

На правах рукописи



Барагузина Виктория Владимировна

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ОРГАНИЧЕСКИХ ИОНООБМЕННИКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
β-ЛАКТАМНЫХ И АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Саратов 2006

Работа выполнена в Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского

Научный руководитель	доктор химических наук, профессор Кулапина Елена Григорьевна
Официальные оппоненты	доктор химических наук, профессор Гусакова Наталья Николаевна доктор химических наук Остроумов Игорь Геннадьевич
Ведущая организация	Казанский государственный университет

Защита состоится «16» марта 2006 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 при Саратовском государственном университете им. Н.Г.Чернышевского по адресу:
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, корп.1, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского.

Автореферат разослан «8» апреля 2006г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор



Штыков С.Н.

2006A
2866

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время β -лактамы и аминогликозидные антибиотики занимают ведущее место в лечении тяжелых инфекционно – воспалительных заболеваний. Однако успешное применение этих препаратов из-за низкого терапевтического индекса (особенно аминогликозидов) возможно лишь при строгом контроле их концентраций в биологических жидкостях. Актуальной проблемой является осуществление лекарственного мониторинга, который обеспечивает выбор адекватной индивидуальной дозы и схемы применения антибиотиков для повышения эффективности и безопасности лечения. Экспрессное количественное определение антибиотиков в биологических жидкостях и лекарственных формах необходимо для оценки физиологических и биохимических процессов, протекающих в организме. Для определения антибиотиков в настоящее время используются микробиологические, спектроскопические, хроматографические и электрохимические методы. Актуальным является разработка экспрессных методов определения антибиотиков, доступных для клинических и биохимических лабораторий.

К настоящему времени имеются единичные публикации по применению потенциометрии с ионоселективными электродами для определения антибиотиков в лекарственных формах. Исследования в данной области носят, в основном, прикладной характер. Не обоснован выбор электродноактивных компонентов (ЭАК) мембран сенсоров, не исследованы физико-химические свойства ЭАК в водных средах и в фазе мембраны, не изучены электроаналитические свойства мембран, чувствительных к антибиотикам.

Работа проводилась в соответствии с Координационным планом Научного Совета РАН по аналитической химии и координируемым Главным Советом по химии и химической технологии РАН по проблеме 2.20.1 “Развитие теоретических основ аналитической химии” по теме НИР 3.71.96 “Изучение механизма аналитических реакций разных типов в водных, неводных и мицеллярных средах для разработки высокоэффективных методов контроля за содержанием металлов, ПАВ, органических соединений в объектах окружающей среды”, номер госрегистрации №01.200.114305.

Цель работы заключалась в установлении закономерностей влияния природы органических ионообменников на электроаналитические свойства потенциометрических сенсоров, чувствительных к β -лактамам и аминогликозидным антибиотикам.

Для достижения поставленной цели в работе необходимо было решить следующие **задачи**:

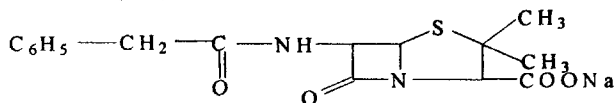
- оценить физико-химические характеристики органических ионообменников, входящих в состав мембран сенсоров, в водных средах и в фазе мембраны;
- установить влияние природы активных компонентов на электродные и транспортные свойства мембран, чувствительных к β -лактамам и аминогликозидным антибиотикам;



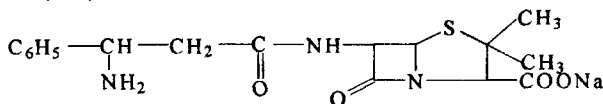
- выявить основные переносчики заряда в фазе мембраны и на границе раздела мембрана-раствор;
- разработать методики определения антибиотиков в лекарственных формах и биологических жидкостях.

Объекты и методы исследования. В работе исследованы жидкоконтактные сенсоры с пластифицированными поливинилхлоридными (ПВХ) мембранами. В качестве электродноактивных компонентов мембран сенсоров, чувствительных к β -лактамам (β -lac) антибиотикам использовали ионные ассоциаты β -lac – тетрадециламмоний (ТДА); к аминогликозидам – ионные ассоциаты гентамицина с тетрафенилборатом (ТФБ) и кислотным хром черным специальным (КЧС). Концентрацию активных компонентов в мембранах варьировали в интервале 0,001-0,1 моль/кг ДБФ (0,04-6,87%), массовые соотношения ПВХ:ДБФ составляли 1:3, толщина мембран – 0,3-0,5 мм.

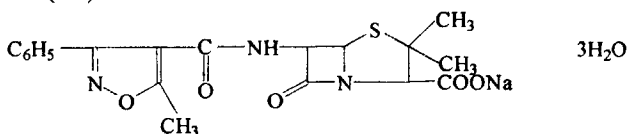
Исследовали антибиотики β -лактамого ряда пенициллиновой группы:
бензилпенициллин (Pen)



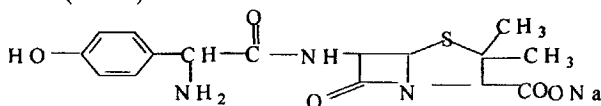
ампициллин (Am)



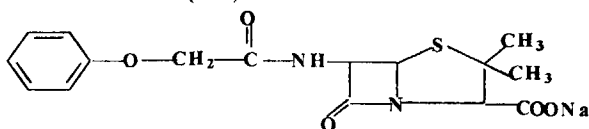
оксациллин (Ox)



амоксциллин (Амох)

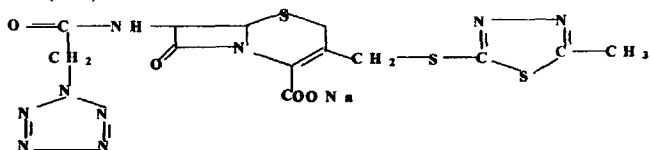


феноксиметилпенициллин (Fen)

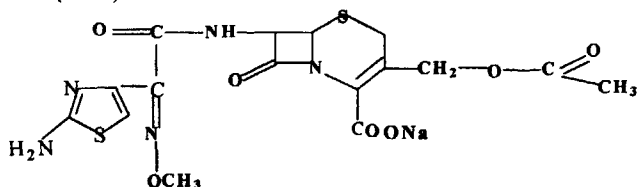


цефалоспорины.

