

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии и химической экологии

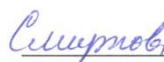
**ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНРОФЛОКСАЦИНА И ЕГО
КОМПЛЕКСОВ С ИОНАМИ ИТТРИЯ В ВОДНЫХ И
МИЦЕЛЛЯРНЫХ СРЕДАХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы
направления 04.03.01 – «Химия»

Института химии
Левиной Натальи Алексеевны

Научный руководитель
профессор, д. х. н.



Т.Д.Смирнова

подпись, дата

Зав. кафедрой
д.х.н., доцент



Т.Ю. Русанова

подпись, дата

Саратов 2019

Введение. Соединения, обладающие биологической активностью, например, различного рода антибиотики, аминокислоты, антикоагулянты и пестициды широко применяют в клинической практике и животноводстве в качестве лекарственных препаратов и добавок к кормам, а также в сельском хозяйстве для уничтожения вредителей. В связи с этим их содержание необходимо контролировать в биологических жидкостях, пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Антибиотики с широким спектром действия, являясь биологически активными веществами, находят широкое применение в качестве популярных медицинских препаратов. Одной из важнейших групп антибиотиков является группа фторхинолонов. Остаточные содержания антибиотиков в пищевых продуктах животного происхождения угнетают микрофлору кишечника организма человека, провоцируют проявления аллергического характера, вторичные грибковые инфекции, снижают сопротивляемость организма, провоцируют нарушения функции почек. Максимально допустимый уровень содержания фторхинолонов в продуктах питания и полуфабрикатах, например, энрофлоксацина в мясе домашних животных составляет 100 мкг/кг.

Актуальность работы. Определение содержания биологически активных веществ в различных объектах является актуальной задачей аналитической химии и имеет большое практическое значение. Биологически активные вещества обладают ярко выраженными физиологическими и фармакологическими свойствами и участвуют во всех процессах человеческого организма. В настоящее время участились случаи фальсификации лекарственных препаратов, особенно антибиотиков, вызывают необходимость в осуществлении контроля качества выпускаемой продукции фармацевтической промышленности.

Цель работы. Изучение флуоресцентных свойств энрофлоксацина и его комплекса с ионами иттрия в водных и мицеллярных средах поверхностно-активных веществ.

Практическая значимость. В настоящее время остается актуальной задача организации постоянного контроля содержания фторхинолонов в продуктах питания, биологических жидкостях. Наиболее часто для таких целей используют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии отличаются более высокой чувствительностью и точностью, но требуют привлечения дорогостоящего специального оборудования и высококвалифицированного персонала. В настоящее время внимание аналитиков привлекают простые и высокочувствительные способы флуориметрического определения антибиотиков. Использование новых подходов к повышению чувствительности и избирательности флуориметрического определения позволяют расширить круг анализируемых объектов анализа и применить разработанные способы к пищевым продуктам, фармацевтическим препаратам, природным объектам и биологическим жидкостям. Нами на основании проведенных исследований предложена флуориметрическая методика определения энрофлоксацина в природной воде.

Для достижения поставленной цели нам необходимо было решить задачи:

- изучить фотометрические и флуориметрические свойства энрофлоксацина, оценить влияние рН среды на спектры поглощения и флуоресценции энрофлоксацина;
- изучить условия взаимодействия энрофлоксацина с ионами иттрия в водных средах;
- оценить влияние природы мицелл ПАВ на собственную флуоресценцию энрофлоксацина и его комплекса с ионами иттрия;
- разработать флуориметрическую методику определения энрофлоксацина в природной воде с помощью реакций

комплексообразования с ионами иттрия в мицеллярной среде додецилсульфата натрия.

Основное содержание работы.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены новизна, практическая значимость полученных результатов.

