



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78423** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/15 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 01911	(72) Винахідник(и):	Леоненко Інна Ігорівна (UA), Александрова Дар'я Ігорівна (UA), Єгорова Алла Володимирівна (UA), Антонович Валерій Павлович (UA), Українець Ігор Васильович (UA), Анельчик Ганна Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	20.02.2012	(73) Власник(и):	ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.03.2013		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2013, Бюл.№ 6		

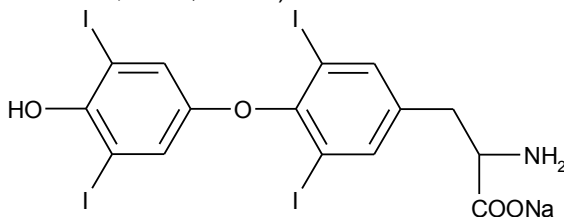
(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕВОТИРОКСИНУ НАТРІЮ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення левотироксину натрію передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчинами хлориду лантаніду і органічного реагенту-сенсibilізатора. Як реагент-сенсibilізатор використовують розчин 1-етил-4-гідроксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти-(4-метил-пірідин-2-іл)-аміду, як хлорид лантаніду використовують хлорид тербію при заданому рН, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину, за величиною якої визначають концентрацію левотироксину натрію.

UA 78423 U

Корисна модель належить до аналізу матеріалів, а саме до флуоресцентного визначення тиреоїдного гормону щитовидної залози - О-(4-Гідрокси-3,5-дйодфеніл)-3,5-дйод-L-тирози́ну натрію (левотироксину натрію; L-тир) (див. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М.: Новая волна, 2006, с. 548).



5

L-тир

Тиреоїдний гормон щитовидної залози - йодоване похідне амінокислоти тирозину - левотироксин натрію, необхідна складова всіх живих організмів, відіграє важливу роль у регулюванні процесів метаболізму, тому актуальна задача підвищення чутливості визначення L-тир завдяки застосуванню люмінесцентних зондів (органічних барвників, комплексів металів), люмінесценція котрих значно змінюється при взаємодії з L-тир (збільшується або гаситься).

10

Лантанідні комплекси широко вживають як люмінесцентні зонди для визначення органічних сполук (зокрема лікарських препаратів), нуклеїнових кислот та в імунофлуоресцентному аналізі. Люмінесценція у цих комплексах є результатом ефективної внутрішньомолекулярної передачі енергії від органічної частини молекули до іона лантаніду. Ефективність застосування таких комплексів як аналітичних форм в біоаналітичній хімії обумовлена їх вузькими емісійними смугами, можливістю усунення впливу біологічної матриці на аналітичний сигнал.

15

Відомий спосіб, який полягає у гасінні інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) органічного барвника - 7-гідроксикумарину при додаванні L-тир (див. Elmas Gök, Canan Oztiirk, Nuriye Akbay. Interaction of Thyroxine with 7 Hydroxycoumarin: A Fluorescence Quenching Study // J. Fluorescence. - 2008. - V. 18, № 5. - P. 781-785). Спосіб передбачає додавання компонентів у наступній послідовності: розчини 7-гідроксикумарину (5×10^{-7} моль/л); L-тир (0,4-3,0) моль/л, катіонного детергенту цетилтриметиламонію броміду (1×10^{-6} моль/л) та буферного розчину (рН = 7,4). Далі цю суміш залишають на 20 хвилин і потім реєструють $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{збвдж}} = 334$ нм та $\lambda_{\text{еміс}} = 464$ нм, межа виявлення $3,42 \times 10^{-8}$ моль/л.

25

Недоліками даного способу є: залежність люмінесцентного сигналу від часу реагування компонентів системи, у зв'язку з чим визначення $I_{\text{люм}}$ необхідно вести при фіксованому часі (20 хвилин), а також використання додаткового компоненту - поверхнево-активної речовини, що ускладнює аналіз.

