



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12806 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

### ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

#### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ НОРФЛОКСАЦИНУ В ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

1

2

(21) а200500670

(22) 25.01.2005

(24) 15.03.2006

(46) 15.03.2006, Бюл. № 3, 2006 р.

(72) Бельтюкова Світлана Вадимівна, Малинка Олена Валентинівна, Бойченко Валентина Дмитрівна, Теслюк Ольга Іванівна, Лівенцова Олена Олегівна

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення норфлораксацину в живильних середовищах, що передбачає відбір проби й взаємодію її з хімічним реагентом, який **відрізняється** тим, що пробу піддають взаємодії з ксерогелем, модифікованим іонами тербію в присутності тетрадецилсульфату натрію при рН=6,8-7,2, після чого ксерогель відокремлюють, опромінюють УФ-світлом, вимірюють інтенсивність люмінесценції іонів тербію, а вміст норфлораксацину визначають по калібрувальному графіку.

Корисна модель відноситься до аналізу живильних середовищ, які містять антибіотик фторхинолонового ряду - норфлораксацин.

Відомий спосіб визначення ципрофлораксацину в живильному середовищі бульйоні Mueller-Hinton методом рідинної хроматографії, що включає 4 стадії: введення зразка в колонку, попереднє виділення, елюювання у відходи біологічної матриці, введення аналіта в аналітичну колонку з наступним елююванням антибіотика і його флуориметричним детектуванням по власній люмінесценції [див. Ва В.В., Ducint D., Fourtillan M., Saux M.-C., J.Chromatogr.B. - 1998. - 714, №2 - с.317-324].

Однак, норфлораксацин, який відноситься до антибіотиків цього ж ряду, не є по реакційній здатності аналогом ципрофлораксацина і для визначення його запропонованим способом необхідно заново вибирати умови виділення й визначення даного препарату в живильних середовищах.

Описано визначення норфлораксацину в сироватці крові [див. Wallis S.C., Charles E.G., Gahan L.R., J.Chromatogr.B. - 1995. - 674, №2. с.306-309]. Методика передбачає попереднє виділення антибіотика й визначення методом високоефективної рідинної хроматографії. Це рішення найбільш близьке заявленого, тому що й сироватка крові, і живильні середовища містять білкові фракції.

Зі зразка сироватки крові (100мкл) екстрагують норфлораксацин за допомогою 1мл хлороформу, що містить внутрішній стандарт - N-етилнорфлораксацин. Органічну фазу відокремлюють центрифугуванням, потім випарюють досуха в струмені повітря при 60°C. Залишок розчиняють

в 200мкл рухомої фази (11% ацетонітрила в фосфатно-триетиламіновому буферному розчині з рН=2,5), 20мкл отриманої суміші інjektують у ВЕЖХ. В якості аналітичної використовують колонку (40×3,2мм), заповнену сорбентом (RP-18 Speri-3) зі сферичними частками діаметром 3мкм. Поділ проводили при температурі 30°C у потоці рухомої фази (див. вище). Використовують спектрофотометричний детектор з довжиною хвилі детектуванням  $\lambda=279\text{nm}$ . Межа виявлення становить 0,02мкг/мл.

Це рішення обране прототипом.

Спільним між прототипом і корисною моделлю, що заявляється, є наявність спільних ознак:

1) відбір проби;

2) взаємодія проби з реагентом.

Однак спосіб, по прототипу, передбачає попереднє екстракційне виділення норфлораксацину за допомогою хлороформу, випарювання розчинника, розчинення в рухомій фазі, що містить ацетонітрил й введення в хроматограф.

Тобто, в процесі виконання аналізу необхідно використовувати токсичні органічні розчинники - хлороформ і ацетонітрил, робота з якими в лабораторії небажана. Крім того, методика вимагає виділення антибіотика, використання специфічного сорбенту RP-18 Speri-3 і складного апаратурного оформлення (ВЕЖХ). Перераховане значно ускладнює процес визначення норфлораксацину.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб, в якому за рахунок більш ефективного відділення обумовленої речовини й введен-

(13) U

(11) 12806

(19) UA

ня хімічного реагенту забезпечити спрощення аналізу й зниження межі виявлення.

Поставлена задача вирішена в способі визначення норфлораксацину в живильних середовищах, що передбачає відбір проби і взаємодію її з хімічним реагентом тим, що пробу піддають взаємодії з ксерогелем, модифікованим іонами тербію в присутності тетрадецилсульфату натрію при pH=6,8-7,2, після чого ксерогель відокремлюють, опромінюють УФ-світлом, вимірюють інтенсивність люмінесценції іонів тербію, а вміст норфлораксацину визначають по калібрувальному графіку.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є використання ксерогелю, модифікованого іонами тербію (III) для окремлювання норфлораксацину від основи, поява сенсibilізованої люмінесценції іонів Tb (III) на твердій матриці, посиленої в присутності аніонної поверхнево-активної речовини - тетрадецилсульфату натрію, виключення з роботи токсичних розчинників - хлороформу й ацетонітрила.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, і досягненням технічного результату можна пояснити таким чином.

