

## ЦИФРОВАЯ ЦВЕТОМЕТРИЯ ИНДИКАТОРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМАРТФОНА И ХЕМОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ХИНОЛОНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

В. Г. Амелин<sup>1,2\*</sup>, З. А. Ч. Шаока<sup>1</sup>, Д. С. Большаков<sup>3</sup>, А. В. Третьяков<sup>2</sup>

УДК 543.068.8:543.426:543.062:577.182.99

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-1-84-93>

<sup>1</sup> Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Владимир, Россия; e-mail: [amelinvg@mail.ru](mailto:amelinvg@mail.ru)

<sup>2</sup> Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр гигиены и эпидемиологии в Владимирской области, Владимир, Россия

(Поступила 29 ноября 2021)

Разработан комбинированный подход для идентификации и определения антибиотиков хинолонового ряда в лекарственных препаратах с использованием цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции и хемометрического анализа. Изучена собственная флуоресценция хинолонов и сенсibilизированная хинолонами флуоресценция европия(III) на различных матрицах. Предложена тест-система, состоящая из четырех индикаторных зон. При облучении УФ-светом (365 нм) нанесенных на индикаторные зоны тест-систем растворов хинолонов наблюдается синяя на целлюлозной бумаге (ЦБ), пластинах для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), и розовая (ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu) флуоресценция. Интенсивность флуоресценции на поверхности матриц измерена с помощью смартфона. Показана возможность использования хемометрического анализа, позволяющего сократить время анализа и визуализировать данные исследования. Обработка данных проведена методами главных компонент, иерархического кластерного анализа и метода *k*-среднего с применением программного обеспечения XLSTAT. Проведены идентификация и оценка содержания антибиотиков хинолонового ряда в таблетированных формах с использованием хемометрического анализа. Градуировочные зависимости в методах PCA и *k*-среднего имеют логарифмический вид в диапазонах определяемых содержаний 0.5–250 мкг/мл ( $R^2 \geq 0.98$ ). Предложена методика определения фторхинолонов в лекарственных препаратах. Относительное стандартное отклонение не превышает 0.09.

**Ключевые слова:** хинолоны, цифровая цветометрия, хемометрический анализ, твердофазная флуоресценция, сенсibilизированная флуоресценция, тест-устройство, смартфон.

*A combined approach has been developed for the identification and determination of quinolone antibiotics in pharmaceuticals using solid-phase fluorescence digital colorimetry and chemometric analysis. The eigen fluorescence of quinolones and quinolone-sensitized fluorescence of europium(III) have been studied on various matrices. The paper proposes a test-system consisting of four indicator zones. Under irradiation with ultraviolet light (365 nm) of quinolone solutions applied to the indicator zones of test systems, there are observed blue fluorescence on cellulose paper (CP) and plates for high performance thin layer chromatography (HPTLC) and pink (CP–Eu, HPTLC–Eu) fluorescence. The measurement of the fluorescence intensity on the surface of the matrices has been carried out using a smartphone. The possibility of using chemometric*

## DIGITAL COLORIMETRY OF INDICATOR TEST-SYSTEMS USING A SMARTPHONE AND CHEMOMETRIC ANALYSIS IN DETERMINATION OF QUINOLONES IN PHARMACEUTICALS

V. G. Amelin<sup>1,2\*</sup>, Z. A. C. Shogah<sup>1</sup>, D. S. Bolshakov<sup>3</sup>, A. V. Tretyakov<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs, Vladimir, Russia; e-mail: [amelinvg@mail.ru](mailto:amelinvg@mail.ru);

<sup>2</sup> The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia;

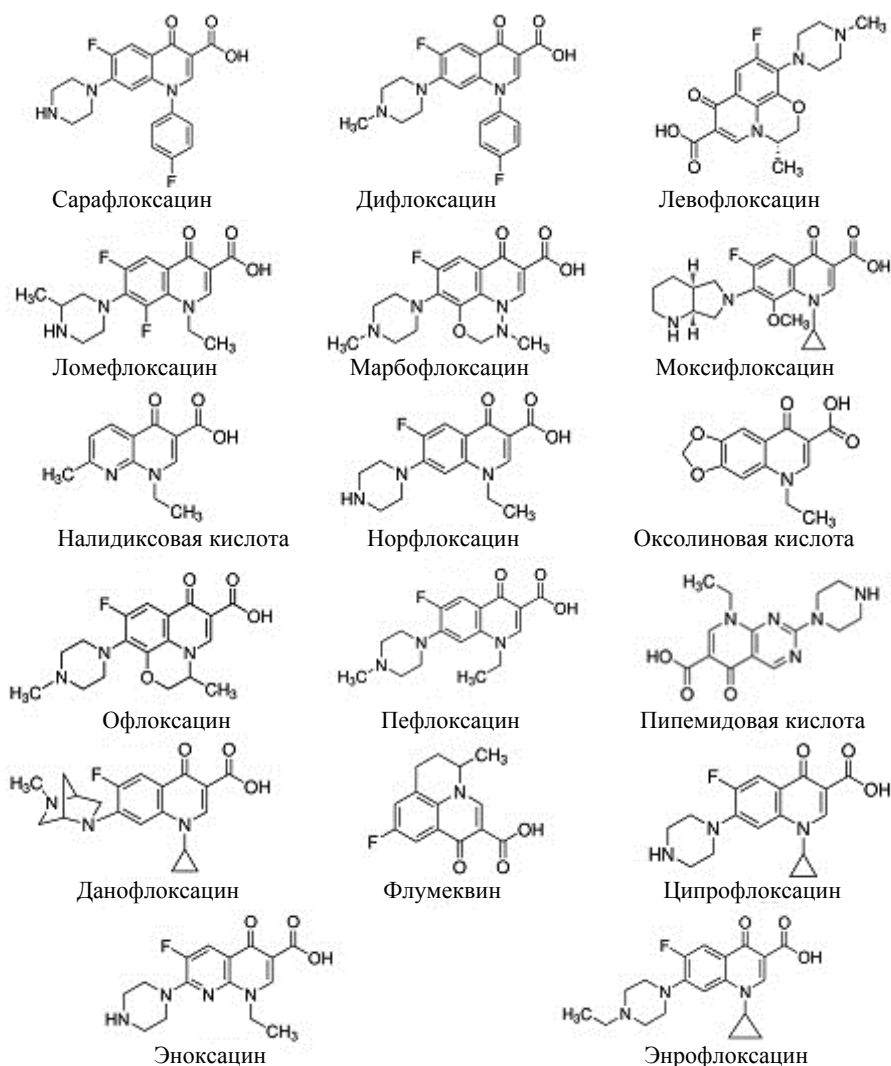
<sup>3</sup> Center for Hygiene and Epidemiology in the Vladimir Region, Vladimir, Russia)

