

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Саратовский национальный исследовательский государственный  
университет имени Н.Г. Чернышевского»

*На правах рукописи*

**ТУМСКАЯ АНАСТАСИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА**

**ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ *БЕТА*-ЛАКТАМНЫХ  
АНТИБИОТИКОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:

доцент, к.х.н. Косырева Ирина Владимировна

Саратов – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	10
<b>ГЛАВА 1. Методы определения антибиотиков</b> .....	10
1.1. Инструментальные способы.....	10
1.2. Экспресс-варианты.....	21
1.3. Применение цветометрии.....	28
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	39
<b>ГЛАВА 2. Реактивы, аппаратура, методики</b> .....	39
2.1 Посуда и реактивы.....	39
2.2 Оборудование и методы.....	41
2.3 Методики.....	43
<b>ГЛАВА 3. Индикаторные системы. Обоснование выбора и характеристика</b> .....	46
3.1. Аналиты и объекты исследования .....	46
3.2. ИК- и УФ-спектроскопическое исследование антибиотиков.....	50
3.3. Типы индикаторных реакций, применяемых в работе .....	54
3.4. Оптимизация условий иммобилизации реагентов на целлюлозную матрицу.....	62
<b>ГЛАВА 4. Изучение особенностей взаимодействия <math>\beta</math>-лактамных антибиотиков с иммобилизованными парадиметиламинобензальдегидом, нингидрином, реактивом Фелинга, сульфатом меди (II) с применением цифровых технологий</b> .....	69
4.1. Спектроскопическое исследование систем .....	69
4.2. Оптимизация условий взаимодействия $\beta$ -лактамных антибиотиков с иммобилизованными реагентами с применением цифровых технологий.....	77

4.3. Оценка влияния условий регистрации параметров цветности и типа фоторегистрирующего устройства .....	87
<b>ГЛАВА 5. Колориметрическое определение <math>\beta</math>-лактамных антибиотиков в лекарственных препаратах.....</b>	<b>90</b>
5.1. Визуальные способы.....	90
5.2. Цветометрические варианты .....	98
5.2.1 Построение лепестковых диаграмм.....	102
5.3. Оценка влияния мешающих компонентов.....	107
5.4. Оценка правильности результатов .....	108
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>115</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>116</b>

## СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Sr – стандартное отклонение

I<sub>П</sub> – интенсивность цветового параметра

ΔI<sub>П</sub> – изменение интенсивности цветового параметра

аПАВ – анионное ПАВ

АМК – амоксициллина тригидрат

БАВ – биологически активное вещество

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДДС – додецилсульфат натрия

ДМАБ – *para*-диметиламинобензальдегид

ДОС – диапазон определяемых содержаний

ИБ – индикаторная бумага

ИН – интервал ненадежности

кПАВ – катионное ПАВ

нПАВ – неионное ПАВ

ОП-10 – оксиэтилированный алкилфенол

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПрО – предел обнаружения

СДО – спектроскопия диффузного отражения

СФМ – спектрофотометрия

ЦПХ – цетилпиридиний хлорид

ЦФЗ – цефазолин

ЦФЛ - цефалексин

ЦФР – цефуроксим

ЦФТ - цефотаксим

ЦФТР - цефтриаксон

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Одной из важных задач аналитической химии является разработка эффективных и экспрессных методов определения действующих веществ при контроле качества лекарственных препаратов (ЛП). В частности актуальна проблема фальсификации, например, экспресс-определение антибиотиков в различных лекарственных формах (таблетках, капсулах, суспензиях и т.д.).

Для быстрого, дешевого внелабораторного определения различных антибактериальных препаратов положительно себя зарекомендовали экспрессные, в том числе и тест-методы анализа. Такие методы часто применяют для предварительного скрининга анализируемых проб. Важными требованиями, предъявляемыми к индикаторным реакциям, являются: скорость, простота и контрастность перехода окраски при формировании аналитической формы. Регистрация аналитического сигнала при этом возможна не только визуальная, но и с применением цветометрии.

Цветометрические методики в комбинации с цифровой обработкой изображений позволяют расширить области применения и улучшить чувствительность способов внелабораторного анализа. Применяют координаты цвета, светлоту, насыщенность, цветовой тон и др. К преимуществам применения метода цифровой цветометрии можно отнести экономичность, простоту выполнения, возможность сохранения информации в электронном формате, проведение анализа как жидких, так и твердых образцов.

**Цель исследования** – разработка способов экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков с применением цифровых технологий, в том числе авторского приложения для смартфона.

**Для достижения цели были поставлены следующие задачи:**

1. Выбор индикаторных реакций для экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Изучение взаимодействия антибиотиков с

различными реагентами методами ИК-, видимой (СФМ), УФ-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения (СДО).

2. Изучение условий иммобилизации реагентов на твердую подложку при варьировании ее типа, концентрации реактантов, времени и температуры.
3. Оптимизация условий реакций антибиотиков с иммобилизованными реагентами с применением цифровых технологий.
4. Разработка методик визуального и цветометрического определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков в лекарственных препаратах.

**Методы исследования.** Для решения поставленных в работе задач применяли методы УФ-, ИК- и видимой спектроскопии, спектроскопии диффузного отражения (СДО), цифровой цветометрии. Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием цифровых технологий, а именно разработанных авторских программ приложения по обработке изображений к смартфону на базе Android, online-программы по обработке RGB-параметров и программы Adobe Photoshop®.

#### **Научная новизна.**

Для определения  $\beta$ -лактамных антибиотиков предложены четыре индикаторные системы: целлюлозная матрица – иммобилизованный реагент (*пара*-диметиламинобензальдегид, нингидрин,  $\text{CuSO}_4$  и реактив Фелинга). Применен цветометрический подход, состоящий в регистрации изменений интенсивностей соответствующих параметров ( $\Delta I_{\text{П}}$ ) наряду с методами ИК-, видимой, УФ-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения для оптимизации как условий иммобилизации реагентов на подложку, так и особенностей формирования соответствующих аналитических форм.

Предложены оригинальные методики визуального и цветометрического экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков в ЛП. Впервые разработано авторское приложение для смартфона, позволяющего исследователю в режиме реального времени получать результат количественного определения аналита.

### **Практическая значимость.**

Предложены индикаторные бумаги (ИБ) для визуального и цветометрического экспресс-определения некоторых антибактериальных препаратов группы  $\beta$ -лактамов, входящих в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения, а именно амоксициллина, цефалексина, цефотаксима, цефуроксима, цефазолина и цефтриаксона для оценки их подлинности и на уровне от 0.25 до 16 мг/мл в капсулах, таблетках и порошках.

Авторское приложение по обработке изображений к смартфону позволяет в режиме реального времени получать концентрацию антибиотиков и может быть реализовано для цветометрического экспресс-определения и других аналитов.

### **Автор выносит на защиту:**

1. Данные исследования методами ИК-, видимой и УФ-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражении взаимодействия  $\beta$ -лактамных антибиотиков с *para*-диметиламинобензальдегидом, нингидрином,  $\text{CuSO}_4$  и реактивом Фелинга.

2. Результаты по иммобилизации исследованных реагентов на целлюлозную матрицу при варьировании ее типа, концентрации реактантов, времени и температуры высушивания.

3. Особенности взаимодействия  $\beta$ -лактамных антибиотиков с иммобилизованными реагентами с применением цифровых технологий, а именно, с помощью авторских программ (приложение по обработке изображений к смартфону на базе Android и online-программа по обработке RGB-параметров) и программы Adobe Photoshop<sup>®</sup>.

4. Методики визуального и цветометрического экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков в лекарственных препаратах.

**Личный вклад автора** заключался в постановке задач, а также в выполнении основных теоретических и экспериментальных работ по

ключевым направлениям исследования. В диссертации обобщены результаты, полученные лично автором совместно с соавторами публикаций.

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на VII и IX международной научной конференции «Компьютерные науки и информационные технологии» (Саратов, 2018, 2021), научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019, 2020, 2022» (Москва, 2019, 2022), XI Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды (Пермь, 2019), XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2019), II Всероссийской конференции «Химия биологически активных веществ» с международным участием (Саратов, 2019), XIV Всероссийской интерактивной (с международным участием) конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2020, 2021), XI всероссийской научной конференции и школе «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2021), XXV Saratov Fall Meeting «International Symposium optics and Biophotonics» (Саратов, 2021), IV Съезде аналитиков России (Москва, 2022).

**Публикации.** Опубликовано 50 работ, из них 30 по теме диссертации: 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus, 12 статей в сборниках научных трудов, 12 тезисов докладов конференций.

**Степень достоверности** результатов обеспечена грамотной постановкой эксперимента, применением современных методов исследования и анализа, непротиворечивостью результатов эксперимента по сравнению с известными в литературе данными, а также взаимной корреляцией результатов, их статистической проработкой.

