

УДК 543.05

*І.В. Кущенко, М.Ф. Зуй***ДИСПЕРСІЙНА РІДИННА МІКРОЕКСТРАКЦІЯ ФТОРХІНОЛОНІВ****Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна**

Стаття присвячена розробці сучасного метода пробопідготовки – дисперсійної рідинної мікроекстракції для визначення лікарських засобів фторхінолонів в водних матрицях методом високоефективної рідинної хроматографії. В роботі проведена оптимізація дисперсійної мікроекстракції і визначені оптимальні параметри: 5 мл водного розчину; 70 мкл хлороформу; 500 мкл ізо-пропанолу; час екстракції 5 хв; час центрифугування 5 хв; рН 7,0–9,0. Інтервал визначення становить 4,0–100 мкг/мл, межа виявлення за 3s-критерієм не перевищує 1,5 мкг/мл для норфлоксацину, ципрофлоксацину і енрофлоксацину. Розроблена методика мікроекстракції і визначення фторхінолонів високоефективною рідинною хроматографією перевірена методом стандартних добавок на зразках мінеральної води «Моршинська» і «Миргородська». Перевагами методики є простота, експресність, хороша прецизійність отриманих результатів, відносно стандартне відхилення не перевищує 2%.

**Ключові слова:** фторхінолони, дисперсійна рідинна мікроекстракція, високоефективна рідинна хроматографія, аналіз води.

**DOI:** 10.32434/0321-4095-2023-147-2-90-98

**Вступ**

Відомо, що фторхінолони – це група лікарських засобів, що широко застосовуються впродовж останніх двох десятиліть в медицині і ветеринарії як антибактеріальні препарати широкого спектра дії. Перевагами цього класу лікарських засобів є можливість застосування як ззовні, так і внутрішньо, широкий спектр антибактеріальної активності, хороша проникність, поліпшені фармакокінетичні властивості, стабільність і порівняно низька токсичність, а також низька ціна.

Фторхінолони за їх структурою поділяють на препарати першого покоління (пєфлоксацин, офлоксацин,), другого покоління (лємефлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин), третього покоління (лєвофлоксацин, спарфлоксацин) і четвертого покоління (моксифлоксацин, геміфлоксацин, сїтафлоксацин, трєвафлоксацин та інші) [1].

Дані лікарські засоби активні щодо більшості грам-негативних бактерій: синьогнійної, гемофільної та кишкової палички, холерних вібріонів, шигел, сальмонел, менінгококів,

гонококів. Вони також активні за відношенням до кампілобактерій, лєгіонелли, мікоплазм і хламідій, і до деяких грам-позитивних бактерій: деяких різновидів пневмококів і багатьох штамів стафілококів. Фторхінолони не діють на анаеробні бактерії. Багато фторхінолонів (офлоксацин, ципрофлоксацин) ефективно відносно мікобактерій туберкульозу. Висока бактерицидна активність фторхінолонів дозволила розробити для багатьох з них лікарські форми для місцевого застосування [2].

Фторхінолони є похідними 4-хінолону і мають в своєму складі в 3-му положенні карбоксильний залишок, в 6-му положенні – атом фтору, в 7-му положенні піперазиновий цикл. Їх загальна формула, а також структура норфлоксацину і ципрофлоксацину надані на схемі 1.

Оскільки при споживанні м'ясо-молочної продукції фторхінолони потрапляють в організм людини, можливе виникнення резистентності у людей до цієї групи антибіотиків. Для зменшення впливу фторхінолонів Федеральним Управлінням з лікарських засобів США (Federal Drug Administration USA, FDA) та Європейським цен-

© І.В. Кущенко, М.Ф. Зуй, 2023



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*I.V. Kushchenko, M.F. Zui*

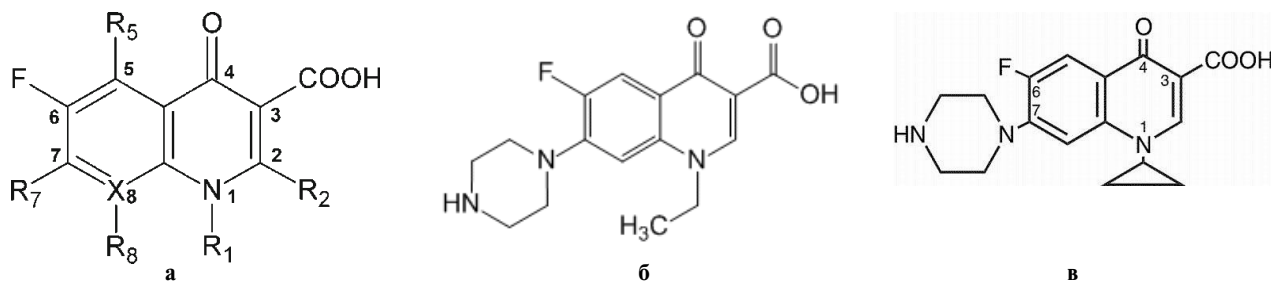


Схема 1. Загальна структура фторхінолонів а, структура норфлораксацину б, ципрофлораксацину в

тром із запобігання хвороб і контролю (European Centre for Disease Prevention and Control) було обмежено використання фторхінолонів при вирощуванні тварин м'ясо-молочного напрямку [3]. Для контролю вмісту фторхінолонів в біологічних рідинах, в питній воді і м'ясо-молочній продукції необхідні високоефективні методи прободготовки і чутливі методи визначення, оскільки кількості даних лікарських засобів при потраплянні в харчові продукти і воду є малими. Тому задача розробки сучасних високоефективних, високочутливих і селективних, простих і недорогих методів прободготовки і визначення фторхінолонів у воді і харчових продуктах є актуальною.

