

РОЗДІЛ III

Аналітична хімія

УДК 543.426;546.661;541.49

С. В. Бельтюкова – доктор химических наук, профессор, старший научный сотрудник Физико-химического института имени А. В. Богатского НАН Украины;
Е. О. Ливенцова – ассистент кафедры химии и безопасности пищевых продуктов Одесской национальной академии пищевых технологий

Люминесцентное определение офлоксацина и ломефлоксацина в сточных водах фармацевтических предприятий

*Работа выполнена в ОНАПП
и ФХИ им. А. В. Богатского НАН Украины*

Изучена возможность хроматографического разделения антибиотиков фторхинолонового ряда офлоксацина и ломефлоксацина с использованием метода тонкослойной хроматографии. Разработана методика определения офлоксацина по сенсibilизированной люминесценции иона Tb (III) и ломефлоксацина по сенсibilизированной люминесценции иона Eu (III) в фазе сорбента в сточных водах фармацевтических предприятий.

Ключевые слова: люминесценция, европий (III), тербий (III), офлоксацин, ломефлоксацин, сточные воды.

Бельтюкова С. В., Ливенцова О. О. Люмінесцентне визначення офлоксацину і ломефлоксацину в стічних водах фармацевтичних підприємств. Вивчено можливість хроматографічного розділення антибіотиків фторхінолонового ряду офлоксацину і ломефлоксацину з використанням методу тонкошарової хроматографії. Розроблено методику визначення офлоксацину за сенсibilізованою люмінесценцією іона Tb (III) і ломефлоксацину за сенсibilізованою люмінесценцією іона Eu (III) у фазі сорбенту в стічних водах фармацевтичних підприємств.

Ключові слова: люмінесценція, европій (III), тербий (III), офлоксацин, ломефлоксацин, стічні води.

Beltykova S. V., Liventsova H. O. Luminescence Determination of Ofloxacin and Lomefloxacin in Sewage of the Pharmaceutical Enterprises. Possibility of chromatographic division of fluoroquinolone antibiotics – ofloxacin and lomefloxacin was developed. By a thin layers chromatography method the technique of determination of ofloxacin using the sensitized luminescence of Tb (III) ions and lomefloxacin using the sensitized luminescence of Eu (III) ions in a phase of a sorbent in sewage of the pharmaceutical enterprises is developed.

Key words: luminescence, europium (III), terbium (III), ofloxacin, lomefloxacin, sewage.

Постановка научной проблемы и её значение. Офлоксацин (ОФ) и ломефлоксацин (ЛФ) относятся к антибиотикам оксохинолонового ряда и находят широкое применение в медицинской и ветеринарной практике. Производство этих препаратов сопровождается образованием загрязненных сточных вод, которые поступают в городскую канализацию и подлежат, чаще всего, биологической очистке. Так как антибиотики, попадающие в сточные воды, ингибируют процесс биологической очистки, необходимы методики, позволяющие достаточно быстро и надежно контролировать содержание этих препаратов в сточных водах фармацевтических предприятий.

Анализ последних достижений по этой проблеме. Для определения производных хинолона применяют спектрофотометрические, люминесцентные, микробиологические методы, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Спектрофотометрический метод основан на образовании комплексов оксохинолонов с ионами железа (III) [1; 2], либо образовании ионных ассоциатов с

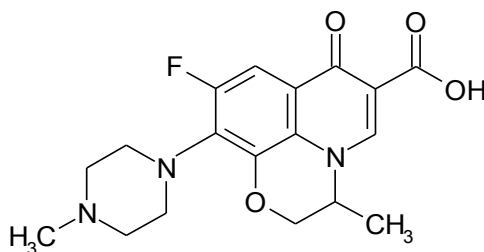
органическими реагентами ряда сульфоптаleinea [3]. Метод применяется, в основном, для анализа лекарственных препаратов. Для определения фторхинолонов в биологических жидкостях предложено [4] использовать их собственную люминесценцию. Известно большое количество методик, основанных на использовании сенсibilизированной люминесценции солей тербия [5; 6].

Методики отличаются простотой выполнения, широким диапазоном определяемых концентраций, низкими пределами обнаружения. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет определять антибиотики в коровьем молоке [7; 8] с использованием УФ и люминесцентных детекторов. В качестве подвижной фазы в данном случае используют органические растворители и ацетонитрил. Диапазон определяемых концентраций составляет $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для определения фторхинолонов в сточных водах применяются в основном метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [9–11], который требует дорогостоящей аппаратуры и довольно сложен в выполнении.