**Финансовая поддержка** работы осуществлялась в рамках гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90020 и гранта РНФ в рамках научного проекта №22-23-00420.



**Объем, логика и структура работы** обусловлены поставленной целью и сформулированными задачами исследования, а также требованиями, предъявляемыми к диссертационным работам. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, схемы и графические иллюстрации. Общий объем диссертации составляет 135 страниц, включая 31 рисунок и 34 таблицы.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. Методы определения антибиотиков

#### 1.1. Инструментальные способы

К антибиотикам относят продукты жизнедеятельности (или их синтетические аналоги) живых клеток, избирательно подавляющих функционирование других клеток - микроорганизмов, опухолей и т.д. По химической структуре выделяют основные классы антибиотиков:  $\beta$ -лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, монолактамы); макролиды и группа линкомицина, стероиды, тетрациклины, хлорамфеникол (левомицетин) и его препараты, аминогликозиды, пептидные антибиотики (полимиксины, ванкомицин), полиены и другие. Антибактериальные агенты различной химической природы широко применяются в медицинской практике для лечения инфекционных заболеваний человека и животных [1].

$\beta$ -Лактамные антибиотики ( $\beta$ -лактамы) отличаются широким спектром антибактериальной активности в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Большинство входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения [2].  $\beta$ -Лактамные антибиотики включают два основных класса: пенициллины и цефалоспорины. Оба класса имеют  $\beta$ -лактамно кольцо как общую структурную особенность, являющуюся структурной предпосылкой антибактериальной активности.

На  $\beta$ -лактамы антибиотики приходится около 60% всех производимых антибиотиков [3]. Благодаря высокой активности и минимальным побочным эффектам они являются наиболее часто используемым классом антибактериальных препаратов для лечения различных инфекционных заболеваний человека и животных, а также тяжелых госпитальных инфекций.

В настоящее время при анализе лекарственных препаратов, в том числе антибактериальных, в основном, применяют современные физико-химические методы, обеспечивающие получение необходимой информации

о качественном и количественном составе анализируемого объекта. С помощью таких методов проводят идентификацию различных групп лекарственных средств, их стандартных образцов, а также таблеток, капсул, мазей и других форм лекарств, применяемых в лечебной практике [4, 5]. В табл. 1.1 представлены некоторые инструментальные методы определения антибактериальных препаратов, в том числе группы  $\beta$ -лактамов с пределом обнаружения до 3 нг/мл.

Наиболее доступны и просты фотометрические методы, в частности, инфракрасная (ИК) и ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия и фотометрия в видимой области. Эти методы включены в Государственную и Международную фармакопеи. Также широко распространены такие методы как, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [19, 25], масс-спектрометрия и электрохимические методы [6, 20, 21, 24]

Спектрофотометрические методы были разработаны для количественного определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков (тригидрата амоксициллина, натрия цефоперазона, моногидрата цефадроксила и безводного цефпрозила) в лекарственных формах, а также в их фармацевтических составах путем их нитрования с последующим комплексообразованием с нуклеофильным реагентом; нитрозирования и последующего хелатирования металла; взаимодействия с diazo-реагентом либо взаимодействия с медью и экстракция полученного хелата в хлороформ [7].

При определении некоторых антибиотиков, таких как ампициллин, диклуксациллин, флуклоксациллин и амоксициллин разработан спектрофотометрический метод, заключается в образовании ионных пар между исследуемыми препаратами и неорганическим комплексом Mo (V) – тиоцианат с последующей его экстракцией метиленхлоридом [8]. Предел обнаружения составляет 0.017, 0.061, 0.014 и 0.073 мкг/см для ампициллина, диклуксациллина, флуклоксациллина и амоксициллина соответственно.

Разработан метод определения широкого спектра антибиотиков с использованием платформы масс-спектрометрии высокого разрешения для использования в отделениях интенсивной терапии [9]. Для количественного определения пенициллинов (амоксциллин, оксациллин, пиперациллин и тикарциллин), цефалоспоринов (цефотаксим, цефтазидим и цефтриаксон), хинолонов (офлоксацин и ципрофлоксацин), карбапенемов и других. Образцы плазмы (100 мкл) добавляли в раствор внутреннего стандарта с последующим осаждением белка. Разделение осуществлялось на колонке Assisore C18, которая позволяла проводить анализ проб каждые 9 минут.

На сенсibilизированной люминесценции ионов европия (III) в системе тетрациклин –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – Fe(II)/Fe(III) основано хемилюминесцентное определение тетрациклина в меде. Предел обнаружения составляет  $5.0 \cdot 10^{-8}$  моль/л [10].

Для одновременного определения нескольких антибиотиков бета-лактаминового ряда в плазме или сыворотке крови применяют способы, основанные на хроматографических методах [11, 12, 13]. Необходимо отметить, что лишь немногие исследователи [14, 15] определяют стабильность крови и плазмы, хотя  $\beta$ -лактамы обычно считаются относительно нестабильными [16]. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектированием (ВЭЖХ-МС) является предпочтительным методом обнаружения  $\beta$ -лактамов в пищевых продуктах [17]. Несмотря на высокую селективность данного метода детектирования, необходимо предварительное хроматографическое разделение аналитов [12, 19, 25].

Таблица 1.1. Инструментальные способы определения некоторых антибактериальных препаратов

Аналит	Метод	Реагент/ Элюент/ датчик	Методика/ Пробоподготовка/Условия определения/объект	ДОС	ПрО	Литера- тура
Амоксицил- лин	ИК- спектроско- пия	-	ИК-спектр полученного амоксициллина тригидрата, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца/ЛП	-	-	[18]
	Тонкослой- ная хроматог- рафия (ТСХ)	-	Подвижная фаза: метанол – хлороформ – пиридин 90:80:10 (о/о/о). На хроматограмме испытуемого раствора должна наблюдаться зона адсорбции по положению, размеру и интенсивности окрашивания соответствующая зоне адсорбции на хроматограмме раствора сравнения	-	-	

	ВЭЖХ/МС	Элюэнт - ацетонитрил	Экстракция с использованием фосфатного буферного раствора, ацетонитрила и метанола. Смесь выпаривают досуха в атмосфере азота и добавляют водный раствор ацетонитрила. После центрифугируют, супернатант фильтруют через фильтр 0.22 мкм/ ЛП	0.1-100 мкг/кг	0.5 мкг/кг	[19]
	Спектрофотометрия	Коньгаты НЧ серебра с кверцетагетином	Измерение поглощения (410 нм) комплекса красного цвета, образующегося при взаимодействии АМК с НЧ серебра, покрытых кверцетагетином (QtAgNPs)/ ЛП	95-10 мкМ	4.46 мкМ	[20]
Амоксициллин	Вольтамперометрия (датчик)	на основе диоксида титана, ЗНЧ, мезопористого углерода и нафтона	Пробу минеральной воды смешивали с соответствующим объемом стандартного раствора АМК (1:24)/ минеральная вода	0.5-2.5 мМ и 2.5-133.0 мМ	0.3 мкМ	[21]
		на основе Au-Pd наноконструкта	Пробу фильтруют, разбавляют фосфатным буферным раствором (рН 7.2). Регистрируют вольтамперограммы в диапазоне 30-200 мкМ	30-350 мкМ	9 мкМ	[22]

	Флуоресцентная спектроскопия	Датчик на основе молекулярно импринтированных полимеров с КТ	Пробу сырого молока центрифугируют, добавляют ацетонитрил. Затем смесь встряхивают и центрифугируют, супернатант собирают и упаривают досуха при 40°C. Экстракт повторно растворяют в фосфатном буферном растворе/ моча	0.20-50.0 мкг/л	0.14 мкг/л	[23]
Амоксициллин	Спектрофотометрия	-	Измерение поглощения раствора антибиотика при $\lambda_{\max}$ 272 нм/ ЛП	100.0-160.0 мг/мл	-	[24]
Цефалексин	ИК-спектроскопия	-	ИК-спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца/ ЛП	-	-	[18]
	ВЭЖХ/ МС	Элюэнт - трифторуксусная кислота	Твердофазная экстракция ЦФЛ с использованием микроколонки с молекулярными отпечатками и импульсное элюирование с использованием 1% трифторуксусной кислоты в метаноле/ биологические жидкости	0.3-25 мкг/мл	0.04 мгк/мл	[25]
	Спектрофотометрия	Реактив Фолина-Чокальтеу	Взаимодействи ЦФЛ с реагентом Фолина-Чокальтеу в присутствии 20% раствора карбоната натрия и	10-160 мкг/ мл		[26]

