

УДК 534.42.062-066:543.424:543.89

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИКАЦИНА МЕТОДОМ РЭЛЕЕВСКОГО РАССЕЯНИЯ ПОСЛЕ КОВАЛЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ АНАЛИТА С ВОДОРАСТВОРИМЫМ ПОЛИМЕРОМ

Т.О. Самарина, М.К. Беклемишев

*(кафедра аналитической химии, e-mail: mkb@analyt.chem.msu.ru)*

Предложен способ определения антибиотиков аминокликозидного ряда, основанный на ковалентном связывании аналита с водорастворимым полимером с последующим измерением интенсивности рэлеевского рассеяния света ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ). Определение проводили на примере амикацина, амидную связь которого с сополимером 4-стиролсульфоновой и малеиновой кислот формировали карбодимидным методом. Выбраны условия проведения этой реакции для получения максимальной интенсивности рассеяния продукта (время 15 мин, pH 7,0, ионная сила 0,02, измерение рассеяния при 362 нм). На определение амикацина не влияют (кратные соотношения, моль/моль): Al(III), Co(II), Cu(II), Fe(III), Ni(II), Zn(II) – 300, Cl<sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – 250, Ca(II) и Mg(II) – 50, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – 20; азотсодержащие соединения и белок влияют при 20–50-кратных и 2,5-кратных соотношениях соответственно. Диапазон определяемых концентраций 0,2–35 мг/л ( $r = 0,993$ ),  $c_{\text{мин}} = 0,08$  мг/л ( $n = 10$ ,  $P = 0,95$ ). Проведен анализ порошка для приготовления инъекций и геля.

**Ключевые слова:** рэлеевское рассеяние, аминокликозиды, амикацин, карбодимидная сшивка, анализ лекарственных препаратов.

Использование резонансного рэлеевского рассеяния света (РРС) в количественном анализе началось сравнительно недавно. В середине 1990-х годов Пастернак с соавторами предложили использовать упругое рассеяние света на частицах как метод изучения самоассоциации поглощающих молекул [1]. Регистрацию спектра РРС проводят на обычном спектрофлуориметре в синхронном режиме, записывая спектр при равенстве длин волн возбуждения и регистрации ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ). Теоретическое обоснование и развитие метод получил в 1996–2000 гг. [2–4]. Метод РРС привлекателен своей простотой и чувствительностью (определение органических соединений на уровне мкг/л), однако он остается явно недоисследованным и мало используется на практике. С использованием РРС может быть развит целый ряд новых подходов к определению органических соединений, плодотворность которых следует проверять. Одним из таких подходов могло бы стать формирование сильно рассеивающих свет агрегатов аналита с высокомолекулярным реагентом за счет использования стандартных способов формирования ковалентных связей, относительно быстро реализуемых в водном растворе и не требующих нагревания.

Аминокликозиды (АГ) – бактерицидные антибиотики широкого спектра действия, активные в

отношении большинства грамотрицательных и грамположительных аэробных микроорганизмов и дающие значительный клинический эффект даже в случаях тяжелых бактериальных инфекций или в случаях угнетения иммунитета пациента [5–7]. Однако АГ обладают значительной нефротоксичностью и ототоксичностью, а также могут вызывать нервно-мышечную блокаду [8]. Существует задача определения этих антибиотиков в технологических средах, биологических жидкостях и пищевых продуктах. Так, по техническому регламенту на молоко и молочную продукцию РФ [9] содержание АГ в продукции недопустимо; по стандартам ЕС [10] и США [11] максимальный предел остаточного содержания АГ в молоке составляет 100 и 30 нг/мл соответственно. Определение АГ в биологических жидкостях позволяет отслеживать фармакокинетику препаратов и оценивать их воздействие на организм человека.