Одними з найбільш поширених фторхінолонів другого покоління є ципрофлораксацин, норфлораксацин і енрофлораксацин. В табл. 1 наведені деякі параметри даних фторхінолонів. Як видно, ці фторхінолони мають невисоку розчинність у воді, є слабкополярними, мають властивості слабких кислот. Фторхінолони швидко засвоюються організмом, легко метаболізують і швидко виводяться [3].

Фторхінолони мають одну або дві функціональні групи, які здатні до іонізації: карбоксильну групу ( $pK_{a1}$  в діапазоні 5.0–6.5) і аміногрупу в 4-му положенні піперазинового кільця ( $pK_{a2}$  в діапазоні 7,0–8,5). При значеннях рН між  $pK_{a1}$  і  $pK_{a2}$  (між рН 3 і 11) фторхінолони знаходяться у формі цвіттеріонів через наявність карбоксильної групи в 3-положенні і основного піперазинового кільця в 7-положенні. Дані функціональні групи обумовлюють певну розчинність фторхінолонів в кислому та лужному середовищі. При  $pH < pK_{a1}$  фторхінолони існують в формі катіонів за рахунок протонування аміногруп. При  $pH > pK_{a2}$  фторхінолони існують в формі аніонів за рахунок дисоціації карбоксильної групи.

В сильнолужному середовищі існує депротонувана форма ( $Q^-$ ), в нейтральному, слабкокислому або слабколужному середовищі – форма цвіттеріонів ( $QH^\pm$ ). В сильнокислому середовищі фторхінолони існують у катіонній формі ( $QH_2^+$ ) і можуть утворювати іонні комплекси з аніонами. Хінолони тільки з одним значенням  $pK_a$  називають «кислими хінолонами», а ті, що

Таблиця 1

## Основні фізико-хімічні властивості та фармакокінетика фторхінолонів [4,5]

Параметр	Норфлораксацин	Ципрофлораксацин	Енрофлораксацин
Зовнішній вигляд	Блідо-жовті кристалічні гігроскопічні порошки		
Хімічна структура			
Молекулярна маса	319,331 г/моль	331,346 г/моль	359,390 г/моль
Біодоступність	30–40%	70–80%	65–80%
Метаболізм	печінка	печінка	нирки
Період напіввиведення	4 год	4 год	4–4,5 год
$pK_1$	6,1	6,0	6,0
$pK_2$	8,6	8,6	7,6
$\log K_{o/w}$	0,82	0,65	1,88
Розчинність у воді, г/л (20°C)	0,28	0,3	0,3
Розчинність у ізо-пропанолі, г/л (20°C)	–	0,23	–

мають два значення  $pK_a$  через наявність піперазинового кільця називаються піперазинілхінолонами [4,5].

Хінолони є бактерицидними агентами, які інгібують реплікацію і транскрипцію ДНК-бактерій, що призводить до швидкої загибелі клітин [6,7]. Хінолони взаємодіють з комплексом ДНК-фермент, який утворює комплекс хінолон-фермент-ДНК, що в свою чергу блокує процес реплікації білків. Антибактерійна активність хінолонів пов'язана також з впливом на РНК бактерій і синтез бактеріальних білків, на стійкість мембран і на інші життєві процеси бактеріальних клітин [8].

Хінолони мають добре виражені комплексуючі властивості. Хелати металів мають підвищену біологічну активність. Полярність іона металу зменшується за рахунок часткового обміну позитивного заряду з групами електронодонорних атомів ліганду фторхінолону і, як наслідок, відбувається перекриття орбіталей ліганду з орбіталями металу. Хелати збільшують делокалізацію  $\pi$ -електронів по всьому хелатному циклу і тим самим збільшують ліпофільну природу центрального іону. Це підсилює проходження комплексу через ліпідні мембрани і проникнення в клітини. Багато чинників впливають на біологічну активність хінолонів: природа іона металу; характер лігандів; хелатний ефект; сумарний заряд комплексу [9].

В літературі відомі методи визначення фторхінолонів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [3] і спектрофотометрії [10]. Спектрофотометричний метод базується на утворенні забарвлених сполук з хлораніловою кислотою і наступним фотометруванням продукту реакції. Закон Бера дотримується в діапазоні концентрації 0,5–10,0 мкг/мл.

В методах, що поєднують мікроекстракцію і ВЕРХ визначення, використовують ультразвукову дисперсійну мікроекстракцію, флотаційну рідинну мікроекстракцію, твердофазну мікроекстракцію, тощо [11–13].

Метод спектрофотометрії поступається методу ВЕРХ і за чутливістю, і за селективністю. Середні межі спектрофотометричного виявлення фторхінолонів становлять 5–10 мкг/мл, а межі виявлення методом ВЕРХ в поєднанні з рідинною і твердофазною мікроекстракцією можуть бути суттєво нижчими.

Дисперсійна рідинна мікроекстракція є одним з простих і ефективних методів прободготовки і відрізняється простотою, дешевизною, швидкістю, високими ступенями вилучення і

коефіцієнтами концентрування.