			измерение поглощения продукта синего цвета при 753 нм/ ЛП			
Цефуроксим	ВЭЖХ	-	Время удерживания основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного вещества на хроматограмме раствора стандартного образца/ ЛП	-	-	[1818]
	Флуоресцентная спектроскопия	1,2-нафтохинон-4-сульфонат	Метод основан на реакции между ЦФР с 1,2-нафтохинон-4-сульфонатом в щелочной среде с образованием флуоресцентных производных, которые экстрагируются хлороформом. Далее измеряют поглощение при 605 нм после возбуждения при 460 нм/ ЛП	15-40 нг/мл	3.02 нг/мл	[27]
	Спектрофотометрия	-	Измерение поглощения раствора ЦФР при $\lambda_{\max}$ 281 нм/ ЛП	0.80-3.60 мкг/мл		[28]
Цефотаксим	ИК-спектроскопия	-	ИК-спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца цефотаксима/ ЛП	-	-	[18]
Цефепим	Флуоресце-	сафранин	Взаимодействие цефалоспоринов с	0.15-1.35	40	[29]



	нтная спектрос- копия		сафранином в слабощелочной среде (рН 8.0) с образованием ионно- ассоциативных комплексов. Флуоресцентные продукты экстрагировали хлороформом, и интенсивность флуоресценции измеряли при 544-565 нм после возбуждения при 518-524 нм/ ЛП	мкг/мл	нг/мл	
Цефтриак- сон, цефотаксим, амоксицил- лин, оксациллин и др.	ВЭЖХ	-	Образцы плазмы (100 мкл) добавляли в раствор внутреннего стандарта с последующим осаждением белка. Разделение осуществлялось на колонке Assicore C18, которая позволяла проводить анализ проб каждые 9 минут / плазма крови	-	-	[9]
Цефазолин, Цефепим и др.	ВЭЖХ	-	В пробы объемом 100 мкл добавляли тиопентал в качестве внутреннего стандарта, белки осаждали ацетонитрилом, содержащим 0,1% муравьиной кислоты. Разделение осуществляли на колонке с пентафторфенилом в режиме градиентного элюирования при скорости потока 500 мкл/мин / плазма крови	2-100 мг/л	-	[30]

Ампициллин, диклуксациллин, флуклоксациллин и др.	Спектрофотометрия	Mo (V) – тиоцианат	Метод заключается в образовании ионных пар между исследуемыми препаратами и неорганическим комплексом Mo (V) – тиоцианат с последующей его экстракцией метиленхлоридом/ ЛП	1.5-77.5, 3-75, 1.5-79 и 7.5-75 мг/мл	0.017, 0.061, 0.014 и 0.073 мкг/см	[8]
Тетрациклин	Флуоресцентная спектроскопия	Eu(III)	Регистрировали спектры люминесценции системы тетрациклин–H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> –Fe(II)/(III)–Eu(III), при 600 нм/ вода, ЛП, мёд	$2 \cdot 10^{-7}$ - $3 \cdot 10^{-5}$ М	$5 \cdot 10^{-8}$ М	[10]
Окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин, доксидоциклина	ВЭЖХ с детектированием по резонансному рассеянию Рэлея	-	Хроматографическое разделение соединений было достигнуто с использованием колонки Synergi Fusion-RP и подвижной фазы, состоящей из метанола–ацетонитрила–щавелевой кислоты (5 мМ), при скорости потока 0.8 мл/мин. Сигнал регистрировали при $\lambda_{ex} = \lambda_{em} = 370$ нм/ ЛП и мёд	10.36-518.0 12.11-605.5, 11.79-589.5, 10.32-516.0 мкг/мл	2.12–5.12 мкг/мл	[31]
Ципрофлоксацин, норфлоксацин и офлоксацин	Жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия	-	Экстракцию аналитов из тканей рыб осуществляли методом твердожидкостной экстракции фокусированным ультразвуком с использованием в качестве экстрагента метанола/уксусной кислоты (95:5).	278 нг/л - 4 нг/г	-	[32]

	рия (ЖХ-МС/МС)		<p>Этапы предварительного концентрирования и очистки были оптимизированы с точки зрения эффективности экстракции и чистоты, и была выбрана наилучшая стратегия для каждой матрицы: Oasis HLB для морской воды, жидкостная экстракция в сочетании с Oasis HLB для печени рыб, комбинация EvoluteWAX и Oasis HLB для стоков очистных сооружений и полимеры с молекулярным отпечатком для биожидкостей / вода (морская вода и стоки очистных сооружений), ткани рыб (мышцы и печень) и биологические жидкости рыб</p>			
--	----------------	--	--	--	--	--

Спектрофотометрические методы, несмотря на невысокую селективность, по-прежнему находят широкое применение в анализе лекарственных препаратов ввиду их сравнительной доступности, относительной простоте и достаточной точности. Большинство лекарственных препаратов в УФ-области обладает собственным светопоглощением [24, 28, 33], некоторые вступают в химические реакции, приводящие к образованию окрашенных продуктов [8, 20, 26].

На рис. 1.1 приведена диаграмма распределения долей физико-химических методов, применяемых при определении некоторых антибактериальных препаратов.

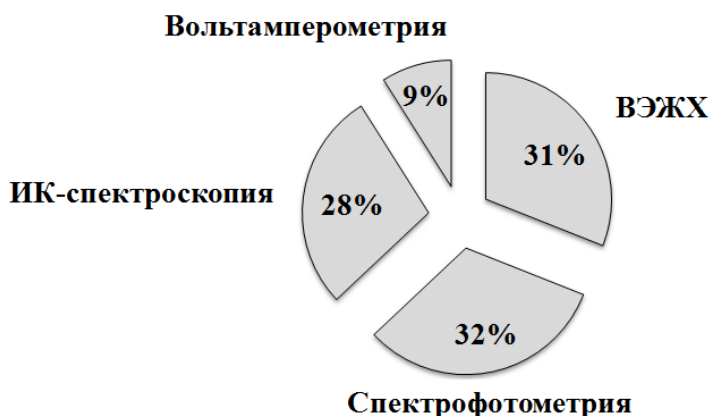


Рис.1.1. Диаграмма распределения долей физико-химических методов, применяемых при определении некоторых антибактериальных препаратов

Для определения химического состава лекарственных препаратов применяют комплекс различных физико-химических методов, приборы которых, как правило, являются достаточно дорогостоящими и малодоступными. К недостаткам указанных методов также можно отнести затрату большого количества времени на проведение пробоподготовки и проведение самого анализа.

## 1.1. Экспресс-варианты

Экспресс-методы – это методы ускоренного проведения анализа, позволяющие в течение от нескольких секунд до нескольких минут определить в исследуемом объекте присутствие какого-либо вещества или количественные отклонения в его содержании. В связи с разработкой и внедрением в практику автоматизированных систем анализа, с 50-х годов экспресс-методы лабораторной диагностики стали активно развиваться.

В настоящее время для решения различных задач качественного и количественного анализа активно применяют тест-методы, представляющие собой простые и, как правило, дешевые устройства и соответствующие тест-методики. Во многих случаях такие методы используют для скрининговой оценки наличия и/или содержания анализируемых компонентов. При скрининге применяют химические, биохимические и биологические методы [34, 35], аналитическим сигналом в которых может быть появление или изменение окраски, возникновение либо тушение флуоресценции, образование осадка, ингибирование или ускорение ферментативных реакций и т.д. В основе химических методов скрининга лежат различные химические реакции: окисления-восстановления, ионного обмена, реакции комплексообразования, характерные реакции на функциональные группы и др. Предложено большое количество индикаторных бумаг (ИБ) для определения органических и неорганических веществ в различных объектах [36, 37]. Содержание аналита определяют по изменению окраски (интенсивности, площади окрашенной или обесцвеченной зон ИБ), возникающей после контакта носителя с исследуемой жидкостью, путем сравнения ее со стандартной цветной шкалой.

Биохимические методы основаны на свойстве аналитов (ионов металлов, органических токсикантов и др.) подавлять ферментативные процессы. При биотестировании и биоиндикации с использованием тест-организмов (бактерий, микроводорослей и высших растений) проводят оценку интегральной токсичности объектов окружающей среды [38]. Для

определения антибактериальных препаратов широко применяют также иммуноферментный анализ (ИФА).

Микробиологические тесты, как правило, надежны и экономичны, но требуют инкубации в течение нескольких часов, прежде чем результат может быть визуализирован. Для определения антибиотиков в молочной промышленности широко используются коммерческие иммунологические и микробиологические тесты «Beta Star<sup>®</sup>», «Tetra Star<sup>®</sup>», «Beta Star<sup>®</sup> Combo», «Coran Test<sup>®</sup>» [39]. Они представляют собой удобные и простые в применении тест-полоски, позволяющие проводить анализ в полевых условиях.

Для определения  $\beta$ -лактамных антибиотиков в лекарственных препаратах и биологических средах предложены потенциометрические сенсоры с пластифицированными мембранами на основе ионных ассоциатов тетраалкиламмония с анионами  $\beta$ -лактамов и их комплексов с ионами серебра. Разработаны твердоконтактные сенсоры для определения цефазолина, цефалексина, цефуроксима и других цефалоспоринов [40, 41].