Большинство методик определения АГ относятся к хроматографическим с масс-спектрометрическим окончанием [12–14], ТСХ и капиллярному электрофорезу [15], причем эти методы не всегда обеспечивают нужную чувствительность определения без концентрирования. Используют также микробиологические [32] и иммуноферментные методы [33]. К наиболее простым

и доступным, с точки зрения рутинного анализа, можно отнести методы спектрофотометрии [16–23], флуориметрии [24–26] и Рэлеевского рассеяния [27–31] (табл. 1). Наиболее чувствительны методики, основанные на рассеянии света и люминесценции. Однако для достижения низких пределов обнаружения необходимо либо использовать дорогостоящие и токсичные реагенты (для получения флуоресцирующих производных АГ), либо синтезировать квантовые точки, либо модифицировать поверхности коммерческих квантовых точек.

В основе РРС-методик определения АГ в большинстве случаев лежит принцип ассоциации протонированных по аминок группам молекул аналита и противоположно заряженного красителя, полиэлектролита или функциональных групп поверхности наночастицы. Полученные таким образом ассоциаты могут давать интенсивный сигнал РРС. Однако сигнал могут давать и другие присутствующие в пробе катионогенные соединения, посторонние ионы и макромолекулы (белки, некоторые аминокислоты, ионы металлов), что мешает определению АГ.

В данной работе в целях повышения селективности определения аминокгликозидного антибиотика амикацина методом РРС мы ре-

ализовали ковалентное связывание аналита с анионным полиэлектролитом – сополимером полистирол-4-сульфокислоты и малеиновой кислоты. Для такого связывания использовали широко применяемый (в основном, в биохимии) метод карбодиимидной сшивки [34] (схема). Такой способ формирования амидной связи удобен тем, что осуществим в водном или спиртовом растворе и не требует нагревания.

### Экспериментальная часть

Для приготовления растворов использовали деионизованную воду (18 МОм·см), полученную на установке «Millipore». Растворением точных навесок в воде готовили следующие растворы:  $1,7 \cdot 10^{-4}$  М дисульфат амикацина («Aldrich»); 0,1 М сополимер 4-стиролсульфоновой и малеиновой кислот (ПССК-со-МК, средняя молекулярная масса 20 кДа, натриевая форма, «Sigma-Aldrich»; в расчете на мономер; растворяли с использованием ультразвуковой бани в течение 5 мин при 25°C, 35 кГц); 0,1 М N-гидроксисукцинимид (ГСИ). При необходимости исходные растворы ПССК-со-МК и ГСИ разбавляли в нужное число раз фосфатным буферным раствором (0,07 М, pH 8,0). N-(3-Диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид

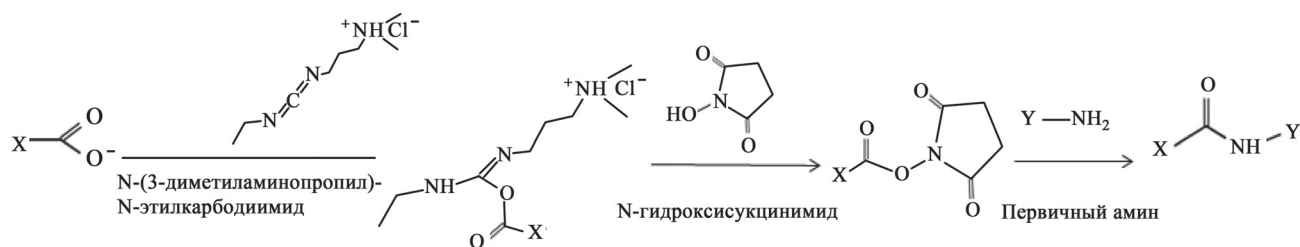
Т а б л и ц а 1

Аналитические характеристики методик определения некоторых аминокгликозидов

Метод	Аналит	Предел обнаружения, мг/л	Линейный диапазон, мг/л	Объект	Литература
СФ	амикацин	1,30	5–100	ЛС	[16]
СФ	амикацин	–	4–15	модельный раствор	[17]
СФ	гентамицин	0,40	30–120	ЛС	[18]
СФ	амикацин	0,02	0,06–0,10	ЛС, молоко	[19]
ФЛ	амикацин	0,5 0	5–100	плазма крови	[24]
ФЛ	амикацин	0,02	0,06–3,00	плазма крови	[25]
ФЛ	амикацин	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$(4–60) \cdot 10^{-6}$	плазма крови	[26]
РРС	стрептомицин	6	7–10	ЛС	[27]
РРС	амикацин	0,003	0,01–1,7	ЛС	[28]
РРС	амикацин	0,004	0,04–6,0	моча, плазма	[29]
РРС	стрептомицин	0,005	0,02–5,2	моча, плазма	[30]
РРС	амикацин	0,005	0,09–7,2	моча, плазма	[31]

О б о з н а ч е н и я. СФ – спектрофотометрия, ФЛ – флуориметрия, РРС – резонансное рассеяние света, ЛС – лекарственное средство.

## Формирование амидной связи первичного амина с карбоновой кислотой методом карбодимидной сшивки



(ЭКДИ,  $\geq 97\%$ , «Aldrich») переводили в гидрохлорид, для этого к 0,80 мл воды добавляли 20 мкл 1 М HCl и 6,8 мкл ЭКДИ. Другие реагенты были квалификации не ниже «х.ч.»

Спектры рэлеевского рассеяния регистрировали на спектрофлуориметре «Caru Eclipse» («Agilent», США) в синхронном режиме ( $\Delta\lambda = 0$ , ширина щелей:  $d_{ex} = 2,5$  нм,  $d_{em} = 5,0$  нм, напряжение на детекторе 600 В) в стеклянной кювете ( $1 \times 1$  см). Спектры трижды регистрировали и усредняли. В качестве аналитического сигнала использовали интенсивность рассеяния при 362 нм. Спектры поглощения и значения оптической плотности растворов регистрировали на спектрофотометре «СФ-102» («Аквилон», Россия), размер частиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии на анализаторе частиц и  $\zeta$ -потенциала «NanoBrook Omni» («Brookhaven Ins. Corp.», США), pH контролировали на иономере «Эксперт 001» («Эконикс-Эксперт», Россия).

**Получение  $N$ -гидроксисукцинимидного эфира сополимера полистиролсульфоновой и малеиновой кислот** проводили согласно [35] с изменениями: к 0,04 мл 0,1 М раствора ПССК-со-МК добавляли 0,1 мл 0,07 М  $KH_2PO_4$  (pH 5,0), затем 0,4 мл 0,04 М гидрохлорида ЭКДИ, перемешивали и оставляли на 1–2 мин, после чего вводили 0,25 мл 0,1 М раствора ГСИ и 0,35 мл деионизованной воды. После добавления каждого реактива раствор перемешивали. Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре 5–7 мин для получения эфира ПССК-со-МК, после чего в течение суток (температура хранения 2–8°C) использовали для получения ассоциатов ПССК-со-МК, ковалентно связанных по аминок группам амикацина.

**Ковалентное связывание эфира сополимера полистиролсульфоновой и малеиновой кислот с амикацином.** К 0,2 мл полученного эфира ПССК-со-МК добавляли 0,5 мл деионизованной воды, 0,1 мл 0,07М фосфатного буферного

раствора (pH 7,2), 0,04 мл 1 М NaCl и не более 1,2 мл анализируемого раствора, содержащего амикацин; раствор доводили до 2,0 мл деионизованной водой, тщательно перемешивали и через 15 мин регистрировали спектр РРС. Строили градуировочную зависимость в координатах: интенсивность РРС (усл. ед.) – концентрация амикацина (М). Предел обнаружения рассчитывали по формуле:  $c_{\min} = 3\delta/S$  ( $n = 10$ ,  $P = 0,95$ ), где  $\delta$  – среднеквадратичное отклонение сигнала фона,  $S$  – тангенс угла наклона линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации амикацина.

