

УДК 543. 554.6

DOI: 10.21779/2542-0321-2022-37-2-79-87

С.Д. Татаева¹, А.К. Абдурахманова¹, К.Э. Магомедов^{1, 2}

Разработка левофлоксацин-селективного электрода для целей медицинской диагностики

¹ Дагестанский государственный университет; Россия, 367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; anchemist@yandex.ru;

² Балтийский федеральный университет им. И. Канта, НОЦ «Умные материалы и биомедицинские приложения», Россия; 236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14

Показана возможность определения левофлоксацина в крови с применением в качестве электродноактивного компонента мембранны левофлоксацина совместно с тетрафенилборатом. Изучены кислотно-основные свойства левофлоксацина (ЛФС). Анализ спектров левофлоксацина, тетрафенилбората натрия (ТФБNa) и ионного ассоциата на их основе свидетельствовал об образовании нового соединения. Электродноактивный компонент (ЭАК) в фазе мембранны функционирует в виде ионного ассоциата с соотношением 2:1, $(\text{ТФБ})_2^- \cdot \text{ЛФС}^{2+}$. Состав мембранны (масс. %) левофлоксацин-селективного электрода (ЛФС–СЭ) соответствовал $\text{ЛФС}^{2+} \cdot (\text{ТФБ})_2^-$ (1.5), диоктилсебацинат (66.3), поливинилхлорид (31.7), тетрафенилборат натрия (0.5). Потенциометрические характеристики ЛФС–СЭ: линейный диапазон определяемых концентраций $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$, тангенс угла наклона электродной функции 26,9 мВ/дек., интервал pH 1–4, время отклика электрода 20 сек, предел обнаружения 0,44 мкг/мл. Определены потенциометрические коэффициенты селективности ЛФС–СЭ по отношению к некоторым ионам. Важнейшие неорганические катионы и анионы, а также некоторые представители фторхинолоновых антибиотиков не мешают определению левофлоксацина. Разработанный электрод апробирован в научно-медицинских учреждениях для контроля содержания левофлоксацина в некоторых жидкостях человека.

Ключевые слова: ионометрия, мембрана, электрод, поливинилхлорид, левофлоксацин, тетрафенилборат, диоктилсебацинат, электродные характеристики, определение.

Введение

Полугидрат левофлоксацина (ЛФС) C36H42F2N6O9 (CAS № 138199-71-0) представляет собой полупрозрачный порошок без запаха от белого до желтого цвета, умеренно растворимый в воде и метаноле, имеющий мол. вес. 740,7 г/моль [1]. ЛФС представляет собой L-изомер офтлоксацина, синтетических фторхинолонов второго поколения, называемых респираторными хинолонами и проявляет бактерицидную эффективность широкого спектра действия в отношении грамположительных и грамотрицательных аэробов, причем более заметное – в отношении грамположительных микробов и меньшее действие в отношении грамотрицательных микроорганизмов. ЛФС препятствует сверхспиральному движению бактериальной ДНК-гиразы и топоизомеразы – II и IV, основных белков в размножении бактериальной ДНК, что приводит к остановке репликации ДНК. Топоизомераза IV необходима для отделения ДНК, которая была имитирована до деления бактериальной клетки. Бактерии не могут делиться из-за прерванного цикла клеточного деления, учитывая, что ДНК не разделяется. Сверхспирализация ДНК вызывается ДНК-гиразой, она будет соответствовать только что сформированным клеткам. Указан-

ные механизмы отвечают за уничтожение бактерий. ЛФС применяется для лечения инфекций дыхательных путей, конъюнктивита, инфекций мочевыводящих путей, острого бактериального синусита, хронического бронхита, хронического простатита, мастита, внебольничной и нозокомиальной пневмонии, абдоминальных инфекций, гастроэнтерита, местных инфекций и острого пиелонефрита [2]. Это основной препарат для лечения туберкулеза с лекарственной устойчивостью ко многим антибиотикам [3]. Он также используется для лечения непреодолимого жидкого стула, вызванного микроорганизмами *E. coli*, *Campylobacter jejuni* и *Shigella*.

