

УДК 543.426:543.862

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕФЛОКСАЦИНА В МОЧЕ МЕТОДОМ СИНХРОННОЙ ФЛУОРИМЕТРИИ

И.Я. Камочкина, Е.М. Рехарская, А.П. Чухаркина, А.Г. Борзенко

(кафедра аналитической химии; e-mail: borzenko@environment.chem.msu.ru)

**На примере пefлоксацина показана принципиальная возможность определения антибиотиков класса фторхинолонов в биологических жидкостях на основе регистрации синхронных спектров флуоресценции. Показано, что чувствительность определения увеличивается при хелатообразовании пefлоксацина с ионами металлов в мицеллярной среде.**

Одной из важных задач является контроль за содержанием фторхинолонов, поступающих в организм во время лечения инфекций мягких тканей. По существу юридическим нормам процесс отбора биопробы не должен причинять пациенту неудобств, в частности, отбор крови из вены допустим только в тех ситуациях, когда жизни человека угрожает опасность. Моча представляет собой один из наиболее информативных объектов для анализа, поскольку с ней выводится из организма большинство лекарственных соединений.

Необходимо отметить, что анализ мочи осложняется рядом факторов. Одним из них является изменение pH среды с течением времени из-за действия бактериальной флоры, выделяющей аммиак. Другим фактором является наличие в составе мочи низкомолекулярных продуктов метаболизма аминокислот и сахаров (аминов, карбоновых кислот и др.), небольших количеств пептидов и сахаров, стероидов и пигмента уробилина, окрашивающего мочу в желтый цвет. В составе мочи помимо органических соединений содержится значительное количество неорганических солей: хлоридов, фосфатов, оксалатов, уратов и т.д.

Как правило, наиболее важной задачей подготовки образца к анализу является выделение анализируемого вещества из биологической матрицы. Наиболее распространенным методом извлечения лекарственных соединений из мочи является жидкостная экстракция, реже используется твердофазная экстракция [1].

Основными аналитическими методами при определении препаратов в биологических пробах являются газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография [2–5]. Эти методы, несмотря на их очевидные достоинства, требуют использования сложной и дорогой аппаратуры, высококвалифицированного персонала и в связи с этим не всегда доступны для рядовых аналитических лабораторий и монито-

рингового контроля. Благодаря своей жесткой структуре большинство фторхинолонов обладают собственной флуоресценцией. Поэтому для определения их в моче перспективно использовать люминесцентные методы, поскольку они достаточно экспрессны и высокочувствительны, а в ряде случаев позволяют проводить определение препаратов без предварительного отделения матрицы.

Настоящая работа посвящена оценке возможности определения люминесцентными методами антибиотиков класса фторхинолонов (на примере пefлоксацина) в моче без предварительного концентрирования.

### Экспериментальная часть

**Реактивы.** В работе использовали  $1,0 \times 10^{-4}$  М раствор гидрохлорида пefлоксацина (“Sigma”, США). Более разбавленные растворы готовили последующим разбавлением исходного непосредственно перед проведением эксперимента. Полученные растворы хранили в темном месте не более 1 недели во избежание фотохимического разрушения соединений. Растворы хлорида кальция, нитрата магния, хлорида алюминия и нитрата железа(III) (“Химмед”, Россия) с концентрациями  $1,0 \times 10^{-3}$  М готовили растворением соответствующих навесок в дистиллированной воде.

При определении констант устойчивости хелатов концентрацию солей варьировали в диапазоне  $2,0 \times 10^{-6}$  –  $2,0 \times 10^{-5}$  М. Необходимое значение pH устанавливали с помощью 0,1 М растворов гидроксида калия и соляной кислоты. Исходный раствор додецилсульфата натрия (ДСН) (“Acros”, Германия) с концентрацией 0,1 М готовили растворением соответствующей навески в дистиллированной воде в ультразвуковой бане. Для определения пefлоксацина в биологической жидкости (моче) использовали образец, полученный от здорового человека.

