

Минобрнауки России

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕВОФЛОКСАЦИНА И ЕГО
КОМПЛЕКСОВ С ИОНАМИ ИТТРИЯ В ВОДНЫХ И МИЦЕЛЛЯРНЫХ
СРЕДАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 411 группы
направления 04.03.01 «Химия»
Института Химии
Брышкиной Анастасии Дмитриевны

Научный руководитель

д.х.н., профессор

подпись, дата

Т.Д. Смирнова

Зав. кафедрой

д.х.н., профессор

подпись, дата

Т.Ю. Русанова

Саратов 2019

Введение

Актуальность темы. Определение содержания антибиотиков и других лекарственных средств в фармацевтических препаратах, биологических жидкостях, пищевых продуктах, объектах окружающей среды на сегодняшний день является актуальной задачей аналитической химии. Широкое и не всегда обоснованное применение антибиотиков в ветеринарии и сельском хозяйстве является причиной их завышенных остаточных содержаний в молоке, мясе и других продуктах питания, что может быть причиной развития резистентности и снижения эффективности антибактериального действия.

Фторхинолоны — группа лекарственных веществ, обладающих выраженной противомикробной активностью, широко применяющихся в медицине в качестве антибиотиков широкого спектра действия. По широте спектра противомикробного действия, активности, и показаниям к применению они действительно близки к антибиотикам, но отличаются от них по химической природе и происхождению. Препараты класса хинолонов, используемые в клинической практике с начала 60-х годов, по механизму действия принципиально отличаются от других АМП, что обеспечивает их активность в отношении устойчивых, в том числе полирезистентных, штаммов микроорганизмов. Левофлоксацин - синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов. Блокирует ДНК-гиразу, нарушает суперспирализацию и сшивку разрывов ДНК, ингибирует синтез ДНК, вызывает глубокие морфологические изменения в цитоплазме, клеточной стенке и мембранах. Левофлоксацин активен в отношении большинства штаммов микроорганизмов, что объясняет его широкое применение в животноводстве, а также при лечении человека.

Фторхинолоны — класс органических веществ, обладающих собственной флуоресценцией. Однако диапазон линейных концентраций при использовании в качестве аналитического сигнала собственной

флуоресценции очень мал, что позволяет определять антибиотики только в качестве основного вещества. Для определения остаточных концентраций требуется увеличение диапазона линейной зависимости концентраций и, соответственно, аналитического сигнала. Одним из таких методов является сенсibilизированная флуоресценция хелатов антибиотиков с ионами лантанидов, однако такой метод не селективен.

Взаимодействие фторхинолонов с ионами лантанидов с полностью заполненной или пустой f -оболочкой сопровождается образованием комплексов без переноса энергии и флуоресценцией длины волны антибиотика, что увеличивает селективность и дает возможность определения в смеси антибиотиков.

Цель работы состояла изучение флуоресцентных свойств ЛФ и его комплексов с ионами иттрия в водных и мицеллярных средах, а также разработка флуориметрической методики определения антибиотика в природной воде.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- оценить фотометрические свойства левофлоксацина и его комплексов с ионами иттрия в водных средах с различным значением рН;
- изучить флуориметрические свойства левофлоксацина и его комплекса с ионами иттрия в водных и мицеллярных средах поверхностно-активных веществ;
- разработать флуориметрическую методику определения левофлоксацина с помощью его комплекса с ионами иттрия в мицеллярных средах ПАВ.

Структура и объем работы. Выпускная бакалаврская работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов исследования, изложения результатов и их обсуждения (6 разделов), заключения и списка

литературы, содержащего 51 ссылку. Работа изложена на 47 страницах, содержит 16 рисунков и 8 таблиц.

Основное содержание работы. Во введении обоснована актуальность проделанной работы, поставлена цель и указаны задачи, выполнимые в ходе научно-исследовательской деятельности.

В обзоре литературы проанализированы основные методы определения и исследования фторхинолонов, особое внимание уделено флуориметрическим методам определения в различных объектах.

В разделе 3.1 рассмотрены спектральные характеристики левофлоксацина. Антибиотик имеет три максимума поглощения разной интенсивности: $\lambda_{\text{погл}} = 290$ нм, $\lambda_{\text{погл}} = 335$ нм и $\lambda_{\text{погл}} = 255$ нм (рисунок 1), обладает собственной флуоресценцией. Максимальное значение интенсивности эмиссии наблюдается при $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм при длине волны возбуждения 290 нм (рисунок 2).

