



УДК 543.544

Хроматографический анализ цефтриаксона в модельных гидроэкосистемах

Шафигулин Р.В.¹, Мащенко З.Е.², Буланова А.В.¹, Шаталаев И.Ф.³

¹ Самарский государственный университет, Самара

² Самарский медицинский институт "Реавиз", Самара

³ Самарский государственный медицинский университет, Самара

Поступила в редакцию 20.08.2012 г.

Аннотация

Разработана методика хроматографического анализа цефтриаксона в модельных гидроэкосистемах.

Ключевые слова: активный ил, цефтриаксон, жидкостная хроматография

The technique of the chromatographic analysis ceftriaxon in modeling hydroecosystems is developed.

Keywords: activated sludge, ceftriaxon, liquid chromatography

Введение

В настоящее время в зарубежной и отечественной литературе обсуждается проблема поступления на городские очистные сооружения сточных вод, содержащих большие количества лекарственных препаратов. В воде обнаруживаются препараты антимикробного действия, вещества, обладающие гормональной активностью, а также нестероидные противовоспалительные лекарственные средства. Эти фармацевтические препараты в неизменном виде или в форме метаболитов переходят в сточные воды вместе с продуктами жизнедеятельности живого организма. Особую проблему составляет присутствие в воде антибиотиков, которые отличаются низкой способностью к биоразложению, а также могут ингибировать микрофлору активного ила городских станций аэрации. Необходимо отметить отсутствие объективных и доступных для лабораторных служб рутинных методов анализа лекарственных средств в объектах окружающей среды, в том числе и сточных водах [1].

Эффективным методом для анализа биологически активных соединений (БАС) [2,3] и лекарственных препаратов, в том числе и антибиотиков, является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в различных ее вариантах. Высокая чувствительность, точность и специфичность этого метода дает значительное преимущество при изучении фармакокинетических свойств большого числа лекарственных средств; скорость анализа позволяет проводить обширные клинические исследования в условиях стационарного лечения, быстрый

эффективный анализ при необходимости срочного диагноза и дозировки лекарств, а также определение остаточных количеств лекарственных препаратов в различных сложных биологических и экологических системах.

Целью настоящей работы являлась разработка методики анализа цефтриаксона в модельных гидроекосистемах с использованием ВЭЖХ.

Эксперимент

В качестве тест – организмов в работе использовали активный ил аэротенка очистных сооружений МП «Самараводоканал».

Объектом исследования являлся антибиотик цефалоспоринового ряда – цефтриаксон (ЗАО «Фармацевтическая фирма «ЛЕККО», Россия). Фармацевтическая субстанция цефтриаксона содержит 2 изомера – Z- и E-изомеры (Z – действующее вещество, E – примесь), химическая структура которых представлена в табл. 1.

Таблица 1. Химическая структура антибиотика

| Название вещества | Структурная формула |
|----------------------|---------------------|
| цефтриаксон Z-изомер | |
| цефтриаксон E-изомер | |

Эксперимент выполняли на жидкостном хроматографе «Милихром-1» со шприцевым насосом, с УФ-спектрофотометрическим детектором с диапазоном длин волн 190-360 нм. Анализ проводили на колонке Ultrasep ES 100RP18 (размеры колонки 120*4,2 мм). Хроматографирование проводили при длине волны 254 нм. Скорость подвижной фазы составляла 50 мкл/мин, объем пробы 10 мкл. Для обработки результатов применяли программу «Мультихром» 3.1.1514 V. В работе использовали подвижные фазы, указанные в табл. 2.

Таблица 2. Составы элюентов

| Составы элюентов | об. % |
|------------------------------------------------------|--------------|
| ацетонитрил/вода/CH ₃ COONH ₄ | 17/81/2 |
| ацетонитрил/вода /CH ₃ COONH ₄ | 10/88/2 |
| ACN/фосф.буфер(pH=2,25)/H ₂ O | 120/13,2/167 |

Пробоподготовка цефтриаксона

Взвешивали анализируемый препарат на аналитических весах с точностью до 0,00001 г.

