



УДК 543.426

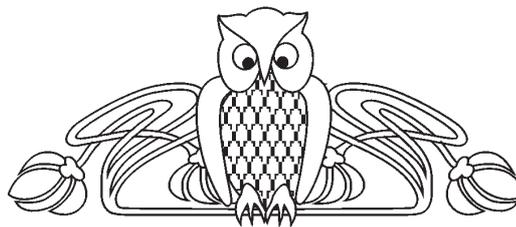
ЭКСПРЕССНОЕ СОРБЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОКСИЦИКЛИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

И. И. Паращенко¹, А. Ю. Удалова¹, Т. Д. Смирнова¹,
С. Н. Штыков¹, Н. Н. Жукова²

¹Саратовский государственный университет

²ЗАО «НИТА-Фарм», Саратов

E-mail: smirnovatd@mail.ru



Изучено влияние сорбции доксициклина, энрофлоксацина и оксолиновой кислоты на силикагеле и фильтровальной бумаге из воды и водно-мицеллярных растворов ПАВ на флуоресцентные свойства указанных антибиотиков. Разработанная экспрессная методика флуоресцентного определения доксициклина в диапазоне концентраций $2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ М на Сорбфиле, модифицированном мицеллами неионного ПАВ Бридж-35, апробирована на лекарственном препарате «Доксициклин», величина S_r не превышает 0.31.

Ключевые слова: доксициклин, сорбционно-флуоресцентное определение, мицеллы.

Express Sorption-Fluorescent Determination of Doxycycline in Drugs

I. I. Parashchenko, A. Yu. Udalova, T. D. Smirnova,
S. N. Shtykov, N. N. Zhukova

The effect of sorption of doxycycline, enrofloxacin, and oksolinievoy acid on silica gel and filter paper from the water and the water-micellar solutions of surfactants on the fluorescence properties of these antibiotics was investigated. Developed express procedure of doxycycline fluorescent determination $2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ M on Sorbfile modified by nonionic surfactant micelles Bridge-35 in the concentration range, was approved on the drug «Doxycycline» $S_r \leq 0.31$.

Key words: doxycycline, sorption-fluorescent determination, micelles.

Наиболее часто фальсифицируемой группой лекарственных средств являются антимикробные препараты, в том числе антибиотики [1]. Доксициклин – один из широко используемых в клинике и ветеринарии антибиотиков группы тетрациклинов, отличающийся пролонгированным действием. Один из видов его возможной фальсификации состоит в имитации препарата, в состав которого вносят меньшее количество антибиотика. В связи с этим возникает необходимость в разработке экспресс-метода определения доксициклина в лекарственных препаратах.

Используемые в настоящее время методики хроматографического [2, 3], вольтамперометрического [4], спектрофотометрического [5] и люминесцентного [6] определения обладают высокой чувствительностью, но мало подходят

для массового анализа лекарственных средств в связи с необходимостью продолжительной пробоподготовки и использованием дорогостоящего оборудования.

Известны тест-методы определения антимикробных препаратов. Среди них фармакопейный, предполагающий диффузию антимикробного вещества в агар с питательной средой для микроорганизмов и сопоставление степени угнетения их роста с действием стандартного раствора антибиотика, который отличается высокой чувствительностью, но низкой избирательностью. Минимальная определяемая концентрация составляет 0.05 мкг/мл. Микробиологические тесты широко используются на практике и не требуют дорогостоящего оборудования. Однако они длительны, причем аналитический сигнал зависит от свойств антибиотика (его растворимости, молярной массы и т. п.), несвязанных с его биологической активностью, и чувствительности питательной среды к качеству агара [7].

Сорбционно-цветометрический способ определения тетрациклина основан на концентрировании определяемого вещества в виде его комплекса с хлоридом железа и $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Основной недостаток такой методики заключается в визуальном определении концентрации искомого вещества, что вызывает большую погрешность, кроме этого необходимо отметить трудоемкость и продолжительность анализа [8].

Сорбция антибиотиков из водных растворов сопровождается увеличением интенсивности собственной флуоресценции, основанном на «жестком» закреплении флуоресцирующей молекулы на поверхности силикагеля за счет вандер-ваальсовых, водородных связей и снижения безызлучательных потерь энергии возбуждения в результате диффузионных столкновений.

Известно, что мицеллярные растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ) и молекулы-рецепторы дополнительно увеличивают интенсивность флуоресценции водных растворов



некоторых антибиотиков [9], что позволяет понизить их предел флуориметрического обнаружения.