analysis, which makes it possible to reduce the analysis time and visualize research data, has been shown. The data array was processed by principal component methods, hierarchical cluster analysis, and the *k*-mean method using the XLSTAT software. The identification and assessment of the quantitative content of quinolone antibiotics in tablet forms have been carried out using chemometric analysis. The calibration dependences in the PCA and *k*-mean methods have a logarithmic form in the ranges of the determined concentrations of 0.5–250 µg/ml ( $R^2 \geq 0.98$ ). A technique for the determination of fluoroquinolones in pharmaceuticals has been proposed. The relative standard deviation does not exceed 0.09.

**Keywords:** quinolones, digital colorimetry, chemometric analysis, solid-phase fluorescence, sensitized fluorescence, test-device, smartphone.

**Введение.** Высокие темпы развития фармацевтической промышленности — увеличение объемов производства готовой продукции и разработка новых лекарственных средств (ЛС) — возможны только в условиях эффективного функционирования системы оценки качества реализуемых лекарственных препаратов (ЛП). В связи с этим совершенствование имеющихся и внедрение новых подходов (в том числе экспресс-методов) актуальны для современной аналитической химии ЛС.

Лидирующие позиции по объемам розничного потребления занимают антибиотики — химические вещества, которые убивают (бактерициды) или подавляют рост (бактериостатики) бактериальных патогенов. Их используют в медицине для лечения широкого спектра бактериальных инфекций и в ветеринарии для предотвращения болезней, стимулирования роста, увеличения скорости набора веса, а также для уменьшения количества корма на единицу прироста. Среди антибактериальных препаратов широкого спектра действия следует выделить хинолоны и фторхинолоны:



Хинолоны представляют собой класс синтетических антибактериальных средств, которые используются в клинической практике с 1961 г. Первые представители этого класса (начиная с налидиксовой кислоты) не фторированы и обладают лишь узким спектром активности против грамотрицательных бактерий. Это так называемые хинолоны I поколения: налидиксовая, оксолиновая и пипемидовая кислоты. В клинической практике, как правило, подобные медикаменты заменяют более новыми ЛС. Последующие поколения хинолонов (начиная с норфлоксацина) обладают более широким спектром действия, они фторированы по С-6 атому углерода основной кольцевой структуры. Представителей II–IV поколений относят к фторхинолонам. Механизм действия соединений данного класса основан на подавлении синтеза бактериальной ДНК за счет связывания с внутриклеточными ферментами топоизомеразы и образования комплексов ЛС—фермент—ДНК.

Нормативным документом, регламентирующим требования к качеству ЛС на территории Российской Федерации, является Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) [1]. Несмотря на широкий спектр действующих веществ, относящихся к классу хинолонов, ГФ РФ предъявляет критерии оценки подлинности для ограниченного круга аналитов, а именно для левофлоксацина, офлоксацина и цiproфлоксацина, и описывает фундаментальный подход для оценки фармацевтических субстанций, используя большой арсенал аналитических методов. Среди основных можно выделить методы ИК-спектроскопии, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, титриметрические и спектрофотометрические методы. Подобный подход чрезвычайно трудоемок, требует использования дорогостоящего оборудования, токсичных растворителей и привлечение к работе высококвалифицированного персонала.

Основным аналитическим инструментом подтверждения качества готовых ЛП на основе антибиотиков хинолонового ряда является экстракционно-спектрофотометрический метод. Предлагаемые методики основаны на образовании ионных пар определяемых аналитов с анионными органическими красителями в кислой среде [2–4]. Последующее извлечение полученных ассоциатов проводили экстракцией соответствующим растворителем. Процедура определения цiproфлоксацина, левофлоксацина и офлоксацина в фармацевтических препаратах описана в [4]. Ионные ассоциаты фторхинолонов с бромтимоловым синим, окрашенные в желтый цвет, экстрагировали хлороформом. Для цiproфлоксацина, левофлоксацина и офлоксацина изучены спектральные характеристики при 420, 415 и 418 нм соответственно. Кроме того, проведена оптимизация условий экстракционно-спектрофотометрического определения заявленных ЛС: рН среды, концентрация красителя, время встряхивания (экстракции), природа экстрагирующего растворителя. При выбранных параметрах пределы обнаружения варьировались от 0.084 до 0.105 мкг/мл. Установлено, что в готовых ЛП вспомогательные компоненты не оказывают влияния на результаты анализа. Дополнительно изучена стехиометрия формирования ионных пар фторхинолонов с бромтимоловым синим, установлено соотношение 1:1.