Приготовление 5 % раствора цефтриаксона

0,5 г (точная навеска) препарата помещали в мерную колбу и растворяли в 10 мл дистиллированной воды.

Приготовление исследуемых растворов

В 3 стеклянных химических стакана объемом 100 мл наливали по 50 мл активного ила и добавляли в каждый стакан различные количества 5 % раствора цефтриаксона (0,2; 0,4 и 0,6 мл).

Приготовление стандартных растворов сравнения цефтриаксона

В три стеклянных химических стакана объемом 100 мл наливали по 50 мл дистиллированной воды и добавляли в каждый стакан различные количества 5 % раствора цефтриаксона (0,2; 0,4 и 0,6 мл).

Хроматографический анализ цефтриаксона

Через каждый час (в течение 4-х часов) отбирали пробы в количестве 4 мл, фильтровали дважды через бумажный складчатый фильтр и хроматографировали 10 мкл получившихся фильтратов.

Обсуждение результатов

Для правильного определения изменения концентраций цефтриаксона в модельных системах важным этапом является подбор условий хроматографического определения изучаемого антибиотика в дистиллированной воде. В частности, важно было оптимизировать состав элюента для разделения Z- и E-изомеров цефтриаксона. С этой целью использовали смеси ацетонитрила с различными водными растворами, в частности с фосфатным буфером (табл. 2). На рисунке 1 представлена одна из полученных в работе хроматограмм, с использованием фосфатного буфера.

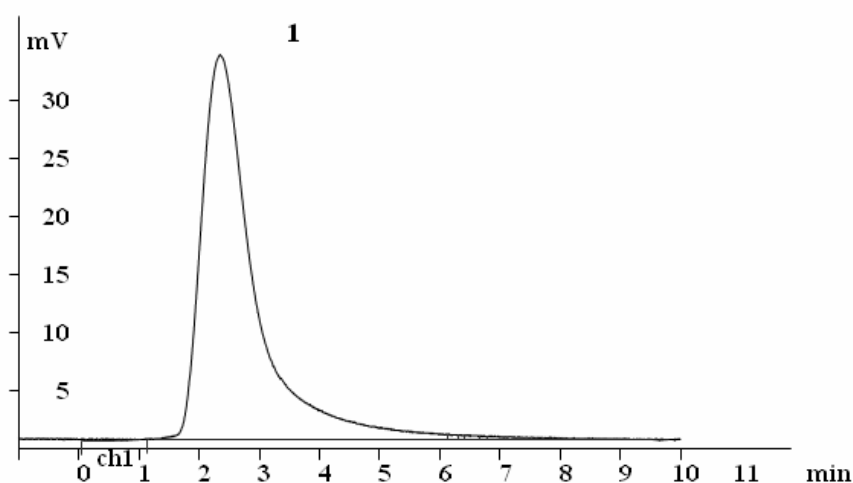


Рис. 1. Хроматограмма цефтриаксона. Состав элюента: ацетонитрил/фосфатный буфер(pH=2,25)/вода (120:13,2:167, об.%).
1- смесь изомеров цефтриаксона

Из анализа хроматограммы можно сделать вывод о том, что использование

ацетонитрила с фосфатным буфером (pH 2,25) не привело к разделению Z-цефтриаксона с его изомером. Для оптимизации хроматографического процесса к водно-ацетонитрильной смеси добавляли разные количества ацетата аммония, что позволило в конечном итоге подобрать наилучшие условия разделения изомеров цефтриаксона (рис. 2-3, табл.2).