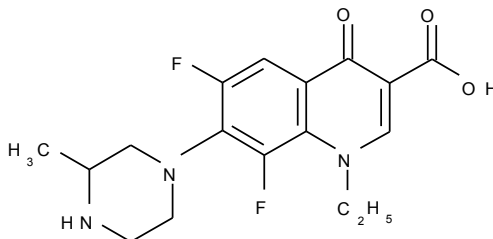
Цель данной работы – разработка чувствительной, простой и доступной методики определения ОФ и ЛФ, основанной на их предварительном выделении с помощью тонкослойной хроматографии и последующей регистрации твердофазной люминесценции их комплексов с ионами лантанидов Ln (III).

Материалы и методы. Стандартные растворы хлоридов тербия и европия ($1 \cdot 10^{-2}$) моль/л готовили из соответствующих оксидов квалификации “о. с. ч” путем растворения их в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением избытка кислоты упариванием. Концентрацию Ln (III) контролировали комплексометрическим титрованием. Стандартные растворы ОФ и ЛФ $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л готовили растворением точных навесок препаратов в этаноле, водные растворы ПАВ $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л – растворением навесок этих препаратов. Пластинки для тонкослойной хроматографии были марки Sorbfil (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ; связывающее вещество – силиказоль; подложка – алюминиевая фольга), а также Silufol UV254 и СТХ-1А. Люминесценцию возбуждали излучением ртутно-кварцевой лампы СВД-120А со светофильтром УФС-2. Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1 (“ЛОМО”). Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Lambda-9 “Perkin-Elmer”. Значения рН растворов измеряли рН-метром ОР-211/1 (“Radelkis”) при 20 ± 2 °С.

Изложение основного материала и обоснование полученных результатов исследования. Офлоксацин (9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо-[1,2,3-de]-1,4-бензоксаинкарбоновая кислота):



Ломефлоксацин (1-этил-6,8-дифтор-1,4-дигидро-7-(3-метил-1-пиперазинил)-4-оксо-3-хинолин-карбоновая кислота):



образуют с ионами Tb (III) и Eu (III) комплексные соединения, в которых осуществляется сенсibilизация люминесценции иона лантанида за счет внутримолекулярного переноса энергии возбуждения [5]. В спектрах поглощения ОФ и ЛФ в УФ-области спектра имеются коротковолновые полосы с максимумами при 210, 310 нм и 285, 385 нм соответственно (рис. 1). Молярный коэффициент поглощения в области второй полосы составляет для ОФ $3,8 \cdot 10^4$, для ЛФ наиболее интенсивной является первая, с $\lambda_{\text{макс}} = 285$ нм, и молярный коэффициент поглощения для неё составляет $6,7 \cdot 10^4$.

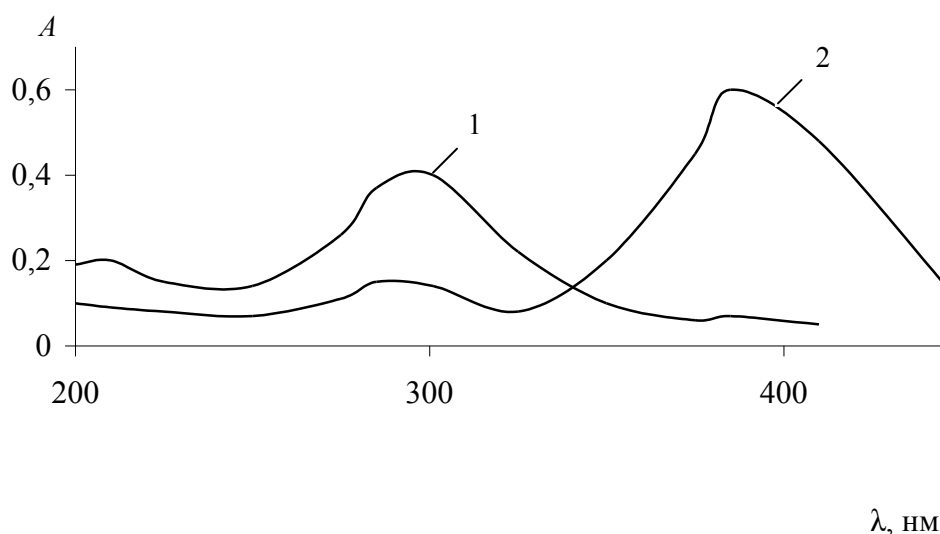


Рис. 1. Спектры поглощения офлоксацина (1) и ломефлоксацина (2)
($C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $l = 1$ см)

Энергии фотовозбужденных триплетных уровней лигандов, рассчитанные по спектрам фосфоресценции их комплексов с иттрием при температуре 77 К, составляют $21\ 050\ \text{см}^{-1}$, что определяет возможность ее переноса с триплетных уровней лигандов на энергетические уровни лантанидов.