Разработаны тест-методики визуально-колориметрического определения цефалексина [48, 49] стрептоцида [44], новокаина [44], анальгина [45], тетрациклина [46], нитроксолина [47]. В табл. 1.2 представлены экспресс-методы определения некоторых антибактериальных лекарственных препаратов, включающие применение тест-культур [42], антител (АТ) [43, 48], индикаторных бумаг, пленок или порошков [44-46].

Таблица 1.2. Экспресс-методы определения антибактериальных лекарственных препаратов

Аналит	Метод	Реагент/ Тест-культура	Методика/пробоподготовка	ДОС	ПО	Примечания	Лит- ра
Пенициллин	Иммуноферментный анализ	тест-культуры штаммы термофильных бактерий <i>Bacillus licheniformis</i> или <i>Bacillus stearotherophilus</i>	Проводят инкубацию тест-культуры совместно с пробой исследуемого объекта, который далее титруется в пластинах для ИФА в питательной среде с индикатором (метиленовый синий). Посторонняя микрофлора не растет при этой температуре, отсутствие изменения цвета среды указывает на наличие антибиотика в исследуемом материале		0.07 ЕД/мл пробы	Недостаток - возможные ложноотрицательные результаты из-за загрязнения проб бактериями, которые могут вызвать обесцвечивание индикатора	[42]
Ампициллин	Иммуноанализ	Конъюгат пенициллин-белок со специфическими антителами, меченными	Конкурентное взаимодействие молекул антибиотика, содержащихся в пробе, и иммобилизованного на мембране конъюгата пенициллин-белок, меченными		10 нг/мл	10 мин при комнатной температуре без пробоподготовки	[43]

		коллоидным золотом	коллоидным золотом, которое происходит при движении вдоль мембраны реагентов и тестируемой пробы				
Стрептоцид белый	Тест-метод (визуальная оценка)	Индикаторная пленка на основе желатина с иммобилизованным ванилином	Тест-определение проводят в присутствии 2 моль/л HCl. Содержание стрептоцида определяют визуально по стандартной цветовой шкале	0.05-0.17 ммоль/л	0.16 ммоль/л	В качестве подложки применяли фотографические пленки марки «Микрат-300», удаляя соединения серебра	[44]
Новокаина гидрохлорид	Тест-метод (визуальная оценка)	Индикаторные пленки на основе желатина с иммобилизованным ванилином и ДМАБ	Тест-определение проводят в присутствии 2 моль/л HCl. Содержание новокаина определяют визуально по стандартной цветовой шкале	0.06-0.24 ммоль/л и 0.1-0.17 ммоль/л	0.22 и 0.16 ммоль/л		
Анальгин	Тест-метод (визуально-колориметрическая оценка)	Индикаторные пленки на основе желатина с иммобилизованным комплексом железо (III) с 2,2'-дипиридиллом и с	Содержание анальгина определяют визуально по стандартной цветовой шкале	0.2-2.6·10 <sup>-5</sup> М и 0.2-5.6·10 <sup>-5</sup> М	2.3·10 <sup>-5</sup> М и 5.1·10 <sup>-5</sup> М		



		1,10-фенантролином					
Тетрациклин и доксициклин	Тест-метод (визуальная и цветометрическая оценка)	Сорбция тетрациклина и доксициклина на поверхности химически модифицированного алюмосиликата	Пробоподготовка включает удаление из пробы белков и молочного жира. Для этого в 100–250 мл анализируемого продукта вносят 2–3 мл концентрированной HCl и термостатируют при 40–45°C в течение 5–10 мин, далее центрифугируют, подкисляют HNO <sub>3</sub> и добавляют ацетатный буферный раствор (pH 2.5). Содержание аналита оценивают визуально или цветометрически	0-50мкг/проба		Количественное извлечение тетрациклина и доксициклина (R > 95%) происходит в статических условиях при pH 2,3–3,4 при 20 ± 1°C в течение 15–20	[46]
Нитроксолин	Тест-метод (визуальная оценка), спектрофотометрия	Индикаторные пленки на основе желатина с иммобилизованным гексацианоферратом (II) кобальта (II) и меди (II)	Плѐнки с иммобилизованными Co <sub>2</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]/Cu <sub>2</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] помещали щелочной раствор нитроксолина (pH > 12) на 6 мин, затем промывали дистиллированной водой в течение 15 мин с помощью аппарата для встряхивания,	1-9/1-5 ммоль/л	2.6/0.88 мг/л		[47]

			сушили и использовали для визуального наблюдения окраски или измерения светопоглощения				
ЦФЛ	Иммуно-анализ	Конъюгат цефалексин-щелочная фосфатаза	Конъюгат цефалексин-щелочная фосфатаза смешивается с образцом, содержащим аналит, и конкурентным образом связывается с соответствующими антителами в иммунореакторе. После добавления субстрата ферментативно генерируемый п-аминофенол обнаруживают на углеродном электроде при +150 мВ относительно Ag/AgCl.	0.4-20 мкг/л	1 мкг/л	Один цикл анализа занимает 16 минут, включая регенерацию иммуносенсора	[48]
ЦФЛ	Флуоресцентный иммуно-анализ	Конъюгаты цефалексина с различными флуоресцентным и метками	Для осаждения белка молока применяли метанол, после смесь центрифугировали и применяли для определения цефалексина		1 мкг/кг		[49]
ЦФЛ	Люминес-	Фосфоресцент-	Наносенсор получен с	2.5-50	0.81		[50]

	центная спектроскопия	ный сенсор на основе квантовых точек Mn:ZnS, полимерного покрытия с молекулярными отпечатками	помощью золь-гель-полимеризации с использованием тиогликолевой кислоты и КТ в качестве люминесцентных материалов, ЦФЛ в качестве матрицы, 3-аминопропилтриэтоксисилана в качестве функционального мономера и тетраэтоксисилана в качестве сшивающего агента. Регистрация эмиссии с максимумами возбуждения / эмиссии при 295/590 нм	мкг/л	мкг/л		
--	-----------------------	---	--	-------	-------	--	--

## 1.2. Применение цветометрии

Цветометрия – это наука о цвете, его измерении и количественном выражении [51]. Как метод химического и физико-химического анализа цветометрия активно применяется на практике и на данный момент является эффективным и информативным методом анализа окрашенных веществ и материалов.

В качестве новой группы методов в 90-х годах XX века в аналитической химии были выделены методы цифрового оптического анализа, в основе которых лежит цифровая обработка изображений анализируемого образца. В зависимости от типа аналитического сигнала выделяют цифровую цветометрию (цвет образца), флуориметрию (флуоресценция) и турбидиметрию (рассеянное излучение). Наиболее развитым в настоящее время методом является метод цифровой цветометрии («Digital Color Analysis» (DCA) – «цифровой анализ цвета» [52]), который широко применяется для анализа различных веществ в разных областях науки и техники: в фармацевтической промышленности [53, 54], при анализе лекарственного растительного сырья [55], пищевой [56, 57], текстильной [58] промышленности, в экологическом мониторинге при определении ПАВ [59, 60], тяжелых металлов [61, 62] и т.д.

Развитие метода цифровой цветометрии соответствует основным тенденциям современной аналитической химии, относит компьютеризацию и автоматизацию анализа, разработку интегральных (обобщенных) показателей качества.

Проведение анализа методом цифровой цветометрии включает в себя регистрацию аналитического сигнала с помощью цифрового устройства (фотокамеры, камеры смартфона, сканера и т.д.) и последующую обработку изображения в специализированной программе. При цифровой обработке изображений происходит преобразование непрерывного (аналогового) изображения в эквивалентный цифровой массив [63]. Для цветометрической обработки применяют различные цветометрические характеристики

аналитической формы: координаты цвета в различных системах, светлоту, насыщенность, цветовой тон и др. Применение различных моделей описания цвета в химическом анализе широко распространено [64, 65]. Из множества цветовых моделей наиболее часто применяют RGB, CMYK, HSB, CIELAB модели [66]. Основные цветовые модели будут рассмотрены ниже.

**Модель RGB** является одной из самых распространенных цветовых моделей для описания цвета, хорошо соотносится с человеческим зрением (сетчатка глаза имеет красно-, зелено- и сине- чувствительные волокна). Математическое описание цвета базируется на представлении о том, что любой цвет можно представить в виде суммы трех линейно независимых цветов: красного (Red), зеленого (Green) и синего (Blue), т. е. трех монохроматических излучений с длинами волн 700, 546.1 и 435.8 нм соответственно. Все цвета можно представить в виде куба, где каждая цветовая составляющая имеет 255 градаций яркости, а при смешении трех основных цветов можно получить 16581375 оттенков.

**Модель CMYK** описывает поглощаемые цвета (в отличие от RGB) и является основной моделью в полиграфии. Цвета в модели CMYK (Cyan (голубой), Magenta (пурпурный) и Yellow (желтый)) получаются путем вычитания аддитивных цветов модели RGB из белого цвета. Так как при смешении всех цветов модели получается грязно-коричневый цвет, был специально введен черный цвет (Key).