Цель работы – разработка экспрессного сорбционно-флуориметрического определения доксициклина и некоторых антибиотиков хинолонового ряда в лекарственных препаратах, основанного на предварительной обработке сорбента различными модификаторами.

Экспериментальная часть

Реагенты. Препараты всех антибиотиков содержали более 99% основного вещества. Раствор гидрохлорида доксициклина (ДЦ) (рис. 1) («Fluka»), концентрации 1.0×10^{-2} М готовили растворением точной навески в 1.0×10^{-2} М HCl.

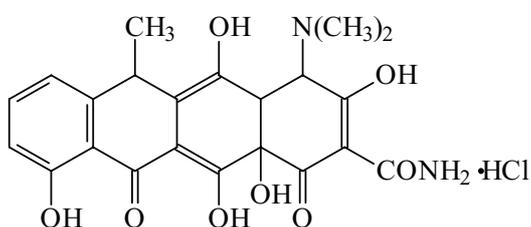


Рис. 1. Гидрохлорид доксициклина

Раствор оксолиниевой (5,8-дигидро-8-оксо-5-этил-1,3-диоксо(4,5-d)хинолин-7-карбоновая кислота) кислоты (ОК) («ICN Biomedicals Inc.») концентрации $1.0 \cdot 10^{-2}$ М готовили растворением точной навески вещества в 0.1 М NaOH. Энрофлоксацин (ЭФ) («ICN Biomedicals Inc.») концентрации $1.0 \cdot 10^{-2}$ М готовили, растворяя точную навеску в 0.1 М HCl при обработке в ультразвуковой ванне.

Препараты органических реагентов, используемых в качестве лигандов для ионов лантаноидов, содержали более 98% основного вещества. Растворы теноилтрифторацетона «Fluka» и триоктилфосфиноксида «Sigma», концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М, готовили растворением точной навески в этаноле. Раствор гидрохлорида 1,10-фенантролина «Chemapol» и динатриевой соли этилендиамин- $N_1N_1N'_1N'_1$ -тетрауксусной кислоты (ЭДТА) «Реахим» концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М получали растворением точной навески в бидистиллированной воде. Бычий сывороточный альбумин (фракция V, молекулярная масса около 66 кДа) концентрации 1000 мкг/мл готовили, растворяя точную навеску вещества в бидистиллированной воде.

Поверхностно-активные вещества. Концентрация исходных водных растворов ПАВ составляла 0.1 М. Цетилпиридиний хлорид (катионный ПАВ) содержал не менее 96% основного вещества, Тритон X-100 (TX-100) «Sigma», Бридж-35 «Acros» (неионные ПАВ) и додецилсульфат натрия (ДДС) «AppliChem» (анионный ПАВ), содержали не менее 99% основного вещества.

Сорбенты. Использовали пластины «Сорбфил АТСХ» (диаметр пор 9–12 нм, объем пор 0,8 мг/л, удельная поверхность $350 \text{ м}^2/\text{г}$, толщина слоя силикагеля 100–120 мкм, связующее – силиказоль). В качестве целлюлозной матрицы использовали фильтровальную бумагу ГОСТ 12026-76.

Аппаратура. Для измерения интенсивности флуоресценции на поверхности использовали видеоденситометр «Сорбфил» 02-29-50-01 фирмы «Сорбполимер», состоящий из осветительной камеры (дневной свет, УФ-254 нм, УФ-365 нм), цветной видеокамеры, платы ввода и захвата изображения, компьютера. Пластины ТСХ с нанесенными пробами помещали в осветительную камеру, полученное видеокамерой изображение пластины обрабатывали на компьютере с помощью программы Adobe Photoshop CS3. В качестве цветовой модели использовали как наиболее универсальную модель RGB. Параметр G(RGB) использовали для оценки интенсивности как окраски, так и флуоресценции зоны сорбированного антибиотика.

Спектры флуоресценции растворов регистрировали на спектрофлуориметре LS-55 «Perkin-Elmer» с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина дифракционной щели возбуждения 10 нм, флуоресценции 5 нм. Скорость регистрации спектров 75 нм/мин. Измерения в растворе проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см.