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены спектры РРС системы ПССК-со-МК – амикацин. Сигналы РРС самого амикацина и  $N$ -гидроксисукцинимидного эфира ПССК-со-МК в отсутствие амикацина малы. При введении амикацина интенсивность РРС-сигнала значительно возрастает, что свидетельствует об образовании более крупных частиц, рассеивающих свет. Эти данные также подтверждены методом лазерной корреляционной спектроскопии: размер ковалентно связанных ассоциатов эфира ПССК-со-МК с амикацином, определенных этим методом, равен  $210 \pm 37$  нм (для концентрации амикацина  $1,7 \cdot 10^{-5}$  М).

Коллоидные растворы ассоциатов устойчивы во времени (до 2 сут). Размер ассоциатов возрастает с увеличением концентрации антибиотика. При высокой концентрации амикацина ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  М) образуются еще более крупные частицы ( $400 \pm 56$  нм) с потерей раствором агрегативной устойчивости. В дальнейшем при выборе условий проведения реакции и определении аналитических характеристик в качестве аналитического сигнала использовали сигнал РРС в максимуме спектра рэлеевского рассеяния (362 нм).

**Получение  $N$ -гидроксисукцинимидного эфира ПССК-со-МК.** Для получения максимального аналитического отклика найдены наи-

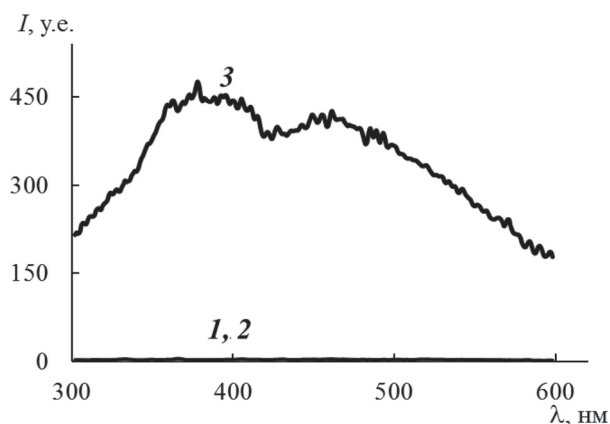


Рис. 1. Спектры РРС амикацина (1), *N*-гидроксисукцинимидного эфира полимера ПССК-со-МК до (2) и после (3) ковалентного связывания с амикацином ( $1,7 \cdot 10^{-5}$  М амикацина,  $4 \cdot 10^{-4}$  М *N*-гидроксисукцинимидного эфира ПССК-со-МК, рН 7,0, 15 мин)

лучшие условия образования ГСИ эфира ПССК-со-МК. Оптимальное время проведения реакции составляет 5–7 мин, продукт реакции стабилен в течение как минимум 4 ч при комнатной температуре и не менее суток при хранении в холодильнике. На рис. 2 представлены зависимости сигнала РРС от рН реакционной смеси (рис. 2, а) и мольного соотношения ПССК-со-МК к ЭКДИ (рис. 2, б). Максимальный отклик получен в диапазоне рН 5–6; в дальнейшем реакцию проводили в среде  $0,07$  М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 5,0).

Для получения максимального числа активированных карбоксильных групп в сополимере ПССК-со-МК (что должно обеспечить достижение высокого сигнала РРС) варьировали количество ГСИ и ЭКДИ на стадии получения эфира ПССК-со-МК. Максимальные сигналы РРС до-

стигаются при введении 3–4-кратного мольного избытка ЭКДИ по отношению к ПССК-со-МК (рис. 2). Минимальное мольное соотношение ЭКДИ к ГСИ для наиболее полного образования активированного эфира ПССК-со-МК составляет 1,0:2,5.

**Условия получения ковалентно связанных ассоциатов эфира ПССК-со-МК с амикацином.** На полноту образования амидной связи сильно влияет кислотность раствора. Максимальный сигнал РРС отмечен при рН 7,0 (фосфатный буферный раствор, рис. 3). Время, необходимое для полного образования ассоциатов из эфира ПССК-со-МК и амикацина, не превышает 15 мин. Образование ассоциатов эфира ПССК-со-МК с амикацином подавляется при высокой ионной силе раствора. Так, при значении ионной силы 0,06 сигнал РРС уменьшается на 10% по сравнению с определением в дистиллированной воде.