Особенности химической структуры антибиотиков хинолонового ряда позволяют их молекулам флуоресцировать при облучении УФ-светом. Установлено, что интенсивность собственной флуоресценции повышается в 2–3 раза в мицеллярной среде додецилсульфата натрия [5–7]. Способность хинолонов образовывать хелатные комплексы с ионами металлов, в частности с европием(III), тербием(III), иттрием(III), позволяет существенно повысить чувствительность флуориметрического определения соединений данного класса. Непрямое возбуждение ионов лантаноидов приводит к сенсibilизированной хинолонами флуоресценции [8–13]. Подобное свойство редкоземельных элементов позволило развить целое направление в определении биологически активных веществ в объектах различной природы.

Сенсibilизированная гатифлоксацином флуоресценция европия(III) в мицеллах додецилбензолсульфоната натрия (ДБСН) используется для его определения в биологических жидкостях и ЛП [8]. Изучена система гатифлоксацин— $\text{Eu}^{3+}$ —ДБСН и установлено, что ДБСН значительно (в ~25 раз) увеличивает интенсивность флуоресценции бинарного хелатного комплекса гатифлоксацин— $\text{Eu}^{3+}$ . Оптимальные условия выполнения анализа:  $\lambda_{\text{возб}} = 338$  нм и  $\lambda_{\text{эм}} = 617$  нм, рН 7.5 при концентрации  $\text{Eu}^{3+} 3.0 \cdot 10^{-6}$  М и ДБСН —  $5.0 \cdot 10^{-5}$  М. Предел обнаружения гатифлоксацина  $1.0 \cdot 10^{-9}$  М, диапазон определяемых содержаний  $1.0 \cdot 10^{-8}$  М— $8.0 \cdot 10^{-7}$  пМ.

В [9] изучено влияние поверхностно-активных веществ и второго лиганда на флуоресцентные свойства хелата европия(III) с цiproфлоксацином и энрофлоксацином. Показано, что интенсивность флуоресценции комплексов европия с хинолонами в присутствии 1,10-фенантролина возрастает в четыре раза, а в мицеллах ПАВ еще в пять раз. Предел обнаружения антибиотиков  $2.3 \cdot 10^{-7}$  М. Разра-

ботанные методики определения ципрофлоксацина и энрофлоксацина апробированы на фармацевтическом препарате коммерческого производства и плазме крови.

С использованием метода капиллярного электрофореза разработана методика оценки качества ЛПП на основе фторхинолонов [14]. Выбраны оптимальные условия электрофоретического разделения смеси семи антибиотиков (в сочетании с четырьмя сульфаниламидами): ломефлоксацина, данофлоксацина, энноксацина, ципрофлоксацина, левофлоксацина, энрофлоксацина и пefлоксацина. С учетом физико-химических свойств определяемых компонентов применен метод капиллярного зонного электрофореза. Разделение проводили в капилляре внутренним диаметром 50 мкм при длине волны УФ-излучения 280 нм, температуре водяной рубашки капилляра 35 °С, напряжении высоковольтного блока +25 кВ, гидродинамическом вводе пробы 30 мбар×10 с, ведущем электролите, состоящем из 25 мМ фосфатного буферного раствора (рН 8.5). Диапазон определяемых содержаний действующих компонентов ЛПП (3÷5)—1000 мг/г для твердых и 0.001—0.50 мас.% для жидких препаратов. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.03.

Несмотря на преимущества описанных выше методик, их существенные недостатки не позволяют обеспечить экспресс-определение действующих веществ антибактериальных препаратов. Перспективным направлением в данной области является цифровая цветометрия [15—17]. Цветометрический метод позволяет проводить скрининговые исследования различных объектов, в том числе фармацевтических субстанций. Потенциал метода обусловлен мобильностью используемых цифровых и считывающих устройств, доступностью программного обеспечения, с помощью которого выполняется обработка полученной информации. В зависимости от выбора базисных компонентов цвета разработаны различные системы (RGB, CMYK, XYZ, Lab, HSB), предоставляющие исследователю возможность оптимизации и совершенствования предложенной им методологии. Дополнительное привлечение хемометрических методов способствует лучшей визуализации, классификации и обобщению большего объема полученных в ходе исследования данных.

Цель настоящей работы — разработка быстрого и простого способа идентификации и определения антибиотиков хинолонового ряда в лекарственных препаратах по их собственной флуоресценции и сенсibilизированной хинолонами флуоресценции европия(III) на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля при регистрации цветометрических характеристик с помощью смартфона и обработке данных с использованием хемометрического анализа.

**Эксперимент.** Для изучения оптических и цветометрических характеристик в качестве цветорегистрирующего устройства использован iPhone X (Apple, США), оснащенный специализированным программным обеспечением RGBer. Возбуждение флуоресценции проводили с помощью источника монохроматического излучения с  $\lambda = 365$  нм, детектора банкнот Dors 60 SYS-033278/277 (DORS, Китай) и осветителя люминесцентной лампы Вуда ОЛДД-01 (Россия). Применены аналитические весы Pioneer PA 214C специального класса точности с пределом взвешивания 0.1 мг (Ohaus Corporation, США), дозаторы Proline Biohit одноканальные механические переменного объема 2—20, 100—1000, 1000—5000 мкл (Biohit, Финляндия), политетрафторэтиленовые мембранные фильтры 25 мм с диаметром пор 0.20 мкм (Pall Corporation, США), полистирольные планшеты для иммуноферментного анализа.

