



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48116 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ ЛОМЕФЛОКСАЦИНУ

1

(21) u200908899

(22) 26.08.2009

(24) 10.03.2010

(46) 10.03.2010, Бюл.№ 5, 2010 р.

(72) БЕЛЬТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, ЛІ-
ВЕНЦОВА ОЛЕНА ОЛЕГІВНА, ТЕСЛЮК ОЛЬГА
ІВАНІВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИ-
ТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) Спосіб тест-визначення ломефлораксацину, що включає відбір проби, взаємодію її з хімічним реагентом в присутності аніонної поверхнево-активної речовини та уротропіну та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що відокремлення ломефлораксацину здійснюють сорбцією на ксерогелю, модифікованому іонами Tb (III), а як аніонну поверхнево-активну речовину використовують гексадецилсульфат натрію, і процес здійснюють при рН 6,8-7,0.

Корисна модель відноситься до аналітичної хімії, зокрема до способу тест визначення антибіотика хінолонового ряду ломефлораксацину (1-етил-6,8-дифтор-1,4-дигідро-7-[3-метил-1-піперазинил]-4-оксохінолонкарбонової кислоти) [див. Машковський М. Д. Лекарственные средства, М., «Новая волна», 2000, т. 2, с. 297] у живильних середовищах.

Відомий спосіб кількісного визначення ломефлораксацину в біологічних рідинах, заснований на використанні метода високоефективної рідинної хроматографії [див. Chan C. Y., Lam A. W., French G. L. Rapid HPLC assay of fluoroquinolones in clinical Specines. Y. Antimicrob. Chemother., 1989, 24(4), p. 297-304]. Спосіб заснований на реєструванні інтенсивності власної люмінесценції ломефлораксацину при $\lambda=285\text{nm}$, після попереднього виділення препарату на спеціальній колонці рідинного хроматографу. Проте, відомий спосіб вимагає попереднього виділення антибіотика на спеціальних картриджах, використання в якості рухомої фази токсичного органічного розчинника - ацетонітрилу, наявність складного апаратурного оформлення (рідинного хроматографа).

Найбільш близький до заявленої корисної моделі є спосіб кількісного визначення ломефлораксацину в біологічних рідинах - сечі та сировотці крові [див. В. П. Антонович, А. В. Егорова, С. В. Бельтюкова, О. И. Теслюк. Люминесцентное определение ломефлораксацина в виде его комплекса с европием (III). Вісник фармації, 1999, т. 2(20), с. 88-91], заснований на реєстрації сенсibilізованої люмінес-

ценції іона європію (III) в присутності вказаного антибіотика.

Визначення проводили наступним чином : аналізовану пробу (0,5мл) розміщували в три пробірки, у кожную додавали відому кількість стандартного розчину ломефлораксацину, потім у всі три пробірки додавали по 1мл розчину хлориду європію ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), 0,7мл ($1 \cdot 10^{-1}$ моль/л) цетілсульфату натрію та 0,2мл 40%-ого розчину уротропіну для створення оптимального значення рН. Розчин доводили до 10мл дистильованою водою, змішували і через 5 хвилин реєстрували $I_{\text{люм Eu}}$ при 612nm. Вміст ломефлораксацину розраховували по методу добавок.

Цей спосіб обраний найближчим аналогом.

Спільним у найближчого аналога і заявленої корисної моделі є наявність таких ознак:

- відбір проби;
- взаємодія проби з хімічним реагентом;
- реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб, запропонований по найближчому аналогу, не є селективним, через те, що інші антибіотики хінолонового ряду, такі як піпемідієва і налідіксова кислоти, а також антибіотики інших класів (тетрацикліни, цефалоспорины) можуть викликати сенсibilізацію люмінесценції іонів Eu (III). Крім того, для реєстрування інтенсивності люмінесценції Eu (III) необхідна наявність люмінесцентного спектрометра, межа визначення ломефлораксацину низька - $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

(13) U

(11) 48116

(19) UA

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб, в якому за рахунок застосування кінетичної реакції взаємодії ломефлосацину і іону Tb (III), використання твердофазної люмінесценції тербію на ксерогелю, забезпечити спрощення апаратного оформлення аналізу, підвищення селективності визначення і зниження межі визначення ломефлосацину.

Поставлена задача вирішена в способі тест-визначення ломефлосацину, що включає відбір проби, взаємодію її з хімічним реагентом в присутності аніонної поверхнево-активної речовини та уротропіну та вимірювання аналітичного сигналу, тим, що відокремлення ломефлосацину здійснюють сорбцією на ксерогелю, модифікованому іонами Tb (III), а як аніонну поверхнево активну речовину використовують гексадецилсульфат натрію, а процес здійснюють при рН 6,8-7,0.

