

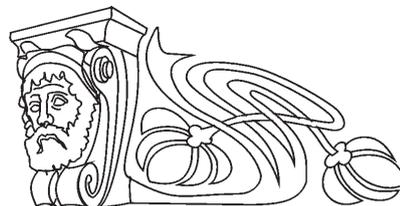


УДК 543

СОРБЦИОННО-ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНРОФЛОКСАЦИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ

О. Р. Егунова, И. С. Решетникова, С. В. Герман, К. О. Казимирова,
В. Р. Хабибуллин, Е. А. Желобецкая, С. Н. Штыков

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



Предложена технология модификации поверхности наночастиц магнетита полиэтиленимином. Методом просвечивающей микроскопии определены размеры наночастиц. Изучено влияние pH раствора, времени перемешивания, концентрации сорбента и антибиотика на сорбцию энрофлоксацина (ЭФ) и найдены оптимальные условия его извлечения. Изучена сорбция ЭФ из плазмозаменяющего средства и показано, что в использованных условиях сорбция составляет 78%, а десорбция из смеси этанол–додецилсульфат натрия – 95%.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, модификация, энрофлоксацин, сорбция, определение, флуориметрия.

Sorption-fluorimetric Determination of Enrofloxacin with Magnetite Nanoparticles Modified by Polyethylenimine

O. R. Egunova, I. S. Reshetnikova, S. V. German,
K. O. Kazimirova, V. R. Khabibullin,
E. A. Zhelobitskaya, S. N. Shtykov

A technology for magnetite nanoparticles surface modification by polyethylenimine was proposed. The sizes of the nanoparticles using transmittance microscopy method were determined. The influence of pH, time of mixing, sorbent and antibiotic concentration on the enrofloxacin sorption was investigated and optimal conditions of extraction were found. Enrofloxacin sorption from plasma-modelling solution was studied and was shown that that in optimal conditions the extent of sorption is 78% and desorption from magnetite modified nanoparticles using ethanol-sodium dodecylsulfate is 95%.

Key words: magnetite nanoparticles, modification, enrofloxacin, sorption, determination, fluorimetry.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-1-48-52

Введение

Энрофлоксацин (ЭФ) относится к антибиотикам группы фторхинолонов 3-го поколения, обладающим широким спектром антибактериального действия. Он активен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, нарушает синтез ДНК, рост и деление бактерий. Энрофлоксацин – первый препарат фторхинолонового ряда, ко-

торый начали применять в ветеринарии для лечения мочевого и дыхательного трактов, кожных инфекций домашних животных и скота. Максимальная концентрация препарата в крови достигается через 0.5–1 ч после введения, сохраняется 4–6 ч, а терапевтическое действие продолжается до 24 часов. Наиболее эффективным методом определения энрофлоксацина является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с флуориметрическим, фотометрическим или масс-спектрометрическим детекторами [1, 2]. Однако чувствительности даже этих методов бывает недостаточно, и при определении низких концентраций ЭФ применяют концентрирование, например методом твердофазной экстракции (ТФЭ) [3]. Ранее нами показано, что ещё одним перспективным вариантом ТФЭ может быть использование магнитных наночастиц (МНЧ) [4], которые в последнее время начали широко применять в различных методах химического анализа [5–12]. В ходе анализа МНЧ выполняют две основных функции: сорбционного концентрирования и последующего отделения сорбента от матрицы, основанного на использовании внешнего магнитного поля.

Наночастицы обладают высокоразвитой активной поверхностью и, как следствие, высокой сорбционной емкостью. Тем не менее для защиты наночастиц от самоагрегации и увеличения селективности и эффективности сорбции аналита их поверхность обычно модифицируют, покрывая неорганическими или органическими соединениями [4, 13]. Цель настоящей работы состояла в оценке возможности применения наночастиц магнетита, модифицированного катионным полиэлектролитом, для концентрирования энрофлоксацина из водных растворов и сред, моделирующих биообъекты, и последующего его определения по собственной флуоресценции антибиотика.



Экспериментальная часть

Для синтеза магнетита использовали дистиллированную воду, соли железа $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.8%, Aldrich), гидроксид натрия (99.8%, Fluka). Магнетит получали по описанной ранее методике [13] и модифицировали 50%-ным раствором полиэтиленimina (ПЭИ) (60 кДа, 20 мг/мл). Исходный раствор ЭФ (99%, ICN Biomedicals Inc.) готовили растворением навески (~90 мг) в 10 мл смеси этанол:буферный раствор (1:4) или смеси этанол:ГЕОПЛАЗМА БАЛАНС (FRESENIUS KABI Дойчланд ГмбХ, Германия) (1:4) при комнатной температуре. Использовали додецилсульфат натрия ((ДДС) 98%, «AMRESCO, Biotechnology Grade»), водный раствор которого имел концентрацию 1 М.