Метою даної роботи було розробити ефективну, просту і недорогу методику вилучення нор-, ципро- та енрофлоксацинів методом дисперсійної рідинної мікроекстракції з водних розчинів з наступним їх ВЕРХ/УФ детектуванням.

#### **Експериментальна частина**

У роботі використовували норфлоксацин виробництва дослідного заводу «ГНЦЛС» м. Харків, ципрофлоксацин виробництва «Астрафарм» м. Вишневе, енрофлоксацин виробництва НВП «СУЛА-ФАРМ» м. Київ; органічні розчинники: тетрахлорметан, хлороформ, дихлорметан, ацетонітрил, метанол, ацетон, ізопропанол. Всі реактиви і розчинники мали чистоту не менше 98%. рН встановлювали за допомогою розчинів 0,001–1,0 М розчинів HCl, KOH, ацетатних і цитратних буферних розчинів.

Визначення проводили на рідинному високоефективному хроматографі Agilent Technologies в таких умовах: колонка ZORBAX Extend-C18: 150 мм×4,6 мм×5 мкм; швидкість потоку 1,05 мл/хв; рухома фаза 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10); детектор УФ.

Вихідні стандартні розчини фторхінолонів з концентрацією 100 мг/л готували послідовним розчиненням норфлоксацину, ципрофлоксацину і енрофлоксацину в суміші 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10) і зберігали в холодильнику. Стандартний розчин суміші фторхінолонів з концентрацією 10 мг/л готували безпосередньо в день проведення досліджень шляхом розведення вихідних стандартних розчинів сумішшю 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10).

Дисперсійну рідинну мікроекстракцію проводили таким чином. У віалу з розчином фторхінолонів додавали буферний розчин з певним значенням рН або розчин кислоти або лугу, довели загальний об'єм розчину водою до 5,0 мл. Потім до розчину додавали суміш диспергуючого і екстракційного розчинників, інтенсивно струшували розчин впродовж 3 хв, після чого утворену емульсію центрифугували 5 хв при швидкості 4000 об./хв. Утворену в результаті центрифугування краплю екстракту відділяли від водного розчину, органічний розчинник заміняли на ацетонітрил і використовували для ВЕРХ аналізу.

#### **Результати та обговорення**

Для обрання довжини хвилі для спектрофотометричного детектування аналітів були отримані молекулярні спектри поглинання фтор-

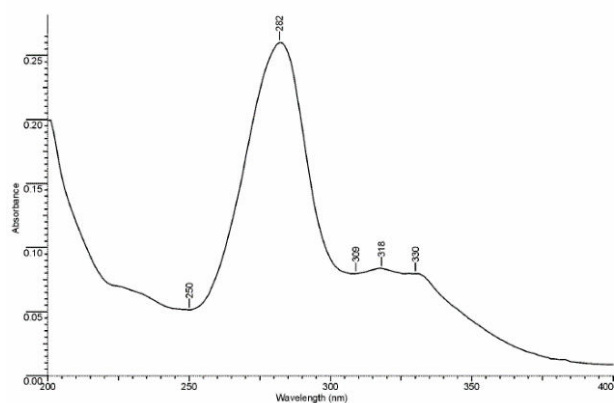


Рис. 1. УФ-спектр поглинання енрофлоксацину. Концентрація 10 мг/л. Рухома фаза: 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10)

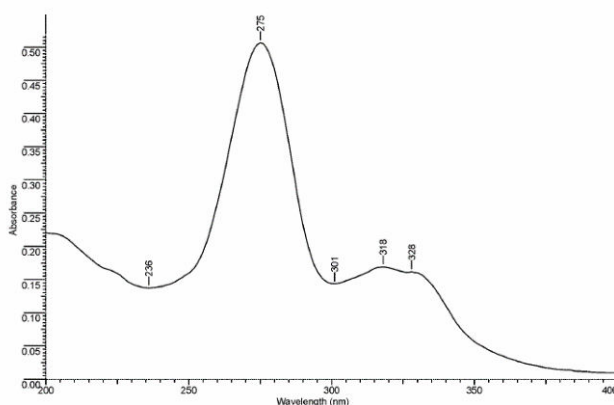


Рис. 2. УФ-спектр ципрофлоксацину. Концентрація 10 мг/л. Рухома фаза: 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10)

хінолонів в УФ діапазоні 200–400 нм, які наведені на рис. 1, 2 і 3. З отриманих даних можна зробити висновок, що максимальні довжини хвиль поглинання для досліджуваних фторхінолонів знаходяться в інтервалі 275–282 нм. Тому для подальших досліджень оптимальною довжи-

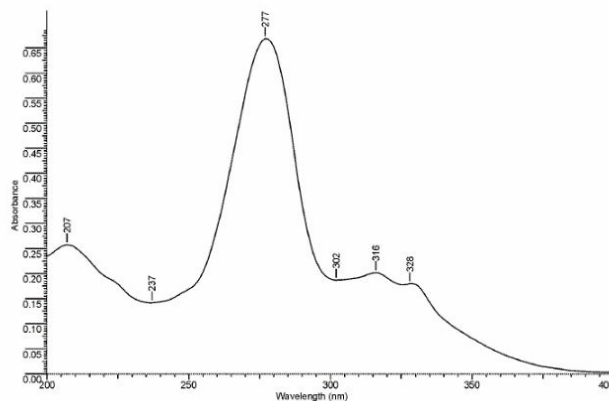


Рис. 3. УФ-спектр норфлоксацину. Концентрація 10 мг/л. Рухома фаза: 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10)

ною хвилі було обрано 278 нм.