Результаты и их обсуждение

Выбор сорбента. Сорбируемые антибиотики обладают слабой собственной флуоресценцией, характеристики которой практически не меняются по сравнению с водным раствором. Как показано нами ранее, исследуемые антибиотики имеют следующие параметры флуоресценции: ДЦ ($\lambda_{\text{фл}} = 540 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ нм}$) (рис. 2), ЭФ ($\lambda_{\text{фл}} = 440 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$) и ОК ($\lambda_{\text{фл}} = 440 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{возб}} = 300 \text{ нм}$). В качестве сорбентов апробировали фильтровальную бумагу и пластины «Сорбфил АТСХ» (рис. 3). Видно, что сорбция антибиотиков на фильтровальной бумаге сопровождается образованием неравномерно окрашенной зоны, связанной с большой пористостью сорбента, что затрудняет обработку зоны по программе Photoshop CS3. При использовании пластин с тонким слоем силикагеля площадь зоны для всех реагентов оставалась постоянной. Кроме того, в условиях $\lambda_{\text{возб}} = 365 \text{ нм}$ сорбент не флуоресцирует и не мешает регистрации флуоресценции антибиотиков. Для дальнейшей работы в качестве матрицы выбраны пластины «Сорбфил АТСХ».

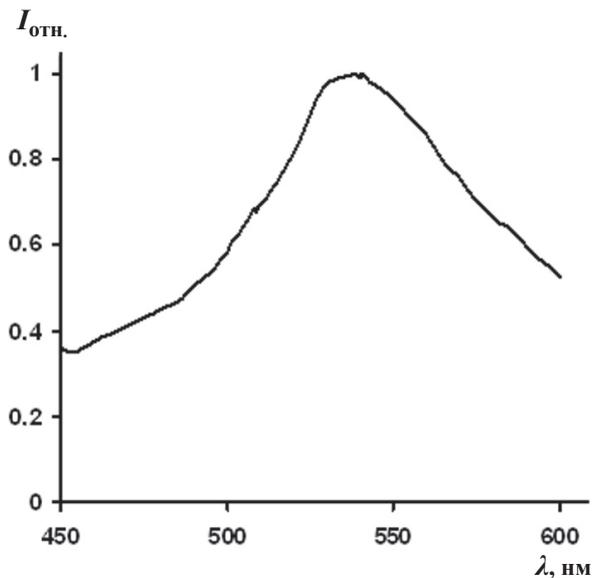


Рис. 2. Спектр флуоресценции раствора ДЦ в воде, $C_{\text{ДЦ}} = 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ nm}$

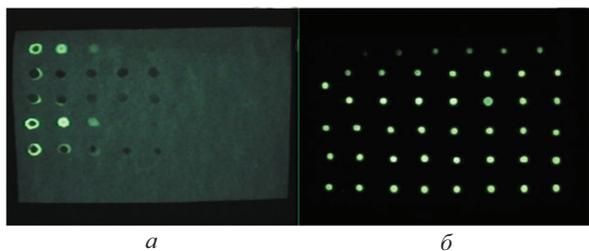


Рис. 3. Флуоресценция доксициклина: а – на фильтровальной бумаге, б – на пластине для ТСХ

Пластины «Сорбфил АТСХ» отличаются различными подложками: алюминиевая фольга и полимерная пленка. Установлено, что коэффициент корреляции градуировочного графика для флуориметрического определения доксициклина ближе к единице при использовании алюминиевой фольги. Кроме того, активацию пластин с алюминиевой подложкой можно проводить при более высокой температуре (110 °С) и в течение меньшего времени (30–45 мин), чем активацию пластин с полимерной основой (60 °С в течение 60 мин). В связи с этим дальнейшие исследования проводили на пластинах с алюминиевой подложкой.

Установлено, что оптимальный объем пробы, наносимой на пластину «Сорбфил АТСХ» для достижения максимальной флуоресценции, составляет 2 мкл (рис. 4). Использование больших объемов вызывает значительный расход матрицы и технические трудности при обработке пластины.

Модификация сорбента мицеллами ПАВ.

С целью увеличения квантового выхода флуоресценции антибиотиков силикагель модифи-

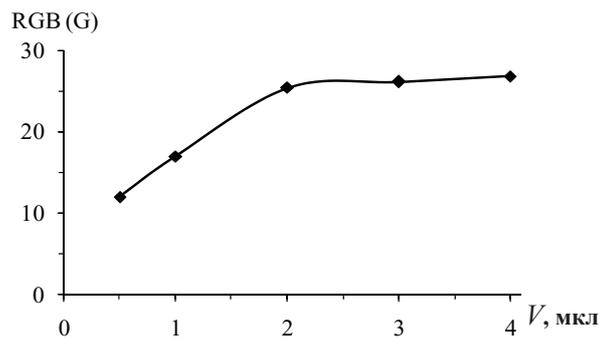


Рис. 4. Влияние объема пробы ДЦ, наносимой на пластину Сорбфила, на интенсивность цвета основного цвета зоны