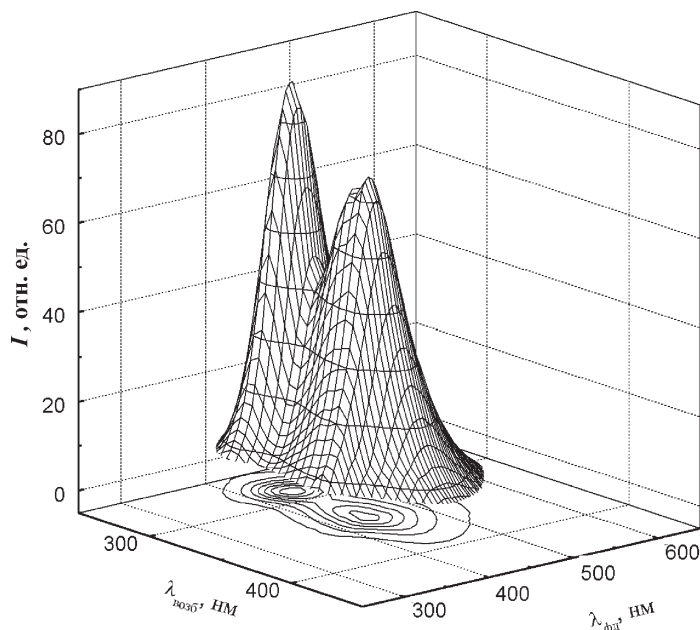


Рис. 1. Спектр ВЭ флуоресценции водного раствора пefлоксацина

**Аппаратура.** Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре “Панорама” (“Люмэкс”, Россия). Для измерения использовали кварцевые кюветы ( $l = 1$  см).

### Результаты и обсуждение

**Анализ спектра флуоресценции пefлоксацина.** Жесткая структура фторхинолонов позволяет при комнатной температуре получать хорошо разрешенные электронно-колебательные спектры фосфоресценции. В основе спектральной селекции люминесцентного метода лежит использование различий в основных спектральных параметрах исследуемых веществ и фона: длинах волн возбуждения и испускания, а также интенсивностях люминесценции. Решение подобных задач возможно на основе трехмерного представления флуоресцентных характеристик, получившего в англоязычной литературе название emission-excitation spectra (EES) или emission-excitation matrix (EEM). Буквальной аналогией этих названий можно будет считать термин “спектры возбуждения–эмиссии” (ВЭ) Такой способ представления данных содержит в себе максимальное количество информации о люминофоре, включая абсорбционные и эмиссионные характеристики, а также направление максимального изменения сигнала, знание которого необходимо для реализации синхронного сканирования. Выбор оптимальных длин волн возбуждения и регистрации индивидуальных веществ в этом случае значительно упрощается.

Спектр ВЭ флуоресценции водного раствора пefлоксацина представлен на рис. 1. На спектре пefлоксацина наблюдаются два максимума возбуждения (283 и 330 нм). Максимум эмиссии расположен при 446 нм. Полученный нами спектр хорошо согласуется с литературными данными [6].

**Синхронные спектры флуоресценции пefлоксацина и образца мочи.** Поскольку сигнал флуоресценции пигмента уробилина, входящего в состав мочи, достаточно интенсивен, использование традиционной флуориметрии для спектрального определения фторхинолонов представляется малоэффективным. Кроме того, области спектров флуоресценции пefлоксацина и уробилина значительно перекрываются (350–500 нм).

В этом случае удобно использовать синхронную флуориметрию. Сущность метода заключается в измерении спектра флуоресценции при одновременном изменении длин волн возбуждающего и регистрируемого излучений. В процессе такого сканирования поддерживается постоянная разность между энергиями возбуждающего и регистрируемого излучений. Применение синхронного сканирования приводит к значительному упрощению вида регистрируемого спектра. Безусловно, такой подход оказывается весьма перспективным для анализа биологических образцов.

Нами были измерены синхронные спектры флуоресценции образца мочи, разбавленного в 100 раз, и раствора пefлоксацина при различных сдвигах  $\Delta\lambda$ : от 5 до 200 нм (через 10 нм). На рис. 2 представлены

синхронные спектры мочи и пefлоксаина при различных  $\Delta\lambda$ .

Установлено, что максимальная разница между интенсивностью флуоресценции пefлоксаина и интенсивностью флуоресценции уробилина наблюдали при  $\Delta\lambda = 150$  нм. При этом пик в синхронном спектре, соответствующий пefлоксаину, имел минимальную ширину. Сигнал пefлоксаина превышал сигнал фона, обусловленный собственной флуоресценцией биологической матрицы, в десятки раз. Эту разницу длин волн выбрали для всех дальнейших измерений.

**Хелатообразование пefлоксаина с Al(III).** Известно, что фторхинолоны образуют хелаты с различными ионами металлов [7, 8]. Флуоресценция данных комплексов в некоторых случаях в несколько раз превышает собственную флуоресценцию исследуемых

веществ. Значительное увеличение интенсивности флуоресценции хелатов по сравнению с фторхинолонами можно объяснить формированием “жесткой” структуры шестичленного цикла, образованной карбонильной и карбоксильной группами веществ и катионом металла. На образование хелатов фторхинолонов влияют размер и заряд иона металла. Двухзарядные и трехзарядные ионы металлов, такие, как  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  и  $\text{Fe}^{+3}$ , способны изменять интенсивность сигнала. В данной работе изучали образование хелатов пefлоксаина с ионами кальция, магния, алюминия и железа(III). Показано, что наиболее устойчивый комплекс пefлоксаина ( $\lg K = 5,7$ ) образуется с ионом алюминия в слабокислой среде.