цефазолин (Cef)

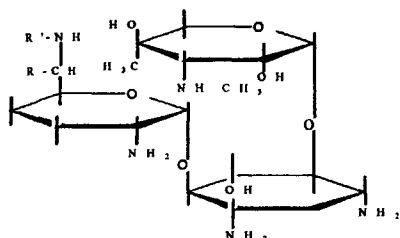


цефотаксим (Cтох)

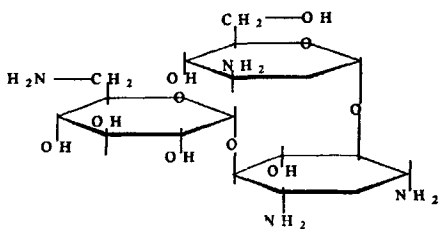


антибиотики аминогликозидного ряда: сульфаты

гентамицина



канамицина



Лекарственные вещества отвечали требованиям Государственной Фармакопеи.

Изучение состояния антибиотиков в водных средах проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-201 в автоматическом режиме. Контроль рН растворов проводили на иономере И-120.2, рН-метре рХ-150МП, со стеклянным электродом ЭСЛ-63-07. ЭДС цепи измеряли с помощью иономера И-130, электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод марки ЭВЛ-1МЗ.

Транспортные свойства мембран изучали в условиях диффузионного массопереноса и постоянного тока. Для исследования транспортных процессов под током использована четырехэлектродная схема, состоящая из пары платиновых (токопроводящих) и пары хлоридсеребряных (регистрирующих) электродов. Измерения проводили в гальваностатическом режиме ($I = 5 \text{ мкА}$) в течение 8 ч, меняя через каждые 2 ч направление тока поляризации. Исследования проводили с растворами-источниками различной концентрации до установления постоянного значения потенциала и наступления равновесия; концентрации антибиотиков определяли способом градуировочного графика.

Селективность мембран на основе различных ЭАК оценивали методами бионных потенциалов и смешанных растворов. Определение антибиотиков в лекарственных формах и биологических жидкостях проводили способами добоков и градуировочного графика.

В работе использовали следующие методы исследования: прямая потенциометрия, потенциометрическое титрование, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, метод постоянного тока, термогравиметрия, титриметрия.

Научная новизна полученных в диссертации результатов заключается в том, что:

- установлены закономерности влияния природы и концентрации активных компонентов мембран, состава внешних растворов на электродные, транспортные свойства сенсоров в растворах β -лактамных и аминокликозидных антибиотиков;
- по физико-химическим параметрам органических ионообменников антибиотик-противоион показана возможность прогнозирования состава мембран сенсоров с оптимальными электроаналитическими характеристиками;
- на основании количественной оценки скоростей переноса, проницаемости и потока ионов антибиотиков в условиях диффузионного массопереноса и постоянного тока установлены основные переносчики заряда в фазе мембран сенсоров и на границе раздела мембрана-раствор;
- созданы жидкостные потенциометрические сенсоры, чувствительные к β -лактамным и аминокликозидным антибиотикам.

Практическая значимость работы

- по величинам стационарного сопротивления мембран и пределам обнаружения антибиотиков установлен оптимальный состав сенсоров, чувствительных к β -лактамам и аминокликозидам;
- выявлено влияние кислотности среды на устойчивость антибиотиков; установлены временные границы хранения их стандартных растворов;
- разработаны методики ионометрического определения β -лактамов и аминокликозидов в лекарственных формах и биологических средах.

На защиту автор выносит:

- физико-химические характеристики органических ионообменников в водных средах и фазе мембраны;
- закономерности изменения электродных и транспортных свойств мембран при варьировании природы и концентрации активных компонентов;
- аналитическое применение сенсоров, чувствительных к β -лактамам и аминокликозидам.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием "Экоаналитика-2003" (Санкт-Петербург, 2003); IV, V Всероссийских конференциях молодых ученых "Современные проблемы теоретиче-

ской и экспериментальной химии” (Саратов, 2003, 2005); VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием (Уфа, 2004); Всероссийской конференции по аналитической химии “Аналитика России” (Москва, 2004); конференции РФФИ “Фундаментальная наука в интересах развития критических технологий” (г. Владимир, 2005); Всероссийской конференции с международным участием “Электроаналитика-2005” (Екатеринбург, 2005), научных семинарах кафедры.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 7 статей, 2 депонированные рукописи, 5 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 185 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы, 61 рисунок. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и приложений. Библиография включает 173 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении рассмотрена актуальность исследований, направленных на создание жидкоконтактных сенсоров для определения β -лактамных и аминогликозидных антибиотиков в фармацевтических формах и биологических субстратах, сформулирована цель и задачи исследования, новизна и практическая значимость работы.

Глава 1 представляет собой обобщенные и систематизированные литературные данные по современным методам определения антибактериальных препаратов в лекарственных формах и биологических жидкостях, тканях и т.п.

В главе 2 описаны объекты и методы исследования, аппаратура. Приведены методики синтеза ЭАК, поливинилхлоридных мембран, конструкции жидкоконтактных сенсоров.

В главе 3 оценены основные физико-химические характеристики органических ионообменников, входящих в состав мембран: соотношения компонентов, произведения растворимости ионных ассоциатов, их термическая устойчивость.

Глава 4 посвящена изучению состояния β -лактамных антибиотиков в водных средах; электроаналитических свойств сенсоров, чувствительных к β -лактамам. Приведены результаты исследования транспортных свойств мембран в условиях диффузионного массопереноса и постоянного тока.

В главе 5 приведены результаты спектрофотометрического исследования различных партий и серий аминогликозидных антибиотиков. Приведены данные влияния природы активных компонентов на электродные и транспортные свойства мембран, чувствительных к аминогликозидным антибиотикам.

Глава 6 посвящена аналитическому применению сенсоров для детектирования β -лактамных и аминогликозидных антибиотиков в лекарственных формах и биологических жидкостях (смешанной слюне).

В приложениях приведены методики определения антибиотиков в фармацевтических препаратах и смешанной слюне, представлены акты о внедрении.