В оптимальних умовах хроматографування, а саме в суміші 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10) була отримана хроматограма суміші фторхінолонів норфлоксацину, ципрофлоксацину і енрофлоксацину (рис. 4).

Як видно з рис. 4, норфлоксацин, ципрофлоксацин і енрофлоксацин добре розділяються в оптимальних умовах і час виходу для них становить 3,65; 4,25 і 5,30 хв відповідно. Також в оптимізованих умовах були побудовані градувальні графіки для ВЕРХ визначення досліджуваних фторхінолонів, які наведені на рис. 5. З рисунку видно чітку лінійну відповідність між аналітичним сигналом хінолонів і їх концентрацією. Отримані рівняння градувальних графіків, розраховані межі виявлення за 3s-критерієм (МВ) та коефіцієнти кореляції наведені у табл. 2. Як видно з отриманих даних, межі виявлення фторхінолонів за 3s-критерієм становлять 3,7–5,5 мг/л. Діапазон визначуваних концентрацій при цьому становить 10–100 мг/л, коефіцієнти кореляції становлять більше 0,99.

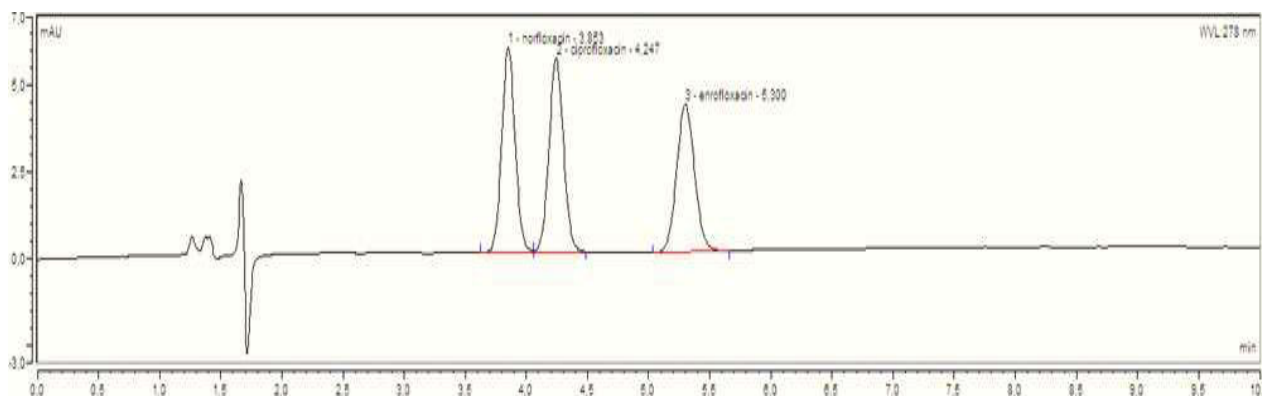


Рис. 4. Хроматограма суміші норфлоксацину, ципрофлоксацину і енрофлоксацину

Таблиця 2

## Кількісні параметри градувальних графіків для фторхінолонів

Фторхінолон	Рівняння градувального графіку	МВ, мг/л	R <sup>2</sup>
норфлоксацин	$S=(11,16\pm 0,97)+(0,79\pm 0,02)\cdot c$	3,7	0,9968
ципрофлоксацин	$S=(2,49\pm 1,16)+(0,89\pm 0,02)\cdot c$	3,9	0,9965
енрофлоксацин	$S=(10,19\pm 1,42)+(0,77\pm 0,02)\cdot c$	5,5	0,9930

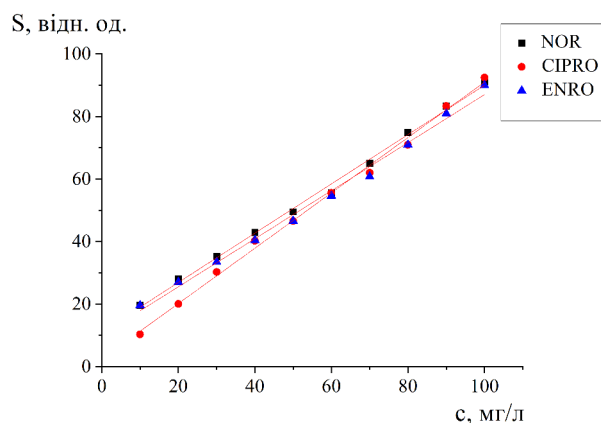


Рис. 5. Градувальні графіки визначення фторхінолонів

*Оптимізація умов проведення дисперсійної рідинної мікроекстракції*

Для вилучення фторхінолонів з водних матриць була застосована дисперсійна рідинна мікроекстракція. Принцип методу дисперсійної рідинної мікроекстракції полягає в вилученні аналітів з водного розчину за допомогою суміші органічних розчинників – дисперсійного полярного і екстракційного неполярного розчинників. В результаті їх сумісної дії на водний розчин утворюється емульсія, яка містить тисячі мікрокрапель екстракційного розчинника, розподілені рівномірно у водному розчині. Утворення емульсії сприяє значному збільшенню площі поверхні контакту двох фаз вода – органічний розчинник і приводить до швидкого і достатньо повного вилучення аналітів в екстракційну фазу. Наступне центрифугування допомагає швидко відділити органічну фазу від водної. Завершальним кроком у методі мікроекстракції є відбір проби з екстракту і наступне детектування аналітів хроматографічними або іншими інструментальними методами [14].