Синтез магнетита проводили в реакторе оригинальной конструкции. Инертную среду в нем создавали пропусканием азота (ГОСТ 9293-74). Для магнитной сепарации использовали постоянный Nd-Fe-B магнит с $(\text{BH})_{\text{макс}} = 40 \text{ МГсЭ}$. Значения дзета-потенциала в растворах получали на анализаторе Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Размеры наночастиц магнетита определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием просвечивающего электронного микроскопа Zeiss Libra 120 (Германия). Растворы перемешивали на орбитальном шейкере с аналоговым управлением ELMIS-3.02. Количественное определение энрофлоксацина проводили на спектрофлуориметре LS-55 фирмы «Perkin-Elmer», (США) с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой.

Результаты и их обсуждение

Синтез, модификация и выбор оптимальных условий сорбции

Синтез и модификация наночастиц магнетита

Наночастицы магнетита получали методом химического осаждения из смешанного раствора солей железа в степени окисления +2 и +3 в щелочной среде в атмосфере азота при 40 °С и скорости перемешивания 1800 об/мин. Химическая реакция, соответствующая формированию наночастиц магнетита, имеет вид



Наночастицы магнетита формировали в диапазоне рН 9–14 в отсутствии кислорода при соотношении молярных концентраций $\text{Fe}^{3+} : \text{Fe}^{2+} = 2:1$.

Поверхностная модификация наночастиц позволяет изменять их зарядовое состояние,

уменьшает агрегацию в растворе и изменяет морфологические характеристики. Модификацию проводили смешиванием полученной магнитной жидкости с раствором ПЭИ (рис. 1), получая МНЧ магнетита, покрытые ПЭИ по типу ядро–оболочка. Средний размер наночастиц, по данным ПЭМ (рис. 2), составил $10 \pm 2 \text{ нм}$ с толщиной оболочки $1,0 \pm 0,1 \text{ нм}$.

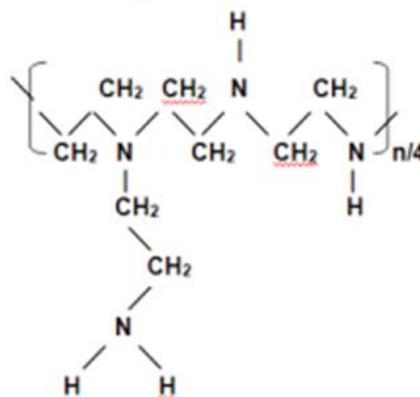


Рис. 1. Структура звена полиэтиленimina

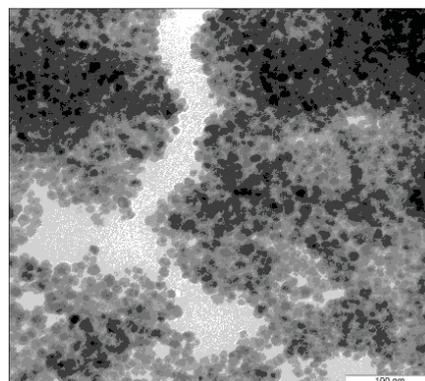


Рис. 2. Микрофотография МНЧ магнетита, модифицированного ПЭИ, полученная методом ПЭМ

Влияние рН на дзета-потенциал МНЧ, покрытых ПЭИ

Необходимость изучения влияния рН обусловлена несколькими причинами. Во-первых, молекула ПЭИ, как видно из рис. 1, содержит большое число первичных, вторичных и третичных основных аминогрупп, состояние которых зависит от кислотности среды. Чем меньше рН раствора, тем большее количество аминогрупп будет протонироваться, тем больше будет положительный заряд ПЭИ и наночастиц магнетита и тем большую степень сорбции анионов ЭФ можно ожидать. Во-вторых, чем больше степень протонирования ПЭИ, зависящая от рН раствора, тем больше будет величина



на ζ – потенциала МНЧ и тем стабильнее будет дисперсия наночастиц.

