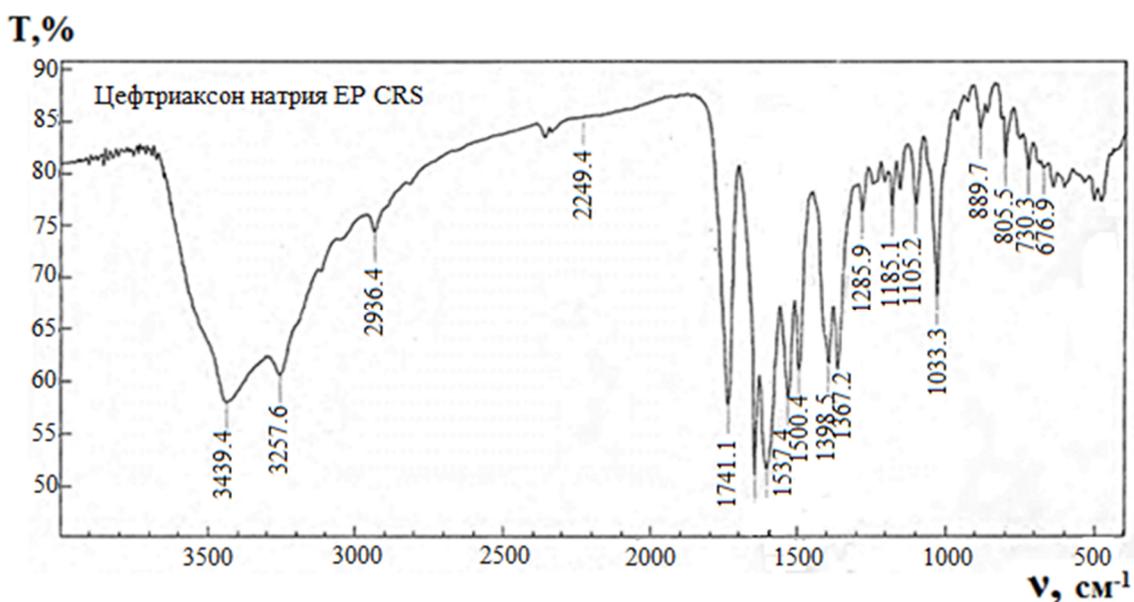


Рис. 2. ИК спектр стандартного образца цефтриаксона натрия ЕР СRS.