Оптимізація дисперсійної рідинної мікроекстракції нор-, ципро-, енрофлоксацинів включала дослідження впливу природи і кількості екстракційного та дисперсійного розчинників, вмісту висолувача, рН розчину на ступінь вилучення аналітів.

Для дослідження дисперсійної мікроекстракції були обрані хлорвмісні органічні розчин-

ники, густина яких більше 1 г/см<sup>3</sup>. Це сприяє утворенню краплі на дні віали/пробірки, що зручно для відбору проби. Екстракційний розчинник або екстрагент має бути неполярним, слабо розчинним у воді і добре екстрагувати аналіт. При виборі екстракційного розчинника були досліджені наступні розчинники: тетрачлорметан, хлороформ та дихлорметан. З рис. 6 видно, що оптимальним екстракційним розчинником є хлороформ, оскільки він найбільш повно вилучає досліджувані фторхінолони при однаковому об'ємі екстракційних крапель 55–65 мкл. Ступені вилучення фторхінолонів не є високими і становлять біля 20–25%. Неповне вилучення аналітів може бути пов'язано з утворенням цвіттеріонів і можливо, з частковим утворенням катіонної форми аналітів. Хоча з літератури відомо, що розчинність ципрофлоксацину і інших хінолонів у воді досить низька і становить менше 1 мг/мл, при ступені вилучення 30% і різниці в об'ємах водної і органічної фаз у 100 разів можна досягти концентрування у 30–35 разів [14]. Це обумовлює покращення чутливості визначення щонайменше у 30 разів.

Була досліджена залежність аналітичного сигналу фторхінолонів від об'єму екстракційного розчинника в присутності різних дисперсійних розчинників. За літературними даними [15], дисперсійний розчинник (диспергатор) має бути полярним, змішуватися як і з водою, так і з екстракційним розчинником. Як дисперсійні роз-

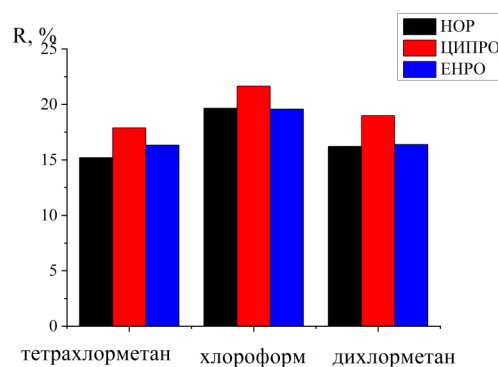


Рис. 6. Залежність ступеня вилучення від природи екстракційного розчинника

чинники були досліджені полярні органічні розчинники: ацетонітрил, метанол, ацетон та ізопропанол.

Дисперсійну мікроекстракцію фторхінолонів проводили, додаючи різну кількість екстракційного розчинника хлороформу: 50, 60, 70, 80, 90 мкл і однакову кількість дисперсійного розчинника – 500 мкл. Встановили, що найбільший аналітичний сигнал, невелика розбіжність та найкраща відтворюваність спостерігається при використанні ізопропанолу і ацетону (рис. 7, 8). Можливо, це пов'язано з їх кращою диспергуючою дією на екстракційний розчинник порівняно з метанолом і ацетонітрилом. Оптимальною кількістю хлороформу як екстракційного розчинника було 50–70 мкл для різних диспергуючих розчинників. При вмісті хлороформу менше 50 мкл вилучення аналітів є неповним, відтворюваність результатів знижується. При збільшенні кількості хлороформу до 90 мкл і використанні ацетону аналітичний сигнал зменшується внаслідок збільшення об'єму

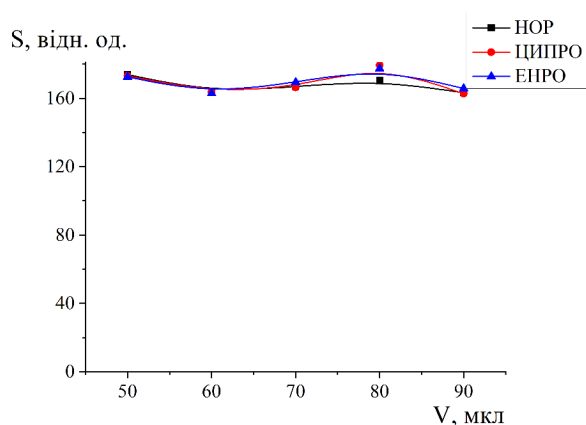


Рис. 7. Залежність аналітичного сигналу фторхінолонів від об'єму хлороформу при додаванні 500 мкл ізопропанолу

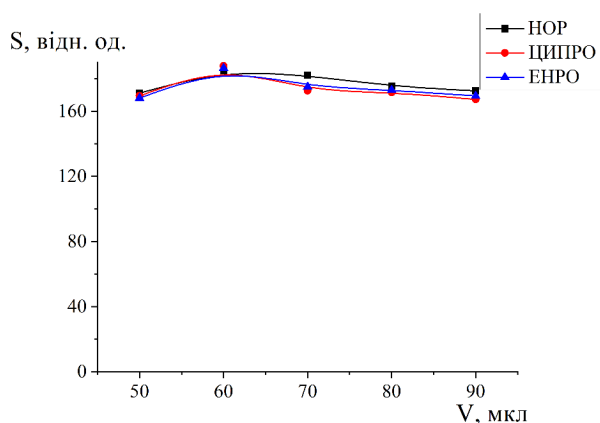


Рис. 8. Залежність аналітичного сигналу фторхінолонів від об'єму хлороформу при додаванні 500 мкл ацетону

екстракту і розведення розчину, оскільки при використанні ацетону екстракційна фаза суттєво збільшується і містить до 30% ацетону.