Методы определения лекарственного препарата

Обзор литературы представляет широкий спектр методов определения левофлоксацина, в частности, спектрофотометрические методы в ультрафиолетовой области спектра [4–6], различные виды высокоэффективной жидкостной хроматографии [7–13], спектрофлуориметрические методы [14], адсорбционная прямоугольная анодно-инверсионная вольт-амперометрия [15], хемиллюминесценция [16], кондуктометрия, потенциометрия [17], которые являются дорогостоящими, длительными и громоздкими в осуществлении и требуют применения методов разделения, высоких температур, большого количества реагентов и растворов. Методика определения антибиотиков приведена в Британской фармакопее [18].

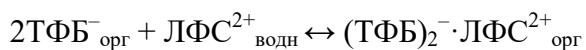
Все эти методы менее эффективны, отличаются высокой стоимостью, длительностью осуществления и применением дорогих реагентов. Очевидно, ионометрия из-за простоты, экономической эффективности, селективности, точности остается альтернативой спектрофотометрическим и хроматографическим методам исследования лекарств. Таким образом, возникает необходимость создать сенсор для надежного и точного определения ЛФС. Настоящее исследование было посвящено разработке простого, быстрого, точного, экономичного и надежного ионометрического определения ЛФС в комбинированных лекарственных препаратах.

Цели работы: изготовление ИСЭ на основе левофлоксацина, изучение основных электрохимических характеристик электрода и применение для анализа.

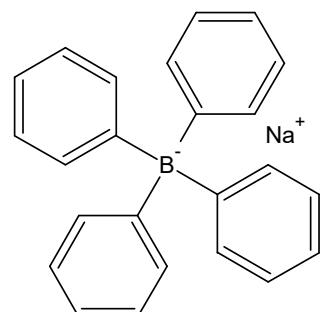
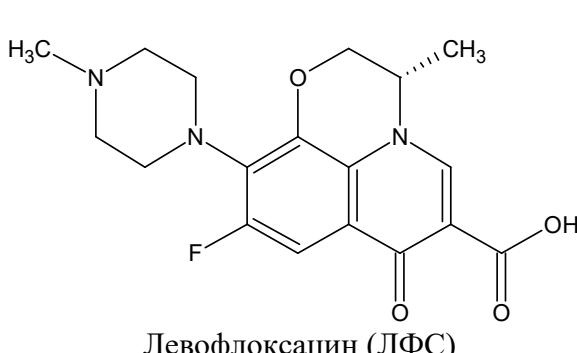
Для их достижения необходимо: выбрать в качестве электродноактивного компонента (ЭАК) липофильный анион тетрафенилбората натрия (ТФБNa) и липофильного катиона ЛФС для состава мембранных левофлоксацин-селективного электрода (ЛФС–СЭ); определить потенциометрические характеристики ЛФС–СЭ; установить возможность применения ЛФС–СЭ биожидкостях.

Экспериментальная часть

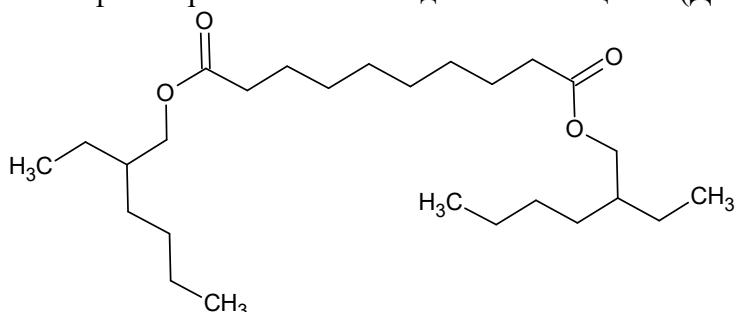
ЭАК растворили в пластификаторе – диоктилсебацинате (ДОС), после чего в смесь добавили поливинилхлорид (ПВХ) (в соотношении 1:3 ПВХ:ДОС). Полученную смесь растворили в циклогексаноне и перемешивали до полной гомогенизации раствора. Полученную мембранный композицию залили в кольца из боросиликатного стекла диаметром 24 мм и 28 мм и оставили до полного испарения растворителя. Из пленок вырезали мембранные диски и kleili на ПВХ-трубки. Электроды кондиционировали в течение 48 часов в $1 \cdot 10^{-2}$ М растворе левофлоксацина. Чистый осадок (ионный ассоциат – ИА) в качестве ЭАК использовали для получения мембран. Ниже представлено уравнение ионного обмена:



В качестве электродноактивного компонента (ионофор) использовали левофлоксацин (ЛФС) и тетрафенилборат натрия (ТФБNa):