Введение органических растворителей, смешивающихся с водой, также приводит к уменьшению аналитического сигнала. Так, 10 об.% тетрагидрофурана снижают сигнал РРС на 37%, а 10 об.% этанола или ацетона уменьшают сигнал более чем на 50%. В выбранных условиях (время реакции 15 мин; рН 7,0;  $I = 0,02$  М;  $\lambda = 362$  нм, общий объем 2 мл), по методике, указанной в экспериментальной части, установлены аналитические характеристики определения амикацина. Диапазон определяемых концентраций ( $0,03\text{--}4,20$ )  $\cdot 10^{-5}$  М ( $r = 0,993$ ), для  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ) не превышает 5%, предел обнаружения ( $n = 10$ ,  $P = 0,95$ ) составляет  $1 \cdot 10^{-7}$  М (0,08 мг/л).

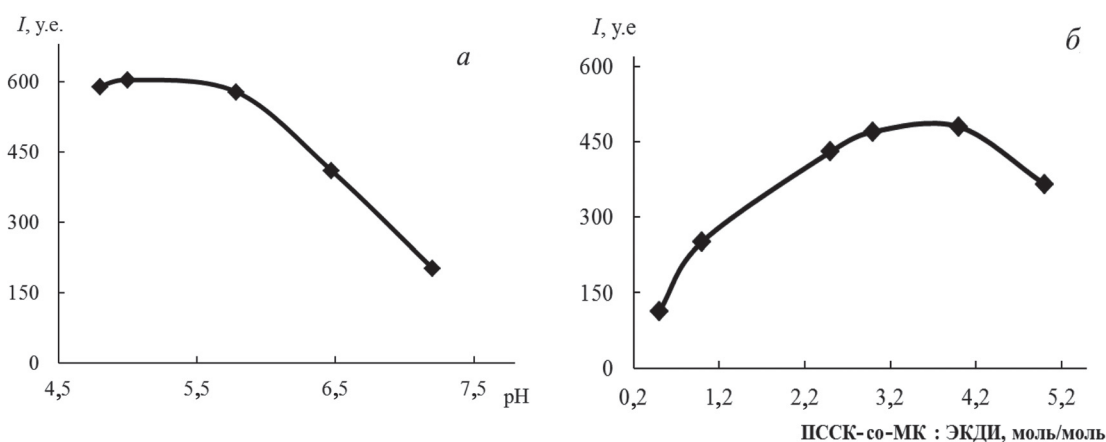


Рис. 2. Влияние условий получения ГСИ эфира ПССК-со-МК на интенсивность рэлеевского рассеяния раствора: а – рН реакционной смеси ( $2 \cdot 10^{-5}$  М амикацина); б – мольное соотношение ПССК-со-МК к ЭКДИ ( $2 \cdot 10^{-5}$  М амикацина)