Физико-химические характеристики органических ионообменников

С целью направленного выбора активных компонентов мембран ионоselectивных электродов, чувствительных к антибиотикам β -лактаминового ряда и аминокликозидам, были изучены основные физико-химические свойства органических ионообменников - тетрадециламмония с анионами β -лактамов, тетрафенилбората и азокрасителя кислотного хром черного специального с катионами аминокликозидов.

Стехиометрические соотношения компонентов, а также величины произведений растворимости (K_S) определяли методом осадительного потенциометрического титрования (рис. 1, 2). Так как индикаторный электрод сохраняет функцию на титруемый ион после точки эквивалентности, величины K_S рассчитывали по формуле:

$$K_S = 10^{\frac{E-E_0}{S}} \cdot \frac{C_{\text{ант}}(V_2 - V_{\text{к.т.т}})}{V_1 + V_2}$$

где E – величина потенциала, найденная по кривой титрования после к.т.т., мВ; E^0 – начальная величина потенциала при $V_{\text{ант}}=0$, мВ; S – угловой коэффициент электродной функции, мВ/рС; $C_{\text{ант}}$ – концентрация раствора антибиотика, М; V_1 – объем раствора тетрадециламмония бромиды, взятого для титрования, мл; V_2 – объем антибиотика после к.т.т.; $V_{\text{к.т.т}}$ – объем антибиотика в к.т.т., мл.

В качестве индикаторных использовали электроды на основе: Реп-ТДА для пенициллинов, Сef-ТДА, Стох-ТДА для цефалоспоринов; Ген-ТФБ и Ген-КЧС для аминокликозидов.

Обработка кривых титрования тетрадециламмония бромиды растворами β -лактаминных антибиотиков проводилась по методу Грана. Экспериментальные данные преобразовывали в функции, дающие линейную зависимость параметра Грана ($\Gamma = 10^{\frac{E}{S}}$, где E – потенциал (мВ); $S = 0,059$ мВ/рС) от объема титранта. Конечную точку титрования находили графически. По кривым потенциометрического титрования установлено, что β -лактамы реагируют с тетрадециламмонием в стехиометрическом соотношении 1 : 1, аминокликозиды с тетрафенилборатом и азокрасителем кислотным хром черным специальным – 1:2. Величины произведений растворимости и соотношений компонентов в ионных ассоциатах приведены в табл. 1.

По величинам произведений растворимости (K_S) органических ионообменников, сделан вывод о возможности их использования в качестве электродноактивных компонентов мембран ИСЭ. Близкие значения K_S ионных ассоциатов позволяют предположить, что пределы обнаружений антибиотиков с электродами на основе различных ЭАК не будут иметь существенных различий.

По результатам исследования *термической* устойчивости ионных ассоциатов β -lac-TDA, Ген-ТФБ и Ген-КЧС установлен температурный интервал

существования фазы электродноактивных соединений. Термоаналитическое исследование показало, что ионные ассоциаты β -lac-TDA являются индивидуальными соединениями, в состав которых не входит вода. Высушивание органических ионообменников следует проводить при 60-70°C. Электродноактивные компоненты гентамицина с тетрафенилборатом и кислотным хром черным специальным являются термически стойкими соединениями. Образцы не претерпевают существенных изменений при нагревании до 100°C.

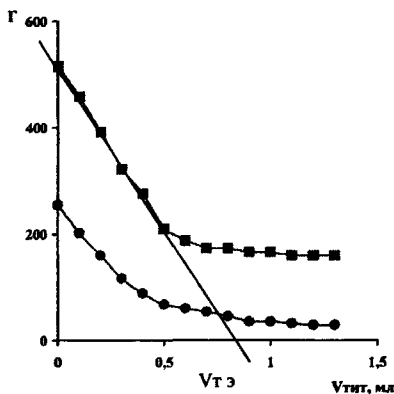


Рис. 1. Кривые титрования $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора TDA-Br $1 \cdot 10^{-3}$ М растворами бензилпенициллина (1), ампициллина (2)

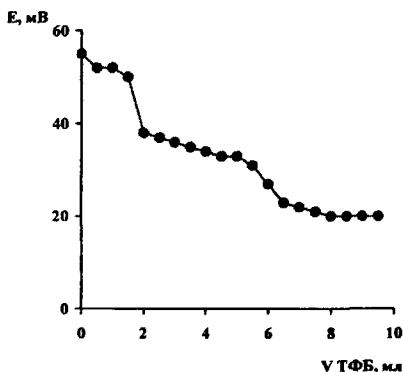


Рис. 2. Кривая потенциометрического титрования гентамицина тетрафенилборатом

Таблица 1. Основные физико-химические характеристики органических ионообменников ($n=3$, $p=0,95$)

ЭАК	соотношение компонентов	$K_S \pm \Delta K_S$	Sr
Pen-TDA	1:1	$(6,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	0,01
Am-TDA	1:1	$(8,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	0,01
Ox-TDA	1:1	$(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-10}$	0,01
Cef-TDA	1:1	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	0,02
Стох-TDA	1:1	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	0,02
Ген-ТФБ	1:2	$(2,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	0,01
Ген-КЧС	1:2	$(8,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,01

Электроаналитические свойства сенсоров, чувствительных к β -лактамам антибиотикам

Для изучения основных электроаналитических характеристик ИСЭ в растворах антибиотиков необходимо оценить *состояние антибактериальных веществ в водных средах*. Нами проведены исследования по установлению временных границ хранения стандартных растворов антибиотиков, выявлено влияние кислотности среды на их устойчивость. *Спектрофотометрически* были исследованы различные серии пенициллинов и цефалоспоринов (рис. 3).

Как видно из рис. 3 оптическая плотность в λ_{\max} отличается для разных серий цефазолина ($\Delta A_{\max} \approx 0,3$), что свидетельствует о различном содержании основного вещества в лекарственных препаратах. Спектры цефотаксима различных производителей практически идентичны.

