

УДК 543.068.8

## ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННОГО *пара*-ДИМЕТИЛАМИНОБЕНЗАЛЬДЕГИДА

© 2024 г. А. В. Тумская<sup>а,\*</sup>, И. В. Косырева<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского  
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012, Россия

\* E-mail: marakaeva\_anastasiya@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

Предложены индикаторные бумаги с иммобилизованным пара-диметиламинобензальдегидом для визуально-колориметрического и цветометрического определения антибактериальных соединений группы цефалоспоринов (цефалексина, цефуроксима, цефотаксима, цефтриаксона, цефазолина) с применением камеры смартфона. Оценено влияние условий и типа фоторегистрирующего устройства. Правильность разработанных экспресс-методик оценивали способом введено–найденно, методики характеризуются удовлетворительной воспроизводимостью результатов ( $sr$  не превышает 19%). Проведен анализ лекарственных препаратов – таблеток “Аксосеф” и капсул “Цефалексин”, найденные содержания цефалоспоринов согласуются с заявленными интервалами их содержаний в препаратах.

**Ключевые слова:** экспресс-определение, индикаторная бумага, цветометрия, *пара*-диметиламинобензальдегид, цефалоспорин.

**DOI:** 10.31857/S0044450224030039, **EDN:** vjrchz

Цефалоспорины, антибактериальные препараты из группы  $\beta$ -лактамов, отличаются широким спектром антибактериальной активности в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Большинство соединений входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [1].

Молекулы цефалоспоринов (схема 1) содержат функциональные группы, которые потенциально могут участвовать в реакциях с хромофорными группами молекул-реагентов. В молекулах цефалоспоринов помимо  $\beta$ -лактамного кольца присутствуют ароматические структуры ряда тиазола, тиadiaзола, фурана и т.д. и функциональные группы  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $>\text{C}=\text{O}$ .

Цефалоспориновые антибиотики в таблетках, капсулах, мазях и других лекарственных формах идентифицируют с помощью современных физико-химических методов. Методы ИК-, УФ-спектроскопии включены в Государственную и Международную фармакопею.

Содержание цефалоспоринов определяют методами флуоресцентной спектроскопии [2,

3] и ВЭЖХ [4]. В качестве реагентов предложены реагент Фолина–Чокалтеу [5], 1,2-нафтохинон-4-сульфонат [2], сульфат меди(II) [6]. Однако предложенные способы определения цефалоспоринов занимают длительное время. Таким образом, разработка недорогих и экспрессных способов определения антибактериальных препаратов весьма актуальна.

Цель настоящей работы – разработка способов экспресс-определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков с помощью индикаторных бумаг с иммобилизованным *пара*-диметиламинобензальдегидом (ДМАБ) и с применением камеры смартфона.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объекты исследования.** Применяли цефалоспориновые антибиотики цефалексин (ЦФЛ, Sigma Aldrich, США), цефуроксим (ЦФР, Зинацеф, GlaxoSmithKline Manufacturing S.p.A, Италия), цефотаксим (ЦФТ, Биохимик, Россия), цефтриаксон (ЦФТР, Синтез, Россия),