Материалы — целлюлозная бумага (ЦБ) для хроматографии Whatman 17 Chr (Cytiva, США), пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) HPTLC Silica gel 60 (Merck, Германия).

В качестве реактивов использованы стандартные образцы хинолонов — сарафлоксацина, дифлоксацина, левофлоксацина, ломефлоксацина, марбофлоксацина, моксифлоксацина, налидиксовой кислоты, норфлоксацина, оксолиновой кислоты, офлоксацина, пefлоксацина, пипемидовой кислоты, данофлоксацина, флумеквина, ципрофлоксацина, энноксацина, энрофлоксацина (98—100 %, Sigma-Aldrich, США). Исходные стандартные растворы (1 мг/мл) готовили растворением точной навески препаратов в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных деионизированной водой (15—18 МОм×см, ОСТ 11 029.003-80). Применяли метанол (Fisher Scientific UK, Великобритания), соляную кислоту (х.ч., АО “БСК”), тетраборат натрия (Sigma-Aldrich, США), хлорид европия(III)  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, США).

*Подготовка матриц для сенсibilизированной флуоресценции европия (ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu).* Бумагу для хроматографии Whatman 17 Chr или пластину ВЭТСХ погружали в 0.001-М раствор хлорида европия на 1—2 мин, затем сушили в потоке теплого воздуха с помощью тепловентилятора. После высыхания матрицу помещали в 0.2 %-й раствор тетрабората натрия на 1—2 мин и сушили. Из

полученных индикаторных бумаг изготавливали тест-устройство. После нанесения 10 мкл пробы на индикаторные зоны и облучения их УФ-светом проводили измерения цветометрических параметров.

*Построение градуировочных зависимостей.* Стандартные растворы хинолонов концентрацией 1 мг/мл приготовлены растворением точных навесок в метаноле. Рабочие растворы концентраций 500, 250, 125, ... 1, 0 мкг/мл готовили последовательным разбавлением исходного раствора деионизированной водой в полистирольном планшете для иммуоферментного анализа. Полученные растворы объемом 5 мкл наносили на матрицу с помощью механического дозатора. После высыхания пятна облучали монохроматическим УФ-излучением (365 нм) и измеряли смартфоном цветометрические характеристики. Аналитический сигнал ( $A_r$ ) в системе RGB:

$$A_r = \sqrt{(R_0 - R_x)^2 + (G_0 - G_x)^2 + (B_0 - B_x)^2},$$

где  $R_0$ ,  $G_0$ ,  $B_0$  и  $R_x$ ,  $G_x$ ,  $B_x$  — интенсивности красного, зеленого, синего цветов холостой и анализируемой проб соответственно.

*Определение хинолонов в лекарственных препаратах.* Одну таблетку ЛП помещали в колбу вместимостью 100 мл, вливали 1 мл 1 М раствора HCl и объем в колбе до метки доводили деионизированной водой, перемешивали до полного растворения таблетки. Отбирали 1 мл полученного раствора и разбавляли деионизированной водой в колбе вместимостью 25—50 мл, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр 0.20 мкм. Отбирали 5 мкл полученного раствора и наносили на ЦБ или пластину ВЭТСХ. После высыхания пятна облучали УФ-светом (365 нм) и измеряли смартфоном цветометрические характеристики, по уравнению градуировочной зависимости рассчитывали содержание хинолонов в таблетке с учетом разбавления пробы. Жидкие ЛП перед анализом разбавляли деионизированной водой.

*Хемометрический анализ.* Для идентификации и определения антибиотиков хинолонового ряда в ЛП применяли метод главных компонент (РСА), иерархический кластерный анализ (НСА) и метод  $k$ -среднего ( $k$ -means) с использованием программного обеспечения XLSTAT (v. 2021.3.1).

**Результаты и их обсуждение.** Хинолоны на поверхности целлюлозной бумаги (ЦБ, ЦБ–Eu) и силикагеля (ВЭТСХ, ВЭТСХ–Eu) проявляют флуоресцирующие свойства. При облучении УФ-светом (365 нм) наблюдается преимущественно синяя, бирюзовая (ЦБ, ВЭТСХ) флуоресценция и красная, розовая (ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu) при использовании матриц, пропитанных солью европия(III) и тетрабората натрия. Слабый аналитический сигнал на ЦБ наблюдали для налидиксовой, оксолиновой, пипемидовой кислот, флумеквина и марбофлоксацина.

Для получения матриц ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu изучено влияние на аналитический сигнал концентрации пропиточных растворов европия (0.0001—0.01 М) и тетрабората натрия (0—1 %). Установлено, что значение  $A_r$  максимально при использовании 0.001 М раствора хлорида европия(III) для пропитки матриц. В отсутствие тетрабората натрия при нанесении растворов хинолонов на ЦБ и ВЭТСХ наблюдали розовое флуоресцирующее кольцо по краям пятна. Повторная пропитка матриц раствором тетрабората натрия (оптимален 0.2 %-й раствор) привела к равномерному окрашиванию флуоресцирующего пятна, что связано, вероятно, с образованием и закреплением в порах ЦБ и ВЭТСХ

