



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56022

(13) A

(51) 7 G01N33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

1

2

(21) 2002086899

(22) 21 08 2002

(24) 15 04 2003

(46) 15 04 2003, Бюл. № 4, 2003 р.

(72) Єгорова Алла Володимирівна, Бельтюкова
Світлана Вадимівна, Теслюк Ольга Іванівна, Вітю-
кова Катерина Олегівна, Целік Олена Іванівна(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БО-
ГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УК-
РАЇНИ

(57) Спосіб кількісного визначення цефтриаксону, що включає приготування проби для аналізу, взаємодію її з хімічним реагентом у розчині, вимірювання інтенсивності флуоресценції розчину, який відрізняється тим, що пробу піддають взаємодії із стандартним розчином хлориду Європію при рН 4,5-6,0, у присутності цетилпіридинію хлориду та вимірюють інтенсивність флуоресценції Європію (III), за величиною якої визначають концентрацію цефтриаксону

Винахід відноситься до аналізу матеріалів, а саме до флуоресцентного визначення лікарського препарату - цефтриаксону (Цеф) (див. Машковський М.Д. Лекарственные средства, Харьков, Торсинг, 1998, т. 2, с. 251).

Відомий спосіб визначення цефтриаксону у сироватці крові за допомогою рідинної хроматографії високого тиску з спектрофотометричним детектуванням (див. S. Bompadre, Ferrante L., Leone L., 1998, v. 812, №1 - 2, p. 191 - 196).

Спосіб передбачає розчинення сироватки крові за допомогою дистильованої води (у 2 рази) і введення її у хроматографічну колонку з послідовною обробкою промиваючим розчином (5% метанол у 0,01М фосфатному буфері) для елімінування компонентів біологічної матриці. Далі пробу хроматографують на колонці сумішшю ацетонітрилу, метанолу та 0,01М фосфорного буферу. Використовують ультрафіолетову детекцію цефтриаксону при $\lambda=265\text{nm}$. Чутливість способу визначення - 2,0мкг/мл.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спектрофлуориметричне визначення цефтриаксону у біологічних сполуках (див. Yang Jinghe, Zhou Guangjun, Jie Nianqin, Han Ronliang, Lin Cunguo, Hu Jingtian Anal. Chim. Acta - 1996, V. 325, №3 P. 195 - 200).

Спосіб передбачає спочатку хімічну обробку цефтриаксону для переведення його у флуоресцируючу сполуку. Визначення здійснюють наступним чином. До 1мл проби додають 3мл 1М NaOH, суміш розводять до об'єму 25мл і нагрівають 30 хвилин при 100°C. По охолодженні в аліквотній частині розчину установлюють рН \approx 7,0 за допомо-

гою 0,5М HCl, додають 1,0мл Na-боратного буферу з рН 9,3 і 4,0мл ацетону, перемішують і доводять водою до об'єму 10мл, далі проводять флуоресцентне визначення цефтриаксону при $\lambda_{\text{збудж}}=365\text{nm}$, $\lambda_{\text{фл}}=395 - 520\text{nm}$.

Дане рішення обрано прототипом

Прототип збігається із винаходом, що заявляється у тому, що містить такі операції

- приготування проби,
- взаємодія проби з хімічним реагентом у розчині,

- вимірювання інтенсивності люмінесценції розчину

Але спосіб за прототипом забезпечує чутливість визначення препарату - 2мкг/мл

У способі за прототипом вживають молекулярну люмінесценцію органічного ліганду - цефтриаксону. Молярний коефіцієнт поглинання цефтриаксону при $\lambda=365\text{nm}$, невеликий $\epsilon=1,2 \cdot 10^3$, у зв'язку з чим відсутнє ефективне поглинання енергії збудження, наслідком чого є низька інтенсивність флуоресценції.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб кількісного визначення цефтриаксону, у якому за рахунок заміни реагентів забезпечується підвищення чутливості визначення.

Поставлену задачу вирішено у способі кількісного визначення цефтриаксону, який включає приготування проби для аналізу, взаємодію її з хімічним реагентом у розчині, вимірювання інтенсивності флуоресценції розчину тим, що пробу піддають взаємодії з стандартним розчином хлориду Європію при рН 4,5 - 6,0 у присутності цетилпіридинію хлориду (ЦПІ) з подальшим вимі-

(13) A

(11) 56022

(19) UA

рюванням інтенсивності флуоресценції

Новим у заявляемому винаході є використання сенситивізованої флуоресценції іону європію, посиленої у присутності поверхнево-активної речовини - цетилпідінію хлориду

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються і досягнутим результатом можна пояснити наступним чином. Підвищення чутливості стає можливим завдяки використанню сенситивізації флуоресценції іону європію (111) внаслідок внутрішньомолекулярної передачі енергії збудження цефтриаксону