30

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб люмінесцентного визначення L-тир (див. Elmas Gök, Serdar Ates. Fluorimetric Determination of Thyroxine Hormone with Eu(III)-(Pyridine-2,6-Dicarboxylate) Tris Complex // J. Fluorescence.-2003. - V. 13, №3. - P. 221-225), в якому до розчину хлориду європію ($1,0 \times 10^{-5}$ моль/л) додають розчин дипіколінової кислоти (ДПК) ($1,9 \times 10^{-5}$ моль/л), розчин L-тир (15,5-551,6 мкг/мл), піперазиновий буферний розчин рН=6,5, перемішують, залишають на 10 хвилин, записують люмінесценцію при $\lambda_{\text{збвдж}} = 282$ нм та $\lambda_{\text{еміс}} = 615$ нм. Інтенсивність люмінесценції комплексу європію з ДПК зменшується у 3,5 рази в присутності 300 мкг/мл L-тир (це максимальна концентрація з інтервалу лінійності). Межа кількісного визначення L-тир в цьому способі становить 15,5 мкг/мл.

35

Цей спосіб визначення L-тир застосовує гасіння люмінесценції зонду (комплексу європію з ДПК).

40

Даний спосіб обрано найближчим аналогом. Найближчий аналог та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

приготування проби;

взаємодія левотироксину натрію з розчином комплексу лантаніду з відповідним органічним реагентом при заданому рН водного середовища;

45

опромінювання утвореної потрійної системи УФ світлом.

вимірювання інтенсивності люмінесценції розчину у видимій області спектра.

Але спосіб за найближчим аналогом забезпечує межу кількісного визначення L-тир, яка дорівнює 15,5 мкг/мл. У способі за найближчим аналогом вживають сенсibilізовану люмінесценцію комплексу європію з ДПК. Молярний коефіцієнт поглинання дипіколінової кислоти при $\lambda = 270$ нм невеликий: $\varepsilon = 3,11 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹, у зв'язку з чим відсутнє ефективне поглинання енергії збудження, наслідком чого є низька інтенсивність люмінесценції комплексу. Відомо, що для створення методик визначення по гасінню люмінесценції зонду необхідно використовувати комплексні сполуки з високим квантовим виходом.

50

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу кількісного визначення левотироксину натрію за ефектом гасіння люмінесценції комплексної сполуки лантаніду, в якому за рахунок заміни реагентів (іону лантаніду та реагенту-сенсibilізатора), а також інших умов проведення реакції та режимів опромінювання і вимірювання люмінесценції тербію, забезпечується більш висока люмінесценція зонду, що призводить до підвищення чутливості визначення левотироксина натрію (гасника).

Поставлена задача вирішена в способі визначення левотироксину натрію, що передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчинами хлориду лантаніду і органічного реагента-сенсibilізатора при заданому рН, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину за величиною якої визначають концентрацію левотироксину натрію, згідно з корисною моделлю, як органічний реагент-сенсibilізатор використовують розчин 1-етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти-(4-метил-піридин-2-іл)-аміду, як хлорид лантаніду використовують хлорид тербію, їх взаємодію здійснюють при рН 7,0-8,0, опромінювання проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}} = 317 \text{ нм}$, а вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину здійснюють при $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є наявність наступних ознак:

як лантанід використовують тербій (III);
як органічний реагент використовують 1-етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти-(4-метил-піридин-2-іл)-амід;

опромінювання утвореної системи Tb(III)-L-L-тир УФ-світлом з $\lambda_{\text{збудж}} = 317 \text{ нм}$.