**Модель HSB** является аналогом модели RGB и основана на тех же базовых цветах, но отличается системой координат. Цвет в HSB модели характеризуется тремя параметрами: тоном (Hue - цвет), насыщенностью (Saturation – процент добавления белого цвета), яркостью (Brightness – процент добавления черного цвета).

**Модель CIELAB** является наиболее удобным способом для количественного определения различий в цветовой гамме, т.к. цветовое пространство в любых ее частях соотносится со зрительным восприятием. Данную систему описывают следующие параметры: светлота (L); красно-

зеленая ось (A) и желто-синяя оси (B); X, Y, Z – координаты белого цвета в системы XYZ; оси A, B перпендикулярны оси L.

Регистрация аналитического сигнала может быть выполнена с помощью любого устройства, позволяющего фиксировать и сохранять изображения в цифровом формате: сканера, цифрового фотоаппарата, камеры смартфона, web- или видеокamеры. В настоящее время способ регистрации аналитического сигнала с помощью камеры смартфонов, с последующей обработкой и интерпретацией полученной информации, приобрел наиболее широкое распространение [67, 68, 69]. В отличие от таких устройств, как, например, сканеры, веб-камеры и цифровые фотоаппараты, смартфоны не нуждаются в подключении к компьютеру для последующей обработки информации.

Для цветометрической обработки изображений применяют различные программы:

- графические редакторы (*Adobe Photoshop*<sup>®</sup>, *Gimp*<sup>®</sup> - в случае компьютерной обработки; приложения для смартфонов, например, *Color picker*<sup>®</sup>);
- компьютерные денситометры (входят в ПО специализированных приборов);
- математические пакеты с возможностью работы с цифровыми изображениями (*MatLab*) [70].

Таким образом, к преимуществам применения метода цифровой цветометрии можно отнести экономичность, простоту выполнения, возможность сохранения информации в электронном формате, проведение анализа как жидких, так и твердых образцов. При этом авторами [71] показано, что применение цифрового фотоаппарата в качестве детектора, с последующей цветометрической обработкой данных, позволяет определять аналиты с такой же чувствительностью, как и с помощью спектроскопии диффузного отражения. Также нужно отметить и применение современных настольных спектрофотометров диффузного отражения, применяющихся для

колориметрических измерений. Данные устройства хорошо зарекомендовали себя в химическом анализе, оценена их погрешность при определении координат цветности [72, 73].

В табл.1.3 представлены способы определения различных биологически активных веществ (БАВ) с помощью метода цифровой цветометрии; применяемые фоторегистрирующие устройства, модели описания цвета, а также используемое программное обеспечение.

Таблица 1.3. Применение метода цифровой цветометрии в анализе биологически активных веществ

Аналит	Реагент	Цветовая модель	Цветометрическая обработка	ДОС (ПрО)	Примечания	Литература
Аскорбиновая кислота	Нанокластеры серебра с папаином	СМΥК	Обработка фотографий раствора наночастиц серебра с папаином в присутствии аскорбиновой кислоты. Под воздействием УФ-излучения происходит каталитический рост наночастиц серебра, изменение цвета раствора с бесцветного на желтый. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Υ и концентрацией аскорбиновой кислоты. Анализ изображений проводили в <i>Photoshop</i> <sup>®</sup>	1-50 мкМ (1мкМ)	Проведена оценка влияния глюкозы, дофамина, мочевой кислоты и цистеина	[74]
Стрептомицин	Аптамер и комплементарная ДНК	RGB	Получение изображений раствора флуоресцентного аптамера стрептомицина проводили с помощью камеры смартфона. Анализ осуществляли в приложении смартфона <i>Touch Color</i> <sup>®</sup> , позволяющем определять интенсивность RGB-параметров. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Green и концентрацией стрептомицина	0.1–100 мкМ (94 нМ)	Проведено определение стрептомицина в образцах молока и мяса кур	[75]
Аскорбиновая кислота	комплекс железа (II) -1,2-	RGB	Цифровые изображения раствора комплекса железа (II)-1,2 орто-фенантролина в присутствии аскорбиновой кислоты получены с помощью web-	1 – 60 мг/л (0.015	-	[76]



	орто-фенантролин		камеры и сохранены в формате JPEG. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Blue и концентрацией аскорбиновой кислоты	мг/л)		
Формальдегид	Биоразлагаемая пленка на основе крахмала	RGB	Изображения получены в фотографическом боксе камерой смартфона, сохранены в 24-битном формате JPEG. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Blue и концентрацией формальдегида	0-25 мг/л (0.7 ± 0.1 мг/л)	Разработанная методика применена анализа для образцов пищевых продуктов	[77]
Металлопротеин	Антитела против щелочной фосфатазы на поверхности бумаги	RGB	Изображения комплекса металлопротеина с антителами, окрашенного в сине-зеленый цвет получены с помощью камеры смартфона. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Red и концентрацией металлопротеина	10-1000 Ед/мл (0.87 Ед/мл)	Время анализа составляет 13 мин	[78]
Глюкоза	Глюкозооксидаза и	RGB	Фотографии получены с помощью камеры смартфона в специализированном боксе, полученном с помощью 3D-печати. Полученные	0-4 ммоль/л (166	Время анализа составляет	[79]

	пероксидаза, хитозан на поверхности бумаги		изображения анализировали в ПО <i>Gimp 2.8.14</i> . Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Blue и концентрацией глюкозы	мкг/л)	3 мин	
Тетрациклина гидрохлорид	Ионы железа (III)	RGB	Проводили сорбцию на ППУ в виде комплексов с ионами металлов. Концентрирование проводили в статическом режиме, встряхивая приготовленные растворы в течение 60 мин. Обработка изображений таблеток ППУ выполнена с помощью	0.02–0.2 мг/мл (0.018 мг/мл)		[80]
Цианокобаламин	Ионы кобальта (II)	RGB	офисного сканера <i>LaserJet M1120 MFP</i> и программы для просмотра и обработки растровых изображений <i>Gimp 2.8.16</i> . Параметры сканирования: цветовой режим – цветное изображение; тип – фото; разрешение – 300 dpi. Получена линейная зависимость между значением интенсивности параметра Red и концентрацией	0.3–1.5 мг/мл (0.090 мг/мл)		
Парацетамол и салицилат натрия	хлорид железа (III) и п-нитро-	RGB	аналита Для регистрации видеосигнала окрашенных продуктов взаимодействия парацетамола и салицилата натрия со специфическими реагентами: хлоридом железа(III) и с	0.05-0.25 г/л	Проведение 2-х цветных реакций	[81]

	анилин		<p>диазотированным пара-нитроанилином использовали цифровую фотокамеру <i>Nikon D3000</i>, установленную в специальном боксе матовой черной окраски. В бокс помещали кювету, заполненную исследуемым раствором, и фотографировали. Изображения сохраняли в формате графической информации – JPEG, размер изображения – 1 мегапиксель, светочувствительность – 100 ISO или «Авто». При компьютерной обработке цифрового изображения применили графический редактор <i>Adobe Photoshop CS3</i><sup>®</sup></p>		на 2-х ТСХ-пластинах для одного анализа	
ЦФЛ	Нанок-мполит, из углеродных точек с SiO <sub>2</sub> , CdTe, конъюгированный с АТ	RGB	<p>Сконструировано портативное устройство, состоящее из смартфона, УФ-лампы и специальной платформы, для контроля расстояния между образцом и УФ-лампой. Изображения получены с помощью камеры смартфона и определены значение RGB с помощью приложения <i>Color picker</i><sup>®</sup>. Получена линейная зависимость между соотношением R/B и концентраций цефалексина</p>	1–500 мкМ (0.7 мкМ)		[82]

Карбама- зепин	Метило- вый оранже- вый	RGB	Тест-устройства и бокс для получения фотографий были изготовлены на 3D-принтере. Бокс был изготовлен из нитей полимолочной кислоты, светодиоды закреплены в его верхней части, а смартфон расположен на высоте 100 мм. Изображения получены обрабатывали в программе <i>Image J</i> <sup>®</sup>	3.00 мг/л	Время реакции 16 с	[83]
Ципроф- локсацин	Fe(III)			1 мг/л		
Норфлок- сацин	Хлорани- ловая кислота			1 мг/л		
Глюкоза	Глюкозо- оксидаза и перокси- даза, 4- аминоант ипирин	RGB	Тест-устройство состоит из двух бумажных слоев: верхний - зона обнаружения, которая модифицирована ферментами и хромогенами. Нижний слой содержит канал, по которому анализируемый раствор попадает в зону обнаружения. Изображения продукта, окрашенного в синий цвет, получены с помощью камеры смартфона и обработаны в <i>Image J</i> <sup>®</sup>	1-20 мМ (0.3 мМ)		[84]
Тетрацик- лины	Eu на поверх- ности бумаги	RGB	Предложено тест-устройство, состоящее из четырёх индикаторных зон. При облучении монохроматическим УФ-светом пятен тетрациклинов нанесенных на матрицы тест- системы, наблюдается желто-зеленая (тетрациклины) и розовая (европий) флуоресценция	8-500 мкг/мл		[85]

Как видно из табл. 1.3, для получения изображений в основном применяются web-камеры [76], камеры смартфонов [75, 77-79, 82, 83] и цифровые фотоаппараты [81, 86]; для цветометрической обработки – программа Photoshop<sup>®</sup> и специализированные приложения для смартфонов, а основной цветовой моделью является RGB.