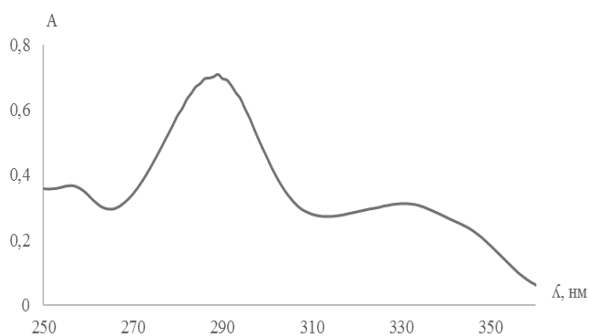


Рисунок 1 - Спектр поглощения ЛФ в воде,
 $C_{\text{ЛФ}} = 2 \times 10^{-5}$ М.

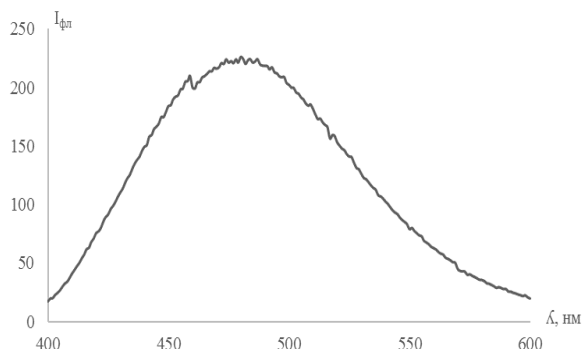


Рисунок 2 - Спектр флуоресценции ЛФ в воде,
 $C_{\text{ЛФ}} = 10^{-6}$ М, $\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм.

В разделе 3.2 приведены результаты изучения влияния кислотности среды на интенсивность поглощения и флуоресценции левофлоксацина.

В зависимости от кислотности среды фторхинолоны могут находиться в 4 разных формах, строение которых обуславливает изменения в спектрах и возможность проведения реакции комплексообразования. В кислой среде ($\text{pH} < 4$) в результате протонирования кислорода карбоксильной группы и азота пиперазинового кольца образуется катионная форма фторхинолона. Хромофор ЛФ

характеризуется полосой высокой интенсивности при 287-292 нм и менее интенсивной при 255 нм. С увеличением концентрации протонированной формы, максимум поглощения при 290 нм возрастает, а при 255 уменьшается. В слабокислой, нейтральной и слабощелочной среде наблюдается гипохромное и гипсохромное смещение максимума поглощения на 8 нм, что связано с диссоциацией карбоксильной группы. Полоса максимума при 335 нм не изменяется во всем диапазоне рН. Рассчитанные коэффициенты молярного светопоглощения полос при рН 6-7 равны $\epsilon_{255}=1.9 \times 10^4$, $\epsilon_{290}=3.5 \times 10^4$, что позволяет отнести их к $\pi-\pi^*$ -переходам в сопряженных системах реагента.

В слабощелочных средах в результате депротонирования образуется анионная форма антибиотика, характеризующаяся более низкой интенсивностью флуоресценции. Наблюдаемые явления обусловлены подвижностью электронов и протонов в окислительно-восстановительных процессах (рисунок 3).

В спектрах флуоресценции наблюдаются схожие изменения. В кислых средах (рН 3-5) интенсивность флуоресценции максимальна, что связано с малой подвижностью протонов. При переходе к нейтральной и слабощелочной среде наблюдается уменьшение интенсивности сигнала. При рН 6, по-видимому, образуется цвиттер-ион. В слабощелочных средах происходит гидролиз органического реагента, т.к. интенсивность резко падает (рисунок 4).

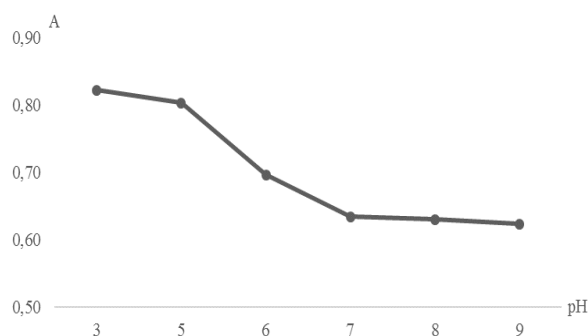


Рисунок 3 - Зависимость интенсивности поглощения ЛФ от кислотности среды, $C_{\text{ЛФ}}=2 \times 10^{-5}$ М.