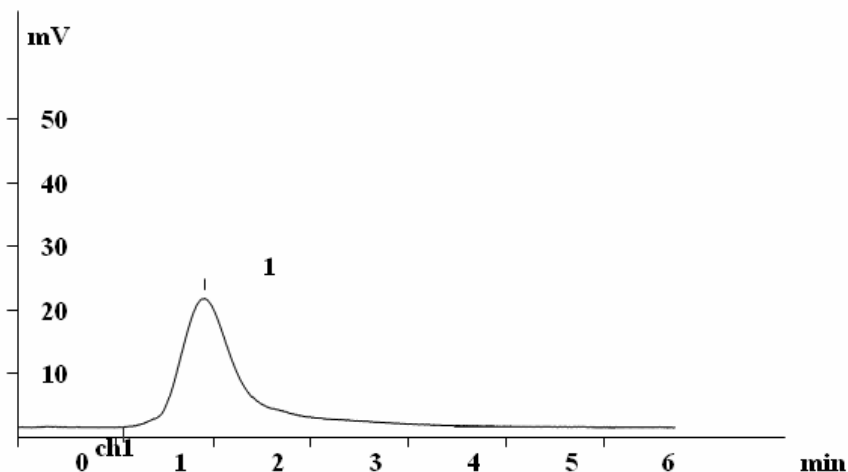


Рис. 2. Хроматограмма цефтриаксона. Состав элюента: ацетонитрил/вода/ацетат аммония (17/81/2, об. %). 1- смесь изомеров цефтриаксона

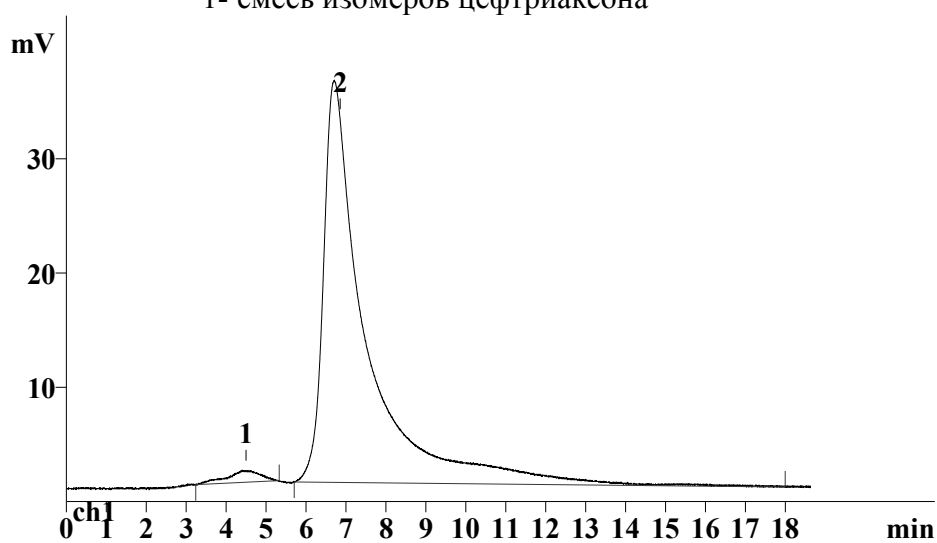


Рис. 3. Хроматограмма цефтриаксона. Состав элюента: ацетонитрил/вода/ацетат аммония (10/88/2, об. %). 1- E-изомер; 2 – Z-изомер

Были рассчитаны некоторые характеристики хроматографического пика Z-цефтриаксона, полученного при использовании элюента состава ацетонитрил/вода/ацетат аммония (10/88/2, об. %), которые представлены в таблице 3.

Таблица 3 . Асимметрия хроматографического пика Z-цефтриаксона и степень разделения (Состав элюента: ацетонитрил/вода/ацетат аммония (10/88/2, об. %))

| Степень асимметрии в пика Z-изомера | $\alpha_{Z/E} = t_{RZ} / t_{RE}$ | t_{RZ} | t_{RE} |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------|----------|
| 2.97 | 1.51 | 6.78 | 4.48 |

Анализируя данные табл. 3 можно сделать вывод о том, что приведенный состав элюента явился оптимальным и позволил нам в дальнейшем проводить количественный хроматографический анализ субстанции Z-цефтриаксона в модельных гидрозекосистемах с достаточно высокой точностью.

В настоящей работе изучили изменение содержания Z-цефтриаксона от времени его нахождения в активном иле. Чтобы избежать погрешностей определения концентраций Z-цефтриаксона, связанных с различными процессами сольватации и гидролиза в воде (не содержащей активного ила) исследовали стандартные системы сравнения (дистиллированная вода). Полученные результаты представлены на рис. 4-6.