Цветометрический метод, несмотря на значительные преимущества, имеет и некоторые ограничения, к главным из которых можно отнести их низкую селективность. Чтобы повысить селективность метода предложено применение молекулярных сенсоров [87], в качестве которых выступают ячейки, содержащие несколько хромогенных агентов. Метод мультисенсорной цветометрии [88] основан на получении окрашенных продуктов взаимодействия аналита с молекулярными сенсорами, с последующим описанием цвета, т.е. получении цветовых характеристик, которые далее преобразуют в уникальный «отпечаток» или «штрих-код» вещества. Такой подход позволяет получить большой объем информации об образце, что с другой стороны приводит к усложнению интерпретации и использования для экспресс-оценки. В таком случае интерпретацию полученной информации проводят с помощью специально сгенерированных электронных баз данных, а также с применением хемометрических подходов. Так, например, предложено применение метода главных компонент (МГК) для сокращения размерности данных, полученных с использованием набора сенсоров [89].

\* \* \*

Для определения химического состава лекарственных препаратов, в том числе обладающих антибактериальным эффектом (бета-лактамов, тетрациклинов, аминогликозидов, фторхинолонов и т.д.), применяют комплекс различных физико-химических методов, таких как ИК-, видимая и УФ-спектроскопия, ВЭЖХ с пределами обнаружения на уровне нанограммовых количеств. При этом широкое распространение находят и экспрессные методы определения антибактериальных препаратов (индикаторные бумаги, тест-культуры, электрохимические датчики и т.п.) с пределом обнаружения - 10 нг/мл.

Обзор данных литературы также показал актуальность применения цифровой цветометрии при анализе БАВ, например, для экспрессного определения антибиотиков в фармацевтических препаратах с пределами обнаружения аналитов на уровне 94 нМ. Особое место среди цветометрических методов и цифровых способов регистрации аналитического сигнала занимают методики, основанные на применении камеры смартфонов для регистрации, обработки и последующей интерпретации полученной информации. Для количественной инструментальной оценки постоянно совершенствуются и автоматизируются цветоизмерительные системы. Развитие цифровых технологий является перспективным для разработки методик экспресс-определения БАВ в различных лекарственных препаратах.

## ГЛАВА 2. Реактивы, аппаратура, методики

### 2.1 Посуда и реактивы

#### *Посуда*

1. Колбы мерные 22-го класса точности, номинальной вместимостью 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 мл, ГОСТ 1770-74.
2. Пипетки 1, 2-го класса точности номинальной вместимостью 1, 2, 5, 10, 25 мл, ГОСТ 29227-91.
3. Стаканы стеклянные мерные 2-го класса точности, номинальной вместимостью 100, 200, 250 мл, ГОСТ 1770-74.
4. Воронки стеклянные, лабораторные тип В стекло ХС, ГОСТ 25336-82.
5. Чашки Петри, ГОСТ 23932-90.
6. Цилиндры мерные стеклянные 10; 25; 50 мл, 2 класс точности (Россия).

#### *Реактивы*

1. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.
2. Спирт этиловый (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), ГОСТ 5962-67.
3. Кислота уксусная (CH<sub>3</sub>COOH), ч.д.а., ГОСТ 61-75.
4. Кислота соляная (HCl), о.с.ч., ГОСТ 14261-77.
5. Аммиак водный (NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O), ч.д.а., ГОСТ 3760, 25 % раствор.
6. Нингидрин (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, Mr 178.14 г/моль), ч.д.а.
7. *n*-Диметиламинобензальдегид ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CHO, Mr 149.19 г/моль), ч.д.а.
8. Натрия гидроксид (NaOH), х.ч., ГОСТ 4328-77.
9. Медь (II) сернокислая 5-водная (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), х.ч., ГОСТ 4165-78.
10. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O), ч., ГОСТ 5845-79.
11. Додецилсульфат натрия (ДДС), C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OSO<sub>3</sub>Na, ГОСТ 8748-2006.
12. N-цетилпиридиний хлористый (ЦПХ), C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>NCl·2H<sub>2</sub>O, х.ч., ТУ-6-09-15-121-74.
13. Полиэтилированный эфир диалкилфенола (ОП-10).

## *Фармацевтические субстанции*

### *Инъекционные лекарственные формы:*

- Амоксициллина тригидрат («Guangzhou Yinglue Tianzhishan Pharmaceutical Co», Китай);
- Цефуроксим (Зинацеф, «GlaxoSmithKline Manufacturing S.p.A», Италия);
- Цефотаксим («Биохимик», Россия);
- Цефтриаксон («Синтез», Россия);
- Цефазолин («Биосинтез», Россия).
- Цефалексин гидрат («Sigma Aldrich», США).

### *Лекарственные препараты:*

- «Амоксициллин» таблетки, 250 мг. Состав: амоксициллина тригидрат 287 мг (в пересчете на амоксициллин 250 мг); вспомогательные вещества: тальк – 3.7 мг, магния стеарат – 3.7 мг, крахмал картофельный - 75.6 мг («АВВА Рус», Россия);
- «Аксосеф» (Цефуроксим), таблетки, 250 мг. Состав: цефуроксима аксетил 300.72 мг (в пересчете на цефуроксим 250 мг); вспомогательные вещества: крахмал прежелатинизированный 62.50 мг и 125.00 мг, кросповидон 62.50 мг и 125.00 мг, кроскармеллоза натрия 10.00 мг и 20.00 мг, натрия лаурилсульфат 4.50 мг и 9.00 мг, магния стеарат 8.50 мг и 17.00 мг, кремния диоксид коллоидный 1.28 мг и 2.56 мг («Nobel Ilac Sanayii ve Ticaret Anonim Sirketi», Турция);
- «Цефалексин», капсулы, 500 мг. Состав: цефалексин - 500 мг (в виде цефалексина моногидрата – 525.9 мг); вспомогательные вещества: магния стеарат, целлюлоза микрокристаллическая («Немофарм», Сербия).



## 2.2 Оборудование и методы

### *Оборудование*

1. Весы лабораторные аналитические ВЛА второго класса точности ГОСТ 24104 – 881.
2. Шкаф сушильный SNOL 58/350 (Литва).
3. рН-метр «рН-150 М» (Белоруссия).
4. Автоматические микродозаторы переменного объема 0.5-10 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл, 1-5 мл.
5. Фильтры обеззоленные «Синяя лента», ТУ 2642-001-13927158-2003, масса золы 1 фильтра 0,00104 г.
6. Фильтры обеззоленные «Белая лента», ТУ 2642-001-13927158-2003, масса золы 1 фильтра 0,00071 г.
7. Фильтры обеззоленные «Красная лента», ТУ 2642-001-13927158-2003, масса золы 1 фильтра 0,00092 г.
8. Бокс для фотографирования размером 22×23×24 см с двумя полосками светодиодного освещения (5V, 1A).
9. Сканер EPSON PERFECTION V700 PHOTO.
10. Спектрофотометр Shimadzu UV-2550 (Япония), приставка для измерения СДО, диапазон 200-800 нм, интервал измерения 1 нм.
11. Двухлучевой сканирующий спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония). Предел допускаемых значений абсолютной погрешности: по шкале  $\lambda \pm 0,3$  нм, по коэффициенту пропускания  $\pm 1\%$ .
12. ИК-спектрофотометр Nicolet 6700 THERMO SCIENTIFIC (Intertech Corporation, США).

### *Цифровые фоторегистрирующие устройства*

1. 13-Мегапиксельная камера смартфона Redmi 6A.
2. 10-Мегапиксельная камера смартфона Lenovo K6 Power.

## *Методы исследования*

***ИК-спектроскопия.*** ИК-спектры образцов антибиотиков получены при помощи пятилучевого ИК–Фурье спектрометра Nicolet 6700 THERMO SCIENTIFIC производства фирмы Intertech Corporation (США). Стандартный спектральный диапазон составляет  $7800 - 350 \text{ см}^{-1}$  при разрешении  $0.09 \text{ см}^{-1}$ .

***Спектрофотометрия.*** Для регистрации спектров поглощения использовали спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu», Япония) с рабочим диапазоном длин волн 190-700 нм и кварцевыми кюветами ( $l = 1 \text{ см}$ ).