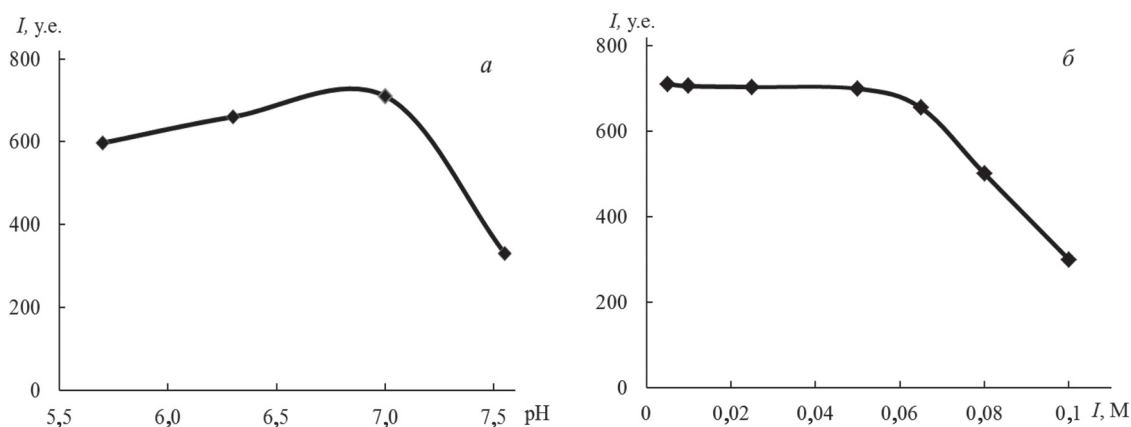


Рис. 3. Зависимость сигнала РРС от рН (а) и ионной силы среды (б) при образовании ковалентно связанных ассоциатов эфира ПССК-со-МК с амикацином ( $3 \cdot 10^{-5}$  М амикацина,  $4 \cdot 10^{-4}$  М ГСИ эфира ПССК-со-МК, 15 мин)

Правильность методики определения амикацина оценивали на модельных растворах в деионизованной воде по методу «введено-найдено» (табл. 2).

Благодаря ковалентному связыванию эфира ПССК-со-МК с амикацином можно достичь относительно селективного определения последнего в присутствии мешающих веществ (табл. 3). Определению сильнее всего мешают другие антибиотики аминогликозидного ряда (неомицин) и белок (вероятно, из-за взаимодействия анионного полиэлектролита и белка с образованием интерполимерных комплексов [36]). Определение амикацина возможно в присутствии 10–75-кратного количества соединений, имеющих одну или две первичные аминогруппы, способные взаимодействовать с N-гидроксисукцинимидным эфиром ПССМ-со-МК аналогично амикацину (кроме тетрациклина, это все органические соединения, приведенные в табл. 3).

**Анализ реальных объектов.** Для проверки применимости предложенного подхода проведен анализ порошка для приготовления инъекционных растворов Амикозита (прямое определение после приготовления раствора из препарата с

последовательным разбавлением исходного раствора перед проведением определения) и геля, содержащего амикацин и Ликацин-Гель. Определение вели методом добавок. Результаты представлены в табл. 4.

Из представленных результатов видно, что предлагаемый подход к определению амикацина как модельного соединения позволяет определять аминогликозидные антибиотики на низком уровне ( $c_{\text{мин}} = 0,08$  мг/л,  $n = 10$ ,  $P = 0,95$ ). Сравнение полученных характеристик с характеристиками известных спектроскопических методик приведено в табл. 1. Чувствительность предложенного метода либо не уступает чувствительности спектрофотометрических и флуориметрических методик, либо находится на их уровне, за исключением методик РРС с применением квантовых точек как частиц, рассеивающих свет. При этом в предлагаемой методике влияние посторонних ионов на определение проявляется меньше – катионы металлов и анионы при соотношении к аналиту 50:1 и выше вызывают изменение сигнала РРС не более чем на 7%. В то же время в работах [29, 31] уже 3–10-кратные количества катионов металлов вызывают снижение сигналов РРС более чем на 10% вследствие комплексообразования с поверхностными функциональными группами модифицированных квантовых точек или красителей. Как и в большинстве РРС-методик определения амикацина, сильно мешает белок, вызывая ложноположительные результаты.

Проведенный анализ лекарственных средств показал применимость разработанной методики для целей практического анализа. Методика позволяет экспрессно определять АГ в фармпрепаратах с приемлемыми аналитическими характеристиками.