В качестве пластификатора использовали диоктилсебацинат (ДОС):



Синтез ионного ассоциата: 25 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора левофлоксацина довели до pH 1,57 0,1 М соляной кислотой и гидроксидом натрия. В стакан емкостью 100 мл налили раствор такой же концентрации тетрафенилбората натрия объемом 50 мл, приготовленного в соответствии с точной массой навески. Выпавший желтовато-белый осадок растворили в ацетоне, затем залили дистиллированной водой до образования муты. Осадок отфильтровали, в течение 4–5 часов выпаривали влагу в сушильном шкафу при температуре 40–50 °C. Конечный продукт представлял собой желтовато-белый порошок, не растворимый в воде, но растворимый в ацетоне. Предположительная формула ЭАК – (ЛФС)([$\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$])₂

Мембранны ЛФС-селективного электрода готовили, используя в качестве пластификатора диоктилсебацинат (ДОС) и растворителя – тетрагидрофуран (ТГФ) по методике [19; 20].

Для оптимизации мембранных композиций ЛФС-селективного электрода (ЛФС-СЭ) варьировали массовые доли компонентов мембранны.

Состав мембран с масс. % компонентов приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав мембран и их потенциометрические характеристики

№ мембранны	ω , (масс. %)				Потенциометрические характеристики			
	ЛФС	ДОС	ПВХ	НаТФБ	Крутизна, мВ/декада	Линейный диапазон, М	Время отклика, с	Диапазон рН
1.	0,5	66,3	32,7	0,5	$23,1 \pm 0,1$	$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$	25 ± 5	1,3–6,3
2.	1	66,3	32,2	0,5	$24,6 \pm 0,2$	$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$	30 ± 5	1,3–2,3
3.	1,5	66,3	31,7	0,5	$26,9 \pm 0,2$	$5 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$	20 ± 5	1,0–5,0
4.	2	66,3	31,2	0,5	$24,1 \pm 0,3$	$1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-5}$	25 ± 5	3,3–4,3

Мембрана с составом масс. %: $(\text{ТФБ})_2^-\cdot\text{ЛФС}^{2+}$ (1.5), ДОС (66.3), ПВХ (31.7), NaTФB (0.5) имела крутизну электродной функции, близкую к теоретической для двухзарядного иона 26.9 мВ/дек.

Обсуждение результатов

Сняты электронные спектры электродноактивных компонентов левофлоксацина, тетрафенилбората натрия, а также ионного ассоциата для подтверждения факта образования нового соединения $(\text{ТФБ})_2^-\cdot\text{ЛФС}^{2+}$ (рис. 1).