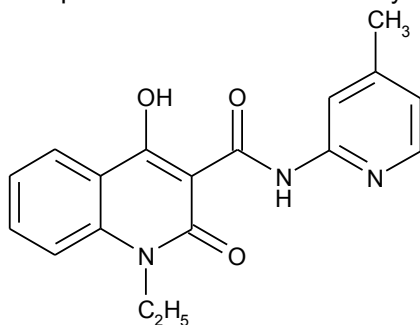
Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю суттєвих ознак, що заявляються, і технічним результатом, що досягається, полягає в наступному:

молярний коефіцієнт поглинання L приблизно в 15 разів більше, ніж у дипіколінової кислоти, що приводить до більш ефективного поглинання енергії збудження, наслідком чого є висока інтенсивність люмінесценції водного розчину комплексної сполуки тербію з наведеним органічним реагентом;

інтенсивність люмінесценції комплексу тербію з L зменшується у 8,5 разів в присутності 300 мкг/мл L-тир;

використання цього люмінесцентного зонда дозволяє знизити межу кількісного визначення L-тир у 3 рази.

Визначення стало можливим завдяки використанню нового люмінесцентного зонда - комплексу тербію з реагентом 1-етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти-(4-метил-піридин-2-іл)-амідом (див. І.В. Українець, С.А. Ель Каяль, О.В. Горохова, Л.В. Сидоренко. Синтез та протитуберкульозна активність метилзаміщених піридил-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот // Фарм. журн.-2004. - № 4. - С. 47-53). Це можна пояснити наступним. Органічний реагент належить до похідних 2-оксо-4-гідроксихінолінкарбонової кислоти і має таку структурну формулу:



L.

Обробка стандартного розчину солі тербію водним розчином реагенту L також, як і у випадку найближчого аналога, сенсibilізує люмінесценцію тербію. Цей реагент має в ультрафіолетовій області спектру смуги поглинання з високими молярними коефіцієнтами екстинкції ($\epsilon_{313} = 49000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), що обумовлює ефективне поглинання енергії збудження. Ця енергія передається з триплетного рівня ліганду ($E_T = 22220 \text{ см}^{-1}$) на енергетичний рівень Tb(III) ($E_{D4}^5 = 20500 \text{ см}^{-1}$), що призводить до значного зростання $I_{\text{люм}}$ тербію.

Взаємодія L-тир з люмінесцентним зондом - комплексом Tb(III)-L відбувається при рН 4,0-10,0, максимум люмінесценції спостерігається при рН 7,0-8,0 (див. Фіг. 1, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb-L-L-тир від рН розчину ($C_{\text{Tb(III)}} = C_L = 1 \times 10^{-6} \text{ моль/л}$; $C_{\text{L-тир}} = 100 \text{ мкг/мл}$)). У запропонованому способі для утворення оптимального рН середовища використовується 40 % уротропіновий розчин (рН=7.5).

Максимальний ефект гасіння спостерігається при співвідношенні Tb: L=1:1, оптимальна концентрація іонів Tb³⁺ та реагенту становить 1×10^{-5} моль/л. Необхідний час для реагування компонентів системи Tb(III)-L-L-тир та досягнення оптимального аналітичного сигналу становить 5 хвилин. Далі інтенсивність люмінесценції залишається постійною протягом 3 годин (див. Фіг. 2, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-b-b-тир від часу реагування компонентів ($C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C_{L-тир} = 100$ мкг/мл)). Гасіння $I_{\text{люм}}$ тербію в комплексі Tb(III)-L-L-тир спостерігається при опромінюванні утвореного комплексу УФ-світлом з $\lambda_{\text{збвдж}} = 317$ нм (див. Фіг. 3, де наведено спектри люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій L-тир ($C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C_{L-тир} = 5,0-300,0$ мкг/мл)). Інтенсивність люмінесценції тербію в системах Tb(III)-L-L-тир пропорційна концентрації L-тир в інтервалі - 5,0-300,0 мкг/мл (див. Фіг. 4, а, де наведено градувальний графік у координатах Штерна-Фольмера для визначення L-тир ($C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)). Залежність I_0/I від $C_{L-тир}$ (градувальний графік у координатах Штерна-Фольмера) у широкому інтервалі описується поліноміальним рівнянням другого порядку $I_0/I = A + B_1 C_{L-тир} + B_2 C_{L-тир}^2$, де A, B₁ і B₂ - емпіричні коефіцієнти. Для визначення можливо використовувати також модифіковану форму рівняння Штерна-Фольмера у координатах $\log(I_0/I)$ від концентрації L-тир (мкг/мл), яке являє лінійним (див. Фіг. 4, б, де наведено градувальний графік у модифікованих координатах Штерна-Фольмера для визначення L-тир ($C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)).