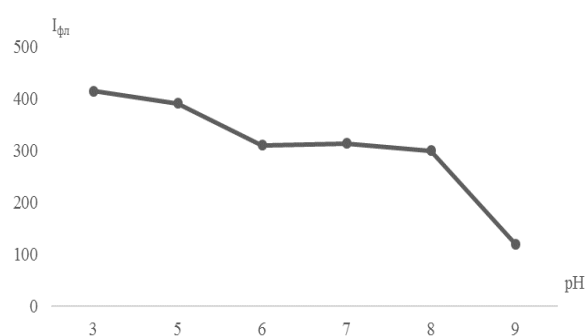


Рисунок 4 - Зависимость интенсивности флуоресценции от кислотности среды, $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М.

В разделе 3.3 рассмотрено влияние мицелл различной природы на собственную флуоресценцию левофлоксацина. Показано, что в присутствии катионных и неионогенных ПАВ сигнал уменьшается, а в присутствии анионных ПАВ увеличивается в 2 раза (рисунок 5).

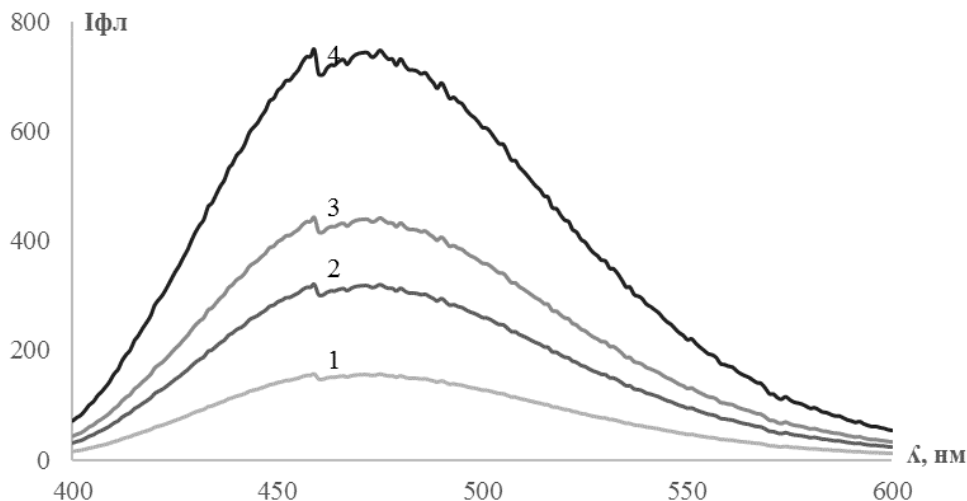


Рисунок 5 - Спектры флуоресценции ЛФ в мицеллярных средах, $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М, $\lambda_{\text{возб}}=290$ нм: 1- ЦПХ (10^{-2} М), 2 - вода, 3 – Бридж-35 (10^{-2} М), 4 – ДДС (10^{-2} М).

Такой эффект объясняется эффективной сольubilизацией молекулы фторхинолона внутри мицеллы, обусловленной электростатическим взаимодействием отрицательно заряженной мицеллы и положительно заряженного атома азота пиперидинового кольца. За счет повышения вязкости среды, дегидратации и увеличения жесткости флуоресцирующего центра происходит увеличение аналитического сигнала.

Полученная линейная зависимость от концентрации левофлоксацина имела узкий диапазон и неудовлетворительные метрологические характеристики, поэтому нами применена реакция комплексообразования для увеличения интенсивности, чувствительности и понижения предела обнаружения.

В разделе 3.4 описаны условия образования комплекса при взаимодействии ионов иттрия и левофлоксацина. Как было указано, флуоресценция левофлоксацина максимальна в кислой среде, однако в ней комплексообразования не происходит.