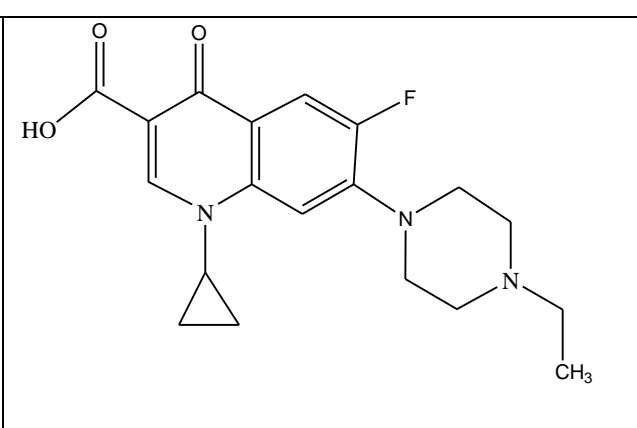
В 1 разделе дано обобщение и систематизация литературных данных по современным методам определения антибиотиков, а именно фторхинолонов в лекарственных препаратах, биологических жидкостях, объектах окружающей среды, проанализированы их достоинства и недостатки.

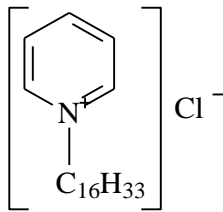
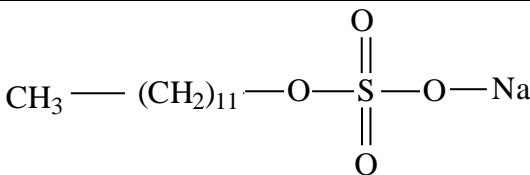
Во 2 разделе описаны использованные в работе реактивы и оборудование. Объекта исследования был выбран биологически активное вещество класса: фторхинолоны.

В 3 разделе приведены экспериментальные результаты исследований.

Энрофлоксацин фирмы ("ICN Biomedicals Inc."), с содержанием основного вещества более 99%, используют в виде растворов концентрации $1.0 \cdot 10^{-3}$ М. Для их приготовления точные навески растворяли в 0.1 М HCl.

Таблица 1- Объекты исследования.

Вещество	Формула	М, г/моль
Антибиотик		
Энрофлоксацина		359,4

Поверхностно - активные вещества		
Цетилпиридиний хлорид (ЦПХ)		375,5
Натрия додecilсульфат (ДДС)		288,4
Бридж-35	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - (-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23} - \text{OH}$	1199,6

Спектры флуоресценции регистрируют при помощи спектрофлуориметра LS-55 фирмы «Perkin-Elmer» с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина дифракционной щели возбуждения 10 нм, флуоресценции 5 нм. Спектрофлуориметр «Shimadzu RF-5301 PC» с источником возбуждения – импульсной ксеноновой лампой. Ширина дифракционной щели возбуждения 10 нм, флуоресценции 3 нм.

Спектральные характеристики

Из литературы известно что энрофлоксацин в зависимости от кислотности среды в растворе находится в катионной, анионной или цвиттер-ионной формах:

- в кислой образуется катионная форма фторхинолона в результате протонирования;
- в нейтральной и щелочных средах наблюдается гипохромный эффект и незначительный гипсохромный эффект, что по-видимому связано с диссоциацией карбоксильной группы.

