



УДК 544.522.121.2:546.661:615.33

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕФЛОКСАЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ

Т. Д. Смирнова, Е. А. Желобницкая, Т. Г. Данилина

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
E-mail: smirnovatd@mail.ru

Показано, что пefлоксацин образует с тербием комплексы в нейтральной и слабокислой среде, которые характеризуются переносом энергии. Установлено, что в мицеллярной среде ПАВ эффективность переноса энергии возрастает. Максимальное увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции наблюдается в присутствии мицелл додецилсульфата натрия. Разработана флуориметрическая методика определения пefлоксацина в лекарственном препарате.

Ключевые слова: пefлоксацин, люминесценция, тербий, перенос энергии возбуждения.

Fluorimetric Determination of Pefloxacin in Pharmaceutical Preparation

T. D. Smirnova, E. A. Zhelobitskaya, T. G. Danilina

It is shown that pefloxacin forms a terbium complexes in neutral and mildly acidic conditions which are characterized by energy transfer. It is found that the micellar surfactant medium energy transfer efficiency increases. The maximum increase sensitized fluorescence intensity is observed in the presence of SDS micelles. A fluorimetric method for determination of pefloxacin in the drug was developed.

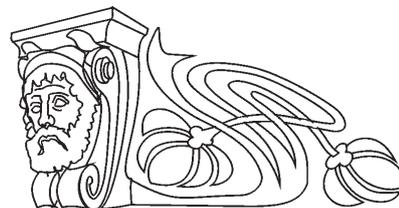
Key words: pefloxacin, luminescence, terbium, excitation energy transfer.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-4-372-376

Введение

Пefлоксацин (ПФ) – препарат группы фторхинолонов второго поколения, обладающий бактерицидным действием, применяется в клинической практике лечения инфекций дыхательных путей, вызванных грамотрицательными и грамположительными аэробными бактериями. Многочисленные случаи фальсификации лекарственных препаратов антимикробного действия вызывают необходимость в осуществлении контроля качества выпускаемой продукции фармацевтической промышленности с помощью простых, доступных и экспрессных методов.

Для определения содержания антибиотиков группы фторхинолонов чаще используют хроматографические, хромато-масс-спектрометрические и флуориметрические методы. Значительным преимуществом люминесцентных методов является простота, экспрессность и высокая чувствительность. В качестве аналитического сигнала исполь-



зуют интенсивность собственной флуоресценции пefлоксацина ($\lambda_{\text{возб}} = 278$ нм, $\lambda_{\text{флуор}} = 432$ нм) в мицеллярных средах анионного поверхностного активного вещества ДДС [1]. Диапазон определяемых содержаний в плазме крови и лекарственных препаратах составляет 0,06–1,20 мкг/мл, предел обнаружения – 0,06 мкг/мл.

Известна методика определения норфлоксацина (НОР), цiproфлоксацина (ЦФ) и пefлоксацина в сыворотке крови, основанная на измерении сенсibilизированной флуоресценции иона Tb^{3+} в присутствии второго лиганда триоктилфосфиноксида при pH 5.5 в мицеллярных растворах цетилпиридиния (ЦПХ) [2]. При поглощении электромагнитного излучения ПФ переходит в возбужденное синглетное, затем триплетное состояние, обладающее большей продолжительностью жизни. Превышение энергии триплета резонансного уровня иона Tb^{3+} обеспечивает внутримолекулярный перенос энергии на ион металла с последующей люминесценцией ($\lambda_{\text{фл}} = 490; 545; 580; 620$ нм), соответствующей переходам ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_6$, ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$, ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_4$, ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_3$. Максимальная флуоресценция наблюдается при сверхчувствительном переходе с $\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм. В случае использования вторых лигандов, содержащих хромофорные группы, возможно увеличение интенсивности флуоресценции, связанное не только с замещением остаточных молекул воды в координационной сфере иона комплексообразователя, но и с дополнительным лиганд-металльным внутримолекулярным переносом энергии возбуждения (усилением эффекта антенны). В этой связи представляет интерес апробация в качестве второго лиганда хромофорсодержащих реагентов, эффективных сенсibilизаторов РЗЭ, таких как производные 2,2-бипиридина или β -дикетонь.