Також встановлено, що при додаванні різних концентрацій L-тир час життя збудженого стану іонів тербію не змінюється ($\tau = 1200$ мкс). Для прикладу наведені криві затухання люмінесценції комплексу Tb(III)-L у присутності різних концентрацій L-тир (див. Фіг. 5, де наведено криві затухання люмінесценції комплексу Tb(III)-L ($C_{Tb} = C_L = 1 \times 10^{-5}$ моль/л) у присутності різних концентрацій L-тир (мкг/мл): 1-0; 2-10,0; 3-30,0; 4-50,0; 5-100,0; 6-200,0).

Висунуто припущення щодо змішаного механізму гасіння: статичного, пов'язаного з утворенням системи Tb(III)-L-L-тир, та динамічного, обумовленого зіткненням молекул зонду та гасників у збудженому стані. При цьому спостерігається характерна в таких випадках особливість графіку Штерна-Фольмера - відхилення вгору та вгнутість по відношенню до осі ординат (див. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York:Plenum, 1986).

Приклад.

Визначення проводили на модельних розчинах шляхом введення відомої кількості L-тир (30,0 мкг/мл, 100,0 мкг/мл та 200,0 мкг/мл) в присутності хлоридів калію, натрію, кальцію, глюкози та L-аланіну. Кількісне визначення L-тир проводили за градувальним графіком.

Градувальник, графік будують наступним чином: у мірні колби місткістю 10 мл вносять по 0,05; 0,10; 0,30; 0,50; 0,60; 0,70; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00 мл робочого розчину L-тир (1000 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). В кожену колбу додають по 1,0 мл 1×10^{-4} моль/л розчину хлориду тербію, 1,0 мл 1×10^{-4} моль/л розчину L, 0,4 мл 40 %-ного розчину уротропіну. Доводять водою до 10,0 мл та перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, який містить усі компоненти, крім L-тир. Через 5 хв вимірюють інтенсивність люмінесценції за $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{збвдж}} = 317$ нм) у кожній точці (I) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (I_0).

За допомогою одержаних результатів будують градувальний графік залежності I_0/I від концентрації L-тир (мкг/мл) у координатах Штерна-Фольмера (див. Фіг. 4, а) в інтервалі концентрацій L-тир 5,0-300,0 мкг/мл.

Методика.

У мірні колби місткістю 10 мл вносять по 1,0 мл робочих розчинів хлоридів калію, натрію, кальцію та глюкози (1×10^{-1} моль/л); по 0,5 мл робочого розчину L- аланіну (1×10^{-4} моль/л), додають по 0,3; 1,0; 2,0 мл робочого розчину L-тир (1000 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). Далі додають усі реактиви та проводять вимірювання, як у випадку градувального графіка.

Таблиця

Сторонні речовини	Введено L-тир, мкг/мл	Знайдено L-тир, мкг/мл	S _r
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , глюкоза, L-аланін	30,0	30,2±1,6	0,042
	100,0	99,4±2,8	0,023
	200,0	202,1±3,8	0,015

$C_{\text{Me}}^{n+} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л; $C_{\text{Глюкоза}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л; $C_{\text{L-Аланін}} = 5 \times 10^{-6}$ моль/л.