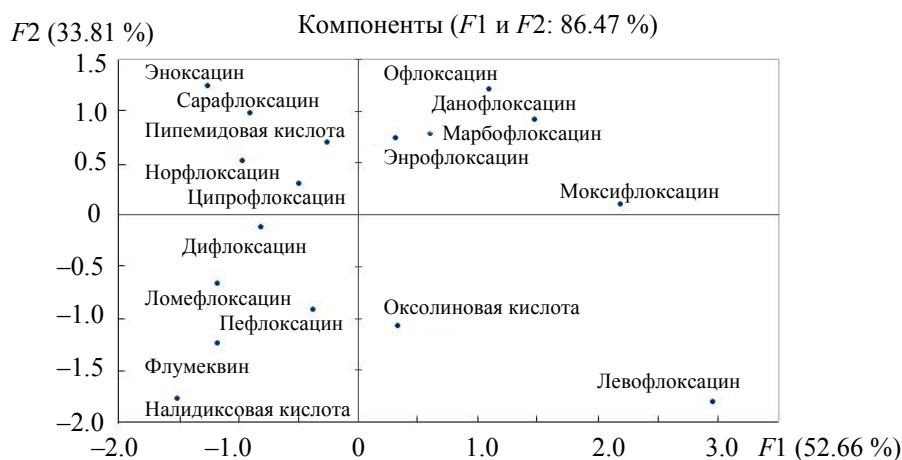


Рис. 1. РСА для идентификации хинолонов при концентрации 125 мкг/мл

гидроксида европия(III). Методом цифровой цветометрии проанализированы 17 хинолонов при различных концентрациях. Цветометрические данные (аналитический сигнал  $A_r$ ) для четырех индикаторных зон и десяти концентраций обработаны методом РСА, получены матрицы счетов и нагрузок. Четкое различие хинолонов при концентрации 125 мкг/мл (86.47 %) получено для первых двух главных компонент ( $F1$ ,  $F2$ ) (рис. 1).

На рис. 2 показаны графики РСА для первых двух главных компонент при различных концентрациях хинолонов. Видна дискриминация хинолонов (95—98 %) в зависимости от концентрации. При малых концентрациях идентифицируемые хинолоны находятся в квадрантах 1 и 3, при больших — в квадрантах 2 и 4. График нагрузок показал ответственность >96 % за различие хинолонов для

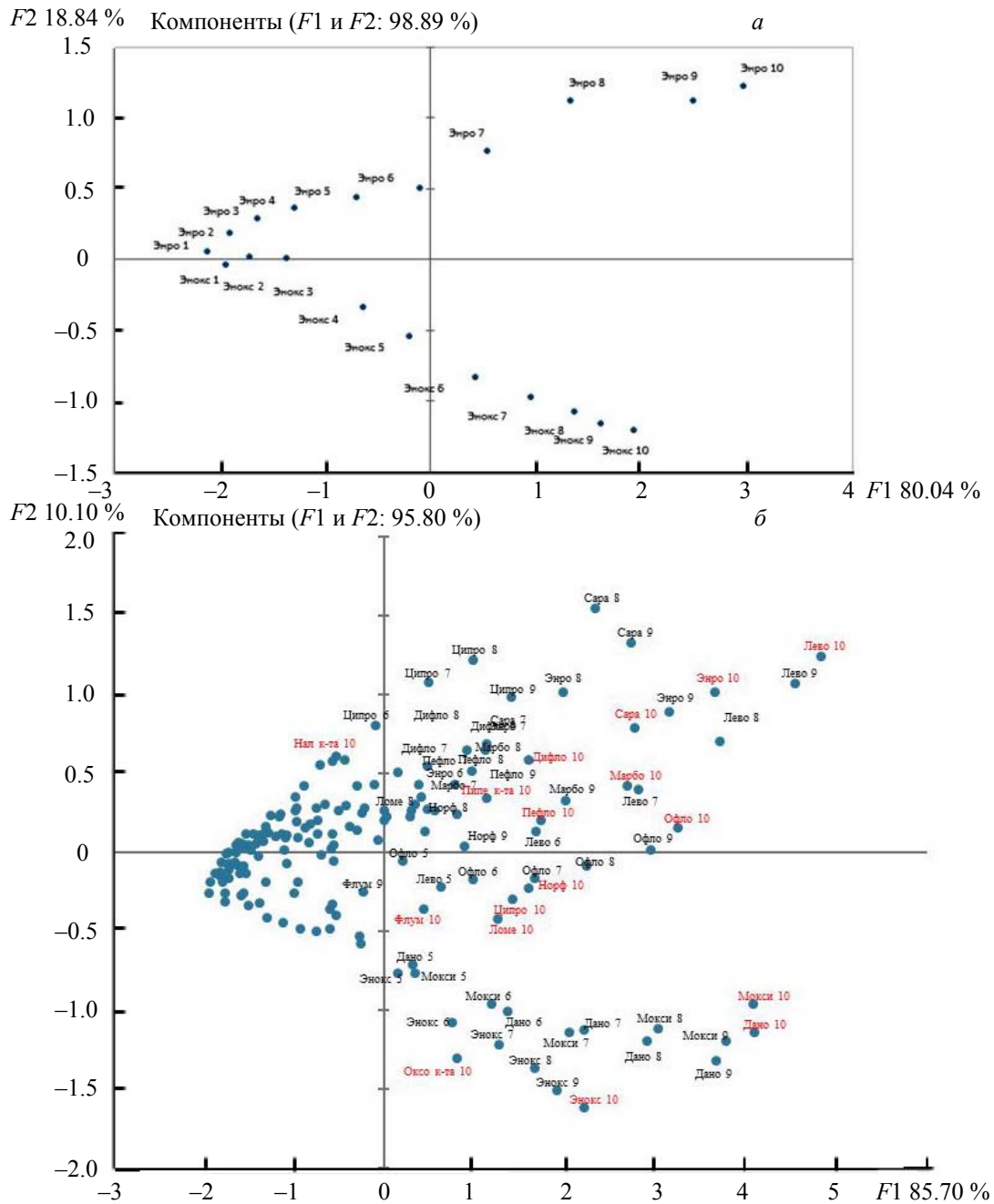


Рис. 2. РСА для идентификации эноксацина и энрофлоксацина (а) и 17 хинолонов (б) в 10 последовательных концентрациях 0.5 (1), 1.0 (2), 2.0 (3), 4.0 (4), 8.0 (5), 16.0 (6), 32.0 (7), 64.0 (8), 125.0 (9) и 250.0 мкг/мл (10)