Известен флуориметрический способ определения ПФ в присутствии серебряных наночастиц [1], которые способствуют увеличению интенсивности сенсibilизированной флуоресценции комплекса с Tb^{3+} и позволяют понизить



предел обнаружения до $0,8 \cdot 10^{-10}$ г/мл. Однако механизм взаимодействия не изучен.

Целью работы явилось изучение флуоресцентных свойств ПФ и его комплекса с ионом Tb^{3+} в присутствии хромофорсодержащих органических лигандов, мицелл различной природы ПАВ в растворах и на поверхности целлюлозной матрицы.

Экспериментальная часть

Реагенты. Пefлоксацин мезилата дигидрат, «Sigma-aldrich» с содержанием основного вещества не менее 99%. Раствор $1,0 \cdot 10^{-2}$ М готовят растворением точной навески в воде. Поверхностно-активные вещества: неионогенные Тритон X-100, «Sigma», содержание основного вещества не менее 99%; Бридж-35, «Acros», основного вещества не менее 99%; Твин-80, «Sigma» с основным веществом не менее 99%; анионные: натрия додецилсульфат (ДДС), «AppliChem», содержание основного вещества не менее 99%; катионные – цетилпиридиний хлорид, «Sigma», содержание основного вещества не менее 96%. Растворы с концентрацией $1 \cdot 10^{-1}$ М готовят растворением точной навески веществ в воде. 1,10-Фенантролин солянокислый, квалификации х.ч. фирмы «Chemapol» готовили концентрацией $1,0 \cdot 10^{-2}$ растворением точной навески в бидистиллированной воде. В качестве второго лиганда выступает 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролин (ДДФен), «Fluka», с содержанием основного вещества не менее 98%. Раствор с концентрацией $1,0 \cdot 10^{-2}$ М готовят растворением точной навески в н-пентаноле. Триоктилфосфин оксид (ТОФО), «Sigma», основного вещества не менее 99%, используют раствор в этаноле концентрацией $1,0 \cdot 10^{-2}$ М. Теноилтрифторацетон (ТТА), «Fluka», с содержанием основного вещества не менее 98%. Раствор с концентрацией $1,0 \cdot 10^{-2}$ М готовят растворением точной навески вещества в этиловом спирте. Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) классификации ч.д.а., «Реахим», готовят растворением точной навески в бидистиллированной воде.

Аппаратура. Спектрофлуориметр LS-55 фирмы «Perkin – Elmer», источник возбуждения – импульсная ксеноновая лампа. Ширина щели возбуждения 10 нм, флуоресценции 5 нм. Скорость регистрации спектров 300 нм/мин. Измерения проводят в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Сигнал регистрируют под углом 90° к возбуждающему свету в режиме времени разрешенной флуоресценции со временем за-

держки 0,03 мс. Значение pH контролируют на pH-метре pH-673 М со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Автоматические дозаторы LabMATE объемом: 0,5–10; 20–200; 100–1000 мкл.

Результаты и их обсуждение

Спектральные характеристики ПФ.

Спектр возбуждения ПФ характеризуется полосой невысокой интенсивности $\lambda_{\text{возб}} = 279$ нм и соответственно обладает незначительной собственной флуоресценцией, поэтому для его определения используют методики, основанные на измерении сенсibilизированной флуоресценции его комплексов с ионами Tb^{3+} . Нами показано, что в системе Tb^{3+} – ПФ осуществляется перенос энергии возбуждения от триплета ПФ на резонансный уровень иона Tb^{3+} . При введении в раствор ПФ различных добавок соли иона Tb^{3+} наблюдается тушение собственной флуоресценции лиганда. В то же время в спектре появляются новые полосы эмиссии, характерные для флуоресценции иона Tb^{3+} , интенсивность которых возрастает с увеличением его концентрации (рис. 1). Линейная зависимость тушения флуоресценции лиганда-донора от концентрации акцептора – ионов Tb^{3+} позволяет предположить статический механизм переноса энергии возбуждения, связанный с процессами комплексообразования в исследуемой системе.