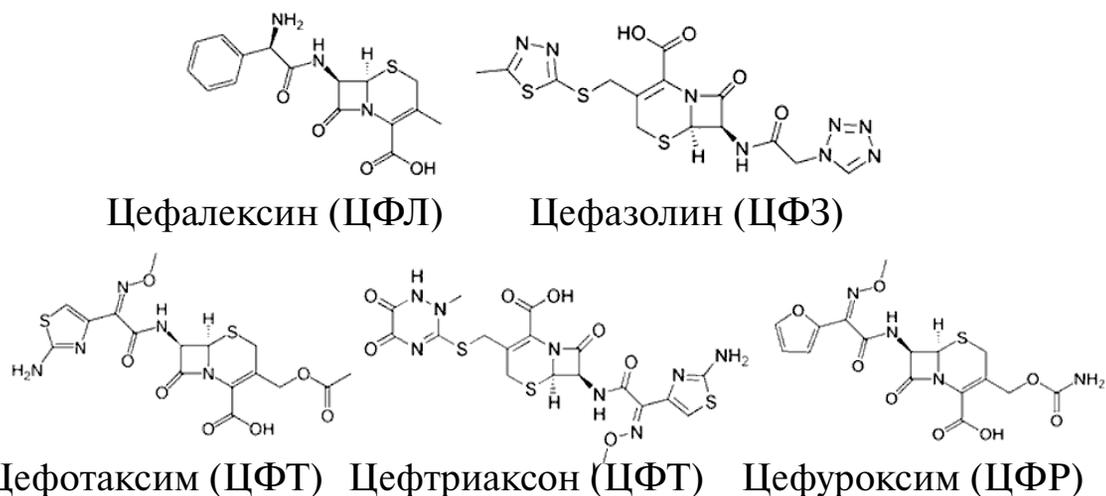


Схема 1. Структурные формулы исследуемых цефалоспоринов.

цефазолин (ЦФЗ, Биосинтез, Россия). Исходные растворы антибиотиков готовили растворением навески соответствующего препарата в дистиллированной воде. Рабочие растворы готовили в день проведения эксперимента разбавлением исходного раствора.

**Реактивы и материалы.** Спиртовой 0.05 М раствор *пара*-диметиламинобензальдегида (Рехим, 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).

**Оборудование и методики исследования.** Спектры диффузного отражения регистрировали на двулучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) с интегрирующей сферой ISR-2200 (Shimadzu, Япония) для анализа твердых образцов; диапазон измерения 200–800 нм. Измеренные значения диффузного отражения ( $R$ ) пересчитывали в функцию Гуревича–Кубелки–Мунка ( $F$ ) по формуле:  $F = (1 - R)^2/2R$ .

Для получения изображений тест-средства помещали в бокс размером 22×23×24 см с двумя полосками светодиодного освещения (5 V, 1 A) и фотографировали камерой смартфона Redmi 6A (на базе ОС Android). Изображения сохраняли в формате .jpg, размер 1 560×1 560 пикселей (формат кадра 18:9, качество фото “высокое”).

Сканирование изображений проводили с применением сканера EPSON с разрешением 1 200 dpi (качество сканирования “наилучшее”, тип изображения “цветной 48-бит”).

Для получения тест-средств целлюлозную бумагу обрабатывали свежеприготовленным спиртовым раствором ДМАБ (0.05 М), при этом полученные индикаторные бумаги не изменяли цвет.

Для приготовления цветовой шкалы концентрации антибиотиков подбирали в соответствии с методиками, предложенными в работах [7–9].

Предел обнаружения (ПрО) определяли в соответствии с методикой, рекомендованной в работе [8].

Условия оптимизировали (время, температура проведения реакции) в соответствии с методиками [9, 10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Взаимодействие цефалоспоринов с *пара*-диметиламинобензальдегидом на поверхности бумаги.** В качестве индикаторной выбрали реакцию аминогрупп цефалоспоринов ( $R-NH_2$ ) с ДМАБ (схема 2) в кислой среде. Преимуществом реакции цефалоспоринов с ДМАБ является одностадийность, отсутствие токсичных реагентов, таких как  $NaNO_3$  и  $\beta$ -нафтол. Кроме того, исследуемые аналиты невозможно определить, с применением индикаторной системы с иммобилизованным нингидрином, предложенной в работе [10].

Реакция ДМАБ с цефуроксимом, цефтриаксоном и цефотаксимом ранее исследована спектрофотометрическим методом [11, 12]. Установлено стехиометрическое соотношение реагентов (1:1) и  $\lambda_{max}$  для производных цефалоспоринов (400–420 нм.). Диапазон определяемых содержаний (ДОС) для цефотаксима составил 2–10 мкг/мл.

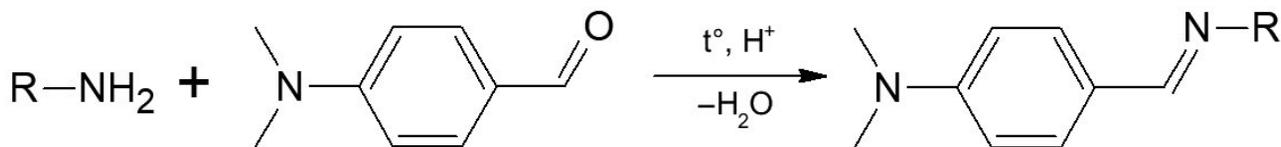


Схема 2. Реакция цефалоспоринов с *para*-диметиламинобензальдегидом.