Були пораховані ступені вилучення ципрофлоксацину, норфлоксацину і енофлоксацину при додаванні до водного розчину суміші фторхінолонів різної кількості хлороформу і 500 мкл ізопропанолу або ацетону. Як видно з рис. 9, максимальні ступені вилучення становлять 28–30%. Неповне вилучення хінолонів з водного розчину можна пояснити досить високою полярністю і розчинністю сполук у воді. Для збільшення чутливості визначення можна зменшувати об'єм екстракційної краплі, коефіцієнти концентрування будуть при цьому рости. В роботі показано, що зі зменшенням об'єму екстракційної краплі до 40–50 мкл коефіцієнти концентрування збільшуються до 35, оскільки аналіти концентруються в меншому об'ємі екстракційного розчинника. Для подальшого дослідження дисперсійної мікроекстракції була обрана оптимальна диспергуюча суміш 70 мкл хлороформу і 500 мкл ізопропанолу.

Також досліджена мікроекстракція при різному вмісті диспергуючого розчинника ізопропанолу: 150, 250, 500, 650, 750 мкл і однаковій кількості доданого хлороформу – 70 мкл. За даними рис. 10, оптимальним об'ємом ізопропанолу було обрано 500 мкл. При збільшенні кількості диспергуючого розчинника сигнал трохи зменшується внаслідок певного збільшення розчинності аналітів, а при зменшенні кількості ізопропанолу зниження сигналу пов'язано з недостатньою кількістю дисперсійного розчинника для утворення емульсії.

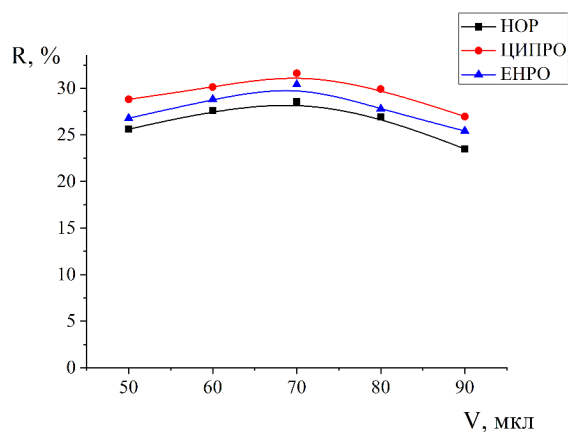


Рис. 9. Залежність ступеня вилучення фторхінолонів від об'єму доданого хлороформу при додаванні 500 мкл ізопропанолу

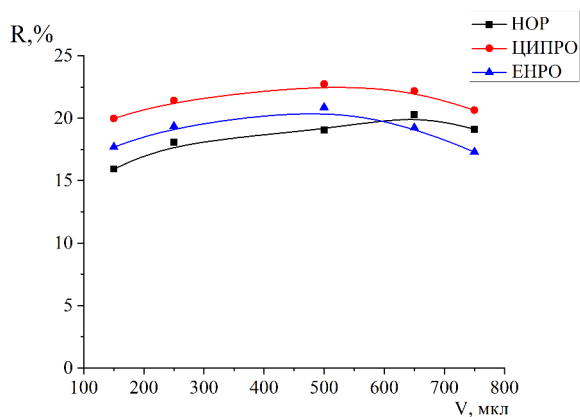


Рис. 10. Залежність ступеня вилучення фторхінолонів від об'єму доданого ізо-пропанолу при використанні 70 мкл хлороформу

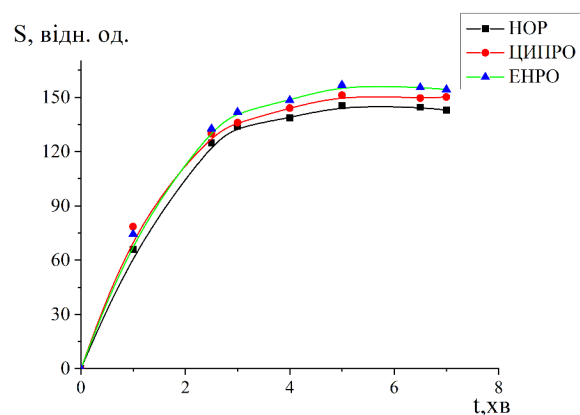


Рис. 11. Залежність аналітичного сигналу фторхінолонів від часу проведення мікроекстракції при додаванні 70 мкл хлороформу і 500 мкл ізо-пропанолу

Наступним кроком був досліджений час мікроекстракції. З рисунка 11 видно, що мікроекстракція проходить досить швидко і 5 хв достатньо для повного завершення мікроекстракції. Швидке досягнення екстракційної рівноваги обумовлено великою площею поверхні між двома фазами: мікрокраплинками екстракційного розчинника і водним розчином аналітів.