***Цифровая цветометрия.*** Аналитический сигнал регистрировали камерой смартфона Redmi 6A, для чего тест-средство помещали в бокс и фотографировали. Полученные изображения обрабатывали с помощью авторских программ (авторское приложение по обработке изображений к смартфону на базе Android и авторская online-программа по обработке RGB-параметров) и программы Adobe Photoshop®. В коммерческой программе Adobe Photoshop® часть изображения тест-средства усредняли с помощью фильтра «Average», в разработанных авторских программах усреднение цвета происходило автоматически после выделения необходимой области изображения. Далее определяли интенсивность параметров цветовых моделей (RGB, CMYK, HSV). Строили зависимости интенсивности цветовых параметров от концентрации аналита.

***Спектроскопия диффузного отражения.*** Измерение спектров диффузного отражения проводили на спектрометре UV-2550 («Shimadzu», Япония) с интегрирующей сферой ISR-2200 («Shimadzu», Япония) - для анализа твердых образцов. Для обработки полученных результатов использовали уравнение Кубелки-Мунка (1):

$$F = \frac{(1-R)^2}{2R}, \quad (1)$$

где  $R$  - диффузное отражение,  $F$  - функция Кубелки-Мунка.

### 2.3. Методики

*Реактив Фелинга* готовили по методике [ 90 ]: 7 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  растворяли в 100 мл дистиллированной воды. К этому раствору прибавляли раствор, содержащий 14 г  $\text{NaOH}$  и 36 г сегнетовой соли в 100 мл воды.

*Для приготовления спиртового 0.05 М раствора нингидрина*, навеску массой 0.1863 г растворяли в мерной колбе на 25 мл.

*Для приготовления спиртового 0.05 М раствора ДМАБ*, навеску массой 0.2225 г растворяли в мерной колбе на 25 мл.

*Для приготовления водного 0.1 М раствора  $\text{CuSO}_4$* , навеску  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  массой 0.6242 г растворяли в мерной колбе на 25 мл.

Исходный *раствор аммиака с концентрацией 2н* для приготовления буферных растворов готовили растворением 165 мл концентрированного раствора реагента дистиллированной водой в мерной колбе ёмкостью 1 л.

Исходный *раствор уксусной кислоты с концентрацией 2н* для приготовления буферных растворов готовили растворением 120 мл 98% раствора реагента дистиллированной водой в мерной колбе ёмкостью 1 л.

*Ацетатно-аммиачные буферные растворы* готовили из 2н  $\text{NH}_4\text{OH}$  и 2н  $\text{CH}_3\text{COOH}$  согласно таблице 2.1:

Таблица 2.1. Приготовление ацетатно-аммиачных растворов

pH	2н CH <sub>3</sub> COOH	2н NH <sub>4</sub> OH
3	99.3	0.7
4	85.9	14.1
5	59.7	40.3
6	51.2	48.8
7	50.0	50.0
8	49.3	50.7
9	44.1	55.9

*Для получения индикаторных бумаг* фильтр размером 5×5 см погружали на 5-7 мин в свежеприготовленный раствор реагентов (реактива Фелинга, ДМАБ, CuSO<sub>4</sub> или нингидрина) либо смесей (реагентов с ПАВ) при варьировании концентрации реагентов, температуры высушивания, типа подложки, типа ПАВ.

*Для получения изображений*, тест-средства помещали в бокс (размером 22×23×24 см с двумя полосками светодиодного освещения (5V, 1A)) и фотографировали камерой смартфона Redmi 6A. Изображения были сохранены в формате «.jpg», размер 1560×1560 пикселей (формат кадра 18:9, качество фото «высокое»).

Сканирование изображений проводили с применением сканера EPSON, с разрешением 1200 dpi (качество сканирования «наилучшее», тип изображения «цветной 48-бит»).

#### *Оценка стабильности ИБ*

В течение месяца получали индикаторные бумаги с иммобилизованным ДМАБ, нингидрином, CuSO<sub>4</sub> либо реактивом Фелинга с интервалом 3 дня и хранили при 3°C. На полученные ИБ наносили каплю

раствора аналита, высушивали при 23-25°C или 80-100°C в течение 5-20 мин. Далее тест-средства фотографировали в боксе, цветометрически обрабатывали и строили зависимости интенсивность цветового канала от времени хранения ИБ.

*Определение интервала ненадежности и предела обнаружения*

Для определения интервала ненадежности и предела обнаружения (ПрО) готовили 3 тест-шкалы с концентрациями аналита от 0.1 до 1 мг/мл с шагом  $\Delta c = 0.1$  мг/мл. Визуальную оценку присутствия аналита оценивали 15 наблюдателей ( $n=45$ ). Определяли вероятность обнаружения антибиотика по формуле :

$$P(c) = n_i / N_i,$$

где  $P(c)$  – вероятность обнаружения антибиотика,  $n_i$  - число положительных ответов наблюдателей о появлении/изменении окраски тест-средства,  $N_i$  – общее число ответов.

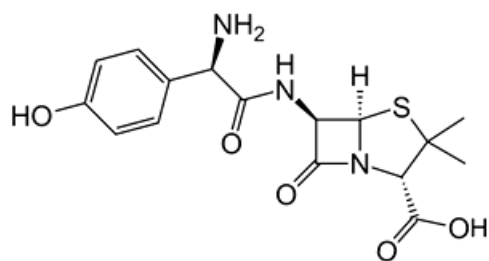
Предел обнаружения определяли, как правую границу интервала ненадежности, то есть концентрацию, при превышении которой вероятность ошибки I рода (вероятность ложного заключения об отсутствии аналита) меньше 1% [91].

## **ГЛАВА 3. Индикаторные системы. Обоснование выбора и характеристика**

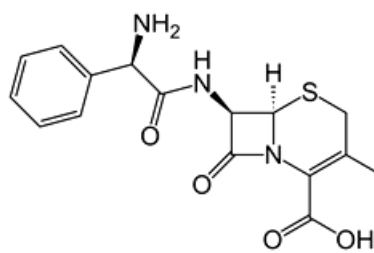
### **3.1. Аналиты и объекты исследования**

В качестве объектов исследования были выбраны препараты из ряда  $\beta$ -лактамных антибиотиков (амоксициллин (АМК), цефуроксим (ЦФР), цефалексин (ЦФЛ), цефотаксим (ЦФТ), цефтриаксон (ЦФТР), цефазолин (ЦФЗ)). Эти вещества фармакологически хорошо изучены, являются широко применимыми в различных областях терапии. Все изучаемые лекарственные средства – это полифункциональные соединения со сложной химической структурой. Бета-лактамные антибиотики (пенициллины и цефалоспорины) содержат  $\beta$ -лактамное кольцо и являются N-ацильными производными соответствующих аминокислот – 6-аминопенициллановой (пенициллины) и 7-аминоце-фалоспорановой или 7-аминодезацетоксицефалоспорановой (цефалоспорины). Структуры их молекул (рис. 3.1) содержат функциональные группы, которые потенциально могут принять участие в реакциях с хромофорными группами молекул-реагентов (сенсоров).

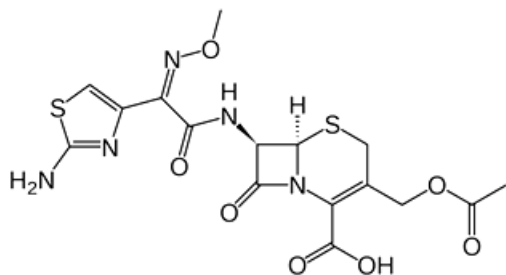
В настоящем исследовании применяли инъекционные лекарственные формы (цефазолин («Биосинтез», Россия), цефотаксим («Биохимик», Россия), цефтриаксон («Синтез», Россия), цефуроксим (Зинацеф, Италия)) и коммерческие препараты (амоксициллина тригидрат («Guangzhou Yinglue Tianzhishan Pharmaceutical Co», Китай) и цефалексин гидрат («Sigma Aldrich», США)).