цировали растворами ПАВ. Использование для модификации силикагеля ионных и молекулярных концентраций растворов ПАВ не дало положительных результатов. Показано, что модификация силикагеля мицеллами указанных анионных, катионных и неионогенных ПАВ не влияет на интенсивность и флуоресцентные характеристики ЭФ и ОК. Можно предположить, что в условиях сорбции на силикагеле (рН 5–6) солубилизация хинолонов в гемимицеллы не происходит.

Для производного тетрациклинового ряда – ДЦ, в результате солубилизации антибиотика его собственная флуоресценция в присутствии гемимицелл Тритона X-100 и Бридж-35 возрастает в 2.5 и 3.6 раза. Максимальная интенсивность сигнала в гемимицеллах Бридж-35 наблюдается при концентрации ПАВ $1.0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$. Модификация силикагеля мицеллами анионных (ДДС) и катионных (ЦПХ) ПАВ не вызывают изменений интенсивности флуоресценции ДЦ (рис. 5.).

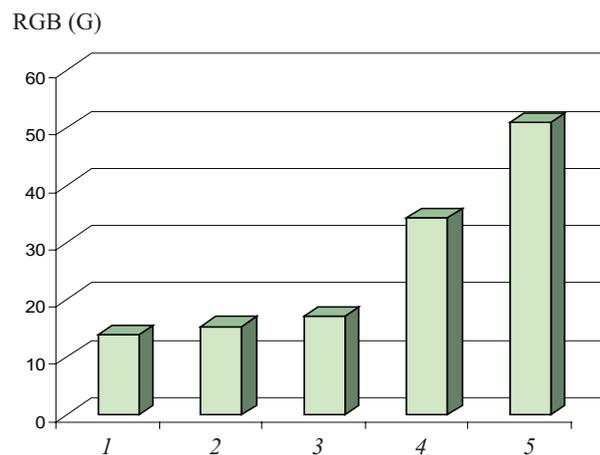


Рис. 5. Влияние природы ПАВ на интенсивность основного цвета зоны ДЦ $1.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, 1 – без ПАВ, 2 – ДДС, 3 – ЦПХ, 4 – Тритон X-100, 5 – Бридж-35

Модификация сорбента солями лантаноидов. С целью расширения диапазона определяемых концентраций антибиотиков и понижения



предела их обнаружения изучена возможность использования в качестве аналитического сигнала *сенсibilизированной флуоресценции* ионов лантаноидов, образующих комплексы с антибиотиками.

Установлено, что при сорбции на силикагеле ионов Sm^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} в диапазоне концентраций $1.0 \times 10^{-2} - 1.0 \times 10^{-7}$ М силикагель при возбуждении в УФ-области ($\lambda_{\text{возб}} = 254, 365$ нм) не флуоресцирует. Предварительная обработка сорбента солями Sm^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} не увеличивает флуоресценцию ДЦ. При нанесении ДЦ на сорбент, обработанный солью Eu^{3+} , в центре зоны появляется зеленое свечение ДЦ, а по краям образуется светящееся розовое кольцо, свидетельствующее о появлении сенсibilизированной флуоресценции европия, связанного в комплекс Eu^{3+} - ДЦ. Неоднородность окраски зоны ограничивает использование такой системы для определения ДЦ.

Модификация силикагеля солью Tb^{3+} позволяет увеличить сигнал собственной флуоресценции ЭФ в 1.4 раза, а предварительная сорбция соли Eu^{3+} , наоборот, уменьшает интенсивность флуоресценции. Интенсивность аналитического сигнала другого антибиотика – оксолиниевой кислоты при модификации силикагеля ионами Tb^{3+} также увеличивается в 1.5 раза ($\lambda_{\text{фл}} = 545$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм) в результате переноса энергии и появления сенсibilизированной флуоресценции иона металла, образующего комплекс с ОК. Сорбция на силикагеле солей других лантаноидов (Sm^{3+} , Gd^{3+} , Eu^{3+}), взаимодействующих с ОК, не вызвала заметных изменений в интенсивности флуоресценции, что связано, по-видимому, с отсутствием условий для переноса триплетной энергии органического лиганда на резонансный уровень иона лантаноида.