Цефтриаксон має у ультрафіолетовій зоні спектру смугу поглинання $\lambda_{\text{max}}=240\text{nm}$. Високий молекулярний коефіцієнт поглинання $\epsilon=48700$ обумовлює ефективне поглинання світлової енергії лігандом. Триплетний рівень ліганда складає 20500cm^{-1} . Мабуть, уданому випадку виникає передача енергії збудження на енергетичний рівень європію $^5D_1(19000\text{cm}^{-1})$ з подальшою безвипромінювальною дезактивацією до першого збудженого стану $^5D_0(17300\text{cm}^{-1})$

Це усе надає можливості досягнути найвищої інтенсивності флуоресценції на відміну від прототипу

Використання поверхнево-активної речовини цетилпідінію хлориду сприяє депратації комплексу, що веде до збільшення інтенсивності флуоресценції

Взаємодія цефтриаксону з європієм відбувається при pH 2,0 - 9,5, максимум флуоресценції комплексу спостерігається при pH 4,5 - 6,0 (Фіг 1)

В запропонованому способі для створення pH розчину (4,5 - 6,0) використовується уротропін (0,1мл 4%-го розчину)

Інтенсивність флуоресценції європію у розчині оптимальна при вмісті цетилпідінію хлориду - 0,5мл ($1 - 10^{-2}$ моль/л) (Фіг 2)

Спосіб здійснюється таким чином готують

пробу для аналізу (наважку препарату розчиняють у дистильованій воді при 30°C , охолоджують), яку піддають взаємодії із стандартним розчином хлориду європію при pH 4,5 - 6,0 у присутності цетилпідінію хлориду з подальшим вимірюванням інтенсивності флуоресценції європію, по величині якої визначають концентрацію цефтриаксону

Приклад

Наважку лікарського препарату "Цефтриаксон" 50мг розчиняють у 50мл дистильованої води при 30°C , розчин охолоджують і доводять об'єм до млки

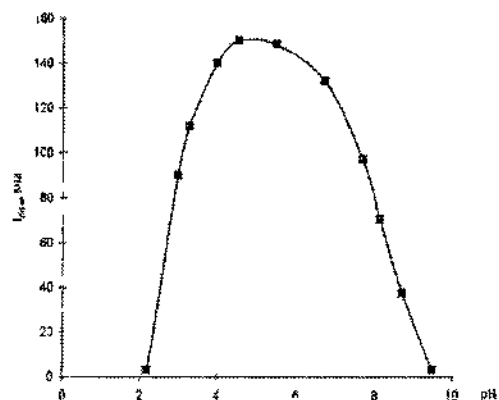
Визначення проводять за методом добавок (див. Васильєв В.П. Аналитическая химия, Москва, Высшая школа, 1989, т.2, с.8). Для цього у три пробірки вміщують по 0,1мл приготовленого аналізованого розчину, у дві пробірки додають 0,2мл та 0,3мл робочого розчину цефтриаксону з концентрацією 1мг/мл. У кожен пробірник додають по 0,1мл розчину хлориду європію з концентрацією $1 - 10^{-3}$ моль/л, додають по 0,5мл водного розчину $1 - 10^{-2}$ моль/л цетилпідінію хлориду, 0,1мл 4% розчину уротропіну і доводять об'єм до 10мл водою

Паралельно готують розчин холостої проби, яка містить усі компоненти, крім цефтриаксону. Проби перемішують, вимірюють інтенсивність флуоресценції європію при $\lambda=612\text{nm}$

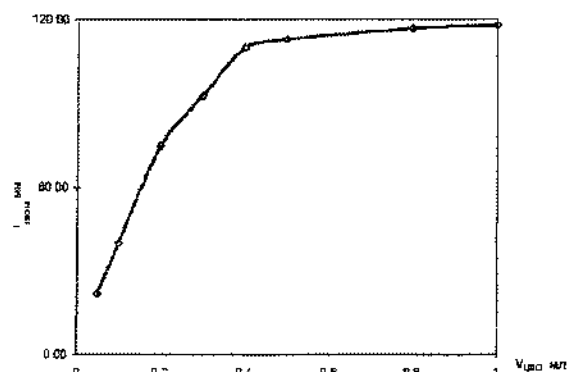
Чутливість способу, яка визначена за допомогою стандартних розчинів цефтриаксону, складає 0,02мкг/мл

Точність і достовірність визначення цефтриаксону у розчині перевірена шляхом статистичної обробки результатів визначення. При $n=5$, $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення 0,035 - 0,055

Таким чином, спосіб дозволяє підвищити чутливість визначення цефтриаксону в 10 разів



Фіг.1



Фіг.2