Новим у корисної моделі, що заявляється є використання кінетичної реакції взаємодії ломефлосацину з іонами Tb (III), яка проходить у фазі сорбенту - ксерогелю, модифікованому іонами Tb (III), з метою відділення антибіотика із розчину і підсилення сенсibilізованої твердофазної люмінесценції іона Tb (III) у присутності поверхнево-активної речовини - гексадецилсульфату натрію та уротропіну при рН 6,8-7,0.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням технічного результату складається в наступному.

Підвищення селективності визначення, спрощення апаратного оформлення, зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. застосуванню кінетичної реакції взаємодії ломефлосацину з іонами тербію (III).

Застосування такого прийому дозволяє підвищити селективність визначення ломефлосацину, так як ця реакція є для даного реагенту вибіркою в групі похідних хінолонкарбонової кислоти. Інші антибіотики цього ряду кінетичної реакції з іонами Tb (III) не виявляють.

2. Застосуванню сорбції ломефлосацину на ксерогелі, модифікованому іонами Tb (III).

Застосування такого прийому дозволяє поєднувати стадію попереднього відокремлення антибіотика з отриманням сорбату комплексу, володіючого люмінесцентними ознаками в твердій фазі сорбенту, що дозволяє проводити тест-визначення ломефлосацину і не вимагає наявності люмінесцентного спектрометра.

3. Застосування сорбції ломефлосацину на модифікованому ксерогелю веде до дегідратації комплексу у твердій фазі і, відповідно, зменшенню безвипромінювальних втрат енергії збудження, що сприяє збільшенню інтенсивності люмінесценції сорбату і зниженню межі визначення ломефлосацину.

Сенсibilізована люмінесценція іона Tb (III) на сорбенті посилюється у присутності поверхнево-активної речовини - гексадецилсульфату натрію, який сприяє дегідратації утвореного комплексу і тим самим зменшенню безвипромінюваних втрат енергії збудження.

Вибір поверхнево-активної речовини (ПАР) проведено експериментально. Дослідження впливу різноманітних аніонних ПАР на $I_{\text{люм}}$ Tb (III) на сорбенті показало, що найбільша $I_{\text{люм}}$ Tb (III) спостерігається у присутності гексадецилсульфату натрію (табл. 1).

Інтенсивність люмінесценції сорбату тербію (III) залежить від кількості гексадецилсульфату натрію у розчині. Найбільша $I_{\text{люм}}$ виявляється при вмісті гексадецилсульфату натрію у розчині $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Сорбат комплексу Tb (III) з ломефлосацином володіє люмінесцентними властивостями в інтервалі значень рН від 5,5 до 8,5 з максимумом люмінесценції при рН 6,8-7,50 (Фіг.1) Для створення необхідного значення рН використовували розчин уротропіну 40%-ого.

Реакція взаємодії тербію з ломефлосацином є кінетичною і протікає в часі. Найбільша $I_{\text{люм}}$ виявляється через 25-30хв. після зливання розчинів (Фіг.2)

Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від температури і часу його висушування. Оптимальним є висушування сорбату при температурі 100°C протягом 10хв. При висушуванні ксерогеля в мікрохвильовій печі час висушування зменшується до 3-х хв.

Визначення ломефлосацину проводили на модельному розчині живильного середовища. В якості модельного було обрано м'ясо - пептонний бульйон, в який вводили різну кількість антибіотика.

Приклад 1.

50мг ксерогелю, модифікованого іонами Tb (III), поміщають у хімічну склянку, додають 0,5мл бульйону з добавкою ломефлосацину, додають 0,6мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л гексадецилсульфату натрію, 0,2мл розчину уротропіну 40%-ого і дистильовану воду до 3мл. Проводять сорбцію при перемішуванні протягом 30 хвилин. Потім сорбент відфільтровують й висушують при температурі 95-100C протягом 10 хв. Люмінесценцію комплексу збуджують при $\lambda_{\text{збуд}} = 365$ нм. Вміст ломефлосацину в живильному середовищі визначають візуально, порівнюючи $I_{\text{люм}}$ сорбату Tb (III) ($\lambda_{\text{випр}} = 545$ нм зелене світіння) з еталонними зразками. Межа виявлення препарату становить $3 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Результати визначення ломефлосацину приведені в таблиці 2.

Точність і відтворюваність визначення перевірена методом статистичної обробки результатів. При $n=5$ і $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення (Sr) складає 0,08-0,09. Межа виявлення ломефлосацину розрахована по (3σ) критерію і складає $3 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Таблиця 1

Вплив аніонних ПАР на $I_{\text{люм}}$ Tb (III) у комплексі з ломефлоксацином

АПАР	Додецилсульфат натрію	Тридецилсульфат натрію	Тетрадецилсульфат натрію	Гексадецилсульфат натрію
Збільшення $I_{\text{люм}}$	0	2	2,2	6,2

Таблиця 2

Результати визначення ломефлоксацину у м'ясо - пептонному бульйоні ($n = 5$; $P = 0,95$)

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	Sr
0,05	0,048	0,09
0,10	0,103	0,08
0,20	0,019	0,08