Образование комплекса с ионами Y^{3+} происходит в нейтральной и слабощелочной среде, о чем свидетельствуют изменения в спектрах поглощения: (рисунок 6) увеличение интенсивности в 1.3 раза при $\lambda = 290$ нм и батохромное смещение максимума на 5 нм. Взаимодействие с ионом металла возможно по карбонильным кислородам пиридинового кольца и карбоксильной группы молекулы антибиотика. При указанных рН подвижность ионов водорода увеличивается и замещение на ионы иттрия становится возможным.

При взаимодействии с ионами Y^{3+} собственная флуоресценция антибиотика увеличивается в 2 раза. Увеличение сигнала эмиссии, а также отсутствие в ионе комплексообразователя электронов на 4f-оболочке говорит об образовании комплекса без переноса энергии.

В спектрах флуоресценции наблюдается гипохромный и батохромный сдвиг максимума на 6 нм, а также уменьшение полуширины полосы (рисунок 7).

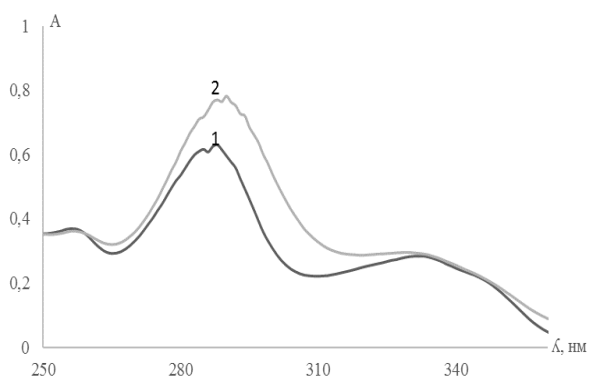


Рисунок 6 - Спектры поглощения ЛФ(1) и ЛФ+Y(2), $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М, $C_{Y^{3+}}=10^{-4}$ М, рН 8

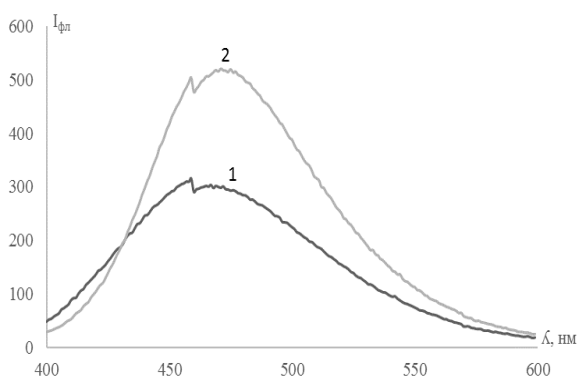


Рисунок 7 - Спектры флуоресценции ЛФ(1) и ЛФ+Y(2), $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М, $C_{Y^{3+}}=10^{-4}$ М, рН 8, $\lambda_{\text{фл}} = 465$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм.

За счет комплексообразования формируется протяженная плоская структура π - π сопряжения. Молекула левофлоксацина стабилизируется, уменьшается доля диссипации энергии возбуждения в результате ингибирования подвижности гидроксильных и карбоксильных групп ЛФ. Таким образом, увеличивается собственная флуоресценция.

В разделе 3.5 рассмотрено влияние мицелл ПАВ различной природы на флуоресценцию комплекса ЛФ-У.

Мицеллы катионных (хлорида цетилпиридиния) и неионогенных ПАВ (Triton-X100 и Бридж-35) тушат флуоресценцию комплекса.

В среде мицелл анионных ПАВ – додецилсульфат натрия – интенсивность увеличивается дополнительно в 2 раза (рисунок 8,9). Возрастание эмиссии связано с эффективной солюбилизацией в мицеллу за счет электростатического взаимодействия остаточного положительного заряда хелата и отрицательного заряда мицеллы.

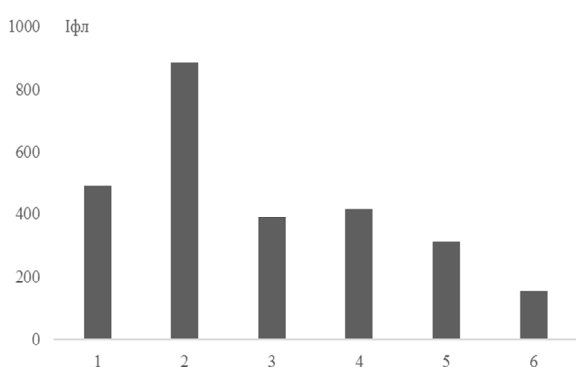


Рисунок 8- Интенсивность флуоресценции комплекса ЛФ-У³⁺ в водных и мицеллярных средах, $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М, $C_{\text{У}^{3+}}=10^{-4}$ М, $\lambda_{\text{возб}}=290$ нм: 1 – вода, 2- ДДС (10^{-2} М), 3 - Бридж-35 (10^{-2} М), 4 – Triton-X100 (10^{-2} М), 5 – Твин-80 (10^{-2} М), 6 – ЦПХ (10^{-2} М).