В комплексах с рассматриваемыми лигандами интенсивную люминесценцию обнаруживают ионы Tb (III) в комплексе с офлоксацином и ионы Eu (III) в комплексе с ломефлоксацином.

Можно предположить, что в случае офлоксацина, имеющего полосу поглощения при $\lambda = 210$ нм, осуществляется эффективная передача энергии возбуждения на ион Tb (III), который имеет в этой же области спектра полосу с максимумом при 219 нм, соответствующую $4f-5d$ переходу с высоким молярным коэффициентом поглощения $\epsilon = 374$. Люминесценция иона Eu (III) в комплексе с офлоксацином практически отсутствует. Ломефлоксацин не имеет такой коротковолновой полосы поглощения. В этом случае, очевидно, происходит передача энергии возбуждения от лиганда $E_m = 21\ 050\ \text{см}^{-1}$ на энергетический уровень Eu (III) 5D_1 ($19\ 000\ \text{см}^{-1}$) с последующей безызлучательной дезактивацией до первого возбужденного состояния 5D_0 ($17\ 300\ \text{см}^{-1}$) с которого и происходит излучение. Для этого реагента характерна люминесценция иона Eu (III).

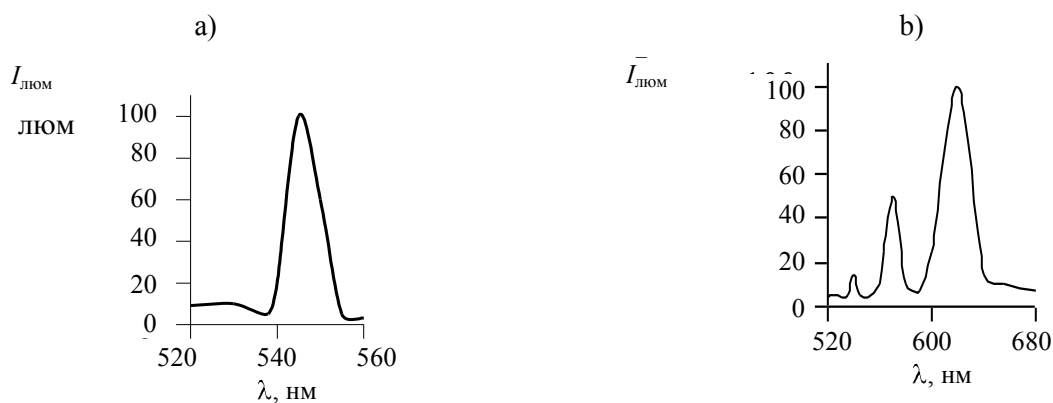


Рис. 2. Спектры люминесценции Tb (III) в комплексе с офлоксацином (a) и Eu (III) с ломефлоксацином (b)
($C_{Ln} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{лиг} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

В пользу передачи энергии возбуждения от органической части молекулы к иону лантанида свидетельствует тот факт, что по мере прибавления к раствору лиганда раствора лантанида в различной концентрации, наблюдается снижение молекулярной люминесценции лиганда (рис. 3).