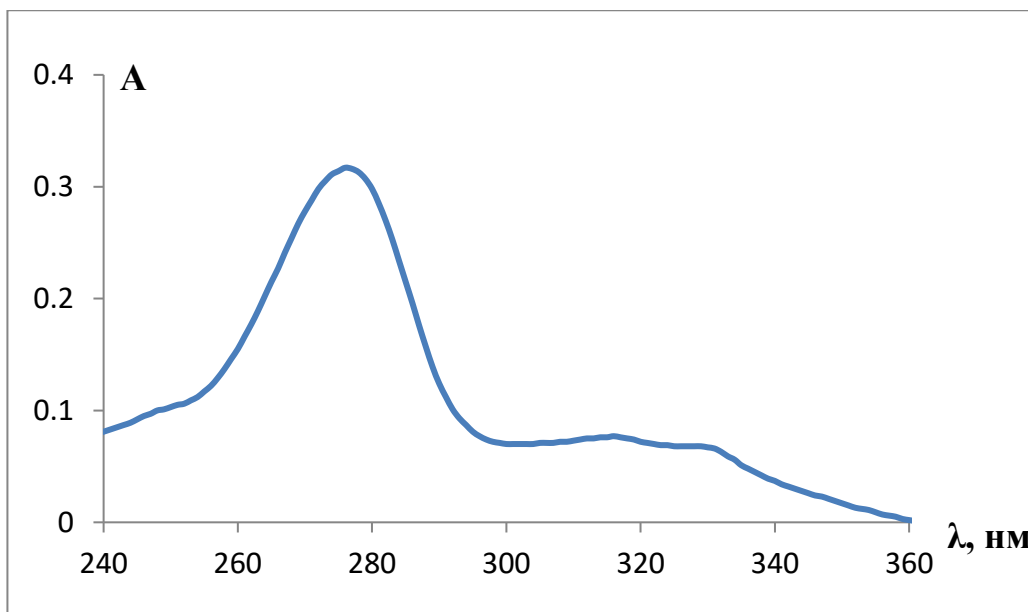


Рисунок 1 - Спектр поглощения раствора энрофлоксацина в воде, $C_{\text{эф.}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Спектр поглощения ЭФ представлен на рис.1. Из рисунка видно, что в спектре присутствует полоса с максимумом при 276 нм, которая отвечает, по-видимому, поглощению хромофора энрофлоксацина, включающего пиперазиновое кольцо и карбоксильную группу. Рассчитанный коэффициент молярного светопоглощения полос при рН 6 равен $\varepsilon_{276} = 3,2 \cdot 10^4$, что позволяет отнести к $\pi\text{-}\pi^*$ -переходам.