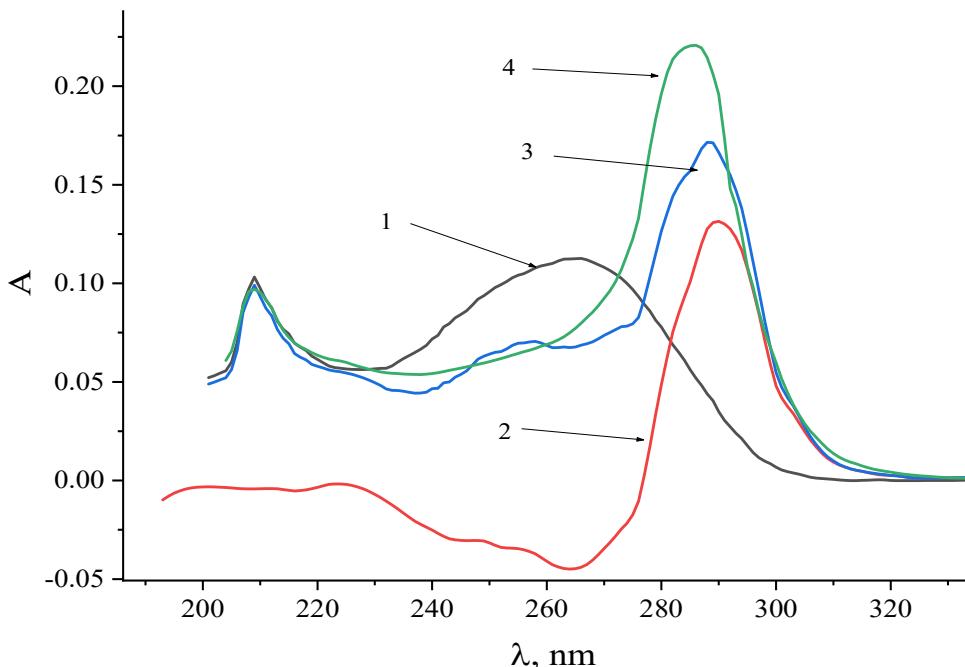


Рис. 1. Спектры светопоглощения компонентов мембраны соответственно с концентрациями $1\cdot10^{-5}$ М. 1 – NaTФB , 2 – ЛФС, 3 – теоретическая кривая, 4 – $(\text{ТФБ})_2^-\cdot\text{ЛФС}^{2+}$ (соотношение 2:1)

Спектры поглощения ИА батохромно смешены относительно ТФБ и гипсохромно относительно ЛФС с гиперхромным эффектом. Исследования проводили применяя в качестве ИА $(\text{ТФБ})_2^-\cdot\text{ЛФС}^{2+}$.

Изучены диаграммы зависимостей мольной доли левофлоксацина от pH (рис. 2). Установлена зависимость коэффициента распределения левофлоксацина в октаноле-1 от кислотности раствора (рис. 3).

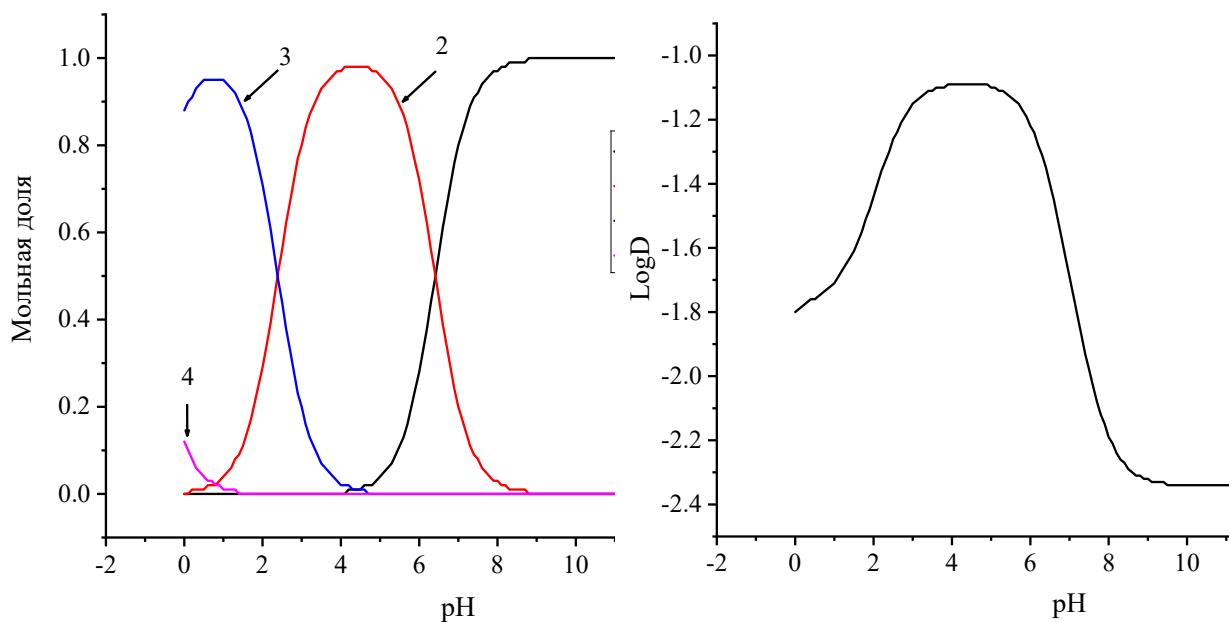


Рис. 2. Влияние рН на мольную долю протонированных частиц ЛФС

Рис. 3. Зависимость коэффициента распределения ЛФС между водой и октиловым спиртом от кислотности

При рН 0–1 ЛФС находится в виде ионов двухзарядных ионов LFC^{2+} , при рН 1–4 – LFC^+ , учитывая, что полуэмпирические методы расчёта могут расходиться с экспериментальными данными.