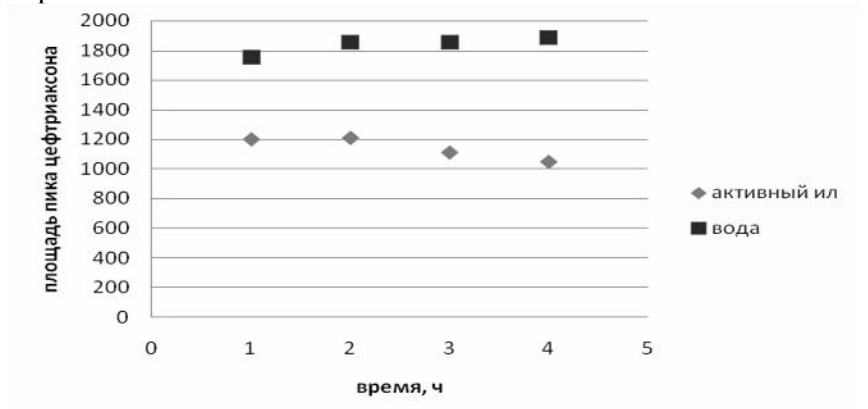


Рис. 4. Изменение содержания Z-цефтриаксона (0,2 мл 5% цефтриаксона в 50 мл) в зависимости от времени инкубации

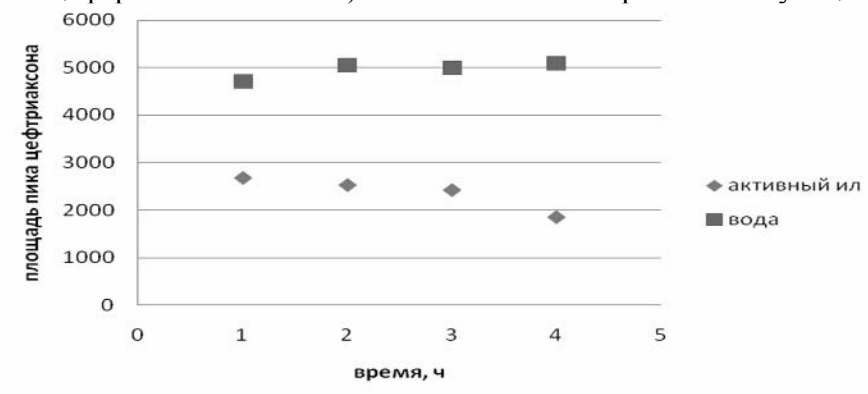


Рис. 5. Изменение содержания Z-цефтриаксона (0,4 мл 5% цефтриаксона в 50 мл) в зависимости от времени инкубации

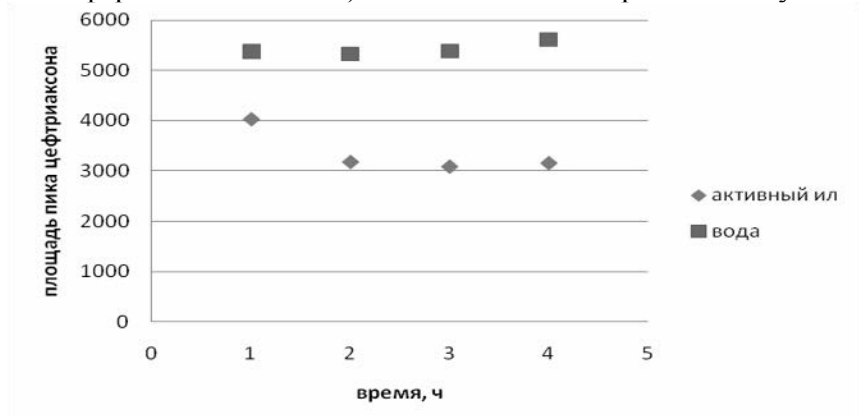


Рис. 6. Изменение содержания Z-цефтриаксона (0,6 мл 5% цефтриаксона в 50 мл) в зависимости от времени инкубации

Видно, что изменение концентрации Z-цефтриаксона в стандартном растворе сравнения практически не происходит (в пределах ошибки метода), и контрольные точки лежат заметно выше аналогичных точек, полученных для проб модельных систем с активным илом. Анализируя выше приведенные графики видно, что уже через 1 час концентрация Z-цефтриаксона в модельной системе с илом резко снижается, что связано, по-видимому, с процессом сорбции активным илом антибиотика в начальной стадии процесса деструкции фармацевтической субстанции.