Влияние мицелл ПАВ. Эффективность переноса энергии в бинарном комплексе возрастает при переходе от гомогенных водных растворов к микрогетерогенным организованным средам мицелл ПАВ. Роль мицелл состоит в концентрировании, сближении компонентов комплекса, увеличении его устойчивости и экранировании флуоресцирующего центра от посторонних тушителей [3]. Изучено влияние мицелл различных типов ПАВ на интенсивность сенсibilизированной флуоресценции хелата Tb^{3+} – ПФ. Проведение реакции комплексообразования в среде неионогенных (Тритон X-100, Бридж-35, Твин-80) и катионного (ЦПХ) ПАВ сопровождается тушением сенсibilизированной флуоресценции. Использование мицеллярного раствора анионного ДДС позволяет увеличить интенсивность эмиссии системы в 3 раза, что связано с эффективной сольubilизацией положительно заряженного комплекса в мицеллы с отрицательно заряженной поверхностью (рис. 2). Оптимальная концентрация ДДС составляет $1,0 \cdot 10^{-3}$ М.

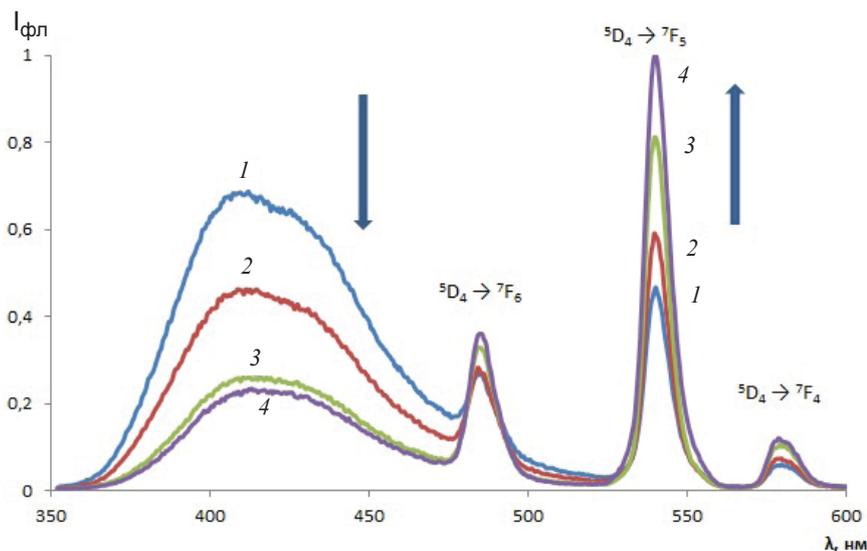


Рис. 1. Спектры флуоресценции растворов комплексов Tb^{3+} – ПФ:
1 – $C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-5}$ М; 2 – $C_{Tb^{3+}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – $C_{Tb^{3+}} = 1 \cdot 10^{-4}$ М; 4 – $C_{Tb^{3+}} = 5 \cdot 10^{-5}$ М;
5 – $C_{Tb^{3+}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{ПФ} = 1 \cdot 10^{-5}$ М; $\lambda_{возб} = 279$ нм