Методика определения антибиотиков включает два этапа – реакцию диазотирования при 0–5 °С и последующее взаимодействие с ДМАБ. Определены оптимальные условия проведения реакции с ДМАБ в водном растворе (15–20 мин при 50–60 °С в присутствии 0.0625 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), а также стехиометрическое соотношение реагентов (1:1). Установлено, что λ<sub>max</sub> для производных цефалоспоринов лежит в диапазоне 400–420 нм. Ринд и соавт. [11] изучили реакцию цефотаксима натрия с ДМАБ в кислой среде и разработали методику спектрофотометрического определения антибиотика, основанную на образовании окрашенного продукта (λ<sub>max</sub> = 398 нм) с ДОС (2–10) мкг/мл.

В настоящей работе изучали взаимодействие цефалоспоринов (цефалексина, цефотаксима, цефтриаксона, цефазолина и цефуроксима) с *para*-диметиламинобензальдегидом на поверхности целлюлозной матрицы. На рис. 1 представлены спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича–Кубелки–Мунка продуктов взаимодействия цефалоспорина с иммобилизованным ДМАБ. Как видно, при добавлении антибиотика в систему появляется полоса в области 415–430 нм.

Необходимо отметить различия в структурах исследуемых цефалоспоринов. Так, в молекуле ЦФЛ первичная аминогруппа в боковой цепи молекулы сопряжена с группой С=О; в молекулах ЦФТ и ЦФТР NH<sub>2</sub>-группа расположена в тиазольном кольце; в молекуле ЦФР содержится карбаматная группа ОС(О)NH<sub>2</sub>; при этом в молекуле цефазолина первичные аминогруппы

вовсе отсутствуют. Так как реакция с ДМАБ протекает в кислой среде, возможно раскрытие β-лактамного кольца с образованием производного 1,3-тиазина (схема 3). Известно, что солянокислый раствор ДМАБ (реактив Эрлиха) применяют для определения химически сходных структур, в частности индола [13, 14].

Для выбора оптимального значения рН на индикаторную бумагу с иммобилизованным ДМАБ наносили анализируемый раствор антибиотика в среде ацетатно-аммиачного буферного раствора (рН 3 и 4) либо в среде 0.1 М HCl, далее тест-средства нагревали в течение 10 мин при 80 °С. Установили, что наиболее контрастная окраска тест-средств и наибольшее значение изменения интенсивности цветового параметра Blue (ΔI<sub>Blue</sub>, табл. 1) по сравнению с контрольным образцом наблюдается в присутствии 0.1 М HCl.

Цветометрически исследовали влияние температуры и продолжительности реакции цефалоспоринов с иммобилизованным ДМАБ (рис. 2). Как видно из рисунка, для исследуемых систем через ~20–25 мин при 90 °С значения ΔI/Blue максимальны, а тест-средства имеют наиболее интенсивную окраску.

Выбранные оптимальные условия (20–25 мин, 90 °С, 0.1 М HCl) применяли при получении цветных шкал для визуально-колориметрического и цветометрического определения исследуемых антибиотиков.

Визуально-колориметрическое определение цефалоспоринов. Оценивали основные метрологические характеристики разработанных методик с визуальной индикацией