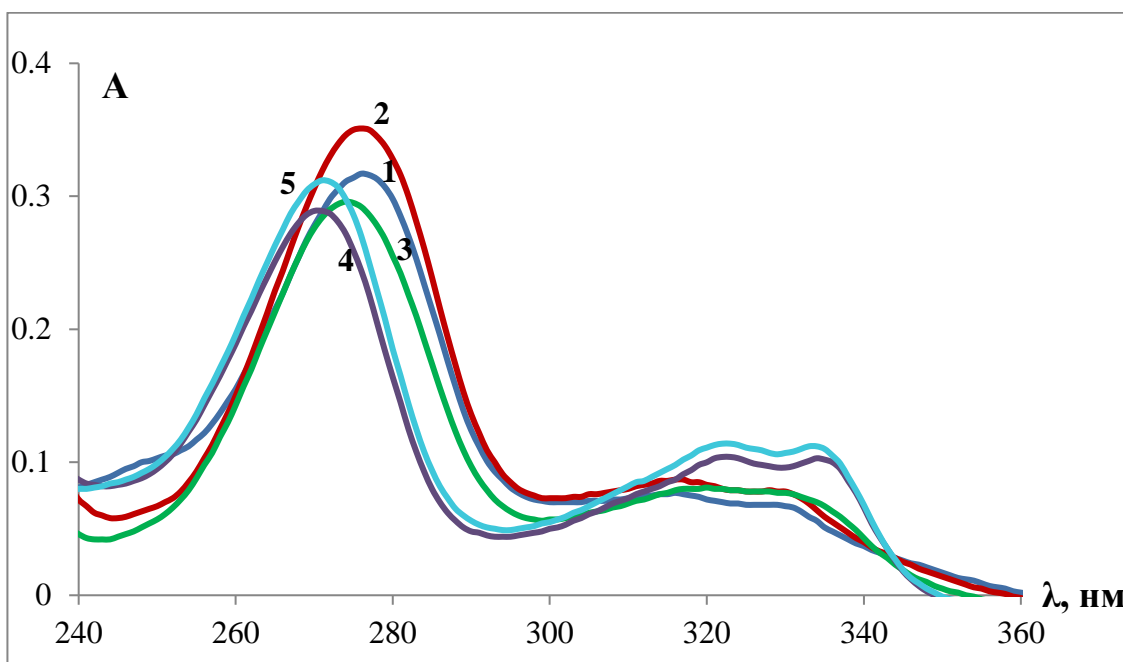


Рисунок 2 - Спектры поглощения растворов энрофлоксацина. 1 - вода, 2 - рН 5, 3 - рН 6, 4 - рН 7, 5 - рН 11, $C_{\text{эф.}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Спектры поглощения энрофлоксацина в зависимости от кислотности среды представлены на рис.2. В кислой среде при $\text{pH} < 4$ в результате протонирования кислорода карбонильной группы и азота пиперазинового кольца образуется катионная форма фтохинолона. В кислых средах ($\text{pH} < 5$) с увеличением концентрации протонированной формы энрофлоксацина максимум поглощения при 276 нм возрастает. В слабокислой среде при $\text{pH} > 5$ наблюдается гипохромное и незначительное гипсохромное смещением максимума практически на 6 нм, что, по-видимому, связано с диссоциацией карбоксильной группы.

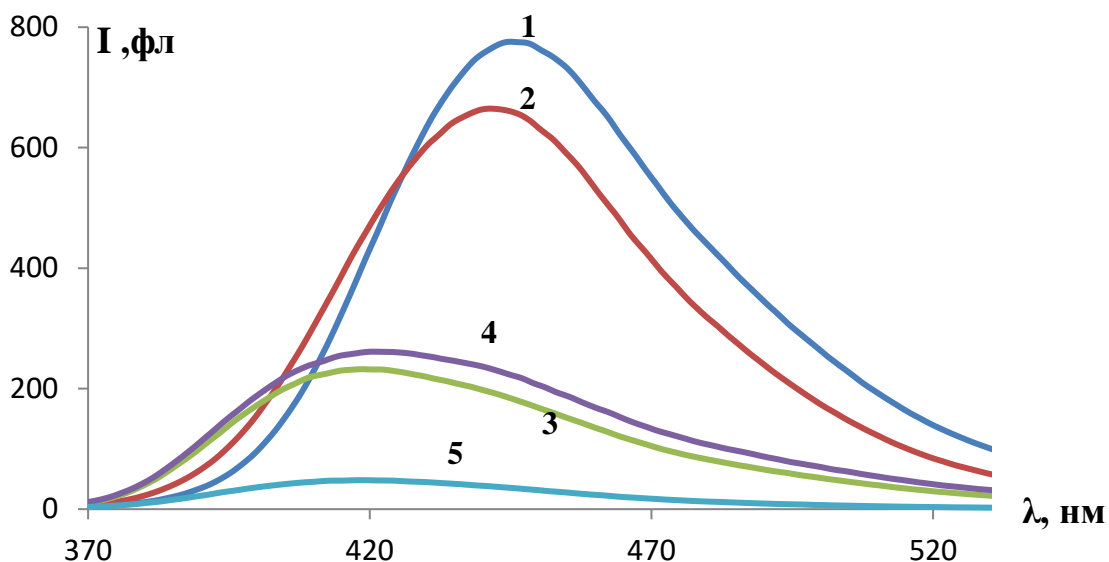


Рисунок 3 - Спектры флуоресценции растворов энрофлоксацина в разных pH среды. 1 - pH 5, 2 - pH 6, 3 - pH 7, 4 - pH 8, 5 - pH 9, $C_{\text{эф}} = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{возб}} = 276 \text{ нм}$.

Энрофлоксацин обладает значительными флуоресцентными свойствами. Спектр возбуждения энрофлоксацина представлен на рис.1. Максимальное значение интенсивности эмиссии наблюдается при $\lambda_{\text{фл}} = 430 \text{ нм}$ и при $\lambda_{\text{возб}} = 276 \text{ нм}$ в pH 5 (рис. 3).

Влияние ионов иттрия

Нами установлено, что в слабощелочной среде (pH 6-7) энрофлоксацин образует с ионами Y^{3+} комплексное соединение, образование

которого сопровождается изменениями в спектрах поглощения: увеличением интенсивности в 1,1 раза при $\lambda = 276$ нм и батохромным смещением максимума на 5 нм. Взаимодействие иона металла возможно по карбонильному кислороду пиридинового кольца и второму карбонильному кислороду карбоксильной группы антибиотика (рис. 4).