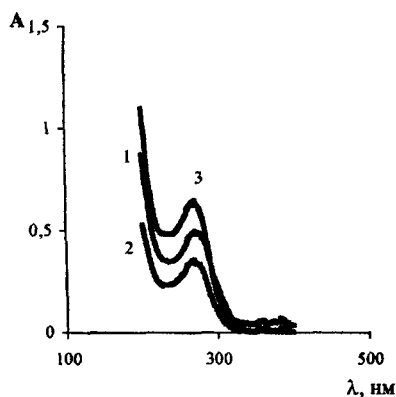


Рис. 3. Спектры поглощения раствора цефазолина различных производителей ($C_{\text{cef}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М): 1- ФАО «Ферейн»; 2- ООО «Хант-Холдинг»; 3- ООО «Компания «Деко»

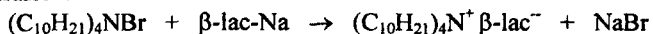
Установлено влияние кислотности среды на основные оптические характеристики цефалоспоринов. Так, для цефазолина происходит смещение A_{\max} ($\Delta A_{\max} = 0,5$), а в случае цефотаксима происходит гипсохромный сдвиг полосы поглощения ($\Delta A_{\max} = 0,5$; $\Delta \lambda_{\max} = 30$ нм). Увеличение оптической плотности и λ_{\max} при изменении кислотности среды можно объяснить тем, что в кислой среде антибиотики быстро гидролизуются, β -лактамное кольцо раскрывается, образуя производное 7-аминоцефалоспороновой кислоты, а в случае цефотаксима происходит дальнейшая гетероциклизация (лактонизация), образуется дезацетилцефотаксим. Дезацетилцефотаксим – производное цефотаксима, которое в больших количествах может быть обнаружено в биологических жидкостях. Дезацетилцефотаксим также проявляет микробиологическую активность и известно, что соединение максимально стабильно в интервале pH 4,3-6,5.

Растворы пенициллинов также во времени неустойчивы, происходит гидролиз антибиотиков. Таким образом, стабильность растворов β -лактамов зави-

сит от температуры, pH раствора и др. Поэтому в настоящей работе использовались только свежеприготовленные растворы антибиотиков.

Для создания сенсоров, чувствительных к β -лактамам антибиотикам, необходимо было установить оптимальный состав мембран, способ введения ЭАК в фазу мембран, оценить их электродные (угловой коэффициент, интервал линейности), транспортные (поток ионов, проницаемость, сопротивление мембран) и операционные (срок службы сенсоров, дрейф потенциала) характеристики.

Ионные ассоциаты β -lac-TDA вводили в фазу мембраны в виде индивидуальных соединений (способ 1) или экстракционно при кондиционировании электрода на основе TDABr в 10^{-2} М растворе антибиотика в течение суток (способ 2). При этом бромид-ионы обмениваются на потенциалопределяющие ионы β -лактамов:



В табл. 2 в качестве примера приведены основные электроаналитические и операционные характеристики сенсоров, чувствительных к β -лактамам при различных способах введения ЭАК.

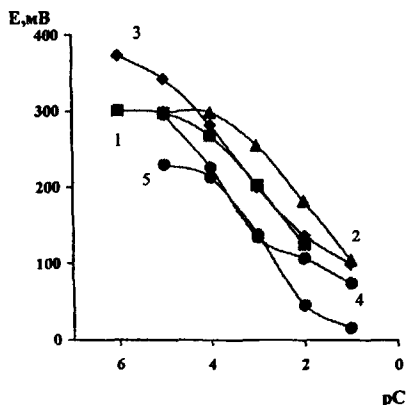
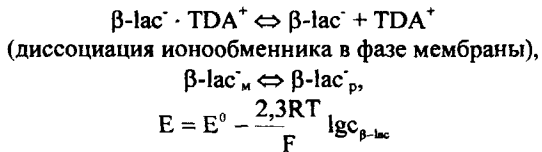
Таблица 2. Влияние природы и способа введения ЭАК на электрохимические свойства ИСЭ (n=3, p=0,95)

ЭАК	$E = f(-\lg C)$	S, мВ/рС	ПрО, М	ΔE , мВ/сут	Срок службы, мес.
Pen - TDA (1 способ)	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	58 ± 2	$1,9 \cdot 10^{-6}$	1	4
Pen - TDA (2 способ)	$3 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	57 ± 2	$5,0 \cdot 10^{-5}$	2	3
Cef-TDA (1 способ)	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	60 ± 2	$4,5 \cdot 10^{-6}$	2	4
Cef-TDA (2 способ)	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	55 ± 1	$6,1 \cdot 10^{-5}$		2

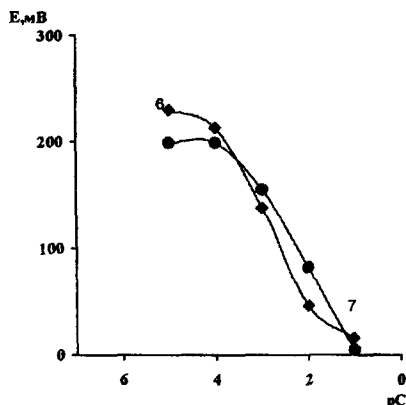
Установлено, что сенсоры на основе β -lac-TDA, введенными в виде индивидуальных соединений) обладают большим сроком службы, стабильными электроаналитическими характеристиками. Аналогичные данные получены для сенсоров на основе ионных ассоциатов тетрадециламмония с анионами ампициллина, оксациллина, цефотаксима.

По основным электроаналитическим характеристикам сенсоров при варьировании концентрации β -lac - TDA (0,001 - 0,1 моль/кг ДБФ) в мембранах установлен их оптимальный состав: ЭАК - Pen-TDA, Cef-TDA, Стох-TDA, C_3 -ак=0,01 моль/кг ДБФ, соотношение ПВХ : ДБФ = 1:3.

Сенсоры на основе органических ионов β -lac-TDA проявляют чувствительность к антибиотикам пенициллинового и цефалоспоринового рядов (рис. 4а, б). Данные табл. 2 и рис. 4а, б свидетельствуют о том, что линейность электродных функций сохраняется в широком диапазоне концентраций антибиотиков, угол наклона близок к теоретическому для однозарядных ионов. Потенциалоопределяющей является реакция ионного обмена на границе раздела мембрана/раствор:



а



б

Рис. 4. Электродные функции сенсоров в растворах β -лактамовых антибиотиков: бензилпенициллина (1); ампициллина (2); оксациллина (3); амоксициллина (4); феноксиметилпенициллина (5) (ЭАК - Реп-TDA); цефазолина (6); цефотаксима (7) (ЭАК Cef-TDA, Stox-TDA)

При исследовании *динамических свойств* селективных электродов установлено, что природа аниона лекарственного вещества в составе ЭАК и анализируемом растворе практически не влияет на время установления стационарного потенциала. Для времен отклика исследуемых сенсоров по отношению к антибиотикам в растворе наблюдается последовательное уменьшение t_{95} при переходе от разбавленных растворов к более концентрированным. Сенсоры характеризуются небольшим временем отклика (0,5-1 мин), следовательно, обладают высокой ионообменной способностью.