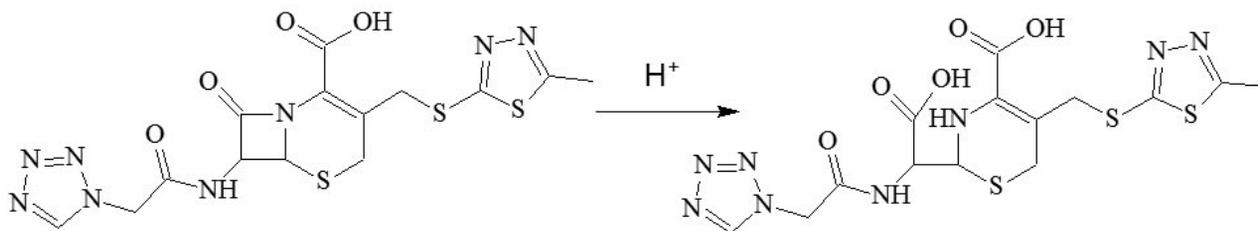
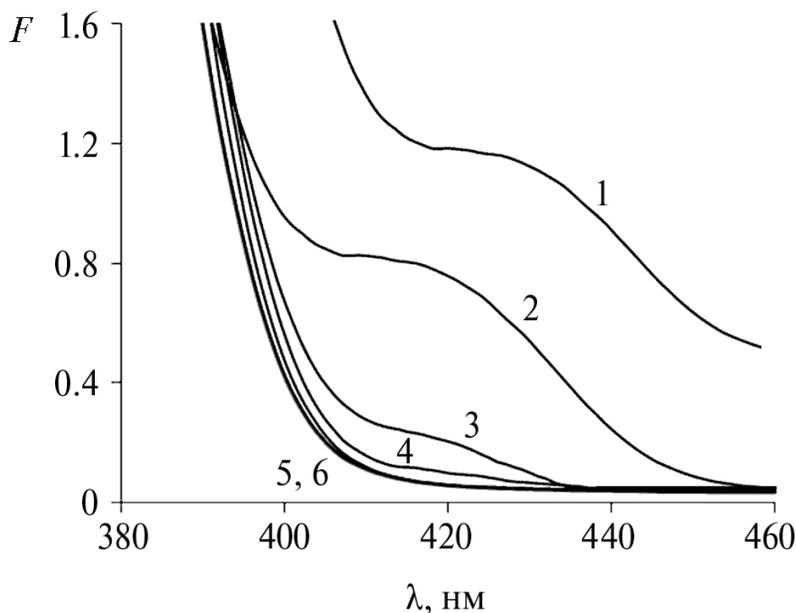


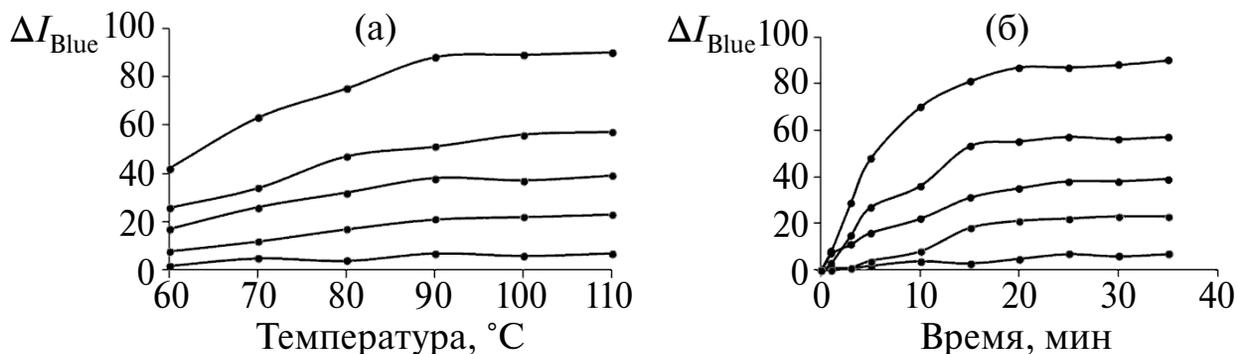
Схема 3. Раскрытие β-лактамного кольца молекуле цефазолина в кислой среде.



**Рис. 1.** Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича – Кубелки – Мунка для систем цефалоспоринов–иммобилизованный *para*-диметиламинобензальдегид (ДМАБ). 1 – цефотаксим, 2 – цефалексин, 3 – цефуроксим, 4 – цефазолин, 5 – цефтриаксон, 6 – ДМАБ; 95 °С, 15 мин, 0.1 М HCl.

**Таблица 1.** Значения изменения интенсивностей параметра Blue (D)

Аналит	pH 3	pH 4	0.1 М HCl
ЦФЛ	56±5	50±5	72±3
ЦФР	21±6	10±5	26±5
ЦФТ	43±5	11±6	67±5
ЦФЗ	92±5	89±4	94±5
ЦФТР	78±4	82±5	88±4



**Рис. 2.** Зависимости  $\Delta I_{\text{Blue}}$  от температуры нагрева (а), от времени нагрева цефалоспоринов с иммобилизованным *para*-диметиламинобензальдегидом (б): 1 — цефуроксим, 2 — цефалексин, 3 — цефотаксим, 4 — цефтриаксон, 5 — цефазолин. 4 мг/мл, 0.1 М HCl.