Из рис. 3 видно, что при рН 3–5 ЛФС имеет максимальную экстракцию октанолом, так как ЛФС имеет нейтральный заряд. Таким образом, рабочий диапазон рН 1–4 ЛФС–СЭ. Определена крутизна электродной функции ЛФС–СЭ (рис. 4).

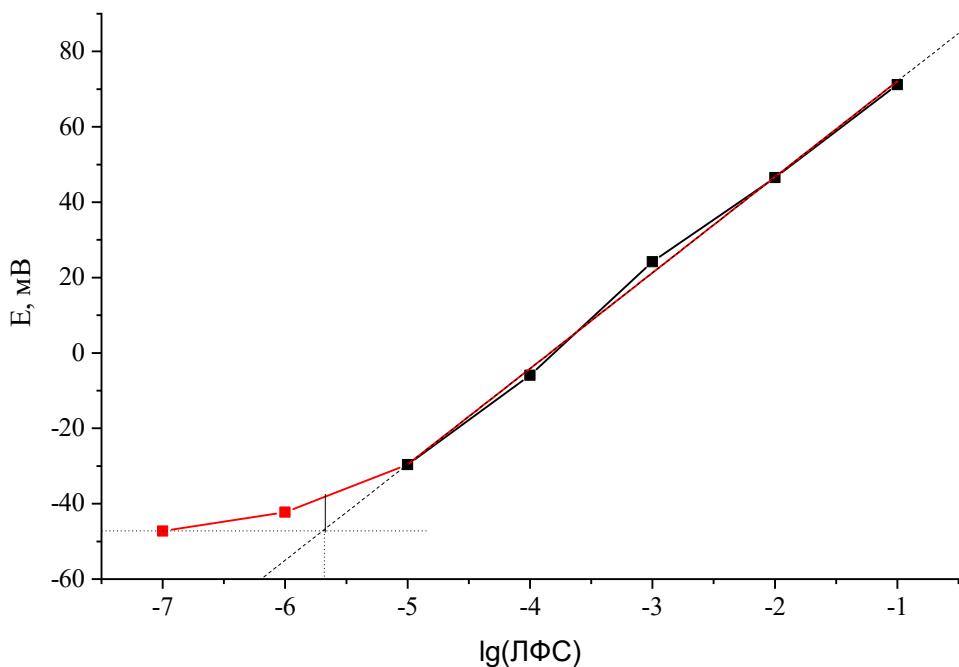


Рис. 4. Градуировочный график для определения содержания левофлоксацина

Крутизна электродной функции составила 26.9 мВ/дек., а предел обнаружения – $2.1 \cdot 10^{-6}$ М (0.8 мг/л).

Методом раздельных растворов (табл. 2) исследована селективность ЛФС–СЭ на основе ИА к важнейшим неорганическим ионам, а также антибиотикам фторхинолонового ряда. Они не оказали существенного влияния на определение левофлоксацина.

Таблица 2. Селективность ЛФС – СЭ по отношению к ионам

LgK _{Sel}		Fe ³⁺	Mg ²⁺	Sr ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Cu ²⁺	K ⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
I	– 1,6	– 1.7	– 2.9	– 3,0	– 1.7	– 0.5	– 0.2	– 2.1	– 1.1	
	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻	NO ₃ ⁻	Br ⁻	IO ₄ ⁻	CrO ₄ ²⁻	SCN ⁻	Г	Моксифлоксацин	
II	– 2.6	– 2.5	– 2.5	– 2.6	– 1.3	– 2.4	– 2	– 1.9	– 0.8	

Методика ионометрического определения ЛФС в сыворотке крови проверена анализом здорового человека с внесенными добавками ЛФС инфекционного больного. Кровь (4–5 мл), выдерживали в течение 30 минут без стабилизатора при температуре 20–22 °С, затем для отделения форменных элементов центрифугировали. Результаты определения ЛФС в сыворотке больного характеризовались параметрами, аналогичными крови здорового человека. Правильность результатов определения левофлоксацина контролировали применением метода добавок по формуле

$$C_x = C_{\text{ст}} \frac{V_{\text{ст}}}{V_x + V_{\text{ст}}} [10^{\Delta E/S} - \frac{V_x}{V_x + V_{\text{ст}}}]^{-1}.$$

Результаты определения ЛФС в плазме крови больного человека методом добавок приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты определения левофлоксацина в плазме крови больного