Результаты изучения влияния рН на ζ -потенциал наночастиц, покрытых ПЭИ в интервале 3–10, представлены в табл. 1. Из неё следует, что, действительно, чем меньше рН раствора, тем больше величина ζ -потенциала наночастиц, максимальная величина которого достигается при рН 3. Таким образом, при рН 3 дисперсия магнетита должна быть наиболее стабильной и иметь наилучшие условия сорбции ЭФ. Полученный результат в целом соответствует выводу работы [14] о том, что, несмотря на достаточно высокую основность аминогрупп, протонирование ПЭИ завершается в основном вблизи рН 3. При этом значении рН только около 18% аминогрупп остаются непротонированными. Это не совсем ожидаемое затруднение протонирования, которое не наблюдается для молекул, содержащих один атом азота, связано с тем, что первые легко протонируемые группы придают молекулам ПЭИ катионный заряд, электростатическое поле которого препятствует дальнейшей протонизации свободных аминогрупп.

Таблица 1

Зависимость дзета-потенциала от рН среды

рН	3	3,5	4	5	7,5	8,5	10
ζ -потенциал, мВ	39,9	39,2	36,5	34,6	20,1	12,4	12,1

Влияние различных факторов на сорбцию ЭФ

Для изучения эффективности сорбции анализировали содержание антибиотика как в оставшемся маточном растворе, так и после десорбции с поверхности МНЧ. В качестве метода анализа была выбрана флуориметрия, поскольку ЭФ интенсивно флуоресцирует, обеспечивая достаточно низкий предел его обнаружения.

Сорбция ЭФ, в молекуле которого (рис. 3) имеется карбоксильная кислотная группа, тоже должна зависеть от рН, а также от времени перемешивания, концентрации сорбента и антибиотика.

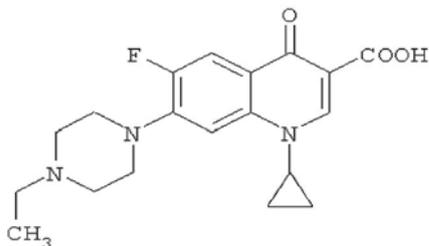


Рис. 3. Формула энрофлоксацина

Полученные результаты в целом подтвердили это предположение (табл. 2), но тоже были не

Таблица 2

Влияние рН раствора и времени контакта на процент сорбции ЭФ на МНЧ магнетита, покрытых ПЭИ

T(мин)	рН 3,0	рН 3,5	рН 4,0	рН 5	рН 7,5	рН 8,5	рН 10
20	90	86	79	72	64	60	62
15	90	88	78	72	52	53	62
10	87	84	73	67	46	52	62
5	81	83	70	63	50	45	62
2	78	85	68	63	64	52	58

совсем обычны, поскольку величина рК карбоксильной группы, участвующей в образовании цикла с Н-связью, находится вблизи рН 6 [15], а сорбция была максимальной при рН 3, т.е. при кислотности на 3 порядка меньше. Однако этот факт также находит объяснение, например, ранее нами показано, что вблизи заряженной поверхности величина рК кислотных групп может уменьшаться на 1–4 ед. рН [16, 17]. В связи с этим диссоциация карбоксильной группы может происходить и в более кислой области, т.е. при рН 3–4. Следует отметить, что молекулы ЭФ при данной кислотности могут находиться в виде цвиттериона, поскольку атом азота должен быть протонирован (рК 7.5–8 [15]). Это предполагает вполне определенное пространственное расположение молекулы ЭФ по отношению к поверхности ПЭИ и, возможно, сохранение величины общего положительного заряда модифицированных наночастиц магнетита и его стабильности в растворе. Из табл. 2 также видно, что оптимальное время перемешивания при сорбции составляет 15 мин.

Следующими факторами, влияющими на степень сорбции, являются концентрация ЭФ и наночастиц магнетита в растворе (табл. 3, 4).

Таблица 3

Зависимость степени сорбции от концентрации энрофлоксацина при концентрации магнетита в растворе 0.28 мг/мл

Концентрация, моль/л	% сорбции
$8 \cdot 10^{-6}$	85.0
$5 \cdot 10^{-6}$	86.5
$2 \cdot 10^{-6}$	88.5
$1 \cdot 10^{-6}$	91.5
$8 \cdot 10^{-7}$	93.0
$5 \cdot 10^{-7}$	94.0

Из указанных табл. 3, 4 видно, что на степень влияет концентрация обоих компонентов, и она достигает максимальной величины либо



Таблица 4
Зависимость степени сорбции от концентрации сорбента при концентрации ЭФ в растворе $2,5 \times 10^{-6}$ М

Концентрация сорбента, мг/мл	% сорбции
0.14	84.0
0.21	87.4
0.28	90.0
0.35	93.0
0.42	93.6
0.49	95.0
0.56	95.4
0.63	96.6
0.70	97.0
0.77	98.0
0.84	98.4

при низких концентрациях ЭФ (менее 10^{-6} М), либо при достаточной для этого концентрации наночастиц магнетита (0.77 мг/мл).