Значение параметра $G(\text{RGB})$ и интенсивность флуоресценции ЭФ и ОК зависит от концентрации иона Tb^{3+} , с ростом которой интенсивность флуоресценции образующихся комплексов увеличивается. Наибольшая величина аналитического сигнала наблюдается при концентрации иона комплексобразователя 1.0×10^{-2} М.

Изучено совместное влияние мицелл ПАВ и ионов тербия на флуоресцентные свойства образующихся на твердой матрице хелатов Tb^{3+} с ЭФ и ОК. Обработка силикагеля мицеллами ДДС и ЦПХ незначительно изменяет интенсивность флуоресценции Tb^{3+} - ОК и Tb^{3+} -ЭФ. Модификация мицеллами Тритона X-100 и Бридж-35 увеличивает интенсивность эмиссии Tb^{3+} в его хелатах на силикагеле с ОК в 1.6 и 2.3 раза; с ЭФ в 1.2 и 1.4 раза соответственно.

Влияние второго лиганда. Известно, что образование разнолигандных комплексов в водном растворе, сопровождаемое удалением молекул воды из первой координационной сферы иона комплексобразователя и уменьшением безызлучательной потери энергии возбуждения, способствует росту интенсивности сенсibilизированной флуоресценции [10]. В качестве вторых лигандов для модификации свойств сорбента апробировали ТТА, ЭДТА, альбумин и Фен. Последовательное закрепление на подложке соли Tb^{3+} , одного из перечисленных выше органических комплексобразующих веществ и дальнейшее нанесение на сорбент антибиотика показало, что в отличие от растворов присутствие второго лиганда не влияет на флуоресцентные свойства комплексов Tb^{3+} с ОК или ЭФ.

Построение градуировочного графика для сорбционно-флуоресцентного определения антибиотиков. На предварительно активированную пластину «Сорбфил АТСХ» на расстоянии 3 см друг от друга несколько раз наносили по 2 мкл смеси Tb^{3+} 1.0×10^{-2} М и Бридж-35 1.0×10^{-1} М в соотношении 1:1 в случае определения ОК и ЭФ или Бридж-35 1.0×10^{-1} М – для определения ДЦ. После высыхания на воздухе зоны обрабатывали 2 мкл раствора соответствующего антибиотика с концентрацией в диапазоне 1.0×10^{-5} М – 1.0×10^{-3} М для ЭФ или 1.0×10^{-3} М – 1.0×10^{-2} М для ОК или ДЦ. Пластины подсушивали, после чего записывали полученное изображение на видеоденситометре и обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop CS3. Метрологические характеристики методик сорбционно-флуоресцентного определения антибиотиков представлены в таблице.

Некоторые характеристики определения антибиотиков на модифицированном силикагеле пластины «Сорбфил АТСХ»

Определяемый компонент	Модификация силикагеля	Диапазон определяемых содержаний, М	R^2	Уравнение градуировочного графика
Энрофлоксацин	Tb^{3+} -Бридж-35	$3 \times 10^{-4} - 7 \times 10^{-3}$	0.974	$y = -24.9x + 98.3$
Доксициклин	Бридж-35	$2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	0.993	$y = -15.7x + 78.3$
Оксолиниевая кислота	Tb^{3+} -Бридж-35	$9 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.974	$y = -22.7x + 73.6$



Определение ДЦ в лекарственном препарате. Для определения ДЦ 10 таблеток препарата «Доксициклин» (фирма ОАО «Синтез») растерли в ступке до порошкообразного состояния. Навеску препарата, соответствующую одной таблетке (0.350 г), растворяли в 1.0×10^{-2} М HCl в колбе объемом 25 мл (7.6×10^{-4} М), выдерживая полученный раствор в ультразвуковой ванне в течение 20 мин, отделяли фильтрованием через «синюю ленту» осадок и использовали раствор для определения ДЦ по градуировочному графику, используя аликвоту объемом 2 мкл. Правильность полученных результатов контролировали методом «введено–найдено». В лекарственном препарате найдено 0.26 ± 0.08 г ДЦ в таблетке, $S_r = 0.31$.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 12-03-00450а) и государственного контракта № 02.740.11.0879.