При исследовании *транспортных свойств* мембран на основе органических ионообменников оценивались скорости переноса, проницаемость и поток

ионов антибиотиков в условиях диффузионного массопереноса и при постоянном токе при варьировании природы и концентрации ЭАК в мембранах, состава внешних растворов.

Установлено, что с увеличением времени контакта с примембранным раствором потенциал уменьшается и достигает стационарного значения через 30 мин, что свидетельствует о достижении состояния равновесия.

На рис. 5а, б представлены зависимости проницаемости и потока ионов от концентрации примембранного раствора для мембран на основе ионного ассоциата Ам-TDA. Полученные зависимости (рис. 5а, б) свидетельствуют о том, что электродноактивные соединения в фазе мембраны находятся в диссоциированном состоянии, и переносчиками зарядов в мембранах являются ионы антибиотиков и тетрадециламмония.

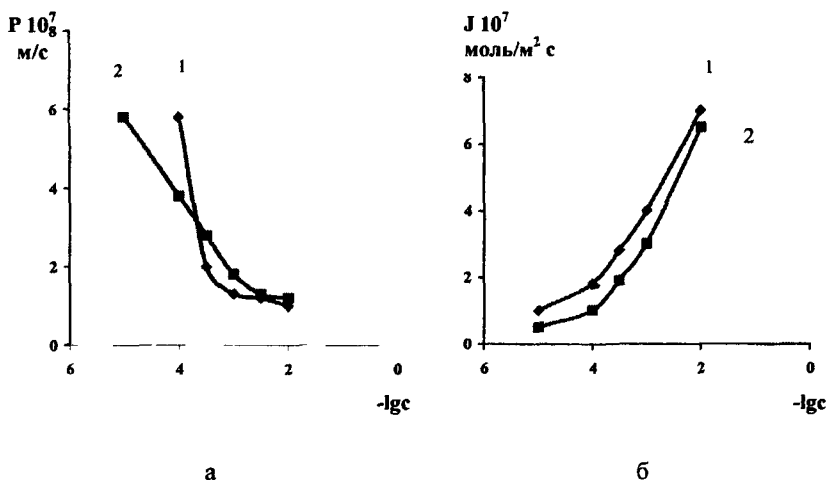


Рис. 5. Зависимости проницаемости (а) и потока ионов (б) антибиотиков от концентрации примембранных растворов в условиях диффузионного массопереноса (1), в условиях постоянного тока (2)

Установлено, что скорости переноса ($2 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-6}$ моль/м²×ч), проницаемости и потока ионов антибиотиков под током выше в среднем на порядок, чем в условиях диффузионного массопереноса. Проницаемости и потоки ионов антибиотиков зависят от времени контакта мембран с растворами антибактериальных препаратов: через 2-3 суток данные параметры принимают стационарные значения. Уменьшение проницаемости с увеличением концентрации связано с насыщением мембраны, а увеличение потока ионов, в тех же условиях – с повышением количества ионов проходящих через мембрану.

Временные зависимости сопротивления мембран на основе ионных ассоциатов β-lac-TDA при варьировании концентрации ЭАК (I=5мА) приведены на рис.6. Все изученные мембраны характеризуются устойчивыми токами прово-

димости в течение продолжительных интервалов времени, даже после смены направления тока. Постоянные значения потенциала устанавливаются через 2 часа после пропуска тока через ячейку в том или ином направлении; величина падения напряжения на мембране не изменяется при смене направления тока. Это свидетельствует о том, что происходит обратимый ионный обмен между мембраной и внешним исследуемым раствором антибиотика (рис.6). При увеличении концентрации электродноактивных компонентов, сопротивление мембран уменьшается, что связано с увеличением концентрации ионообменных центров в фазе мембран. Фоновые мембраны имеют высокое сопротивление ($R=3$ МОм); накопление подвижных носителей заряда в фоновой мембране происходит за счет поглощения ионов антибиотиков из раствора.

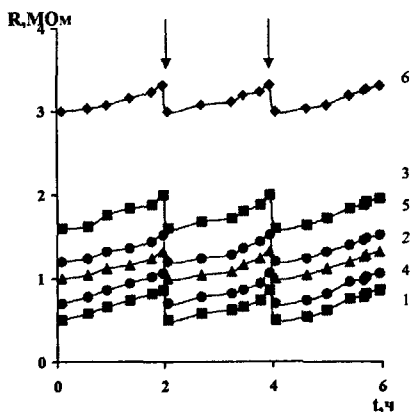
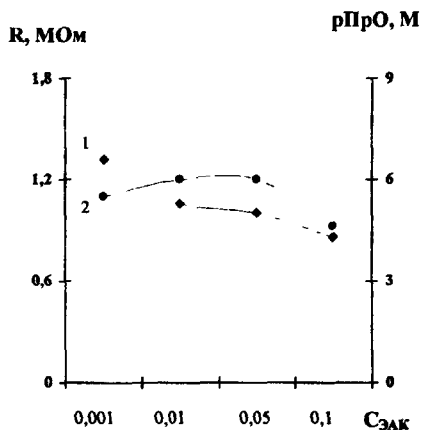


Рис. 6. Зависимости сопротивления мембран на основе ионных ассоциатов ампициллин - тетрадециламмоний (1-3), цефазолин-тетрадециламмоний от времени контакта с 1×10^{-3} М раствором ампициллина (1-3) и цефазолина (4-6). Концентрация ЭАК в мембране моль/кг ДБФ: 1-0,1; 2-0,01; 3-0,001; 4-0,1; 5-0,01; 6-фоновая

По стационарному сопротивлением рассчитаны кажущиеся константы диссоциации ($K_{дис}$) ассоциатов β -lac-тетрадециламмоний в мембранной фазе, получено, что $K_{дис}$ электродноактивных компонентов имеют близкие значения и составляют: $(7,62 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$; $(3,65 \pm 0,11) \cdot 10^{-2}$; $(5,12 \pm 0,15) \cdot 10^{-2}$ ($6,44 \pm 0,07$) $\cdot 10^{-2}$ для Реп-TDA, Ам-TDA, Ох-TDA, Cef-TDA соответственно. Это свидетельствует о том, что природа антибиотика в составе электродноактивных компонентов практически не влияет на свойства мембран на их основе.