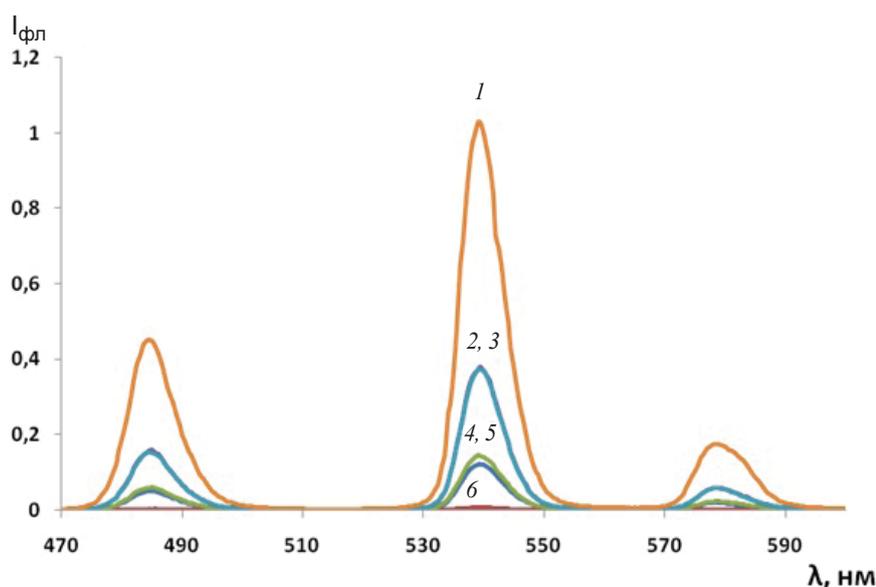


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов комплексов:
1 – Tb^{3+} – ПФ – ДДС; 2 – Tb^{3+} – ПФ; 3 – Tb^{3+} – ПФ – ЦПХ; 4 – Tb^{3+} – ПФ – Бридж–35;
5 – Tb^{3+} – ПФ – Тритон Х–100; 6 – Tb^{3+} – ПФ – Твин–80; $C_{ПФ} = 1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Tb(III)} = 1 \cdot 10^{-3}$ М;
 $pH = 6.0$, $\lambda_{возб} = 279$ нм

Влияние второго лиганда. В качестве второго лиганда выступают органические реагенты, которые чаще всего используются на практике во флуориметрическом анализе: ДДФен, ЭДТА, Фен, ТОФО и ТТА. Установлено, что в присутствии ДДФен в системе образуется труднорастворимое соединение. Введение добавок Фен и ТТА к растворам Tb^{3+} – ПФ сопровождается тушением флуоресценции, что, по-видимому, связано с конкурирующим комплексообразованием

(рис. 3). В присутствии ЭДТА и ТОФО интенсивность сенсibilизированной флуоресценции практически не изменяется (см. рис. 3). Таким образом, применение второго лиганда в исследуемой системе не имеет практического значения.

Оптимальные условия флуоресценции. Показано, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции в системе Tb^{3+} – ПФ – ДДС зависит от кислотности среды и максимальна при pH 5.5–6.5 (рис. 4).