Список литературы

1. Ушакова Е. А. Проблемы фальсификации лекарственных средств : фокус на antimicrobные препараты // Клинич. микробиол. антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7, № 2. С. 167–173.
2. Березкин В. Г., Онучак Л. А., Евтюгина Е. Н. Применение нового варианта капиллярной тонкослойной хроматографии для анализа антибиотиков группы тетрациклина // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8, вып. 4. С. 570–576.
3. Fiori J., Grassigli G. HPLC-DAD and LC-ESI-MS analysis of doxycycline and related impurities in doxipan mix, a medicated premix for incorporation in medicated feedstuff // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. Vol. 37, № 5. P. 979–985.
4. Charoenraks T., Palaharn S. Flow injection analysis of doxycycline or chlorotetracycline in pharmaceutical formulations with pulsed amperometric detection // Talanta. 2004. Vol. 64, № 5. P. 1247–1252.
5. Sunaric S. M., Mitic S. S. Determination of doxycycline in pharmaceuticals based on its degradation by Cu(II)/H₂O₂ reagent in aqueous solution // Журн. аналит. химии. 2009. Vol. 64, № 3. P. 248–253.
6. Zhang L. W., Luo L., Jiang C. Q., Shi J. M. Spectrofluorimetric determination of trace doxycycline with diethyl- β -cyclodextrin-doxycycline-Eu³⁺ system // Chin. J. Anal. Chem. 2008. Vol. 36, № 11. P. 1547–1550.
7. Фирсов А. А., Алексеева М. Е., Кулешов С. У. Ципрофлоксацин : ВЭЖХ и микробиологический метод при оценке биоэквивалентности лекарственной формы // Хим.- фарм. журн. 1995. № 3. С. 17–19.
8. Пат. 2350950 Российская Федерация. Способ экспрессного сорбционно-цветометрического определения тетрациклина в моче / Алыков Н. М., Алыкова Т. В., Салмахаева А. М. ; № 2007128393/15 : заявл. 27.03.2008 ; опубл. 27.03.2009, Бюл. № 9.
9. Штыков С. Н. Химический анализ в нанореакторах: основные понятия и применение // Журн. аналит. химии. 2002. Т. 57, № 10. С. 1018–1028.
10. Егорова А. В., Скрипинец Ю. В. Применение сенсibilизированной люминесценции ионов лантаноидов в биоанализе. Одесса : Астропринт, 2008. 200 с.

УДК 543.572.3:541.123.5

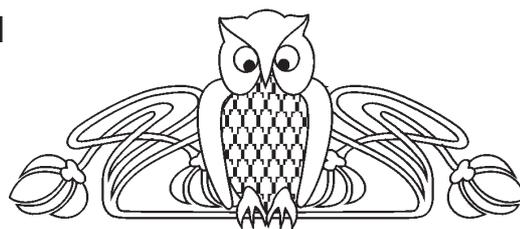
ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕТЫРЕХКОМПОНЕНТНОЙ ВЗАИМНОЙ СИСТЕМЫ Li, K||Br, MoO₄, WO₄

М. А. Радзиховская, И. К. Гаркушин, Е. Г. Данилушкина

Самарский государственный технический университет
E-mail: radzihovskaya@mail.ru

Проведено разбиение четырехкомпонентной взаимной системы Li, K||Br, MoO₄, WO₄ и методом дифференциального термического анализа (ДТА) исследованы стабильные треугольники KBr-Li₂MoO₄-Li₂WO₄, KBr-LiKMoO₄-LiKWO₄ и стабильный тетраэдр LiBr-KBr-Li₂MoO₄-Li₂WO₄. Установлено отсутствие в системе точек невариантных равновесий вследствие образования бинарных непрерывных рядов твердых растворов Li₂Mo_xW_{1-x}O₄, K₂Mo_xW_{1-x}O₄, LiKMo_xW_{1-x}O₄.

Ключевые слова: дифференциальный термический анализ, четырехкомпонентная взаимная система, фазовые равновесия, диаграммы плавкости солевых систем, непрерывный ряд твердых растворов, ликвидус.



Investigation of Quaternary Mutual System Li, K||Br, MoO₄, WO₄

М. А. Radzikhovskaya, I. K. Garkushin, E. G. Danilushkina

The quaternary mutual system Li, K||Br, MoO₄, WO₄ was broken and the stable triangles KBr-Li₂MoO₄-Li₂WO₄, KBr-LiKMoO₄-LiKWO₄ and the stable tetrahedron LiBr-KBr-Li₂MoO₄-Li₂WO₄ was investigated by method of differential thermal analysis (DTA). Due to the formation of the binary continuous series of solid solutions Li₂Mo_xW_{1-x}O₄, K₂Mo_xW_{1-x}O₄, LiKMo_xW_{1-x}O₄ the lack of the points of nonvariant equilibria was established.