Спрощення виконання аналізу й зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам:

1) використанню ксерогелю, модифікованого іонами Tb (III), що дозволяє виключити стадію попереднього відокремлювання норфлораксацину органічним розчинником, відгін розчинника, тому що норфлораксацин сорбується на ксерогелі, й утворює з іонами Tb (III) комплексну сполуку на поверхні сорбенту, реєстрація аналітичного сигналу (інтенсивності люмінесценції) здійснюється безпосередньо з поверхні ксерогеля;

2) використання твердофазної сенсibilізованої люмінесценції іону Tb (III), посиленої в присутності поверхнево-активної речовини - тетрадецилсульфату натрію дозволяє знизити межу виявлення антибіотика.

Внутрішньомолекулярна передача енергії збудження від молекули органічного ліганду - норфлораксацину до іону Tb (III), закріпленого на поверхні ксерогелю, обумовлена тим, що норфлораксацин має в Уф-області спектра дві смуги поглинання з максимумами 210 і 286нм. Енергія триплетного рівня ліганду ( $21280\text{см}^{-1}$ ) значно вища енергії збудження  $^5\text{D}_4$  рівні тербію ( $20500\text{см}^{-1}$ ), що уможливило ефективне поглинання й наступну передачу світлового збудження іону Tb (III).

Застосування аніонної поверхнево-активної речовини (ПАР) тетрадецилсульфату натрію призводить до входження молекули ПАР у внутрішню сферу комплексу в якості другого ліганда, дегідратації комплексу й тим самим зниження безвипро-

мінювальних втрат енергії збудження, що призводить до збільшення інтенсивності люмінесценції іону Tb (III).

Вибір поверхнево-активної речовини й режимів сорбції проведений експериментально. Дослідження впливу різних ПАР на  $I_{\text{люм}}$  сорбата Tb (III) на ксерогелі показало, що додецил-, тридецил-, тетрадецил- і гексадецилсульфат натрію викликають збільшення  $I_{\text{люм}}$  Tb (III) в 186, 209, 235 і 181 разів, відповідно. Найбільше збільшення  $I_{\text{люм}}$  викликає тетрадецилсульфат натрію - 235 разів, тому він був обраний для подальшого визначення.

Оптимальна інтенсивність сорбата спостерігається при значеннях pH 6,2-7,2 (Фіг.1), що створювали надалі за допомогою уротропіну.

Для одержання найбільшої інтенсивності люмінесценції сорбата сорбцію проводити треба протягом 15хв. (Фіг.2).

Визначення норфлораксацину проводили на модельних розчинах.

У якості модельного був використаний м'ясопептонний бульйон, що містить віл м'ясного водного екстракту 10г пептону й 10г NaCl в який вводили різні кількості норфлораксацину. У попередніх дослідках було встановлено, що пептон у кількості 2-10мг, а NaCl у кількості 5-20мг не впливають на  $I_{\text{люм}}$  комплексу Tb (III) на ксерогелі.

#### Приклад 1

У хімічну склянку вміщують 60мг ксерогелю, модифікованого іонами Tb (III), додають 0,5мл бульйону з добавкою норфлораксацину у кількості 0,005мкг/мл. Додають 0,5мл тетрадецилсульфату натрію (0,01моль/л), 0,2мл 40%-ного розчину уротропіну й дистильовану воду до 5мл. Сорбцію проводять при перемішуванні протягом 15 хвилин. Потім сорбент відфільтровують, промивають дистильованою водою і висушують при температурі 95°C протягом 10хв. Інтенсивність люмінесценції сорбата Tb (III) вимірюють при 545нм. Вміст норфлораксацину у живильному середовищі визначають за калібрувальним графіком.

Знайдено 0,0051мкг/мл норфлораксацину. Величина стандартного відхилення  $Sr=0,07$ .

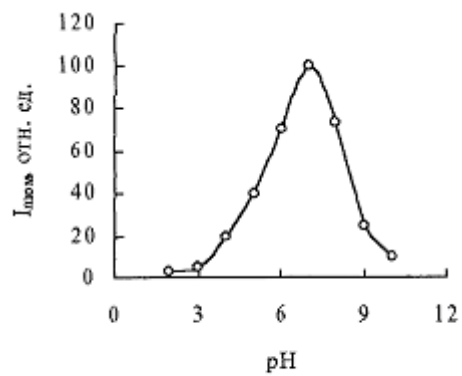
Приклади 2 і 3 здійснювали аналогічно прикладу 1. Результати наведені в таблиці.

Лінійна залежність  $I_{\text{люм}}$  Tb (III) від концентрації норфлораксацину в інтервалі концентрацій останнього 0,005-0,1мкг/мл. Точність і вірогідність визначення перевірена методом статистичної обробки результатів визначення. При  $n=5$  і  $P=0,95$  величина відносного стандартного відхилення ( $Sr$ ) становить 0,07. Межа виявлення норфлораксацину, розрахована за 3  $\delta$ -критерієм становить 0,0008мкг/мл.

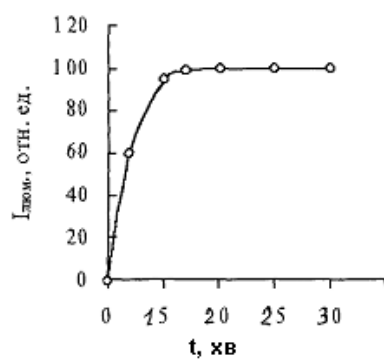
Таблиця

Результати визначення норфлораксацина в живильному (середовищі мкг/мл)

№№ прикладу	Уведено	Знайдено	Sr
1	0,005	0,0051	0,07
2	0,010	0,0105	0,07
3	0,020	0,019	0,06



Фиг.1



Фиг.2