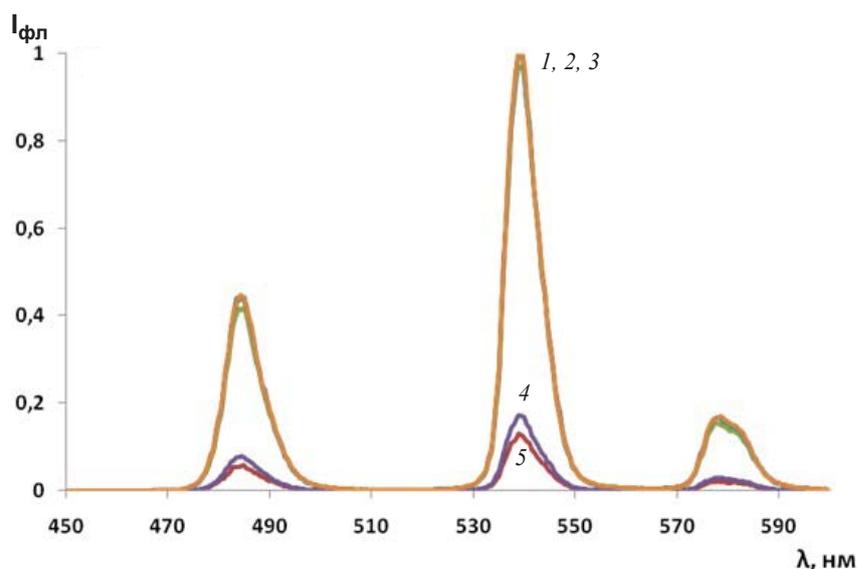


Рис. 3. Спектры флуоресценции растворов комплексов:
 1 – Tb³⁺-ПФ-без 2-го лиганда-ДДС; 2 – Tb³⁺-ПФ –ТОФО –ДДС; 3 – Tb³⁺-ПФ-
 ЭДТА-ДДС; 4 – Tb³⁺-ПФ-Фен-ДДС; 5 – Tb³⁺-ПФ –ТГА-ДДС; C_{ПФ} = 1·10⁻⁵ М;
 C_{Tb³⁺} = 1·10⁻³ М; рН = 6.0; λ_{возб} = 279 нм

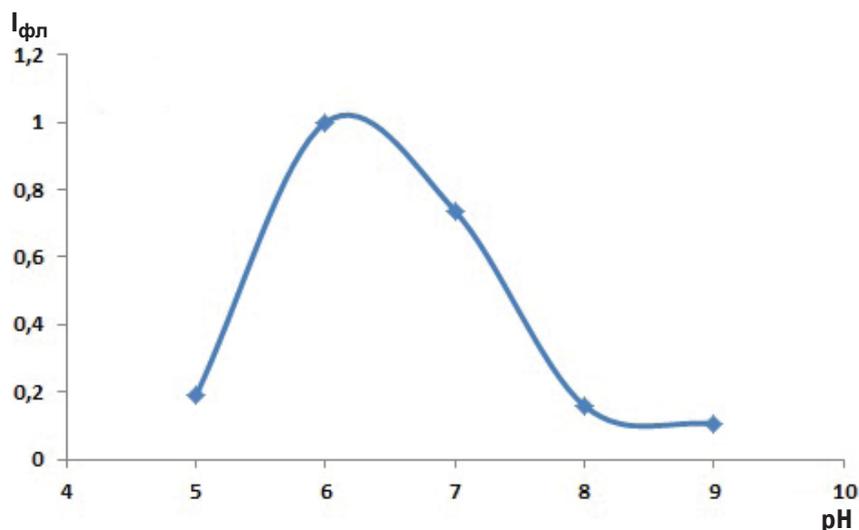


Рис. 4. Влияние кислотности среды на интенсивности сигнала сенсibilизированной
 флуоресценции хелата Tb³⁺-ПФ в мицеллярных растворах ДДС. C_{Tb³⁺} = 6·10⁻⁵ М,
 C_{пф} = 1·10⁻⁵ М, λ_{возб} = 279 нм

Порядок сливания компонентов также влияет на интенсивность аналитического сигнала. Оптимальный результат измерения флуоресценции достигается при следующей последовательности добавления компонентов реакции: ДДС-ПФ-Tb³⁺.

Применяя способ регистрации люминесценции в сочетании с разрешением во времени, можно увеличить интенсивность аналитического сигнала. Нами установлено, что возрастание времени задержки измерения сигнала способ-

ствует росту его интенсивности. Максимальное значение люминесценции наблюдается в случае задержки-0.03 мс.

Влияние сорбции. В качестве матрицы для иммобилизации комплекса Tb³⁺-ПФ использовалась фильтровальная бумага, обработанная 1.0 М раствором сахарозы, позволяющая уменьшить неоднородность материала, устранить влагу, подавить диффузию флуоресцирующих частиц. Интенсивность аналитического сигнала увеличивается в присутствии анионного



ПАВ–ДДС, катионные и неионогенные способствуют тушению флуоресценции. Оптимальная концентрация ДДС составляет $1.0 \cdot 10^{-3}$ М. Интенсивность флуоресценции системы зависит от кислотности среды и максимальна при pH 5,0–6,5.

Нами показано, что интенсивность флуоресценции системы Tb³⁺–ДДС зависит от концентрации ПФ, но в случае проведения определения в растворе линейная зависимость соблюдается в более узком диапазоне концентраций с меньшей чувствительностью (табл. 1).