Також досліджена дисперсійна мікроекстракція фторхінолонів в інтервалі рН: 7,0–11,0. Як видно з рис. 12, оптимальним є рН в інтервалі 8,0–9,0. Це можна пояснити тим, що в нейтральному і слабколужному середовищі норфлоксацин, ципрофлоксацин і енрофлоксацин існують в цвіттер-формі, молекули є нейтральними, що обумовлює здатність до вилучення в органічну фазу. Однак наявність часткових зарядів в молекулі пояснює низькі величини ступенів вилучення і коефіцієнтів концентруван-

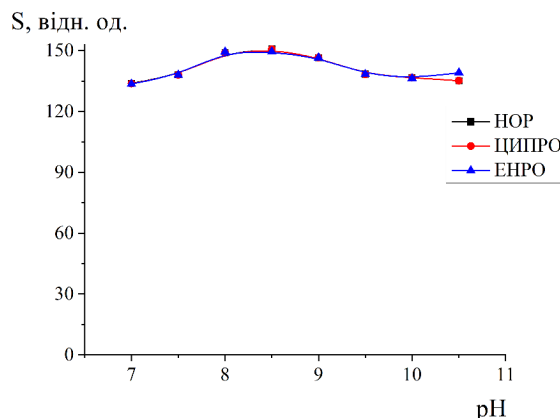


Рис. 12. Залежність аналітичного сигналу фторхінолонів від рН водного розчину при додаванні 70 мкл хлороформу і 500 мкл ізо-пропанолу

ня. При рН нижче 6 молекула фторхінолону є протонною, при рН більше 9 іонізованою, що значно погіршує екстракцію фторхінолонів.

Загальновідомо, що додавання висоловача підвищує повноту вилучення аналітів з водної в органічну фазу. Була досліджена мікроекстракція фторхінолонів при різних концентраціях NaCl: 1; 2,5; 5; 7,5 і 10%. За результатами дослідження додавання солі не впливає на вилучення аналітів з водного розчину, що може бути пов'язано з високою полярністю сполук, середньою розчинністю сполук у воді і складністю переходу сполук в органічну фазу як в присутності, так і у відсутності висоловача.

Таким чином, оптимальними умовами мікроекстракції норфлоксацину, ципрофлоксацину і енрофлоксацину є наступні:

- об'єм диспергуючого розчинника, ізо-пропанолу, 500 мкл,
- об'єм екстракційного розчинника, хлороформу, 70 мкл,
- рН в інтервалі 8,0–9,0,
- час екстракції 5 хв,
- довжина хвилі детектування 278 нм,
- рухома фаза: 0,4 М лимонна кислота–метанол–ацетонітрил (80:10:10).

Розроблена методика для визначення фторхінолонів була перевірена на зразках мінеральних вод методом «введено–знайдено». Як видно з результатів аналізу (табл. 3), методика характеризується хорошою точністю і відтворюваністю, отримані значення відносного стандартного відхилення не перевищують 2%.

Таким чином, в роботі показана можливість застосування дисперсійної мікроекстракції для вилучення нор-, ципро- і енрофлоксацинів з

Таблиця 3

## Результати аналізу природних вод на вміст фторхінолонів (n=3; P=0,95)

Фторхінолони	Вода «Моршинська», вміст солей: 0,1–0,4 г/л			Вода «Миргородська», вміст солей: 2,5–3,2 г/л		
	Введено мкг/мл	Знайдено мкг/мл	S <sub>r</sub> , %	Введено мкг/мл	Знайдено мкг/мл	S <sub>r</sub> , %
ципрофлоксацин	20,0	19,9±0,2	1,0	20,0	19,7±0,3	0,8
	30,0	29,7±0,1	0,5	30,0	29,7±0,1	0,2
енрофлоксацин	20,0	19,8±0,3	1,9	20,0	19,5±0,7	1,6
	30,0	29,4±0,2	0,4	30,0	29,6±0,7	1,6
норфлоксацин	20,0	19,6±0,5	0,5	20,0	19,8±1,1	0,9
	30,0	29,5±0,2	0,4	30,0	29,5±0,4	0,8

водних розчинів з наступним ВЕРХ/УФ детектуванням.

**Висновки**

Оптимізовані умови ВЕРХ/УФ визначення ципрофлоксацину, норфлоксацину, енрофлоксацину в водному розчині. Встановлені оптимальні умови проведення дисперсійної мікроекстракції фторхінолонів: тип і кількість екстракційного і дисперсійного розчинників, часу, рН, висолювача. Невисокі величини ступенів вилучення флоксационів 28–30% обумовлені існуванням цвіттеріонів і протонізацією сполук в водному розчині. Розроблена методика вилучення з водних розчинів і ВЕРХ/УФ визначення фторхінолонів перевірена при аналізі природних вод методом «введено–знайдено». Перевагами методики є простота, експресність, хороша прецизійність отриманих результатів, відносно стандартне відхилення не перевищує 2%.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: пособие для врачей // Харьков: Торсинг. – 1997. – 2 т. – 592 с.
2. *Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials* / Blokhina S.V., Sharapova A.V., Ol'khovich M.V., Volkova T.V., Perlovich G.L. // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol.93. – P.29-37.
3. *High-resolution mass spectrometry applied to the identification of transformation products of quinolones from stability studies and new metabolites of enrofloxacin in chicken muscle tissues* / Morales-Gutierrez F.J., Hermo M.P., Barbosa J., Barron D. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – Vol.92. – P.165-176.
4. *Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients* / Babic S., Horvat A.J.M., Pavlovic D.M., Kastelan-Macan M. // *Trends Anal. Chem.* – 2007. – Vol.26. – No. 11. – P.702-706.
5. *Oliphant C.M., Green G.M.* Quinolones: a comprehensive review // *Am. Fam. Physician.* – 2002. – Vol.65. – No. 3. – P.455-464.