Рис. 7. Зависимости сопротивлений мембран в 10^{-3} М растворе Реп (1) и предела обнаружения бензипенициллина (2) от концентрации ЭАК



По величинам сопротивлений мембран и пределам обнаружения антибиотиков установлен оптимальный состав мембран сенсоров ($C_{ЭАК}$ 0,01-0,05 моль/кг ДБФ, соотношение ПВХ : ДБФ = 1:3) (рис.7).

Потенциометрические сенсоры, чувствительные к аминогликозидным антибиотикам

Проведенное в настоящей работе *спектрофотометрическое* исследование гентамицина сульфата различных производителей (Дальхимфарм, Ферейн), различных сроков хранения свидетельствует о неодинаковом составе исследуемых препаратов: λ_{max} находится в пределах 270-295 нм; оптическая плотность в максимуме колеблется от 0,3 до 0,9 (рис. 8). Растворы гентамицина сульфата имеют различную кислотность: рН 3,4 (Дальхимфарм, серия 3) – 4,6 (Ферейн, серия 1), которая увеличивается при хранении; оптическая плотность при этом возрастает (рис. 8).

Установлено, что λ_{max} и A_{max} различаются для исследуемых растворов гентамицина. Это свидетельствует о том, что содержание основного вещества колеблется в зависимости от производителя и анализируемой партии.

Таким образом, состояние гентамицина в водной среде является нестабильным и следует проводить тщательный контроль за содержанием гентамицина в фармацевтических формах. В работе использовали только свежеприготовленные растворы аминогликозидов.

Для моделирования состава мембран сенсоров, чувствительных к аминогликозидам, использованы ионные ассоциаты гентамицина с тетрафенилборатом и кислотным хром черным специальным. На рис. 9 приведены электродные функ-

ции сенсоров на основе Ген-ТФБ и Ген-КЧС в растворах аминогликозидов; в табл. 3 сведены их основные электродные и операционные характеристики.

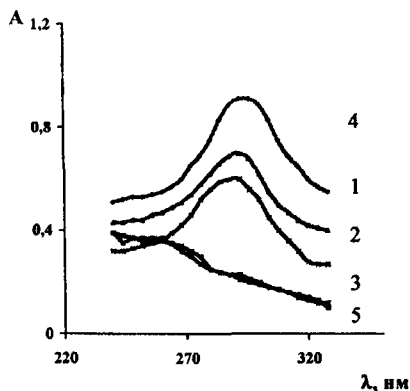


Рис. 8. Спектры светопоглощения растворов гентамицина различных серий: Дальхимфарм (1,2,3), Ферейн (4,5)

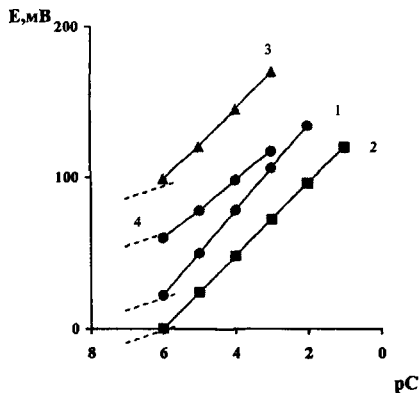


Рис. 9. Электродные функции ИСЭ на основе Ген-ТФБ в растворах гентамицина (1), канамицина (2); Ген-КЧС в растворе гентамицина (3, 4); $S_{ЭАК}$ (моль/кг ДБФ) – 0,01 (3); 0,001 (4)

Таблица 3. Влияние природы противоиона в составе ЭАК на характеристики сенсоров

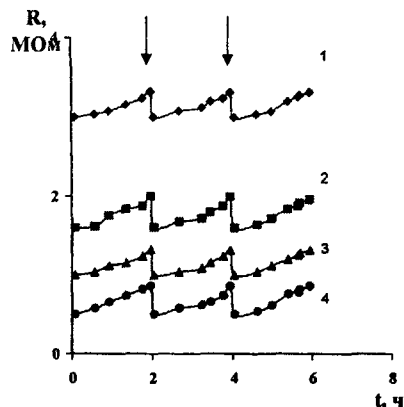
ЭАК	Ген-ТФБ	Ген-КЧС
Свойства		
$E=f(-lgC), M$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-6} - 1,6 \cdot 10^{-3}$
$S, мВ/ρC$	28 ± 2	24 ± 2
PrO, M	$8 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$
Время отклика, мин.	3-5	3-5
ΔE мВ/сут.	3-4	3-4
Срок служ. мес.	1	2

Проведенное исследование показало, что сенсоры на основе гентамицина с тетрафенилборатом и азокрасителем кислотным хром черным специальным различаются по основным характеристикам (см. табл. 3). Электрод на основе Ген-ТФБ проявляет чувствительность как к гентамицину, так и к канамицину, угловой коэффициент максимально приближен к теоретическому, но для оптимальной работы сенсора в растворах гентамицина сульфата необходимо поддерживать соответствующий интервал кислотности ($pH\ 6,0 \pm 0,1$).

Электрод на основе Ген-КЧС является высокоселективным к гентамицину, обладает низким пределом обнаружения, и его можно рекомендовать для определения гентамицина в присутствии канамицина

Транспортные свойства мембран на основе ионных ассоциатов Ген-ТФБ и Ген-КЧС исследовали при постоянном токе. На рис. 10 представлены зависимости сопротивлений при постоянном токе со сменой поляризации от времени контакта с раствором аминокгликозида.