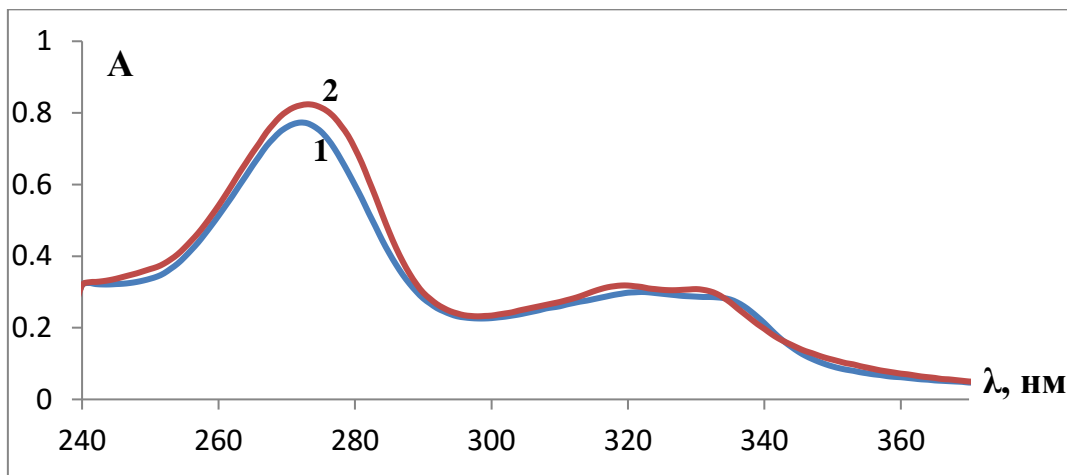


Рисунок 4 - Спектры поглощения энрофлоксацина (1) и его комплекса с Y^{3+} (2). $C_{эф.} = 2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Y(III)} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, рН 6.

В присутствии иона иттрия собственная флуоресценция фторхинолонов усиливается за счет образования комплексов (рис. 4,5). Возрастание сигнала собственной флуоресценции лиганда в 1,3 раза связано с повышением «жесткости» структуры флуоресцирующего центра. Отсутствие в ионах комплексообразователей электронов на 4f-оболочке, наличие которых обычно приводит к тушению люминесценции органического лиганда в результате безызлучательных переходов, способствует увеличению сигнала эмиссии.

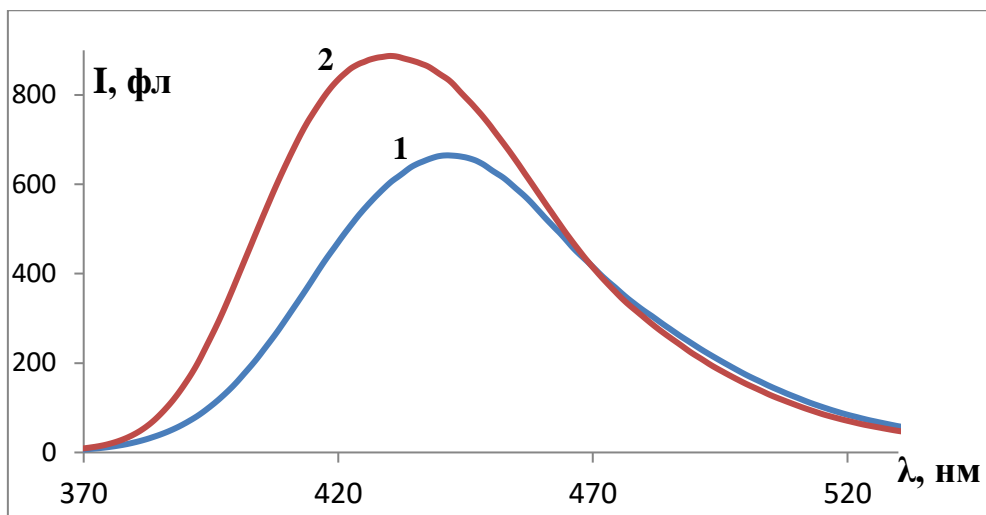


Рисунок 5 - Спектры флуоресценции энрофлоксацина (1) и комплекса с Y^{3+} (2) $C_{эф} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Y(III)} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, рН 6, $\lambda_{возб} = 276$ нм.