В настоящей работе был рассчитан процент уменьшения содержания цефтриаксона в модельной гидроэкосистеме относительно стандартных растворов сравнения с использованием формулы 1 :

$$\Delta = \frac{S_{\text{в}} - S_{\text{и}}}{S_{\text{в}}} \cdot 100\% = \frac{c_{\text{в}} - c_{\text{и}}}{c_{\text{в}}} \cdot 100\% \quad (1)$$

где $S_{\text{в}}$ – площадь пика Z-цефтриаксона в стандартных растворах сравнения; $S_{\text{и}}$ – площадь пика Z-цефтриаксона в модельных гидроэкосистемах; $c_{\text{в}}$ – концентрация Z-цефтриаксона в стандартных растворах сравнения; $c_{\text{и}}$ – концентрация Z-цефтриаксона в модельных гидроэкосистемах.

Относительное снижение содержания Z-цефтриаксона в гидроэкосистеме представлены на рис. 7 – 10.

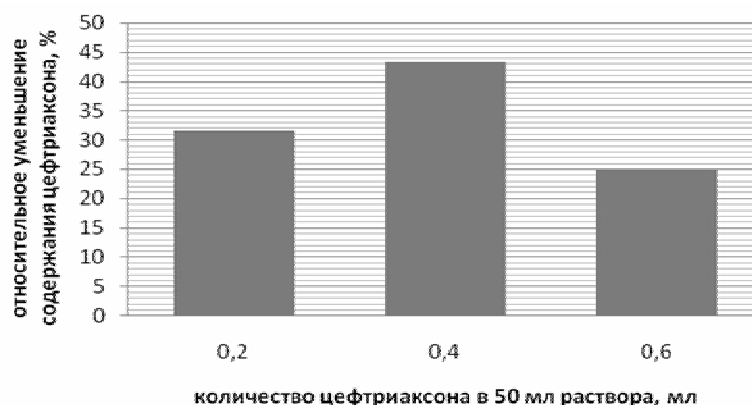


Рис. 7. Динамика уменьшения содержания Z- цефтриаксона через 1 час

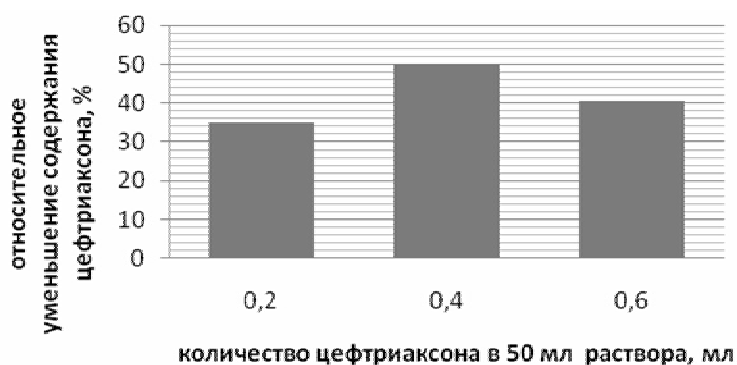


Рис. 8. Динамика уменьшения содержания Z- цефтриаксона через 2 часа

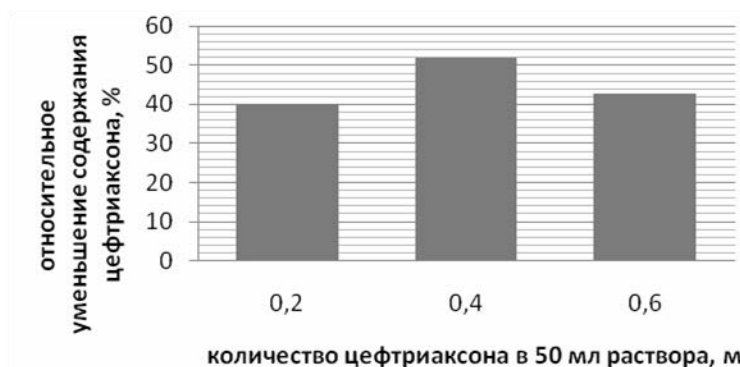


Рис. 9. Динамика уменьшения содержания Z- цефтриаксона через 3 часа

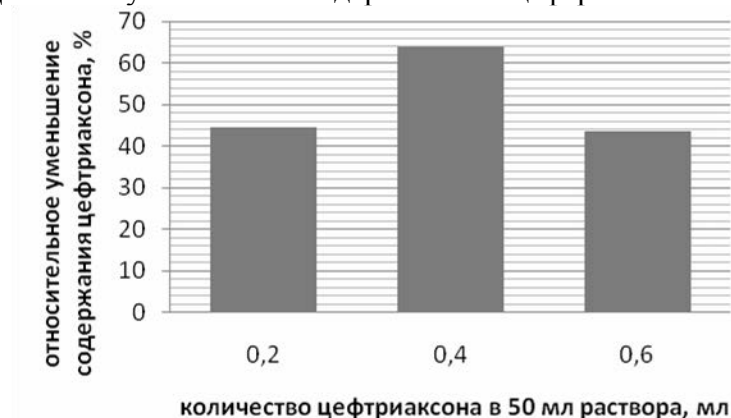


Рис. 10. Динамика уменьшения содержания Z- цефтриаксона через 4 часа

Из анализа рис.7-10 видно, что концентрация Z- цефтриаксона снижается в пределах от 32 до 60 %. Значительное снижение содержания Z- цефтриаксона в процессе инкубации происходит вследствие его сорбции активным илом, а также трансформации Z-изомера в менее активную форму (E-изомер) [4].

Таким образом, разработана экспресс-методика качественного и количественного определения цефтриаксона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием в модельных гидроэкосистемах.

Список литературы

1. Reif R., Suárez S., Omil F., Lema J.M. Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage // *Desalination*, № 221, 2008, P. 511–517.