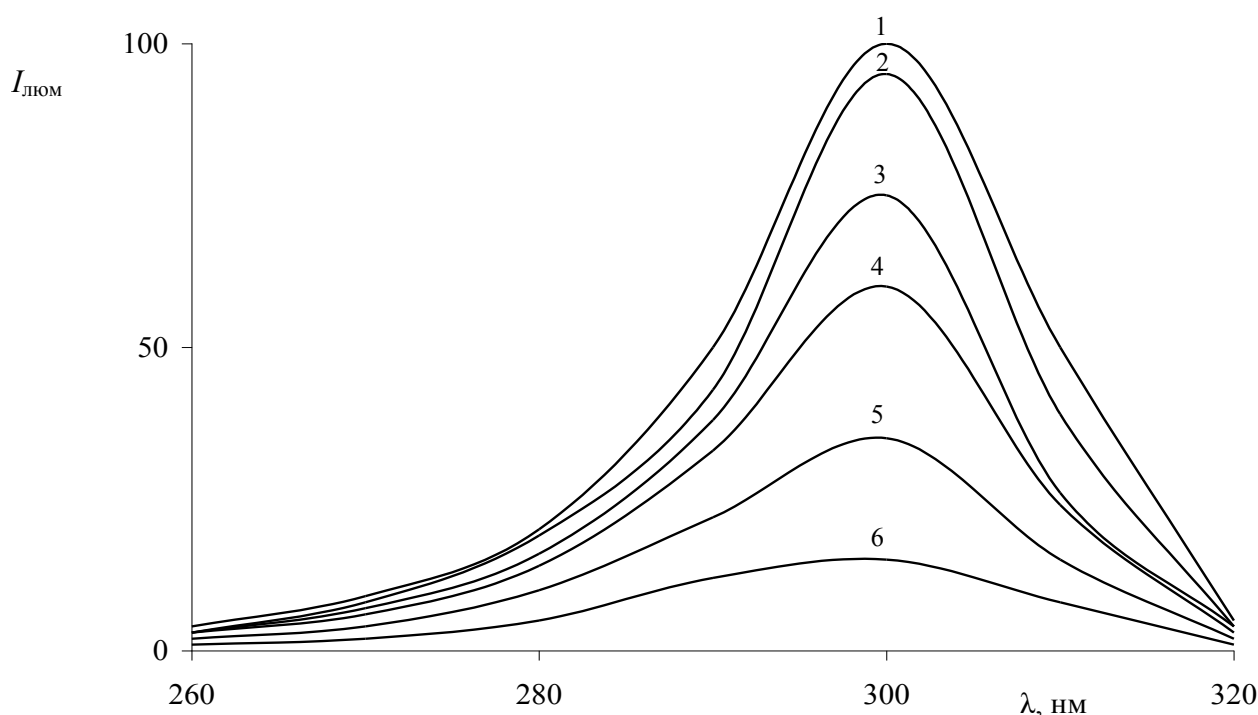


Рис. 3. Гашение молекулярной люминесценции офлоксацина в присутствии Tb(III): $C_{Tb^{3+}} = 0$ моль/л (1); $C_{Tb^{3+}} = 10^{-7}$ моль/л (2); $C_{Tb^{3+}} = 10^{-6}$ моль/л (3); $C_{Tb^{3+}} = 10^{-5}$ моль/л (4); $C_{Tb^{3+}} = 10^{-4}$ моль/л (5); $C_{Tb^{3+}} = 10^{-3}$ моль/л (6)

Как видно из рисунка, при добавлении к раствору офлоксацина различных содержаний Tb (III), наблюдается гашение молекулярной люминесценции реагента. Начиная с концентрации Tb (III), соответствующей 10^{-6} М, прослеживается четкая закономерность в снижении $I_{\text{люм}}$ лиганда при увеличении концентрации иона лантанида. При добавлении иона Tb (III) в концентрации ($10^{-6} \div 10^{-4}$) М интенсивность люминесценции реагента снижается от 1,5 до 4 раз соответственно. Молекулярная люминесценция реагента почти полностью гасится при концентрации иона Tb (III) 10^{-3} М.

Комплексообразование ионов Tb (III) с ОФ и ЛФ происходит в интервале рН 3–11, максимальная интенсивность люминесценции наблюдается при рН 7–8. При меньших значениях рН (в кислых растворах) комплекс, очевидно, не образуется, либо степень его образования мала, а в щелочных растворах (при рН > 9,0) наблюдается разрушение комплекса с образованием гидроксидов лантанидов. Интенсивность люминесценции Tb (III) и Eu (III) в комплексах значительно увеличивают анионные ПАВ: додецил-(ДДС), тридецил-(ТДЦ), тетрадецил-(ТТДС) и гексадецилсульфат натрия (ГДС) (табл. 1). Наибольшее увеличение $I_{\text{люм}}$ наблюдается в присутствии ТТДС – 30 раз для Eu (III) и 115 раз для Tb (III). Причины такого влияния связаны с вхождением АПАВ во внутреннюю сферу комплекса в качестве второго лиганда [12].