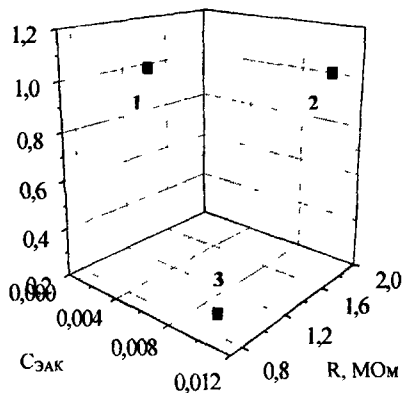
Рис. 10. Зависимости сопротивления мембран на основе ионных ассоциатов Ген – ТФБ (2), Ген-КЧС (3, 4) с $1 \cdot 10^{-3}$ М раствором гентамицина. Концентрация ЭАК в мембране, моль/кг ДБФ: 1- фонная; 2 - 0,01; 3 - 0,001; 4 - 0,01



Сопротивление мембраны (при одинаковой концентрации ЭАК в фазе мембраны) на основе Ген-ТФБ выше, чем сопротивление мембран, в состав которого входит Ген-КЧС.

ПрО, $\cdot 10^5$, М

Рис. 11. Зависимость сопротивления мембран от предела обнаружения гентамицина и концентрации ЭАК – Ген-КЧС (1, 3); Ген-ТФБ (2)



Показано, что низкими значениями сопротивления и предела обнаружения антибиотиков обладает мембрана на основе Ген-КЧС с концентрацией

электродноактивного компонента 0,01 моль кг/ДБФ (3), которая является оптимальной по составу (рис.11).

Аналитическое применение сенсоров

Коэффициенты потенциометрической селективности ($k^{пот}$), например, бензилпенициллина к оксациллину и ампициллину близки к единице, то есть возможно определение индивидуальных антибиотиков или их суммарного содержания; $k^{пот}$ к ряду неорганических ионов (Cl^- , I^- , Br^- , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) позволяют использовать данные электроды для определения антибиотиков в биологических жидкостях

Разработаны экспрессные методики определения β -лактамных и аминогликозидных антибиотиков в фармацевтических препаратах различных производителей, сроков хранения, форм выпуска (порошки во флаконах, таблетки, ампулы).

Содержание основного лекарственного вещества определяли в различных фармацевтических препаратах методом прямой потенциометрии (способ градуировочного графика). Всего было проанализировано 48 образцов фармацевтических препаратов, содержащих пенициллины, примеры определений представлены в табл.4.

Оценку правильности проводили фармакопейным методом - йодометрического титрования (табл.5). Сравнение результатов по F- и t-критериям показало отсутствие систематической погрешности.

Таблица 4. Результаты определения антибиотиков пенициллинового ряда в лекарственных формах различных сроках хранения (n=3, p=0,95).

№ пп	Анализируемый объект	Антибиотик	Производитель	Год выпуска	Найдено $\bar{m} \pm \Delta m$, мг/25 мл	Найдено $w \pm \Delta w$, масс, %	Sr
1	порошок	Pen	ОАО «Биохимик»	1999	9,0±0,9	75±8	0,04
2	таблетка	Am	Борисовский завод мед. препаратов	1998	9,1±0,9	71±7	0,04
3	порошок	Am	АКО «Синтез»	1996	6,0±0,1	68±2	0,01
4	порошок	Ox	ОАО «Биохимик»	2003	9,2±0,2	89±3	0,01
5	таблетка	Fen	АКО «Синтез»	1996	3,3±0,1	33±2	0,01

Таблица 5. Результаты определения пенициллинов потенциометрическим и йодометрическим методами (n=3, p=0,95)

№ образца	Антибиотик	Ионометрия		Йодометрия		F _{эсп}
		$\bar{m} \pm \Delta m, \%$	Sr, %	$\bar{m} \pm \Delta m, \%$	Sr, %	
9	Pen	99±1	0,4	99±3	1,2	4,0
4	Ox	89±3	1,3	89±5	2,2	2,4
7	Amox	33±2	2,4	34±3	3,5	2,0
3	Am	68±2	1,2	68±3	1,8	3,2

Впервые предложенные сенсоры были использованы для определения β-лактамов и аминогликозидов в смешанной слюне. Корреляции концентраций антибиотиков в слюне и плазме крови позволяет использовать вместо проб крови более доступные образцы смешанной слюны. Слюна содержит около 99,42% воды и 0,58 % растворенных органических и минеральных веществ. Смешанная слюна или ротовая жидкость отличается от секрета слюнных желез дополнительным присутствием микрофлоры. Пробоподготовку слюны проводили с помощью центрифугирования, в качестве депротенизатора использовался этиловый спирт. Для предотвращения белкового отравления мембран необходимо кондиционировать сенсор в донорской смешанной слюне в течение 20 мин. Определение содержания антибиотиков в биопробах пациентов проводили способом добавок. Проанализировано 18 образцов смешанной слюны больных урологическими заболеваниями (примеры определения антибиотиков приведены в табл. 6).

Для оценки правильности разработанной методики в биопробу сыворотки донора вводили добавку стандартного раствора антибиотика и далее пробу проводят через все стадии пробоподготовки. Показано, что найденные содержания антибиотиков соответствуют введенным.

Таблица 6. Результаты определение цефазолина и цефотаксима в смешанной слюне больных (n=3, p=0,95)

Пациент	Антибиотик	Найдено, мкг/мл	Sr
1	Ctox	0,15±0,02	0,05
2	Cef	0,20±0,05	0,10
3	Cef	0,03±0,005	0,07
4	Amox	0,76±0,06	0,03
5	Am	0,90±0,03	0,01

Электроды на основе ионного ассоциата Ген-КЧС были использованы для определения гентамицина и канамицина в варианте осадительного потенциометрического титрования в пробах смешанной слюны с внесенными добавками (табл.7, рис.12).

Таблица 7. Результаты определения аминогликозидов в пробах смешанной слюны с внесенным добавками антибиотиков методом потенциометрического титрования (n=3, p=0,95)

п/п	Антибиотик	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	D, %
1	Ген	0,48	0,47±0,01	2,1
2	Ген	2,39	2,32±0,02	2,9
3	Ген	1,43	1,40±0,01	2,1
4	Кан	0,93	0,91±0,01	2,1
5	Кан	9,30	9,00±0,01	3,0

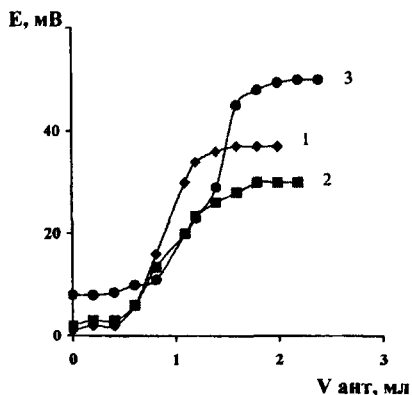


Рис. 12. Кривые потенциометрического титрования кислотного хром черного специального смешанной слюной с внесенными добавками аминогликозидов ($1 \cdot 10^{-4}M$; $2 \cdot 10^{-5}M$; $3 \cdot 5 \cdot 10^{-6}M$)

Методики ионометрического определения антибиотиков не требуют сложной пробоподготовки, отличаются экспрессностью, широким диапазоном определяемых содержаний.