2. Шафигулин Р.В., Буланова А.В., Пурьгин П.П., Константинов А.В., Сафронова И.А. Сорбция некоторых азольных производных бензойной кислоты в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Физикохимия поверхности и защита материалов*, Т. 47, № 6, 2011, С. 647–651.
3. Шафигулин Р.В., Мякишев А.А., Ильина Е.А., Ильин М. М., Даванков В.А., Буланова А.В. Сорбция замещенных индолов на сверхсшитом полистироле из водно-ацетонитрильных растворов// *Журнал физической химии*, Т. 85, № 7, 2011, С. 1322-1328.
4. Машенко З.Е., Шафигулин Р.В., Шаталаев И.Ф. Биодegradация цефтриаксона в процессе биологической очистки сточных вод // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. Т. 13, № 1, Ч. 8, 2011, С. 2070-2072.

Шафигулин Роман Владимирович - к.х.н., ст. преподаватель кафедры общей химии и хроматографии, Самарский государственный университет, тел. (846)334-54-47, факс (846)334-54-17

Машенко Зинаида Евгеньевна - к.фарм. наук, доцент кафедры фармацевтического факультета, Самарский медицинский институт "Реавиз", Самара

Буланова Анджела Владимировна – д.х.н., профессор кафедры общей химии и хроматографии, Самарский государственный университет, Самара

Шаталаев Иван Федорович - доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, Самара

Shafigulin Roman V. - Candidate of science Chemistry, senior teacher of department general chemistry and chromatography, Samara State University, E-mail: shafiro@mail.ru

Machenko Zinaida E. - Candidate of science pharmaceutical, docent of department pharmaceutical faculty, Samara medical institute "Reaviz", Samara

Bulanova Andgela V. - doctor of science Chemistry, professor of department general chemistry and chromatography, Samara State University, Samara

Shatalaev Ivan F. - doctor of science Biological, professor of department chemistry pharmaceutical faculty, Samara state medical university, Samara