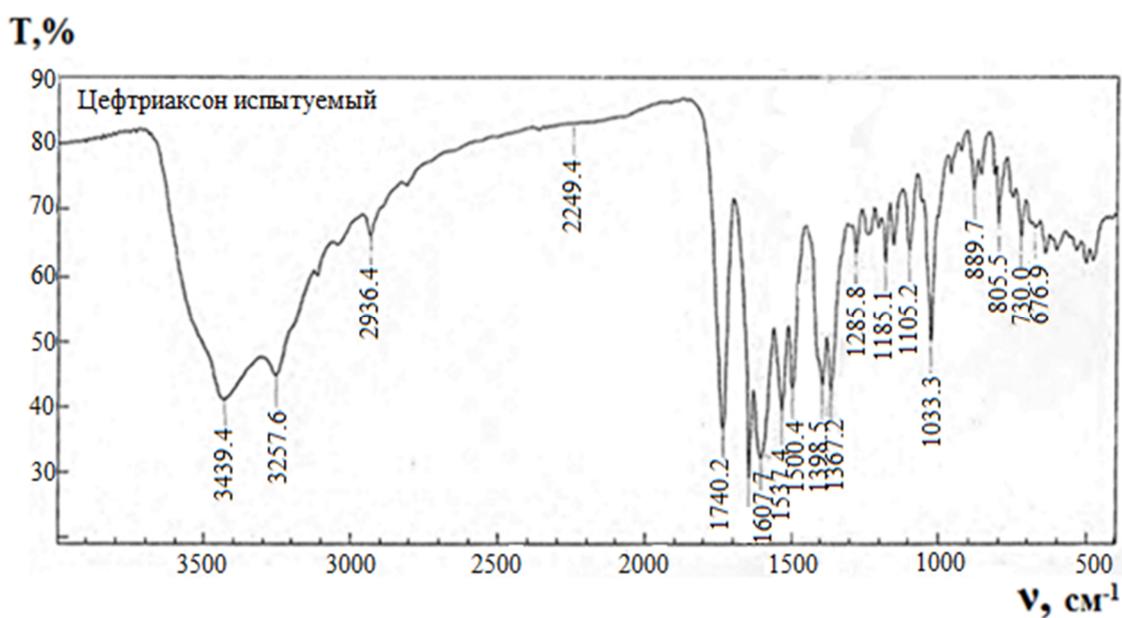


Рис. 3. ИК спектр рабочего образца цефтриаксона.

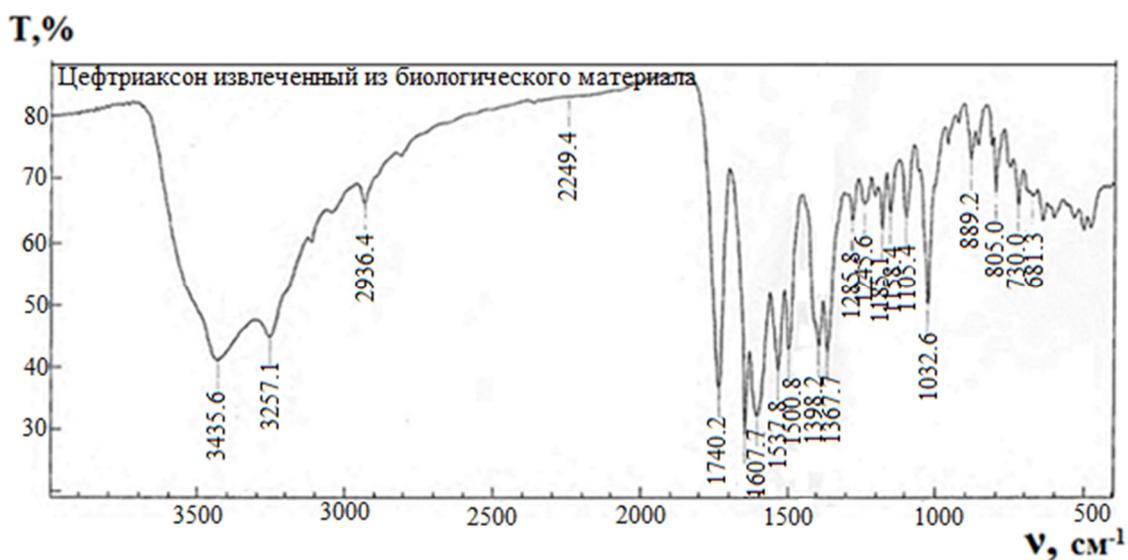


Рис. 4. ИК спектр цефтриаксона, извлеченного из биологического материала.

Таблица 1

## Характеристика ИК-спектров цефтриаксона

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

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено совпадение ИК-спектров рабочего образца и эталонного стандарта по положению основных характеристических частот в их спектральных кривых, что свидетельствует о принципиальной возможности применения относительно недорогого рабочего стандарта и замены им дорогостоящего эталонного стандарта при проведении исследований биологических образцов на присутствие в них цефтриаксона динатриевой соли.