цефалоспоринов – интервал ненадежности (ИН) и предел обнаружения аналита. Для оценки достоверности методик с визуальной индикацией применяли зависимости вероятности обнаружения аналита  $P(c)$  от его концентрации.

Вероятность обнаружения вычисляли по формуле:  $P(c_i) = n_i/N_i$ , где  $n_i$  – число положительных наблюдений,  $N_i$  – общее число испытаний для концентрации  $c_i$ . Соответствующие зависимости вероятностей обнаружения цефалоспоринов от их концентрации в интервале ненадежности индикаторной реакции представлены на рис. 3 и в табл. 2.

Установлены диапазоны определяемых содержаний (от 0.13 до 16 мг/мл), интервалы ненадежности индикаторных реакций (от 0.05 до 1.7 мг/мл), а также пределы обнаружения (от 0.12 до 1.7 мг/мл) цефалоспоринов при их визуальном-колориметрическом определении.

Цветометрическое определение цефалоспоринов. Цветометрическую обработку изображений тест-средств проводили в разработанной ранее онлайн-программе по определению R, G, B-параметров [15] в разработанном нами приложении к смартфону [16], либо в коммерческой программе Adobe Photoshop® (табл. 3).

При цветометрическом определении цефалоспоринов строили зависимости оптимального (по чувствительности и коэффициенту регрессии) цветового канала от концентрации аналита. Некоторые метрологические характеристики цветометрических методик определения цефалоспоринов с помощью индикаторных бумаг представлены в табл. 4.

Благодаря простоте применения, портативности и возможности хранения информации смартфоны являются одними из наиболее распространенных фоторегистрирующих устройств [15, 17, 18]. Такой способ позволяет проводить цветометрическую оценку в режиме онлайн без подключения к дополнительному оборудованию. В настоящем исследовании для оценки влияния

типа фоторегистрирующего устройства применяли различные марки смартфонов (Redmi 6A, Lenovo K6 Power), а также офисный планшетный сканер (Epson). Изображения тест-средств регистрировали без применения специализированных устройств, а также в боксе для фотографирования (с двумя полосками светодиодного освещения (5 V, 1 A)). В табл. 5 представлены уравнения регрессии градуировочных зависимостей, а также значения изменения интенсивностей параметра Blue, полученные при варьировании типа и условий фотографирования. Как видно, значения  $\Delta I_{Blue}$ , а также уравнения градуировочных зависимостей одинаковы в пределах доверительного интервала (значения  $\Delta I$  от 61 до 66). Таким образом, тип фоторегистрирующего устройства и условия фотографирования не влияют на полученные результаты.

Правильность разработанных экспресс-методик оценивали способом введено–найдено (табл. 6). Как видно из таблицы, значения относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) для разработанных экспресс-методик находятся в диапазоне от 9 до 19% для всех анализируемых цефалоспоринов, что свидетельствует о возможности применения разработанной экспресс-методики для определения антибиотиков с погрешностью, не превышающей 19%.

Определение антибиотиков в лекарственных препаратах. Разработанные тест-средства апробировали при оценке содержания цефалоспоринов в лекарственных препаратах (“Аксосеф” (цефуросим) таблетки, “Цефалексин” капсулы). При тест-определении содержания антибиотика каплю анализируемого раствора наносили на индикаторную бумагу, нагревали и оценивали содержание антибиотика с помощью разработанных методик визуального и цветометрического определения (табл. 7). Найденные в препаратах содержания цефуросима и цефалексина согласуются с заявленными интервалами

**Таблица 2.** Некоторые метрологические характеристики методик визуального-колориметрического определения цефалоспоринов

Аналит	ДОС, мг/мл	ИН, мг/мл	ПрО, мг/мл
ЦФР	2.0–16	1.4–1.7	1.7
ЦФЛ	0.25–8.0	0.06–0.17	0.17
ЦФТ	0.13–16	0.05–0.12	0.12
ЦФТР	1.0–16	0.82–1.0	1.0
ЦФЗ	2.0–16	1.1–1.3	1.3