Влияние поверхностно- активных веществ

Известно, что при переходе от гомогенных к микрогетерогенным средам, увеличивается устойчивость комплексов, что сопровождается увеличением сенсibilизированной флуоресценции. Действие ПАВ также обуславливает солубилизацию компонентов реакции в мицеллы, что способствует дегидратации и сближению компонентов реакции. Параметры мицеллярной среды изменяются:

- диэлектрическая проницаемость уменьшается, молекула комплекса становится более « жесткая»;
- мицелла экранирует комплекс от посторонних тушителей.

Из всех рассмотренных нами ПАВ наибольшее увеличение интенсивности собственной флуоресценции наблюдалось при использовании Бридж-35, наибольшее увеличение интенсивность флуоресценции комплекса энрофлоксацин – Y^{3+} при использовании ДДС.

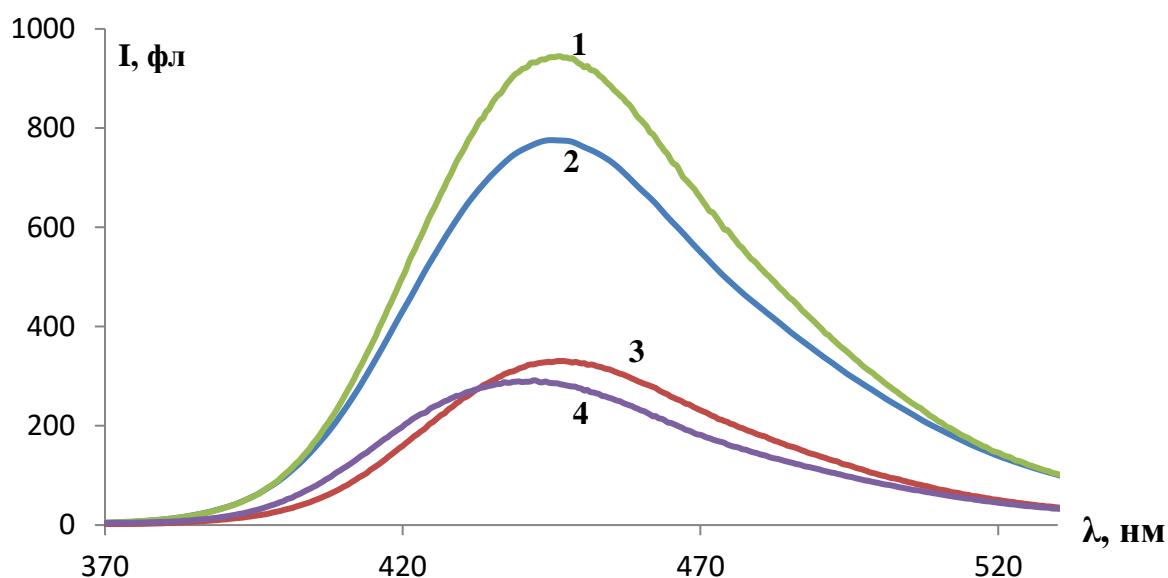


Рисунок 6 - Спектры флуоресценции энрофлоксацина – ПАВ. 1-Бридж-35, 2 – без ПАВ , 3 – ЦПХ, 4 – ДДС, рН 5, $C_{\text{эф.}} = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{ПАВ}} = 1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\lambda_{\text{возб.}} = 276 \text{ нм}$.

Необходимо отметить, что мицеллярные среды неионогенного ПАВ – Бридж-35 максимально увеличивают интенсивность флуоресценции энрофлоксацина при рН 5 (рис.6), что связано, по-видимому, с особенностью структуры поверхностно- активного вещества и эффективной солюбилизации мицеллами цвиттер-иона энрофлоксацина.