Таблица 1

Влияние ПАВ на интенсивность люминесценции комплексов Tb (III) с ОФ и Eu (III) с ЛФ

Антибиотик	I/I_0^*			
	ДДС	ТДС	ТТДС	ГДС
Ломефлоксацин	20	20	30	24
Офлоксацин	22	110	115	72

I_0 – интенсивность люминесценции в отсутствие ПАВ; I – то же при добавлении различных ПАВ.

Интенсивная люминесценция Tb (III) и Eu (III) в комплексах с ОФ и ЛФ сохраняется на твердой матрице, в частности в слое сорбента на хроматографической пластинке. Среди испытанных материалов наиболее четкие изображения пятен антибиотиков получены при использовании пластинок Sorbfil.

В качестве подвижных фаз были испытаны следующие индивидуальные растворители и их смеси: бензол, толуол, хлороформ, этилацетат, водный аммиак, формамид. Однако разделить ОФ и ЛФ не удалось. Оптимальная подвижность пятен фторхинолонов наблюдается при использовании смеси метанол – 25%-ный раствор аммиака-этилацетат-ацетонитрил (1:1:2:1), в которой отсутствует эффект размывания пятен. Подвижность ОФ и ЛФ при этом одинакова и составляет 0,65.

Оптимальный объем пробы, наносимой на пластинку, составляет 2 мм³. При меньших и больших количествах пятна на пластинке приобретают вытянутую форму. Интенсивность люминесценции Ln (III) на пятне хроматограммы зависит от концентрации Tb (III) и Eu (III), максимальное увеличение $I_{\text{люм}}$ наблюдается при концентрации Ln (III) в проявляющем растворе $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Максимальная интенсивность люминесценции сорбатов комплексов ОФ и ЛФ с Tb (III) и Eu (III), как и в водных растворах, обнаруживается при pH 7–8, для создания необходимой величины pH при проявлении пластинки пятна обрабатывали раствором уротропина 4%-ного. Интенсивность люминесценции сорбатов максимальна в присутствии ТТДС при его концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Методика определения. Методика разработана на сточных водах фармацевтического предприятия ОАО “ИнтерХим”. В пробы сточных вод объемом 10 мл вводили различные количества этанольных растворов ОФ и ЛФ и разбавляли до 100 мл дистиллированной водой. Анализируемую пробу в виде двух параллельных в количестве 2 мкл каждая наносили шприцем на линию старта пластинки размером 100×100 мм на расстоянии ~ 1,5 см друг от друга. Параллельно на пластинку наносили стандартные растворы офлоксацина и ломефлоксацина с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (в зависимости от предполагаемого содержания антибиотика в пробе). Пластинку подсушивали и помещали в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь метанол: раствор аммиака 25%-ный: этилацетат: ацетонитрил (1:1:2:1)).

Когда фронт растворителя достигал высоты 70 мм, пластинку извлекали из камеры и отмечали положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивали и равномерно обрабатывали проявителем – раствором хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) для обнаружения офлоксацина, и раствором хлорида европия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) для обнаружения ломефлоксацина. После этого пятна на пластинке обрабатывали раствором ТТДС ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и уротропином 4%-ным.

Идентификацию ОФ на пластинке проводили по появлению зеленой люминесценции Tb (III) и ЛФ – красной люминесценции Eu (III) при освещении люминесцентной лампой со светофильтром УФС-2 ($\lambda_{\text{макс}} = 365$ нм).

Количественное определение ОФ и ЛФ проводили по градуировочным графикам, для построения которых поступали следующим образом. На пластинку наносили различные количества стандартных растворов ОФ и ЛФ и далее проводили хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезали пятна с ОФ и ЛФ, помещали в кювету для твердых образцов, интенсивность люминесценции измеряли при 545 нм (в случае ОФ) и при 612 нм (в случае с ЛФ). По полученным данным $I_{\text{люм}}$ Ln (III) – концентрация ОФ (ЛФ) строили градуировочные графики, по которым определяли содержание антибиотиков в анализируемой пробе.