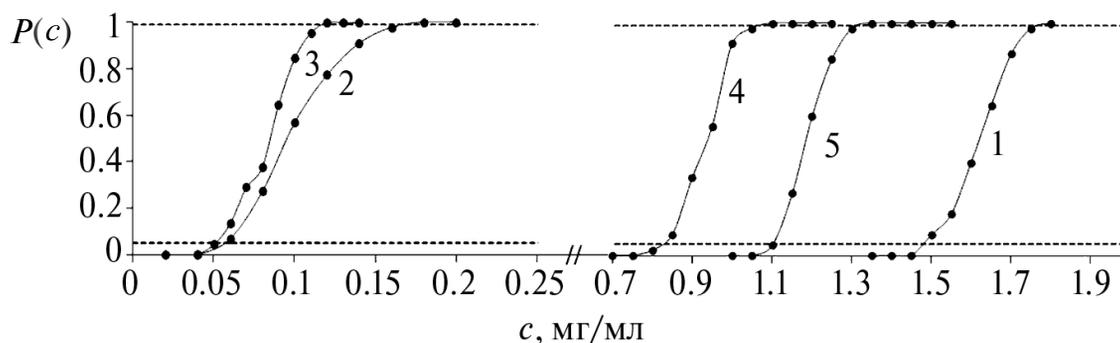


Рис. 3. Зависимости вероятности обнаружения антибиотиков от их концентрации (мг/мл) в интервале ненадежности. 1 – цефуроксим, 2 – цефалексин, 3 – цефотаксим, 4 – цефтриаксон, 5 – цефазолин.

Таблица 3. Адекватность цифровых технологий для регистрации некоторых цветовых параметров

Цветовой параметр	Программа		
	Adobe Photoshop®	авторская программа по определению RGB-параметров	авторское приложение для смартфона
Red	83±4	83±5	83±3
Green	98±3	99±4	98±4
Blue	91±4	91±4	91±4

Таблица 4. Некоторые характеристики цветометрических методик определения цефалоспоринов

Аналит	Диапазон линейности, мг/мл	Уравнение регрессии	$r^2$	ПрО, мг/мл
ЦФЛ	0.25–16	$y = -33.0x + 136$	0.98	0.23
ЦФТР	0.50–16	$y = -46.2x + 143$	0.98	0.25
ЦФР	2.0–16	$y = -34.8x + 181$	0.95	0.34
ЦФТ	0.13–16	$y = -50.9x + 127$	0.99	0.10
ЦФЗ	1.0–16	$y = 45.7x + 165$	0.94	0.28

Таблица 5. Уравнения градуировочных зависимостей при определении цефалексина с помощью иммобилизованного *para*-диметиламинобензальдегида

Устройство для регистрации изображений	$D$	Уравнение; $r^2$
Камера смартфона Redmi 6A	65±5*	$y = -33x + 136; 0.98$
	64±4	$y = -32x + 159; 0.98$
Камера смартфона Lenovo K6 Power	66±5*	$y = -32x + 166; 0.97$
	61±4	$y = -33x + 139; 0.97$
Сканер EPSON	66±5	$y = -33x + 222; 0.98$

\*Бокс для фотографирования с двумя полосками светодиодного освещения (5 V, 1 A).

содержаний определяемых компонентов в коммерческих лекарственных препаратах. Таким образом, разработанные тест-средства можно применять для полуколичественного определения цефуроксима и цефалексина. Разработанные

методики с применением смартфона в качестве регистрирующего устройства можно использовать в бытовых условиях. Предложенные методики не могут быть использованы в фармацевтической промышленности для контроля качества

**Таблица 6.** Оценка правильности цветометрического определения  $\beta$ -лактамов способом введено–найдено (введено 10 мг/мл аналита;  $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ; цветовой параметр Blue)

Аналит	Найдено, мг/мл	$s_r$
ЦФЛ	9 $\pm$ 1	0.13
ЦФР	10 $\pm$ 1	0.16
ЦФТ	10 $\pm$ 1	0.09
ЦФТР	10 $\pm$ 1	0.18
ЦФЗ	9 $\pm$ 1	0.19

**Таблица 7.** Результаты (мг) определения содержания цефалоспоринов в лекарственных препаратах с помощью разработанных индикаторных бумаг ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )

Заявлено в препарате, мг	Визуальная оценка	Цветометрическая оценка					
		$I_{Blue}$ (авторское приложение)	$s_r$	$I_{Blue}$ (Adobe Photoshop)	$s_r$	$I_{Blue}$ (авторская программа)	$s_r$
“Аксосеф”, 250	250 $\pm$ 50	230 $\pm$ 25	0.13	230 $\pm$ 35	0.11	230 $\pm$ 30	0.11
“ЦФЛ”, 500	500 $\pm$ 100	520 $\pm$ 50	0.11	490 $\pm$ 40	0.17	480 $\pm$ 540	0.10

продукции. Такой подход возможен только для первичного скрининга.