**Определение пefлоксаина в моче.** С целью максимального увеличения сигнала флуоресценции

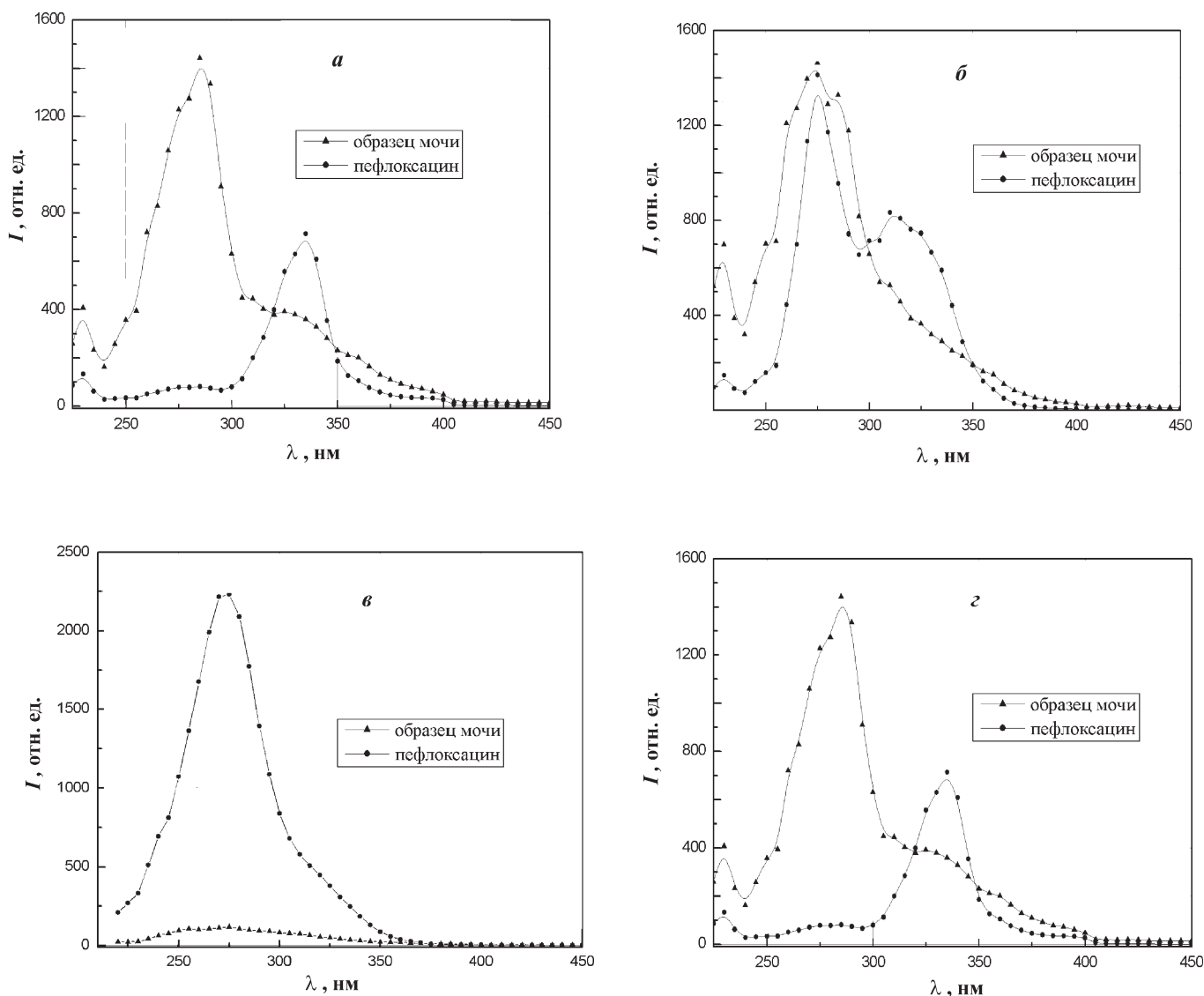


Рис. 2. Синхронные спектры флуоресценции пefлоксаина и образца мочи при разных значениях  $\Delta\lambda$  (нм): а – 60, б – 110, в – 150, г – 200