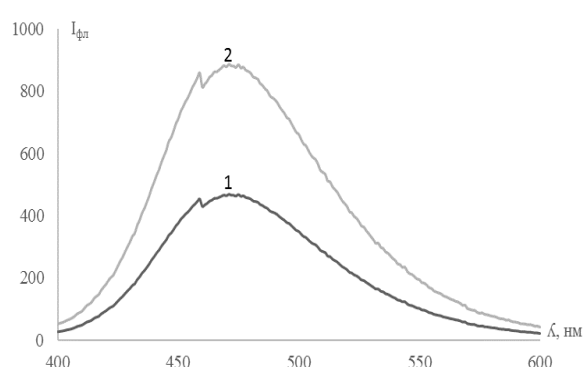


Рисунок 9 - Спектры флуоресценции комплекса ЛФ-У³⁺ в водной(1) и мицеллярной среде ДДС (2), $C_{\text{ЛФ}}=10^{-6}$ М, $C_{\text{У}^{3+}}=10^{-4}$ М, $C_{\text{ДДС}}=10^{-2}$ М, $\lambda_{\text{возб}}=290$ нм.

В разделе 3.6 указаны диапазоны линейности зависимости интенсивности флуоресценции различных систем от концентрации левофлоксацина.

Измеряя собственную флуоресценцию антибиотика возможно его флуориметрическое определение в диапазоне концентраций 5×10^{-7} - 3×10^{-5} М. Используя в качестве аналитической системы образующийся комплекс с ионами иттрия, можно расширить диапазон определяемых концентраций левофлоксацина и практически на два порядка понизить нижнюю границу определяемых содержаний (1×10^{-7} - 3×10^{-5} М). Проводя аналитическую реакцию в микрогетерогенных растворах, мицеллярных растворах

додецилсульфата натрия, мы дополнительно расширяем диапазон определяемых концентраций антибиотика до трех порядков (1×10^{-8} - 2×10^{-5} М) и в 10 раз понижаем нижнюю границу определяемых содержаний (рисунок 10).

Таким образом, использование реакций комплексообразования с ионами иттрия в мицеллярной среде ДДС натрия линейный диапазон расширяется почти до 3 порядков, при этом нижняя граница определяемых концентраций уменьшается на порядок, чувствительность определения возрастает в 10 раз (таблица 1).

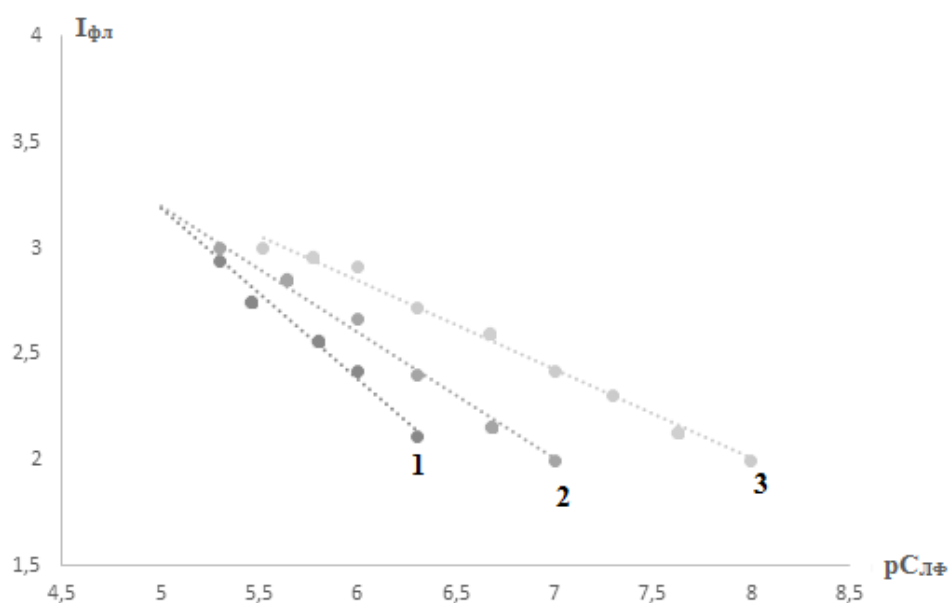


Рисунок 10 - Зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ЛФ:

1 – ЛФ, $C_{\text{ЛФ}} = 3 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-7}$ М, 2 – ЛФ+Y, $C_{\text{ЛФ}} = 3 \times 10^{-5} - 10^{-7}$ М, $C_{Y^{3+}} = 10^{-4}$ М, 3 – ЛФ+Y+ДДС, $C_{\text{ЛФ}} = 2 \times 10^{-5} - 10^{-8}$ М, $C_{Y^{3+}} = 10^{-4}$ М, $C_{\text{ДДС}} = 10^{-2}$ М, $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 465$ нм.

Таблица 1 - Метрологические характеристики исследуемых систем.

Система	Линейный диапазон, М	R^2	Уравнение прямой
ЛФ	$3 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-7}$	0.995	$y = -0.81x + 7.24$
ЛФ+Y ³⁺	$3 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-7}$	0.991	$y = -0.60x + 6.20$
ЛФ+Y ³⁺ +ДДС	$2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-8}$	0.991	$y = -0.42x + 5.40$

Определение левофлоксацина в природной (Волжской) воде.

Определение проводили с использованием реакции комплексообразования в мицеллярной среде додецилсульфата натрия.

Методика построения градуировочного графика: в шесть мерных колб (25 мл) помещали аликвоты (2-3 мл) природной воды, 5 мл буферного раствора рН 8, добавляли от 0.25 до 1.25 мл стандартного раствора левофлоксацина с концентрацией от 1.0×10^{-3} М до 1.0×10^{-7} М, 0.25 мл соли иттрия

$C=1.0 \times 10^{-2}$ М, 2.5 мл додецилсульфат натрия концентрации 1.0×10^{-1} М, буферный раствор до общего объема 25 мл. Интенсивность флуоресценции измеряли при $\lambda_{\text{фл}}= 465$ нм $\lambda_{\text{возб}}= 290$ нм. Градуировочный график строили в координатах $\lg I_{\text{фл}} - pC_{\text{лф}}$.

Таблица 2 – Результаты определения ЛФ в природной воде (Волжской) (n=3, p = 0.95, $t_{\text{табл.}}=4.30$)

Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	S_r	$t_{\text{экспер}}$
6.0	5.9 ± 0.6	0.25	0.97
7.0	6.9 ± 0.7	0.31	0.90
8.0	7.8 ± 0.7	0.30	0.94

Правильность установлена методом «введено – найдено». Значение рассчитанного t-критерия меньше теоритического, что говорит о правильности предлагаемой методики.

Заключение:

1. Анализ литературы, посвященной методам определения фторхинолонов в фармацевтических, пищевых и природных объектах, а также в биологических жидкостях показал, что наиболее часто используемым методом является ВЭЖХ с различными типами детектирования. Широко используются люминесцентные методы с привлечением нанообъектов, улучшающих метрологические характеристики флуориметрического определения фторхинолонов.

2. Показано, что интенсивность поглощения и флуоресценции левофлоксацина зависит от рН среды и максимальны при рН 3-5. Комплексообразование левофлоксацина с ионами иттрия в нейтральной и слабощелочной средах сопровождается увеличением собственной флуоресценции в 2 раза.
3. Изучено влияние природы мицелл ПАВ на интенсивность флуоресценции комплекса левофлоксацина с иттрием и установлено, что мицеллы катионных и неионогенных ПАВ тушат сигнал флуоресценции, а анионные увеличивают его в 2 раза.
4. Установлена линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации левофлоксацина в различных системах. При проведении реакции комплексообразования в мицеллярной среде линейный диапазон определяемых концентраций достигает 3 порядков.
5. Разработана флуориметрическая методика определения содержания левофлоксацина в природной (Волжской) воде с использованием реакции комплексообразования антибиотика с ионами иттрия в мицеллярной среде додецилсульфата натрия. Правильность определения установлена методом «введено – найдено».