Т а б л и ц а 2

**Проверка правильности определения амикацина в модельных растворах ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )**

Введено, М	Найдено		$s_r$
	М	% от введенного	
0,050	0,053±0,002	94	0,11
1,50	1,47±0,070	92	0,05
4,00	4,23±0,110	95	0,07



Таблица 3

**Влияние посторонних веществ на определение  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М амикацина после его ковалентного связывания с эфиром полистиролсульфокислоты и малеиновой кислоты**

Вещество/ион	Соотношение вещество:амикацин, моль/моль	Отклонение сигнала PPC при введении мешающего иона, %
Al(III)	400	1,2
Fe(III)	350	2,4
Cu(II), Ni(II), Co(II), Zn(II)	300	-6,0
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	250	5,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24	6,1
Ca(II)	50	4,2
Mg(II)	80	3,4
Ампициллин	75	5,6
Тетрациклин	50	-5,8
Изониазид	40	-3,2
Цефтриаксон	34	5,8
N,N-Диэтилэтилендиамин	20	-2,2
Триэтилететрамин	20	-3,4
Триметоприм	10	-3,3
Бычий сывороточный альбумин	2,5	7,6
Неомицин	2	4,0

Таблица 4

**Результаты определения амикацина в лекарственных препаратах  
( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )**

Препарат	Заявлено производителем	Найдено	
		концентрация	% от заявленного
Амикозит (Eczacibasi Пас Sanayi, Турция)	50 мг/мл	48,6±0,2 мг/мл	97
Ликацин (Lisapharma, Италия)	50 мг/г	44±1 мг/г	88

Работа выполнена на средства гранта РФФИ (проект № 14-23-00012). Авторы благодарят партнерскую лабораторию Agilent Technologies и ООО «СокТрейд Ко» за предоставленное оборудование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pasternack R.F., Collings P.J. // Science. 1995. Vol. 269. P. 935.
2. Yguerabide J., Yguerabide E.E. // J. Cellul. Biochem. 2001. Vol. 37. P. 71.
3. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A. // Critic. Rew. Biotech. 2010. Vol. 30. P. 127.
4. Lu W., Band B.S.F., Yu Y., Li Q.G., Shang J.C. et al. // Microchim. Acta. 2007. Vol. 158. P. 29.
5. Shakil S., Khan R., Zarrilli R., Khan A.U. // J. Biomed. Sci. 2008. Vol. 15. P. 5.