ВЫВОДЫ

1. Установлены закономерности влияния природы органических ионообменников на электроаналитические свойства потенциометрических сенсоров, чувствительных к антибиотикам. Показано, что близость физико-химических характеристик ЭАК обуславливает идентичность электродных, транспортных, селективных свойств мембран и позволяет прогнозировать создание сенсоров для детектирования индивиду-

- альных или отдельных групп β -лактамов и аминогликозидных антибиотиков.
2. Оценены транспортные характеристики мембран (скорости переноса, проницаемость, поток ионов) при варьировании природы и концентрации органических ионообменников в фазе мембраны, природы и концентрации внешних растворов антибиотиков в условиях диффузионного массопереноса и постоянного тока. По величинам кажущихся констант диссоциации показано, что электродноактивные компоненты находятся в фазе мембраны в диссоциированном состоянии, основными переносчиками заряда являются ионы антибиотиков.
 3. По величинам стационарных сопротивлений мембран и пределам обнаружения антибиотиков, способам введения электродноактивных компонентов в фазу мембран установлен оптимальный состав сенсоров. В качестве ЭАК рекомендованы ионные ассоциаты тетрадециламмония с бензилпенициллином, цефазолином, цефотаксимом, гентамицина с тетрафенилборатом и кислотным хром черным специальным ($C_{\text{ЭАК}} = 0,01$ моль/кг ДБФ, соотношение ПВХ:ДБФ – 1:3).
 4. Установлено, что водные растворы антибиотиков неустойчивы во времени, что связано с протеканием протолитических процессов. На практике необходимо использовать только свежеприготовленные растворы антибиотиков с предварительной спектрофотометрической оценкой содержания вещества.
 5. Созданы потенциометрические сенсоры на основе органических ионообменников, чувствительных к β -лактамам и аминогликозидам. Оценены их эксплуатационные характеристики (дрейф потенциала, срок службы).
 6. По коэффициентам потенциометрической селективности сенсоров показана возможность их применения для определения антибиотиков в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях. Разработаны экспрессные методики ионометрического определения β -лактамов и аминогликозидов в твердых и ампульных лекарственных формах и смешанной слюне.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И. Ионоселективные электроды для определения антибиотиков пенициллинового ряда в биологических жидкостях и лекарственных формах // Журн. аналит. химии. 2004. Т.59, №9. С.971–975.
2. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И. Экспрессное ионометрическое определение аминогликозидных антибиотиков в лекарственных формах и биологических жидкостях больных инфекционной патологией // Журн. аналит. химии. 2005. Т.60, №6. С.592–597.
3. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И. Определение гентамицина и

- канамицина в биологических жидкостях и лекарственных препаратах // Хим.-фарм. журн. 2004. Т.39, №9. С.48–51.
4. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Чернов Д.В. Электрохимические свойства мембран на основе ассоциатов β -лактамных антибиотиков с тетрадециламмонием // Электрохимия. 2005. Т.41, №8. С.981–986.
 5. Михалева Н.М., Кулапина Е.Г., Барагузина В.В. Транспортные свойства ионообменных и нанофильтрационных поливинилхлоридных мембран // Мембраны, 2005. №4. С.26–29. (Сер. «Критические технологии»).
 6. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И., Михайлова Е.Е. Современные методы определения антибиотиков. М., 2003, 54 с. Деп. ВИНТИ. №2155-В.
 7. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В. Методы определения аминогликозидных антибиотиков. М., 2004, 17 с. Деп. ВИНТИ. №264-В.
 8. Барагузина В.В. Новые ионоселективные электроды, чувствительные к различным группам антибиотиков // Сб. научных статей молодых ученых, посвященный 75-летию химического факультета «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии». Саратов, 2004. С.105–109.
 9. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Петрова В.В. Ионметрическое и фотометрическое определение антибиотиков аминогликозидного ряда // Сб. научных статей «Органические реагенты в организованных средах». Саратов, 2003. Вып.7. С.94–98.
 10. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В. Электроаналитические свойства мембран на основе ионных ассоциатов тетрадециламмония с антибиотиками пенициллинового ряда // IV Всерос. конф. по электрохимическим методам анализа с междунар. участием (ЭМА-2004). Уфа, 2004. С.131.
 11. Кулапина О.И., Барагузина В.В. Ионметрическое определение антибиотиков в биологических жидкостях больных с инфекционной патологией // Всерос. конф. по аналит. химии «Аналитика России». М., 2004. С. 220.
 12. Барагузина В.В., Кулапина Е.Г. Спектрофотометрическое определение гентамицина и канамицина в лекарственных препаратах // Всерос. конф. по аналит. химии «Аналитика России». М., 2004. С. 202.
 13. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И., Чернов Д.В. Анализ медицинских объектов на содержание β -лактамных антибиотиков с применением потенциометрических сенсоров // Всерос. конф. с междунар. участием «Электроаналитика-2005». Екатеринбург, 2005. С. 249.
 14. Барагузина В.В., Гречушникова Д.В. Кулапина Е.Г. Новые потенциометрические сенсоры для определения аминогликозидных антибиотиков // V Всерос. конф. молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии». Саратов, 2005. С. 50.

Автореферат

Барагузина Виктория Владимировна

Потенциометрические сенсоры на основе органических ионообменников
для определения β -лактамных и аминогликозидных антибиотиков

02.00 02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Подписано в печать 01 02 06
Формат 60×84 1/16 Объем 1,5 усл. печ л. Тираж 100 экз Заказ № 3

Типография Издательства Саратовского университета
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

2006A
2866

#-2866