трех переменных (ЦБ–Eu, ВЭТСХ, ВЭТСХ–Eu) из четырех (ЦБ, ЦБ–Eu, ВЭТСХ, ВЭТСХ–Eu). Наблюдается логарифмическая зависимость между компонентой  $F1$  и концентрацией хинолонов в диапазоне 0.5—250 мкг/мл с коэффициентом корреляции  $R^2 \geq 0.98$  (рис. 3, а, табл. 1). Данная зависимость использована в качестве градуировочной при определении концентрации хинолонов.

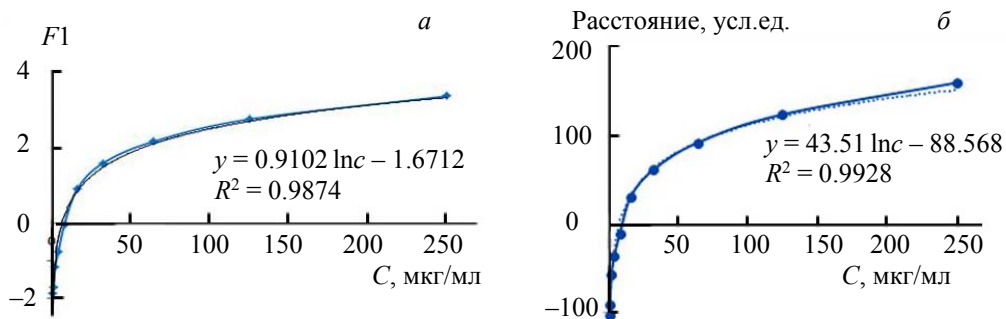


Рис. 3. Градуировочные зависимости для данофлоксацина в методе PCA (а) и сарафлоксацина в методе  $k$ -means (б)

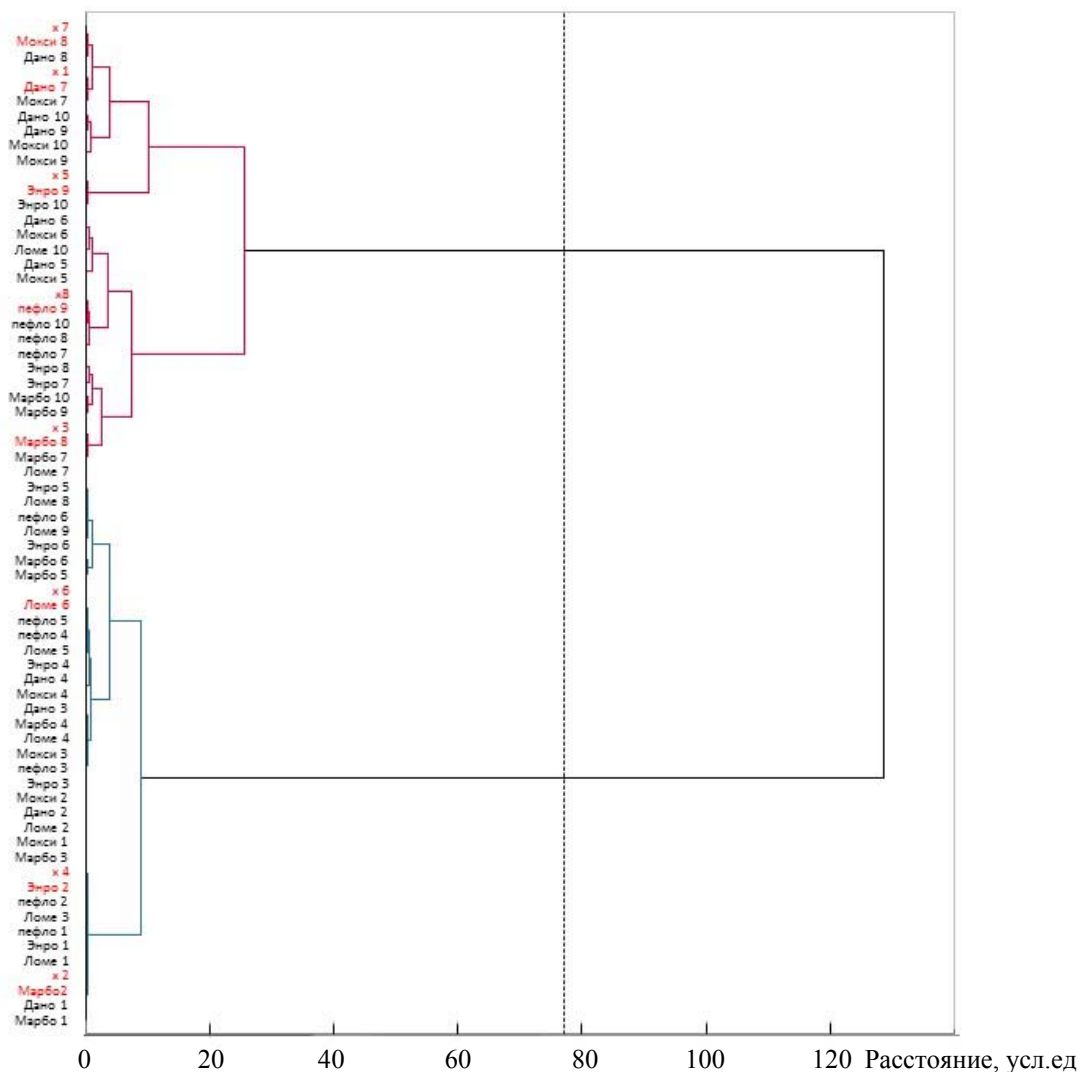


Рис. 4. Дендрограмма для 17 хинолонов в 10 последовательных концентрациях: 0.5 (1), 1.0 (2), 2.0 (3), 4.0 (4), 8.0 (5), 16.0 (6), 32.0 (7), 64.0 (8), 125.0 (9), 250.0 мкг/мл (10) (X — идентифицируемые хинолоны)