*Финансовая поддержка работы осуществлялась за счет средств гранта РНФ в рамках научного проекта № 22-23-00420.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 № 2406-р (ред. от 06.10.2022) “Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи”.
2. *Elbashir A.A., Ali S.M., Aboul-Enein H.Y.* Optimization and validation of spectrofluorimetric method for determination of cefadroxile and cefuroxime sodium in pharmaceutical formulations // *Luminescence*. 2013. V. 28. P. 490.
3. *Derayea S.M., Ahmed H.M., Abdelmageed O.H., Haredy A.M.* New valid spectrofluorimetric method for determination of selected cephalosporins in different pharmaceutical formulations using safranin as fluorophore // *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016. V. 153. P. 655.
4. *Wu S.G., Lai E.P. C., Mayer P.M.* Molecularly imprinted solid phase extraction–pulsed elution–mass spectrometry for determination of cephalexin and  $\alpha$ -aminocephalosporin antibiotics in human serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. V. 36. № 3. P. 483.
5. *Patel S.A., Patel N.M., Patel M.M.* Spectrophotometric methods for the estimation of Cephalexin in tablet dosage forms // *Indian. J. Pharm. Sci.* 2006. V. 68. P. 278.
6. *Božić B., Korać J., Stanković D.M., Stanić M., Romanović M., Pristov J.B., Spasić S., Popović-Bijelić A., Bajčetić, M.* Coordination and redox interactions of  $\beta$ -lactam antibiotics with Cu<sup>2+</sup> in physiological settings and the impact on antibacterial activity // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. Vol. 129. P. 279–285.
7. *Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логина Л.П.* Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом. Харьков: Тимченко, 2008. 128 с.
8. Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М., 2018.
9. *Тумская А.В., Доронин В.С., Косырева И.В., Доронин С.Ю.* Способы экспресс-определения гентамицина // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 67. № 8. С. 79.
10. *Тумская А.В., Косырева И.В.* Экспресс-определение некоторых бета-лактаменных антибиотиков // *Журн. аналит. химии*. 2022. Т. 77. № 8. С. 742.
11. *Adegoke O.A., Quadri M.O.* Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azo dye

- formation with p-dimethylaminobenzaldehyde // Arab. J. Chem. 2016. V. 9. P. S1272.
12. Rind F.M. A., Almani F., Maheshwari M.L., Memon A.H., Mughal U.R., Lagharl M.G.H, Memon N., Khuahwar M.Y. Spectrophotometric determination of cefotaxime Sodium using 4-dimethylaminobenzaldehyde as a Derivatizing reagent // Sci. In. (Lahore). 2009. V. 21. № 3. P. 177.
  13. Lamb A.C., Federico-Perez R. A., Xue Z.L. Product in indole detection by Ehrlich's reagent // Anal. biochem. 2015. V. 484. P. 21.
  14. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Госхимиздат, 1962. 836 с.
  15. Габидулина М.К., Говорухин В.А., Доронин С.Ю., Косырева И.В., Ли Е.П., Маракаева А.В., Такшаитова Э.И. Программа для обработки цветометрических параметров тест-средств в химическом анализе // Материалы междунар. науч. конф. "Компьютерные науки и информационные технологии". Саратов: Издат. центр "Наука", 2018. С. 93.
  16. Tumskaya A.V., Loginov I.V., Tumskiy R.S., Kosyreva I.V. Simple and rapid determination of cephalixin by digital colorimetry using a laboratory-developed smartphone application // Instrum. Sci. Technol. 2022. V. 50. № . 2. P. 190.
  17. Амелин В.Г., Чалави Ш.З. А., Большаков Д.С., Третьяков А.В. Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хемометрического анализа при определении тетрациклинов в лекарственных препаратах // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2022. Т. 65. № . 7. С. 17.
  18. Аяри В., Горбунова М.В., Исаченко А.И., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Использование бытовых цветорегистрирующих устройств в количественном химическом анализе // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № . 11. С. 963.