Период/время (сут/час) приема левофлоксацина	Время отбора проб крови, час	Введено ЛФС, мкг/мл	Найдено ЛФС в плазме крови (мкг/мл)
Первые/8:00	11:00	–	0.81 ± 0.05
	14:00	–	0.67 ± 0.06
	17:00	0.50	0.62 ± 0.02
	19:00	0.50	0.58 ± 0.03
	20:00	0.50	0.54 ± 0.01
	21:30	0.50	0.49 ± 0,01
Вторые/8:00	11:00	–	0.78 ± 0,05
	15:00	–	0.65 ± 0,06
	17:30	0.50	0.60 ± 0,04
Третий /8:00	10:00	–	0.93 ± 0.02

Заключение

Таким образом разработанный сенсор на основе левофлоксацина обеспечивает широкий диапазон определяемых концентраций антибиотика с пределом обнаружения 0.8 мг/л и расширяет возможности экспрессного анализа биологических жидкостей.

Литература

1. WHO, Revision of the monograph on levofloxacin hemihydrate draft proposal for The International Pharmacopoeia. – World Health Organization, Working document QAS/17.717/Rev1 2019.
2. Drugbank online, Chemical structure search. – URL: https://go.drugbank.com/structures/search/small_molecule_drugs/structure (accessed on 20th April 2022).
3. Ghimire S., Maharjan B., Jongedijk E.M., etc. Evaluation of saliva as a potential alternative sampling matrix for therapeutic drug monitoring of levofloxacin in patients with multidrug-resistant tuberculosis // Antimicrob Agents Chemother. 2019. Vol. 63. – P. e02379-18. – URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.02379-18>.
4. El-Yazbi A.F., Khamis E.F., Youssef R.M. etc. Green analytical methods for simultaneous determination of compounds having relatively disparate absorbance; application to antibiotic formulation of azithromycin and levofloxacin // Heliyon. 2020. Vol. 6. – P. e04819. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04819>.
5. Wang Q., Wang, G., Xie S., Zhao X., Zhang Y. Comparison of high-performance liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry to determine the best method to assess Levofloxacin released from mesoporous silica microspheres/nano-hydroxyapatite composite scaffolds // Experimental Therapeutic Medicine. 2019. Vol. 17. – P. 2694–2702. – URL: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7238>.
6. Alffenaar J.W.C., Jongedijk E.M., Winkel C.A.J., etc A mobile microvolume UV/visible light spectrophotometer for the measurement of levofloxacin in saliva // J. Antimicrob. Chemother. 2021. Vol. 76. – P. 423–429. – URL: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa420>.
7. Babu N.P., Ramachandran R.D., Bhavani K.G. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for quantitative estimation of levofloxacin injection 5mg/ml dosage form // Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 2020. Vol. 15. – P. 51–61. – URL: <https://doi.org/10.5530/ctbp.2021.1.6>.
8. Goswami J.A., Shah N.J. Stability indicating RP-HPLC method for combination of ambroxol hydrochloride and levofloxacin hemihydrate in pharmaceutical formulation // Int. J. Pharma Sci Res. 2019. Vol. 10. – P. 356–362. – URL: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(1\).356-362](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).356-362).
9. Yildirim S., Karakoc H.N., Yasar A., Koksal I. Determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin in urine and plasma by HPLC–FLD–DAD using pentafluorophenyl core–shell column: Application to drug monitoring // Biomed. Chromatogr. 2020. Vol. 34. – P. e4925. – URL: <https://doi.org/10.1002/bmc.4925>.
10. Czyrski A., Anusiak K., Tezyk A. The degradation of levofloxacin in infusions exposed to daylight with an identification of a degradation product with HPLC-MS // Sci Rep. 2019. Vol. 9. – P. 3621. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40201-9>.
11. Ghimire S., Jongedijk E.M., Elsen S.H.J., etc. Cross-validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of levofloxacin in saliva // J. Appl. Bioanal. 2020. Vol. 6. – P. 68–70. – URL: <https://doi.org/10.17145/jab.20.008>.