Также было установлено наличие совпадения положения основных полос поглощения в ИК-спектрах анализируемого вещества, выделенного из биологического материала, и рабочего образца цефтриаксона. Это свидетельствует в пользу достаточной эффективности примененной схемы очистки и целесообразности использования метода ИК-спектрофотометрии для идентификации рассматриваемого соединения в объектах биологического происхождения. Обнаруживаемое минимальное количество цефтриаксона в ткани свежей трупной печени составляет при определении в соответствии с предлагаемой методикой около 1 мг в 100 г биологического материала.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- изучены особенности поглощения стандартом и рабочим образцом цефтриаксона ИК-излучения в области частот 4000–400 см<sup>-1</sup>;
- установлена подлинность рабочего образца цефтриаксона;

- выявлена возможность применения метода колебательной спектрофотометрии для идентификации рассматриваемого соединения в извлечениях из биологического материала.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Вакуленко С.Б.* Механизм действия β-лактамов антибиотиков и устойчивость к ним микроорганизмов // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – № 4. – С. 294-302. [*Vakulenko S.B.* The mechanism of action of β-lactam antibiotics and the resistance of microorganisms to them. *Antibiotiki i meditsinskaya biotekhnologiya.* 1987; (4): 294-302 (in Russ.)].
2. *Квачахия Л.Л., Шорманов В.К.* Идентификация нифедипина в биологических жидкостях // Фармация. – 2013. – Т. 62, № 8. – С. 16-19. [*Kvachakhia L.L., Shormanov V.K.* Identification of nifedipine in biological fluids. *Farmatsiya.* 2013; 62 (8): 16-19 (in Russ.)].
3. *Провоторов В.М., Иванова Г.А.* Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств // Клиническая медицина. – 2009. – № 9. – С. 4-8. [*Provotorov V.M., Ivanova G.A.* The role and place of erythrocytes in the directional transport system of various pharmacological agents. *Klinicheskaya meditsina.* 2009; (9): 4-8. (in Russ.)].
4. Цефтриаксон. Порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения 0,5 г и 1,0 г // РУП «Белмедпрепараты». – 2011. – ЛП 000937-181011. – С. 1-18. [Ceftriaxone. Powder for preparation of solution for intravenous and intramuscular injection of 0.5 g and 1.0 g // RUE

- "Belmedpreparaty". 2011. LP 000937-181011: 1-18 (in Russ.).
5. *Шорманов В.К., Цацуа Е.П., Асташкина А.П.* Определение 2,4-ди-трет-бутилгидроксибензола при химико-токсикологическом исследовании биологического материала // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 4. – 34-39. – DOI: 10.17116/sudmed201760434-39. [*Shormanov V.K., Tsatsua E.P., Astashkina A.P.* The determination of 2,4-di-tret-butyl hydroxybenzene for the purpose of the chemical toxicological study of the biological materials. Sudebno-meditsinskaya ekspertiza. 2017; 60 (4): 34-39 (in Russ.)].
  6. *Farghaly O.A., Abdel Hameed R.S., Abu-Nawwas A.-A.H.* Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques // Int. J. Electrochem. Sci. – 2014. – Vol. 9. – P. 3287-3318.
  7. *Farghaly O.A., Hazzazi O.A., Rabie E.M., Khodari M.* Determination of Some Cephalosporins by Adsorptive Stripping Voltammetry // Int. J. Electrochem. Sci. – 2008. – Vol. 3. – P. 1055-1064.
  8. *Khasanov V.V., Sokolovich E.G., Dychko K.A.* Determination of ceftriaxone in blood and tissues using ion-exchange chromatography // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Vol. 40, N 2. – P. 109-111. – DOI: 10.1007/s11094-006-0070-2.
  9. *Malgundkar S.S., Mulla S.* Validated Hptlc Method for Simultaneous Determination of Ceftriaxone Sodium and Tazobactam Sodium in Combined Dosage Form // Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS). – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. 60-65. – DOI: 10.9790/3008-09256065.
  10. *Rind F.M.A., Laghari M.G.H., Memon A.H., Mughal U.R., Almani F., Memon N., Khuhawar M.Y., Maheshwari M.L.* Spectrophotometric Determination of Ceftriaxone Using 4-Dimethylaminobenzaldehyde // Pak. J. Anal. Environ. Chem. – 2008. – Vol. 9, N 1. – P. 43-48.