Результати визначення L-тир в модельних розчинах представлено в таблиці. Точність і правильність визначення L-тир у розчинах перевірені методом "введено - знайдено". При n=5;

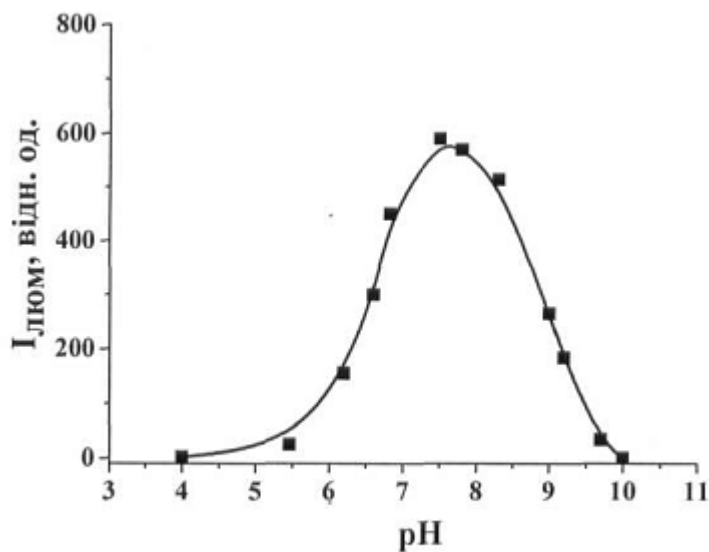
$R=0,95$ відносно стандартне відхилення (s_r) складає 0,015-0,042. Таким чином, спосіб дозволяє підвищити чутливість визначення L-тир в 3 рази.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

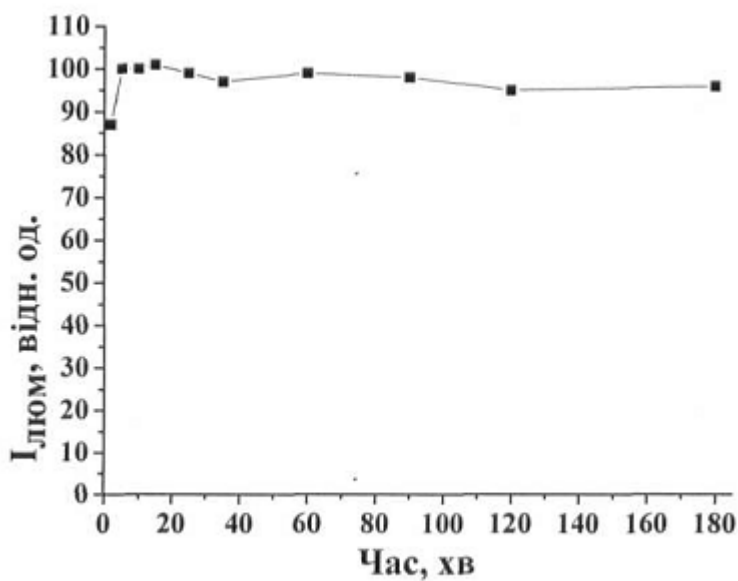
5

Спосіб кількісного визначення левотироксину натрію, що передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчинами хлориду лантаніду і органічного реагенту-сенсibilізатора при заданому рН, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину, за величиною якої визначають концентрацію левотироксину натрію, який **відрізняється** тим, що як органічний реагент-сенсibilізатор використовують розчин 1-етил-4-гідроксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти-(4-метил-піридин-2-іл)-аміду, як хлорид лантаніду використовують хлорид тербію, їх взаємодію здійснюють при рН 7,0-8,0, опромінювання проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}} = 317$ нм, а вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину здійснюють при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм.