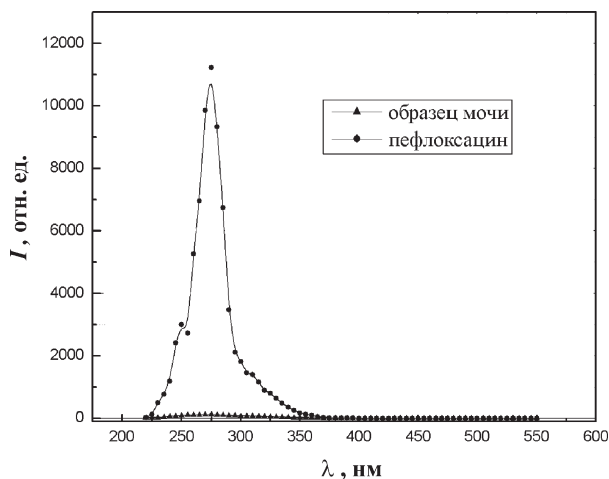


Рис. 3. Синхронные спектры флуоресценции пefлоксацина и образца мочи при  $\Delta\lambda = 150$  нм в присутствии додецилсульфата натрия ( $c = 2,5 \times 10^{-2}$  М) и хлорида алюминия ( $c = 1,5 \times 10^{-4}$  М)

определение пefлоксацина в моче мы проводили в присутствии оптимальных концентраций хлорида алюминия и додецилсульфата натрия [9]. Известно, что в основе мицеллярно-стабилизированной флуоресценции лежит способность мицелл поверхностно-активных веществ концентрировать частицы, уменьшать их колебательную энергию и снижать влияние тушителей, тем самым увеличивая сигнал флуоресценции. Установлено, что оптимальные концентрации хлорида алюминия и додецилсульфата натрия составляют  $1,5 \times 10^{-4}$  и  $2,5 \times 10^{-2}$  М соответственно. Использование этих реагентов для определения пefлоксацина в моче методом синхронной флуоресценции позволяет увеличивать интенсивность пefлоксацина более чем в

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clarke E.G.C. Clarke's isolation and identification of drugs. L., 1985.
2. Samanidou V.F., Demetriou C.E., Papadoyannis I.N. // Anal. Bioanal. Chem. 2003. **375**. P. 623.
3. Rizk M., Belal F., Aly F.A., El-Enany N.M. // Talanta. 1998. **46**. P. 83.
4. Kamberi M., Kamberi P., Nakano S. // J. Chromatography B. 2000. **741**. P. 295.
5. Immanuel C., Hemanth Kumar A.K. // J. Chromatography B. 2001. **760**. P. 91.
6. Albin A., Monti S. // Chem. Soc. Rev. 2003. **32**. P. 238.
7. El-Kommos M.E., Saleh G.A., El-Gizawi S.M., Abou-Elwafa M.A. // Talanta. 2003. **60**. P. 1033.
8. Djurdjevic P.T., Jelkic-Stankov M., Stankov D. // Anal. Chim. Acta. 1995. **300**. P. 253.
9. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Carpena J. // Analyst. 1999. **122**. P. 705.

Поступила в редакцию 08.06.06.

## DETERMINATION OF PEFLOXACIN IN URINE BY SYNCHRONOUS FLUORIMETRY

I. Ya. Kamochkina, Ye.M. Rekharsky, A.P. Chukharkina, A.G. Borzenko

(Division of Analytical Chemistry)

The possibility of determination of fluoroquinolone antibiotics in biological liquids by using synchronous fluorimetry is shown in present article. It is demonstrated that sensibility of determination increases using formation complexes of pefloxacin with metal ions in micellar medium.

6,5 раз (рис. 3). Отметим, что в этих условиях фоновый сигнал флуоресцирующих компонентов мочи остается практически неизменным. Это позволило определять данный препарат в моче без предварительного отделения матрицы.

Проверку правильности определения пefлоксацина в моче проводили методом "введено-найдено". Готовили серию растворов с концентрацией пefлоксацина в моче 1,7–33,3 мкг/мл. Оптимальные условия измерений обеспечивали добавлением всех необходимых реагентов в соответствующих количествах. Предел обнаружения пefлоксацина по такой методике составил 0,1 мкг/мл. Результаты определения пefлоксацина в образцах мочи приведены в таблице.

Таким образом, показана принципиальная возможность использования метода синхронной флуориметрии для определения пefлоксацина в моче на следовом уровне без предварительного выделения его из биологической матрицы.

Результаты определения пefлоксацина в моче ( $n = 3, P = 0,95$ )

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл
1,7	1,6±0,2
3,3	3,4±0,2
16,7	16,5±0,2
33,3	33,5±0,2