Сорбция ЭФ из плазмозаменяющего средства

Методика сорбции и десорбции энрофлоксацина

Для построения градуировочного графика готовили 7 стандартных растворов с точной навеской энрофлоксацина, соответствующих концентрациям ЭФ: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 8×10^{-6} , 10^{-5} М. В каждую пробирку емкостью 4 мл вносили 1 мл магнетита с концентрацией 0.84 мг/мл, 2 мл плазмозаменяющего средства, содержащего ЭФ с необходимой концентрацией ЭФ, добавляли плазмозаменяющее средство до общего объема 4 мл и перемешивали на шейкере 15 мин. По истечении указанного времени ставили эппендорф на постоянный магнит и отбирали надосадочную жидкость на анализ. Далее сорбент промывали водой, после чего к нему добавляли 300 мкл ДДС, 3.7 мл этанола, перемешивали 15 мин на шейкере и отбирали аликвоту надосадочной жидкости на анализ.

Спектры флуоресценции ЭФ из надосадочной жидкости исходного и десорбированного с поверхности магнетита представлены на рис. 4. Видно, что максимумы спектров флуоресценции находятся в области 405–410 нм, что соответствует литературным данным. Уравнения градуировочных графиков определения ЭФ, построенные на исходном растворе плазмозаменяющего средства и при его десорбции с поверхности магнетита смесью этанола с ДДС,

линейны в интервале 1×10^{-7} – 1×10^{-5} моль/л, их уравнения имеют вид

$$y = 4 \times 10^{-6}x + 16,679, \quad y = 2 \times 10^{-6}x + 7,045.$$

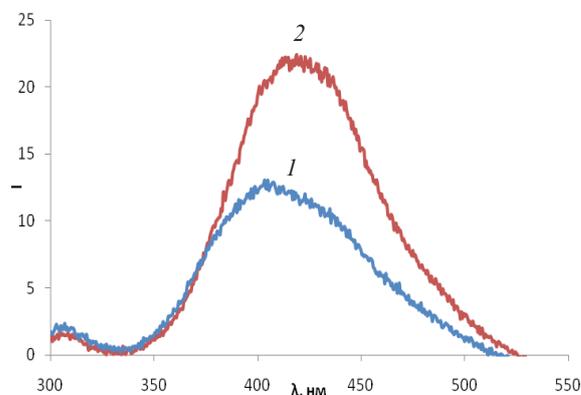


Рис. 4. Спектры флуоресценции исходного (1) и десорбированного (2) энрофлоксацина

Установлено, что при сорбции из плазмозаменяющего средства степень сорбции составляет 78%. Это следует из низкой остаточной флуоресценции маточного раствора (см. рис. 4). Десорбция энрофлоксацина в смеси ДДС–этанол протекает количественно и составляет 95%. Причиной десорбции может быть как замещение антибиотика в порах модифицированного сорбента на линейные молекулы ДДС, так и образование ионного ассоциата аниона ДДС катионным центром протонированного азота ЭФ.

Таким образом, нами показано, что модификация наночастиц магнетита полиэтиленгликолем позволяет количественно сорбировать энрофлоксацин при pH 3 в условиях максимального протонирования аминогрупп полиэлектролита и возможной диссоциации карбоксильной группы антибиотика. Изучена сорбция антибиотика из плазмозаменяющего средства и показано, что в использованных условиях сорбция составляет 78%, а десорбция из смеси этанол–ДДС – 95%.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-03-99704).