Использование метода иерархического кластерного анализа позволило идентифицировать и определить концентрацию хинолонов (рис. 4). На дендрограмме отдельные кластеры образуют хинолоны с различными концентрациями. Идентифицируемые хинолоны ( $X$ ) выделены в кластеры с нулевым или небольшим расстоянием от аналогичных, используемых для обучающей выборки. Концентрация хинолонов определена по градуировочной зависимости  $F1-c$  (табл. 2).

**Т а б л и ц а 1. Уравнения градуировочных зависимостей для определения хинолонов, полученные методами PCA и  $k$ -means в диапазоне определяемых содержаний 0.5—250 мкг/мл**

Хинолон	Метод $k$ -means	$R^2$	Метод PCA	$R^2$
Моксифлоксацин	$y = 66.851 \ln c - 84.969$	0.9854	$y = 1.0106 \ln c - 1.4936$	0.9822
Левифлоксацин	$y = 59.915 \ln c - 81.542$	0.9907	$y = 1.1376 \ln c - 1.5868$	0.9800
Энрофлоксацин	$y = 43.41 \ln c - 87.092$	0.9812	$y = 0.7919 \ln c - 1.5907$	0.9801
Марбофлоксацин	$y = 47.9 \ln c - 100.91$	0.9828	$y = 0.6607 \ln c - 1.7861$	0.9852
Пефлоксацин	$y = 32.663 \ln c - 93.112$	0.9843	$y = 0.5623 \ln c - 1.5567$	0.9879
Дифлоксацин	$y = 31.267 \ln c - 96.937$	0.9888	$y = 0.5078 \ln c - 1.6691$	0.9859
Ломефлоксацин	$y = 23.148 \ln c - 96.001$	0.9858	$y = 0.3858 \ln c - 1.5857$	0.9962
Налидиксовая кислота	$y = 28.198 \ln c - 98.645$	0.9854	$y = 0.2222 \ln c - 1.6246$	0.9952
Эноксацин	$y = 47.922 \ln c - 70.501$	0.9840	$y = 0.6768 \ln c - 1.2152$	0.9934
Норфлоксацин	$y = 35.833 \ln c - 93.896$	0.9812	$y = 0.4935 \ln c - 1.6139$	0.9848
Офлоксацин	$y = 46.739 \ln c - 79.098$	0.9911	$y = 0.8411 \ln c - 1.4334$	0.9886
Пипемидовая кислота	$y = 36.495 \ln c - 98.043$	0.9813	$y = 0.4225 \ln c - 1.5052$	0.9966
Сарафлоксацин	$y = 43.51 \ln c - 88.568$	0.9928	$y = 0.7837 \ln c - 1.6595$	0.9836
Флумеквин	$y = 13.842 \ln c - 96.715$	0.9904	$y = 0.3178 \ln c - 1.5945$	0.9883
Ципрофлоксацин	$y = 34.903 \ln c - 90.666$	0.9928	$y = 0.6169 \ln c - 1.6581$	0.9901
Данофлоксацин	$y = 62.836 \ln c - 82.756$	0.9912	$y = 1.0222 \ln c - 1.5282$	0.9863
Оксалиновая кислота	$y = 33.076 \ln c - 100.01$	0.9818	$y = 0.2984 \ln c - 1.7265$	0.9934

**Т а б л и ц а 2. Идентификация и определение хинолонов методами PCA (числитель) и  $k$ -means (знаменатель)**

Хинолон	$F1$	Идентифицировано (расстояние от цент- роида, усл. ед)	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Относительная погрешность, %
	Расстояние от цен- троида, усл. ед.				
X1	$\frac{2.2}{140}$	Данофлоксацин 7 (139)	32	$\frac{33}{34}$	$\frac{3.1}{6.3}$
X2	$\frac{-1.7}{-97}$	Марбофлоксацин 2 (-98)	1	$\frac{1.2}{1.1}$	$\frac{20}{10}$
X3	$\frac{0.98}{100}$	Марбофлоксацин 8 (-104)	64	$\frac{65}{66}$	$\frac{1.5}{3.1}$
X4	$\frac{-1.5}{-79}$	Энрофлоксацин 2 (-79)	1	$\frac{1.2}{1.2}$	$\frac{20}{20}$
X5	$\frac{3.2}{125}$	Энрофлоксацин 9 (124)	125	$\frac{133}{138}$	$\frac{6.4}{10}$
X6	$\frac{-0.57}{-37}$	Ломефлоксацин 6 (-36)	16	$\frac{19}{13}$	$\frac{19}{-18}$
X7	$\frac{3.1}{197}$	Моксифлоксацин 8 (199)	64	$\frac{65}{67}$	$\frac{1.5}{4.7}$
X8	$\frac{1.1}{64}$	Пефлофлоксацин 9 (65)	125	$\frac{118}{116}$	$\frac{-5.6}{-7.2}$

Идентификация и определение концентрации проведены также методом  $k$ -среднего по расстоянию от центроида до хинолона. В этом случае градуировочные графики представляют собой зависимость расстояния от центроида (лемефлоксацин 8) до центральной точки кластера хинолона с определенной концентрацией. Для хинолонов с концентрациями в 1 и 3 квадрантах расстояние от центроида взято со знаком минус. Градуировочные зависимости имеют логарифмический вид с коэффициентом корреляции  $R^2 \geq 0.98$  (рис. 3, б, табл. 1). Как видно из табл. 2, расхождения в расстояниях от центроида хинолонов  $X$  и хинолонов, используемых для обучающей выборки, незначительны, что приводит к 100 %-й идентификации.