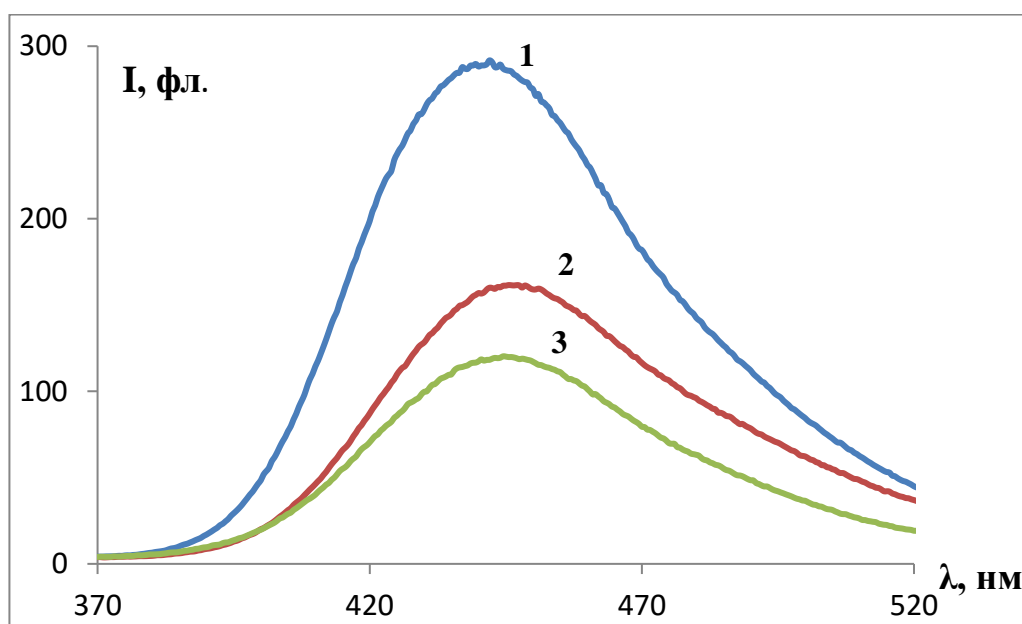


Рисунок 7 - Спектры флуоресценции растворов комплекса Y^{3+} - энрофлоксацин- ПАВ. 1- ДДС, 2 – Бридж-35, 3 – без ПАВ, $C_{ЭФ} = 1,0 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{Y(III)} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{ПАВ} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ М, рН 5, $\lambda_{возб} = 276$ нм, $\lambda_{флуор} = 430$ нм.

Из рис.7 можно сделать вывод, что мицеллярный раствор ДДС в наибольшей степени увеличивает интенсивность флуоресценции комплекса энрофлоксацина с иттрием. Нами установлено увеличение интенсивности флуоресценции в 2,1 раз в присутствии мицелл ДДС, и в 1.2 раза - в среде мицелл Бридж-35.

Построение градуировочных графиков для определения энрофлоксацина

Для построения градуировочного графика использовали растворы ацетатно-аммиачного буфера (рН 5), соли Y^{3+} $1,0 \cdot 10^{-4}$ М, стандартные растворы энрофлоксацина в диапазоне концентраций $1,0 \cdot 10^{-9}$ – $7,0 \cdot 10^{-6}$ М, мицеллярные растворы ДДС $1,0 \cdot 10^{-2}$ М. Объем раствора довели до общего объема 4 мл, перемешивали и измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{возб} = 276$ нм, $\lambda_{фл} = 430$ нм).