Предел обнаружения ЛФ составляет 0,002 мкг, а для ОФ – 0,02 мкг. Точность и достоверность определения этих препаратов проверена методом статистической обработки результатов анализа, которые приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты определения антибиотиков в сточной воде ($n = 5$; $P = 0,95$)

Антибиотик	Введено	Найдено	Sr
	мг/мл		
Ломефлоксацин	0,5	$0,50 \pm 0,004$	0,07
	1,0	$1,02 \pm 0,08$	0,06
	10,0	$10,2 \pm 0,6$	0,05
Офлоксацин	5,0	$5,1 \pm 0,4$	0,06
	10,0	$9,6 \pm 0,7$	0,06
	20,0	$20,1 \pm 1,2$	0,05

Література

1. Chowdary K. P. R., Annapurna A. New spectrophotometric method for the estimation of norfloxacin in dosage forms and in dissolution rate studies // *Indian Drugs*.– 1992.– Vol. 29(13).– P. 612–615.
2. Diurdjevic P., Todorovic M., Staukov M., Odovic Y. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin in serum using iron (III) ion as chromogenic agent // *Anal. Lett.*– 2000.– № 4.– P. 657–665.
3. Sastry C., Rama-Rao K., Prasad D. Extractive spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in pure and dosage forms // *Talanta*.– 1995.– Vol. 42(3).– P. 311–316.
4. Stankov M., Stankov D., Milizevic Z., Veselinovic D., Djurdjevic P. Fluorimetric and derivative-spectrophotometric determination of norfloxacin // *Spectrosc.-Lett.*– 1993.– Vol. 26(9).– P. 1709–1714.
5. Hernandez-Arteseros J. A., Compano R., Patt M. D. Determination of ciprofloxacin and enrofloxacin in edible animal tissues by terbium – sensitized luminescence // *Analyst*.– 2000.– Vol. 125.– P. 1155–1158.
6. Veiopoulou C. J., Ioannou P. C., Liaidou E. S. Application of terbium sensitized fluorescence for the determination of fluoroquinolone antibiotics perfloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin in serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 1997.– Vol. 15.– P. 1839–1844.
7. Hormazabal V., Indestad M. Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin in milk and meat tissues by HPLC // *J. Liquid Chromatogr.*– 1994.– Vol. 17, № 17.– P. 3775–3782.
8. Capitan-Vallvey L. T., Al-Barbazawi Osama M. N., Fernandes-Ramos M. D., Avidad R., Ramizer Gonzalez V. Singleuse phosphorimetric sensor for the determination of nalidixic acid in human urine and milk // *Analyst*.– 2000.– Vol. 125, № 11.– P. 2000–2005.
9. Golet E. M., Strehler A., Alder A., Giger W. Determination of fluoroquinolone antibacteriol agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction // *Analytical chemistry*.– 2000.– Vol. 74(21).– P. 5455–5462.
10. Reitord A., Vazquez L., Soursae M. et. al. Fluoroquinolones as sensitizers of lanthanide fluorescence: application to the liquid chromatographic determination of ciprofloxacin using terbium // *Anal. Chim. Acta.*– 1993.– Vol. 290.– P. 215–225.
11. Golet E., Alder A., Hartmann A., Ternes T., Giger W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents un urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection // *Anal. Chim. Acta.*– 2001.– Vol. 3, № 15.– P. 3632–3638.
12. Бельтюкова С. В., Егорова А. В., Теслюк О. И. Использование f-f люминесценции ионов Eu (III) и Tb (III) в анализе лекарственных препаратов // *Укр. хим. журн.*– 2000.– Т. 66, № 9–10.– С. 115–121.

Статья сдана в редколлегию
08.12.2008 г.

УДК 543.47.689

І. Л. Марченко – кандидат хімічних наук, старший викладач кафедри хімії та охорони праці Донбаської державної машинобудівельної академії;

О. М. Бакланов – доктор хімічних наук, доцент кафедри хімії та охорони праці Донбаської державної машинобудівельної академії, провідний науковий співробітник акредитованої випробувальної лабораторії харчової продукції при Українському науково-дослідному інституті соляної промисловості;

Н. І. Євграфова – кандидат хімічних наук, доцент кафедри хімії та охорони праці Донбаської державної машинобудівельної академії

Визначення мікроелементів свинцю, міді та кадмію у розсолах із використанням двочастотної дії ультразвуку

Роботу виконано на кафедрі хімії та охорони праці ДДМА

Розглянуто використання двочастотної дії ультразвуку при визначенні вмісту свинцю, міді та кадмію у розсолах. Показано, що порівняно з використанням одночастотної дії ультразвуку, нова методика має кращі метрологічні характеристики.

Ключові слова: ультразвук, частота, інтенсивність, час дії, розсоли, токсичні елементи.

© Марченко І. Л., Бакланов О. М., Євграфова Н. І., 2008