При выбранных параметрах твердофазно-флуориметрического определения хинолонов по собственной и сенсibilизированной флуоресценции европия(III) проведена оценка качества готовых ЛП медицинского (ципрофлоксацин, левофлоксацин, ципролет, вигамокс, флоксал) и ветеринарного назначения (байтрил). В табл. 3 представлены результаты определения хинолонов в ЛП по цветометрии индикаторных бумаг с использованием хемометрического анализа. Результаты подтверждают соответствие содержания действующих веществ ЛП заявленному производителем на упаковке. Относительное стандартное отклонение не превышает 0.09.

**Т а б л и ц а 3.** Результаты определения хинолонов в лекарственных препаратах при обработке данных методами PCA (числитель) и  $k$ -means (знаменатель) ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Наименование препарата (действующее вещество, содержание)	Найдено	$s_r$
Ципрофлоксацин (ципрофлоксацин, 500 мг)	$517 \pm 18$ $530 \pm 20$	$0.08$ $0.09$
Левофлоксацин (левофлоксацин, 250 мг)	$260 \pm 7$ $253 \pm 9$	$0.02$ $0.03$
Ципролет (ципрофлоксацин, 500 мг)	$498 \pm 15$ $508 \pm 14$	$0.07$ $0.06$
Вигамокс (моксифлоксацин, 0.5%)	$0.48 \pm 0.03$ $0.49 \pm 0.02$	$0.02$ $0.01$
Флоксал (офлоксацин, 3 мг/мл)	$2.9 \pm 0.2$ $2.8 \pm 0.3$	$0.03$ $0.04$
Байтрил (энрофлоксацин, 5%)	$4.8 \pm 0.6$ $4.9 \pm 0.5$	$0.05$ $0.04$

**Заключение.** Для идентификации и определения антибактериальных веществ хинолонового ряда в лекарственных препаратах предложено сочетание цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции и хемометрического анализа. Разработана тест-система, состоящая из четырех индикаторных зон. Для измерения интенсивности собственной флуоресценции антибиотиков и сенсibilизированной хинолонами флуоресценции европия(III) на индикаторных зонах использовано цветорегистрирующее устройство (смартфон). После расчета аналитического сигнала дальнейшая хемометрическая обработка данных проведена несколькими методами с использованием специализированного программного продукта. Предложенный подход апробирован на коммерческих лекарственных препаратах медицинского и ветеринарного назначения.

- [1] Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд., Т. III, Москва (2018)  
 [2] T. D. Nguyen, H. B. Le, T. O. Dong, T. D. Pham. J. Anal. Methods Chem. (2018) 1—11  
 [3] S. Mostafa, M. El-Sadek, E. A. Alla. Pharm. Biomed. Anal., **28** (2002) 173—180  
 [4] A. S. Amin, A. A. E. Gouda, R. El-Sheikh, F. Zahran. Spectrochim. Acta A, **67** (2007) 1306—1312  
 [5] J. A. O. Gonzalez, M. C. Mochon, F. J. B. de la Rosa. Talanta, **52** (2000) 1149—1156  
 [6] J. A. Ocana, F. J. Barragan, M. Callejon. J. Pharm. Biomed. Anal., **37** (2005) 327—332  
 [7] J. A. Ocana, F. J. Barragan, M. Callejon. Talanta, **63** (2004) 691—697  
 [8] C. Guo, P. Dong, Z. Chu, L. Wang, W. Jiang. Luminescence, **23** (2008) 7—13  
 [9] S. N. Shtykov, T. D. Smirnova, Y. G. Bylinkin, N. V. Kalashnikova, D. A. Zhemerichkin. J. Anal. Chem., **62** (2007) 136—140

- 
- [10] **S. Beltyukova, O. Teslyuk, A. Egorova, E. Tselik.** *J. Fluorescence*, **12**, N 2 (2002) 269—272
- [11] **A. Egorova, S. Beltyukova, O. Teslyuk.** *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21** (1999) 585—590
- [12] **R. C. Rodriguez-Diaz, M. P. Aguilar-Caballo, A. Gomez-Hens.** *Anal. Chim. Acta*, **494** (2003) 55—62
- [13] **X. Zhu, A. Gong, S. Yu.** *Spectrochim. Acta A*, **69** (2008) 478—482
- [14] **Д. С. Большаков, В. Г. Амелин, Т. Б. Никешина.** *Журн. аналит. химии*, **71**, № 1 (2016) 97—104
- [15] **О. В. Моногарова, К. В. Осколок, В. В. Апяри.** *Журн. аналит. химии*, **73**, № 11 (2018) 857—867
- [16] **В. В. Апяри, М. В. Горбунова, А. И. Исаченко, С. Г. Дмитриенко, Ю. А. Золотов.** *Журн. аналит. химии*, **72**, № 11 (2017) 963—977
- [17] **В. М. Иванов, О. В. Кузнецова.** *Успехи химии*, **70**, № 5 (2001) 411—428