Таблица 1

Линейная зависимость интенсивности флуоресценции системы Tb³⁺–ДДС от концентрации ПФ в растворе и на поверхности матрицы

Система	Диапазон концентраций ПФ, М	Уравнение линейности	r ²
Раствор	$5.0 \cdot 10^{-8} - 1.0 \cdot 10^{-5}$	$Y = -0.70x + 6.1$	0.982
Матрица	$2.0 \cdot 10^{-8} - 1.0 \cdot 10^{-5}$	$Y = -0.64x + 5.8$	0.991

Определение ПФ в препарате «Абактал».

На основании проведенных исследований разработана флуориметрическая методика определения содержания ПФ в лекарственном препарате «Абактал» («Lek», Словения) с использованием метода градуировочного графика.

10–15 таблеток препарата растирают в ступке до порошкообразного состояния, навеску (соответствующую весу одной таблетки) переносят в колбу, объемом 25 мл, растворяют в бидистиллированной воде, в ультразвуковой ванне (20 мин.). Аликвотную часть (0.20–0.30 мл) предварительно разбавленного в 100 раз раствора переносят в пробирку, добавляют 1 мл буферного раствора (pH 6.0), 0,2 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора соли Tb³⁺; 0,4 мл $1 \cdot 10^{-1}$ М ДДС, буферный раствор до общего объема 4 мл. Измеряют интенсивность флуоресценции с временной задержкой 0,03 мс ($\lambda_{\text{возб}} = 278$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм) и по градуировочному графику определяют содержание ПФ в лекарственном препарате.

В табл. 2 представлены результаты определения ПФ в лекарственном препарате. Правильность контролировали методом «введено – найдено» (табл. 3). Кроме ПФ в состав таблетки входят вспомогательные вещества: крахмал,

поливинилпирролидон, лактоза, стеарат кальция, целлюлоза. Предварительный эксперимент позволил установить, что вспомогательные вещества при данных содержаниях не оказывают мешающего действия.

Таблица 2

Результаты определения пefлоксацина в лекарственном препарате «Абактал» (n = 3, p = 0,95). Заявленное содержание 400 мг

Образец	Найдено, мг	
	$x \pm \Delta x$	S _r
1	490 ± 290	0.12
2	410 ± 150	0.15

Таблица 3

Контроль правильности определения пefлоксацина в препарате «Абактал» методом «введено – найдено» (n = 3, p = 0,95, t_{табл} = 4,30)

Введено, мг/л	Найдено, мг/л	S _r	t _{экспер}
0,47	0,51 ± 0,01	0,03	2,17
0,23	0,23 ± 0,02	0,04	1,73
0,93	0,96 ± 0,04	0,02	2,02

Выводы

В результате проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что ПФ в нейтральной и слабнокислой средах образует комплекс с ионом Tb³⁺, характеризующийся переносом энергии возбуждения;
2. Показано, что в присутствии мицелл ДДС интенсивность флуоресценции системы Tb³⁺–ПФ увеличивается в 3 раза;
3. Разработана флуориметрическая методика определения ПФ в лекарственном препарате.

Список литературы

1. Du L. M., Wang J. P., Wang C. X. The fluorescence characteristics of micelle inclusion of pefloxacin and its application // Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2004. Vol. 24, № 7. P. 855–857.
2. Veiopoulou C., Ioannou P., Lianidou E. Application of terbium sensitized fluorescence for the determination of fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in serum // J. of Pharm. and Biomed. Analysis. 2003. Vol. 15, № 12. P. 1839–1844.
3. Shtykov S. N. Surfactants in analysis : Progress and development trends // J. of Analyt. Chem. 2000. Vol. 55, № 7. P. 608–614.

Образец для цитирования:

Смирнова Т. Д., Желобицкая Е. А., Данилина Т. Г. Флуориметрическое определение пefлоксацина в лекарственном препарате // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 4. С. 372–376. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-4-372-376.