Список литературы

1. Marazuela M. D., Moreno-Bondi M. C. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1034, № 1–2. P. 25–32.
2. Toussaint B., Chedin M., Bordin G., Rodriguez A. R. Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues



- in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry : I. Laboratory-validated method // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1088, № 1–2. P. 32–39.
- Lee H.-B., Peart T. E., Svoboda M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1139, № 1. P. 45–52.
 - Егунова О. Р., Константинова Т. А., Штыков С. Н. Магнитные наночастицы магнетита в разделении и концентрировании // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2014. Т. 14, вып. 4. С. 27–34.
 - Dios A. S. de, Diaz-Garcia M. E. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 666. P. 1–22.
 - Rios A., Zougagh M., Bouri M. Magnetic (nano)materials as an useful tool for sample preparation in analytical methods. A review // *Anal. Methods*. 2013. Vol. 15. P. 23–32.
 - Chen L., Wang T., Tong J. Application of derivatized magnetic materials to the separation and the preconcentration of pollutants in water samples // *Trends Anal. Chem.* 2011. Vol. 30, № 7. P. 1095–1108.
 - Aguilar-Arteaga K., Rodriguez J.A., Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry : A review // *Anal. Chim. Acta*. 2010. Vol. 674. P. 157–165.
 - Zhao X., Shi Y., Wang T., Cai Y., Jiang G. Preparation of silica-magnetite nanoparticle mixed hemimicelle sorbents for extraction of several typical phenolic compounds from environmental water samples // *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1188. P. 140–147.
 - Erdem A., Sayar F., Karadeniz H., Guven G., Ozsoz M., Piskin E. Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems // *Electroanalysis*. 2007. Vol. 19. P. 798–804 .
 - Li J., Wei X., Yuan Y. Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor // *Sensors Actuators B*. 2009. Vol. 139. P. 400–406.
 - Liu Z., Liu Y., Yang H., Yang Y., Shen G., Yu R. A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core–shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode // *Anal. Chim. Acta*. 2005. Vol. 533. P. 3–9.
 - Егунова О. Р., Герман С. В., Штыков С. Н. Получение и модификация наночастиц магнетита тетраэтоксисиланом // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии : межвуз. сб. науч. тр. X Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием*. Саратов : Саратовский источник, 2015. С. 35–37.
 - Suh J., Paik H.-J., Hwang B. K. Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH's // *Bioorg. Chem.* 1994. Vol. 22. P. 318–327.
 - Babić S., Horvat A. J. M., Pavlović D. M., Kaštelan-Macan M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients // *Anal. Chim. Acta*. 2007. Vol. 27, № 11. P. 1043–1061.
 - Штыков С. Н., Русанова Т. Ю. Пленки Ленгмюра – Блоджетт как матрицы чувствительных элементов оптических сенсоров кислотности растворов // *Докл. РАН*. 2003. Т. 388, № 5. С. 643–645.
 - Штыков С. Н., Русанова Т. Ю., Смирнова Т. Д., Горин Д. А. Чувствительный элемент оптического сенсора на основе бензопурпурина 4Б для определения кислотности травильных растворов // *Журн. аналит. химии*. 2004. Т. 59, № 2. С. 198–201.

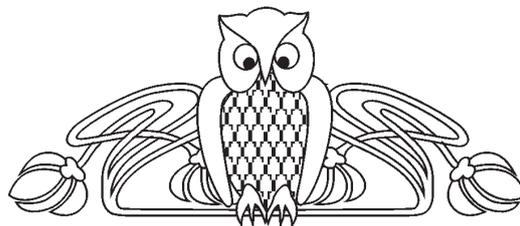
УДК 543.424.2

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫМИ ГКР-АКТИВНЫМИ СТРУКТУРАМИ «ЯДРО–ОБОЛОЧКА»

Н. Е. Маркина¹, М. В. Пожаров¹, А. М. Захаревич¹,
Н. А. Бурмистрова¹, А. В. Маркин^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

²Балаковский инженерно-технологический институт филиал НИЯУ МИФИ
E-mail: av_markin@mail.ru



В работе представлены результаты синтеза, исследования и применения материалов на основе микрорядер карбоната кальция со встроенными наночастицами магнетита, покрытых серебряной наноструктурированной оболочкой. Данный композитный материал (ГКР-платформа) использовали для получения спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) родамина 6Ж, а также различных лекарственных препаратов, таких как ипратропия

бромид, хлорамфеникол, пропранолол, пиндолол, тамоксифен, дилтиазем. Анализ проводили путем добавления анализируемых растворов к ГКР-платформам, сорбции, отделения платформ от анализируемого раствора магнитом и регистрации спектров ГКР. Рассчитанный коэффициент усиления спектров комбинационного рассеяния полученными структурами составил примерно 10^7 (для родамина 6Ж). Способность полученных материалов пере-