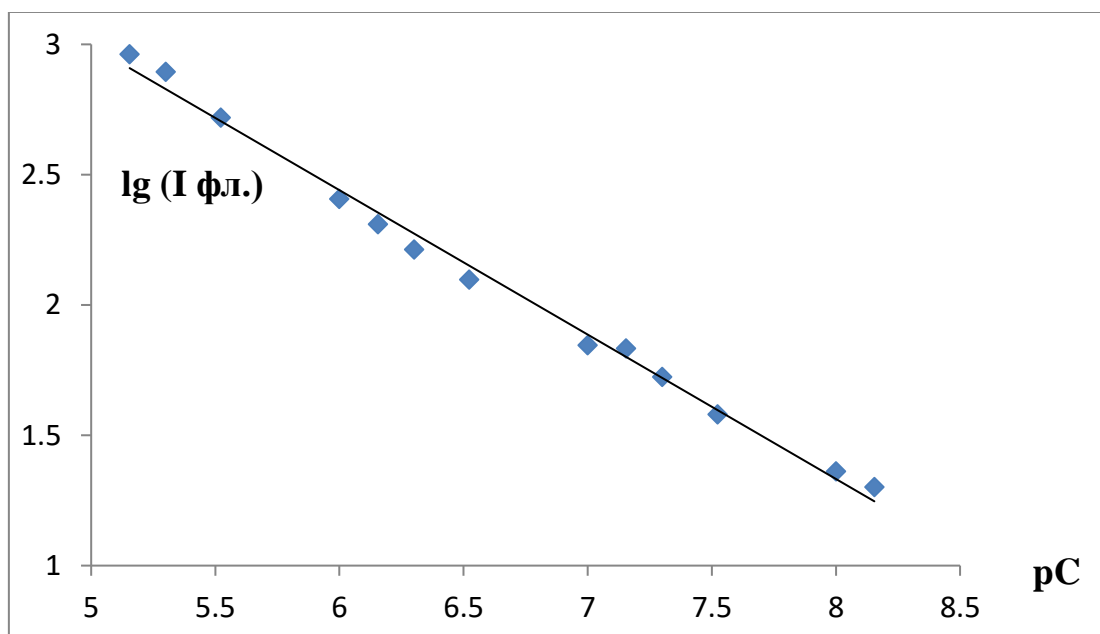


Рисунок 8 - Зависимость интенсивности флуоресценции комплекса Y^{3+} - энрофлоксацин- ДДС от концентрации ЭФ, $C_{ДДС} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{Y(III)} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, рН 5, $\lambda_{фл} = 430$ нм, $\lambda_{возб} = 276$ нм.

Таблица 2- Метрологические характеристики.

Антибиотик	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	Диапазон определяемых содержаний, М	R^2	Уравнение градуировочного графика
ЭФ + Y^{3+} + ДДС рН 5	276	$7,0 \cdot 10^{-9} - 7,0 \cdot 10^{-6}$	0.998	$y = -0,47x + 5,14$

Для определения содержания энрофлоксацина в природной воде использовали метод градуировочного графика. Определение проводилось по следующей методике. Аликвотные части анализируемой воды, содержащей ЭФ, 0,2-0,28 мл, вносили в пробирку, добавляли последовательно 1 мл буферного раствора (рН 5), 0,4 мл $1,0 \cdot 10^{-3}$ М раствора Y^{3+} , 0,4 мл $1,0 \cdot 10^{-2}$ М раствора ДДС, буферный раствор до общего объёма 4 мл. Измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 276$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 430$ нм) и по градуировочному графику определяли количество энрофлоксацина, содержащееся в пробе воды. Правильность определения контролировали методом «введено – найдено» (таблица 3).

Таблица 3 - Результаты определения энрофлоксацина в природной воде
($n=3$, $p=0,95$, $t_{\text{табл.}}=4,3$).

Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л	S_r	$t_{\text{экспер}}$
5,0	$5,2 \pm 0,7$	0,29	1,17
7,0	$7,1 \pm 0,2$	0,09	1,92
8,0	$8,1 \pm 0,2$	0,11	1,93

Правильность определения контролировали методом «введено – найдено».

Заключение

1. собрана и проанализирована литература, посвященная методам определения энрофлоксацина в пищевых объектах, лекарственных препаратах и биологических материалах;
2. показано, что комплекс Y^{3+} с энрофлоксацином образуется в слабокислой и нейтральных средах, при этом интенсивность флуоресценции системы возрастает в 1,4 раза при рН 6;
3. показано, что на интенсивность флуоресценции комплекса ЭФ с ионами Y^{3+} влияет природа мицелл ПАВ. В присутствии мицелл ДДС интенсивность флуоресценции максимально увеличивается в 2,1 раза;
4. на основании проведенных исследований разработана флуориметрическая методика определения ЭФ в природной воде. Диапазон определяемых концентраций ЭФ составляет $7,0 \cdot 10^{-9}$ – $7,0 \cdot 10^{-6}$ М. Правильность определения установлена методом «введено – найдено».