6. *Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry* / Maia A.S., Ribeiro A.R., Amorim C.L., Barreiro J.C., Cass Q.B., Castro P.M.L., Tiritan M.E. // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – Vol.1333. – P.87-98.

7. *Cozzarelli N.R.* DNA gyrase and the supercoiling of DNA // *Science.* – 1980. – Vol.207. – P.953-960.

8. *Mitscher L.A.* Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents // *Chem. Rev.* – 2005. – Vol.105. – P.559-592.

9. *Psomas G., Kessissoglou D.P.* Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives // *Dalton Trans.* – 2013. – Vol.42. – P.6252-6276.

10. *Arayne M.S., Sultana N., Ali I S.N.* Spectrophotometric determination of quinolones by charge transfer complexation with chloranilic acid: synthesis and characterization // *Med. Chem.* – 2013. – Vol.3. – No. 4. – P.271-275.

11. *Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater* / Yan H., Wang H., Qin X., Liu B., Du J. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – Vol.54. – No. 1. – P.53-57.

12. *Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography* / Lili L., Xu H., Song D., Cui Y., Hu S., Zhang G. // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol.1217. – No. 16. – P.2365-2370.

13. *Mirzajani R., Kardani F.* Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol.122. – P.98-109.

14. *Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants* / Hashemi B., Zohrabi P., Kim K.-H., Shamsipur M., Deep A. // *Trends Anal. Chem.* – 2017. – Vol.97. – P.83-95.



15. Nuhu A.A., Basheer C., Saad B. Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: recent applications in bioanalysis // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol.879. – No. 17-18. – P.1180-1188.

Надійшла до редакції 09.01.2023

## DISPERSION LIQUID MICROEXTRACTION OF FLUOROQUINOLONES

I.V. Kushchenko, M.F. Zui \*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

\* e-mail: maryzuy@knu.ua

The dispersive liquid-liquid microextraction method of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin with chromatographic detection was developed. The optimization of dispersive microextraction was carried out, and the optimal parameters were determined as follows: 5 ml of aqueous solution; 70  $\mu$ l of chloroform; 500  $\mu$ l of isopropanol; extraction time of 5 min; centrifugation time of 5 min; and pH 7.0–9.0. The concentration range was 4.0–100  $\mu$ g/ml, and the limit of detection was not exceeded 1.5  $\mu$ g/ml. The microextraction method was tested on mineral water samples by the standard addition method. The obtained results indicate sufficient accuracy and reproducibility of the developed method. The relative standard deviation does not exceed 2%.

**Keywords:** fluoroquinolones; dispersive liquid microextraction; high performance liquid chromatography; water; analysis.

### REFERENCES

- Mashkovskiy MD. *Lekarstvennye sredstva: posobie dlya vrachei. T. 2* [Drugs: handbook for doctors. Vol. 2]. Kharkiv: Torsing; 1997. 592 p. (in Russian).
- Blokhina SV, Sharapova AV, Ol'khovich MV, Volkova TV, Perlovich GL. Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 93: 29-37. doi: 10.1016/j.ejps.2016.07.016.
- Morales-Gutierrez FJ, Hermo MP, Barbosa J, Barron D. High-resolution mass spectrometry applied to the identification of transformation products of quinolones from stability studies and new metabolites of enrofloxacin in chicken muscle tissues. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 92: 165-176. doi: 10.1016/j.jpba.2014.01.014.
- Babic S, Horvat AJM, Pavlovic DM, Kastelan-Macan M. Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal Chem.* 2007; 26: 1043-1061. doi: 10.1016/j.trac.2007.09.004.
- Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician.* 2002; 65(3): 455-464.
- Maia AS, Ribeiro AR, Amorim CL, Barreiro JC, Cass QB, Castro PML, et al. Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014; 1333: 87-98. doi: 10.1016/j.chroma.2014.01.069.
- Cozzarelli NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science.* 1980; 207: 953-960. doi: 10.1126/science.6243420.
- Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem Rev.* 2005; 105: 559-592. doi: 10.1021/cr030101q.
- Psomas G, Kessissoglou DP. Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives. *Dalton Trans.* 2013; 42: 6252-6276. doi: 10.1039/C3DT50268F.
- Arayne MS, Sultana N, Ali SN. Spectrophotometric determination of quinolones by charge transfer complexation with chloranilic acid: synthesis and characterization. *Med Chem.* 2013; 3(4): 271-275. doi: 10.4172/2161-0444.1000150.
- Yan H, Wang H, Qin X, Liu B, Du J. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 53-57. doi: 10.1016/j.jpba.2010.08.007.
- Lili L, Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Zhang G. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2010; 1217: 2365-2370. doi: 10.1016/j.chroma.2010.01.081.
- Mirzajani R, Kardani F. Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 122: 98-109. doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.046.
- Hashemi B, Zohrabi P, Kim KH, Shamsipur M, Deep A, Hong G. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *Trends Anal Chem.* 2017; 97: 83-95. doi: 10.1016/j.trac.2017.08.014.
- Nuhu AA, Basheer C, Saad B. Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: recent applications in bioanalysis. *J Chromatogr B.* 2011; 879: 1180-1188. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.02.009.