6. Loomans E. E. M. G., Van W. J., Koets M., Van A. A. // J. Agric. Food Chem. 2003. Vol. 51. P. 587.
7. Finberg R.W., Moellering R.C., Tally F.P., Craig W.A., Pankey G.A. et al. // Clin. Infect. Diseases. 2004. Vol. 39. P. 1314.
8. McCracken G.H. // Am. J. Med. 1986. Vol. 80(6B). P. 172.
9. Федеральный закон Российской Федерации № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию». <http://www.rg.ru/2008/06/20/reglament-dok.html> Просмотрено 28.01.2015.
10. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, Gentamicin Summary Report. L., 2001.
11. Heller D.N., Clar S.B., Righter H.F. // J. Mass Spectr. 2000. Vol. 35. P. 39.
12. Robert C., Gillard N., Basseur P.-Y., Ralet N., Dubois M., Delahaut P. // Food Control. 2015. Vol. 50. P. 509.
13. Bijleveld Y., Haanb T., Toerschea J., Jorjani S., Leec J. // J. Chromatogr. B. 2014. Vol. 951-951. P. 110.
14. Holthoona F.L., Essersa M.L., Muldera P.J., Steadb S.L., Caldwell M. et al. // Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 637. P. 135.
15. Stead D.A. // J. Chromatogr. B. 2009. Vol. 747. P. 69.
16. Omar M. A., Nagy D.M., Hammad M.A., Aly A.A. // J. Appl. Pharm. Sci. 2013. Vol. 3. P. 151.
17. Шачнева Е.Ю. // Астр. Вест. Экол. Обр. 2013. Vol. 25. С.103.
18. Frutos P., Torrado S., Perez-Lorenzo M. E., Frutos G. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. Vol. 21. P. 1149.
19. Caglayan M.G., Onur F. // Spectr. Lett. 2014. Vol. 47. P.771.
20. Levin G. I., Sosnina L. N. // Antib. Khimioter. 2014. Vol. 59. P. 10.
21. Ni Y., Xia Z., Kokot S. // Cur. Anal. Chem. 2012. Vol. 8. P. 382.
22. Zaubitzter F., Buryak A., Severin K. // Chem. Eur. J. 2006. Vol. 12. P. 3928.
23. Confino M., Bontchev P. // Mikrochim. Acta. 1990. Vol. III. P. 305.
24. Ogun S., Miki Y. // J. Chromatogr. B. 1996. Vol. 686. P. 205.
25. Sánchez-Martínez M.L., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. // J. Pharm. Biomed. 2004. Vol. 34. P. 1021.
26. Omar M.A., Nagy D.M., Hammad M.A., Aly A.A. // Pharm. Sci. Tech. 2013. Vol. 12. P. 828.
27. Florea M., Monciu C.-M., Ilie M. // Farmacia. 2014. Vol. 62. P. 318.
28. Wenli H., Fei Q., Jingchuan S., Wei L., Junqing Y., Qing M. // Cur. Pharm. Anal. 2014. Vol. 10. P.105.
29. Liu S., Hu X., Liu Z. // Sci. China. B. 2006. Vol. 49. P. 507.
30. Liu Z., Liu S., Wang L., Peng J., He Y. // Spectrochim. Acta A. 2009. Vol. 74. P. 36.
31. Wang L., Peng J., Liu Z., He Y. // Luminescence. 2010. Vol. 25. P. 424.
32. Sánchez-Martínez M.L., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. // Talanta. 2009. 78. P. 305.
33. Yamamoto C.H., Pinto T.J.A. // J. AOAC Int. 1996. Vol. 79. P. 434.
34. Sehgal D., Vijey I.K. // Anal. Biochem. 1994. Vol. 218. P. 87.
35. [http://www.covachem.com/pibs/edc\\_sulfo\\_nhs\\_protocol.pdf](http://www.covachem.com/pibs/edc_sulfo_nhs_protocol.pdf) (просмотрено 28.01.2015).
36. Cooper C.L., Dubin P.L., Kayitmazer A.B., Turksen S. // Curr. Opin. Coll. Interf. Sci. 2005. Vol. 10. P. 52.

Поступила в редакцию 10.04.15

## DETERMINATION OF AMIKACIN BY RAYLEIGH SCATTERING METHOD BASED ON THE COVALENT BONDING OF THE ANALYTE WITH A WATER SOLUBLE POLYMER

T.O. Samarina, M.K. Beklemishev

(Division of Analytical Chemistry)

**A method for the determination of aminoglycoside antibiotics based on the covalent bonding of the analyte with a water-soluble polymer by Rayleigh scattering method ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ) is proposed. Determination of amikacin (as model analyte) is carried out by the carbodiimide crosslinking technique that forms amide bonds between the co-polymer of 4-styrenesulfonic acid and maleic acid and primary amine groups of amikacin. Conditions of the reaction have been selected to obtain maximum scattering intensity of the product: reaction time 15 min, pH 7.0, ionic strength 0.02, measuring of scattering intensity at 362 nm. The determination of amikacin is not influenced by (mol/mol ratio): Al(III), Co(II), Cu(II), Fe(III), Ni(II), Zn(II) – 300,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{NO}_3^-$  – 250, Ca(II) and Mg(II) – 50,  $\text{HCO}_3^-$  – 20; nitrogen compounds affect at 20 – 50-fold, protein – 2.5-fold ratio. The calibration plot was constructed over the range of 0.2–35 mg/L ( $r = 0.993$ ), LOD (3s-criterion) is 0.08 mg/L ( $n = 10$ ,  $P = 0.95$ ). The analyses on the drug powder for injection and gel have been performed.**

**Key words:** Rayleigh scattering method, aminoglycosides, amikacin, carbodiimide cross-linking technique, drug analysis.

**Сведения об авторах:** Самарина Татьяна Олеговна – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (samato13@mail.ru); Беклемишев Михаил Константинович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (mkb@analyt.chem.msu.ru).