12. *Pooja M., Sowmya H.G., Jose G.C.* RP-UFLC method development and validation for simultaneous estimation of levofloxacin in bulk and tablet // *Int. J. Pharm Biomed Eng.* 2019. Vol. 6. – P. 46–53. – URL: <https://doi.org/10.14445/23942576/ijpbe-v6i1p107>.
13. *Lopis B.L., Funck-Brentano C., Tissot N., etc.* Development and validation of a UPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and rifampicin in human plasma: Application to the therapeutic drug monitoring in osteoarticular infections // *J. Pharma Biomed. Anal.* 2020. Vol. 183. – P. 113137. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113137>.
14. *El-Hamshary M.S., Fouad M.A., Hanafi R.S., etc.* Screening and optimization of samarium-assisted complexation for the determination of norfloxacin, levofloxacin and lomefloxacin in their corresponding dosage forms employing spectrofluorimetry // *Spectrochim. Acta A.* 2019. Vol. 206. – P. 578–587. – <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.053>.
15. *Ghanbari M.H., Shahdost-fard F., Khoshroo A., etc.* A nanocomposite consisting of reduced graphene oxide and electropolymerized β-cyclodextrin for voltammetric sensing of levofloxacin // *Microchim. Acta.* 2019. Vol. 186. – P. 438. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3530-6>.
16. *Ahmed S., Ning J., Peng D., etc.* Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review // *Food Agric Immunol.* 2020. Vol. 31. – P. 268–290. – URL: <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171>.
17. *Ibrahim F., El-Adl S.M., Baraka M.M., etc.* Analytical methods for the determination of certain antibiotics used in critically ill patients // *J. Pharma Biopharm. Res.* 2020. Vol. 2. – P. 99–117. – URL: <https://doi.org/10.25082/JPBR.2020.01.002>.
18. British Pharmacopoeia 98/34/EEC. HMSO Publication, The Department of Health, Social Services and Public Safety, The Stationery Office Ltd. – London, Published online, 2005.
19. *Tataeva S.D., Magomedov K.E., Zeynalov R.Z., etc.* The Ionic Associate of Metamizole as an Electrode-Active Component of a PVC Plasticized Membrane Electrode // *Chemosensors.* 2022. Vol. 10. – P. 17.
20. *Магомедов К.Э., Татаева С.Д., Горячая В.С.* Потенциометрический сенсор на ионы кадмия (II) // Вестник Дагестанского государственного университета. 2013. Вып. 6. – С. 210–214.

Поступила в редакцию 22 марта 2022 г.

UDK 543. 554.6

DOI: 10.21779/2542-0321-2022-37-2-79-87

Development of a Levofloxacin-selective Electrode for the Purposes of Medical Diagnostics

S.D. Tataeva¹, A.K. Abdurakhmanova¹, K.E. Magomedov^{1, 2}

¹ Dagestan State University; Russia, 367000, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a;
anchemist@yandex.ru;

² Immanuel Kant Baltic Federal University, REC “Smart Materials and Biomedical Applications”; Aleksandr Nevskij st., 14, Kaliningrad, 236041, Russia

The possibility of determining levofloxacin in the blood using levofloxacin together with tetraphenylborate as an electrode active component of the membrane was shown. The acid-base properties of levofloxacin (LFS) have been studied. The analysis of the spectra of levofloxacin, sodium tetraphenylborate (TPBNa), and their ionic associate indicated the formation of a new compound. The electrode active component (EAC) in the membrane phase functions as an ionic associate with a ratio of 2:1, $(\text{TPB})_2^-\cdot\text{LPS}^{2+}$. The composition of the membrane (wt. %) of the levofloxacin-selective electrode (LFS-SE) corresponded to $\text{LFS}^{2+}\cdot(\text{TFB})_2^-$ (1.5), dioctyl sebacate (66.3), polyvinyl chloride (31.7), sodium tetraphenylborate (0.5). The potentiometric characteristics of LFS-SE: linear range of determined concentrations $1\cdot10^{-1}-1\cdot10^{-5}$, slope of the electrode function 26.9 mV/dec., pH range 1–4, electrode response time 20 sec, limit of detection 0.44 µg/ml. The potentiometric selectivity coefficients of LFS-SE with respect to some ions have been determined. The most important inorganic cations and anions, as well as some representatives of fluoroquinolone antibiotics, do not interfere with the determination of levofloxacin. The developed electrode was tested in scientific and medical institutions to control the content of levofloxacin in some human fluids.

Keywords: ionometry, membrane, electrode, polyvinyl chloride, levofloxacin, tetraphenylborate, dioctyl sebacate, electrode characteristics, determination.

Received 22 March 2022