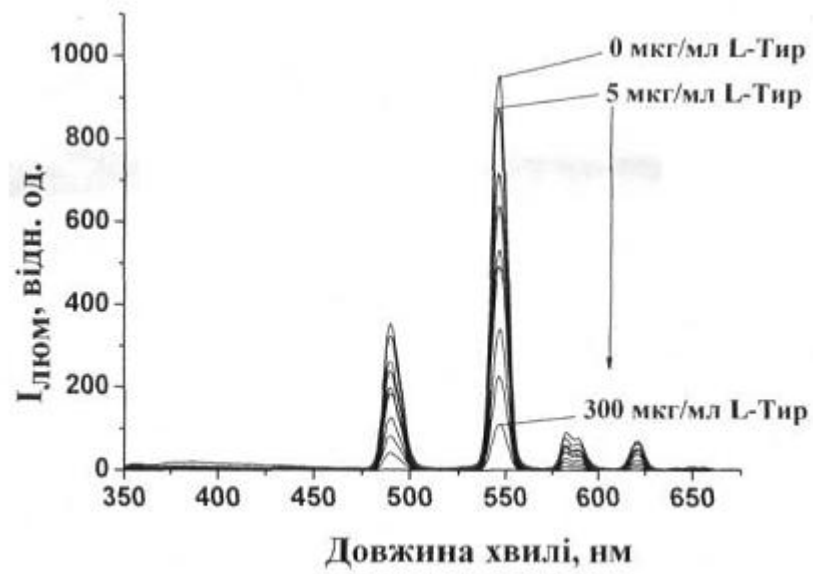
10



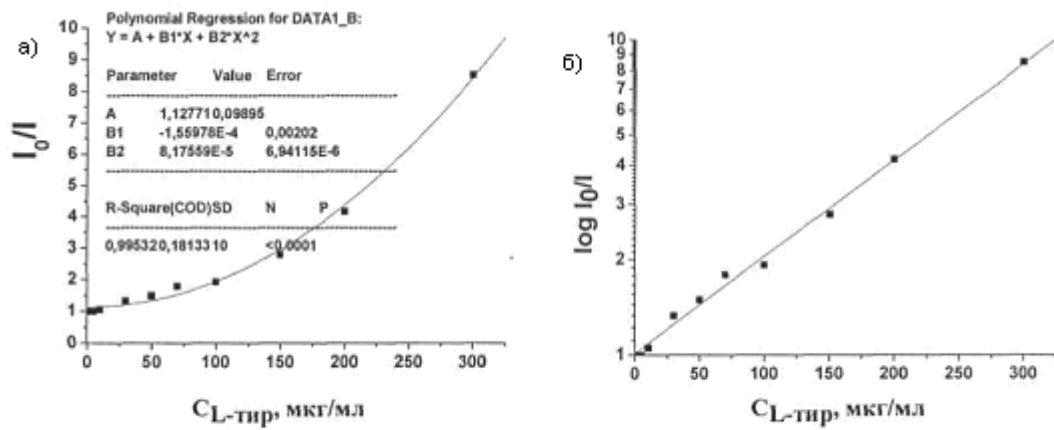
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

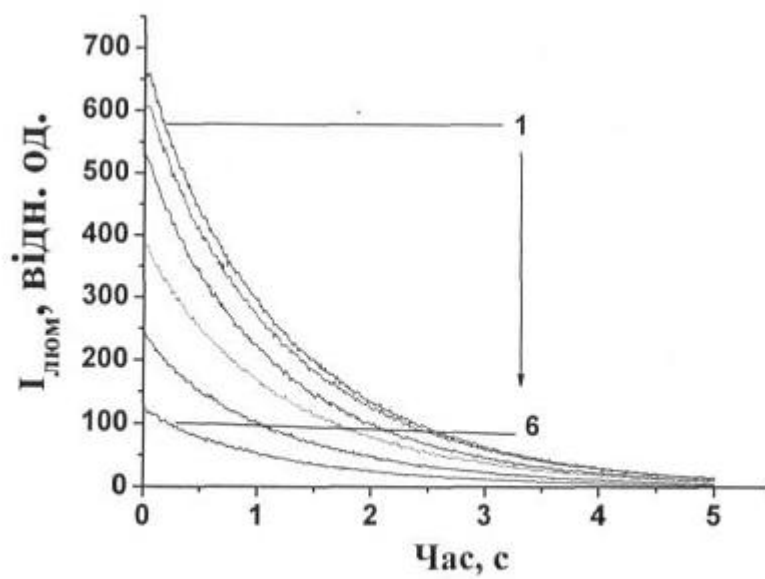


Fig. 5

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601