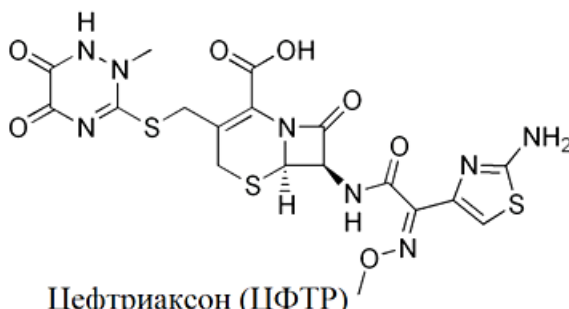
Амоксициллин (АМК)



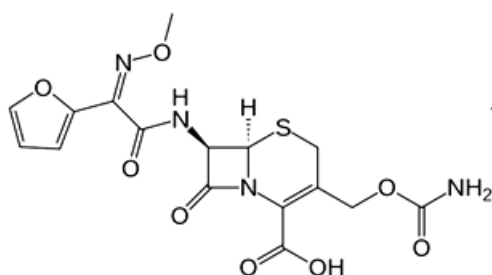
Цефалексин (ЦФЛ)



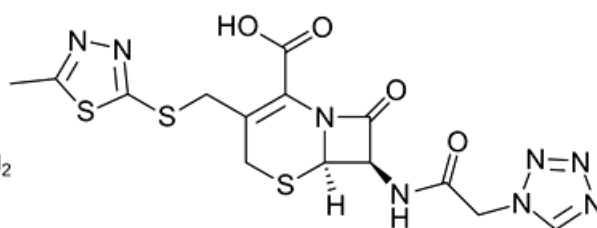
Цефотаксим (ЦФТ)



Цефтриаксон (ЦФТ)



Цефуросим (ЦФР)



Цефазолин (ЦФЗ)

Рис. 3.1. Структурные формулы  $\beta$ -лактамных антибиотиков

В частности, в молекулах данных препаратов, помимо  $\beta$ -лактамного кольца, присутствуют ароматические структуры ряда тиазола, тиadiaзола, фурана и т.д.; различные функциональные группы (NH<sub>2</sub>, OH, COOH, C=O), что позволяет рассматривать большое количество аналитических подходов для разработки экспрессного способа оценки качественного состава препаратов.

$\beta$ -Лактамные антибиотики благодаря высокой клинической эффективности и низкой токсичности, доступности и невысокой стоимости составляют на современном этапе основу антимикробной химиотерапии, занимая одно из ведущих мест при лечении широкого круга инфекций [92,

93]. Большинство  $\beta$ -лактамов входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения.

Наиболее часто  $\beta$ -лактамные антибиотики получают полусинтетически из 6-аминопенициллановой кислоты или 7-аминоцефалоспоровой кислоты. Бензилпенициллин (пенициллин G) и феноксиметилпенициллин (пенициллин V) представляют собой встречающиеся в природе  $\beta$ -лактамы, которые могут быть извлечены непосредственно из *Penicillium chrysogenum* и *Penicillium notatum* [94].

*Стабильность  $\beta$ -лактамов.* Значительную часть антибиотиков выпускают в виде сухих порошков, вследствие их нестабильности в водных растворах. Так, пенициллины стабильны в форме щелочных или щелочноземельных солей в сухом состоянии. В водных растворах пенициллины относительно быстро расщепляются. Скорость гидролиза зависит от нескольких факторов: pH, температура и боковая цепь в молекуле. Определенные буферные соли, тяжелые металлы (например, медь) или органические растворители также могут влиять на разрушение молекулы пенициллинов [95].

В водных растворах одноосновные пенициллины, такие как бензилпенициллин, показывают оптимальную стабильность в диапазоне pH 6-7. Константа диссоциации (pKa) карбоксильной группы составляет 2.4-2.7. Для амфотерных пенициллинов, таких как ампициллин, константа диссоциации (pKa) аминогруппы в водном растворе составляет 7.2-7.4. Максимум стабильности в водном растворе при pH 4-5 [96] ниже, чем в бензилпенициллине. Это связано с тем, что электроноакцепторный заместитель (в данном случае амино-группа) в  $\alpha$ -положении боковой цепи является стабилизирующим эффектом в кислой среде. На рис. 3.2 представлены формы амоксициллина, существующие в водном растворе в зависимости от pH среды [97].



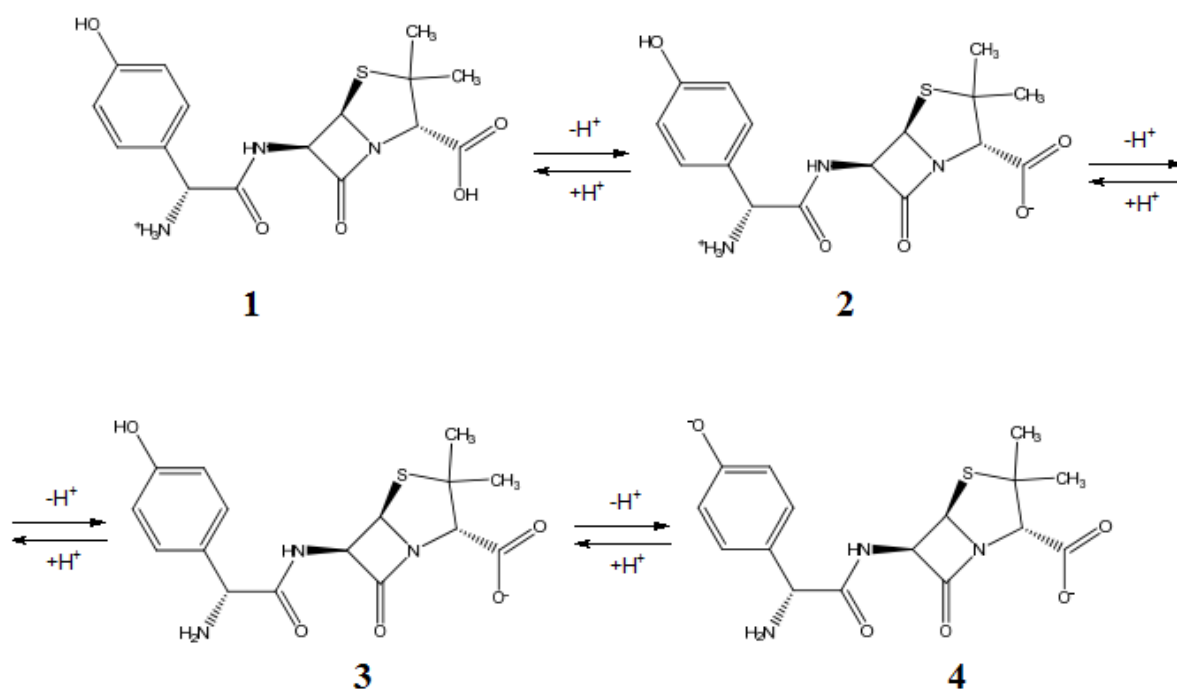
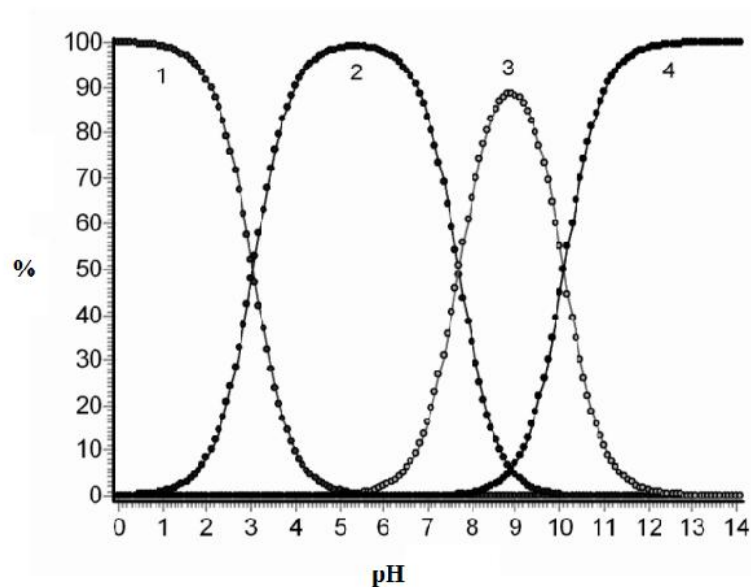


Рис. 3.2. Диаграмма распределения форм амоксициллина в водном растворе в зависимости от рН среды

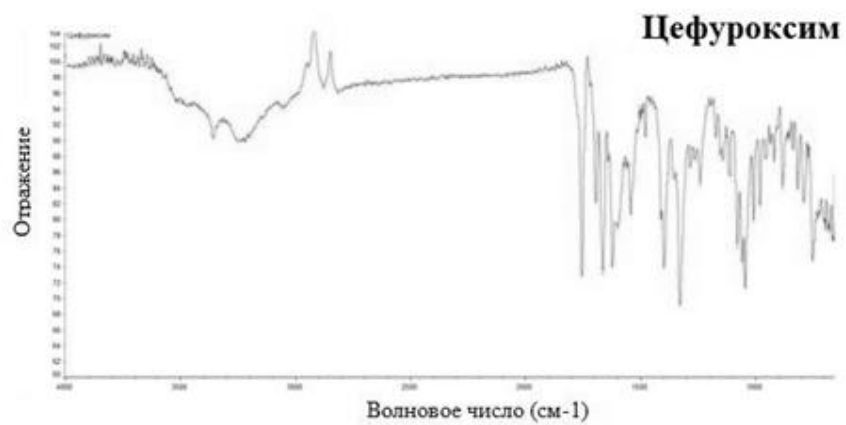
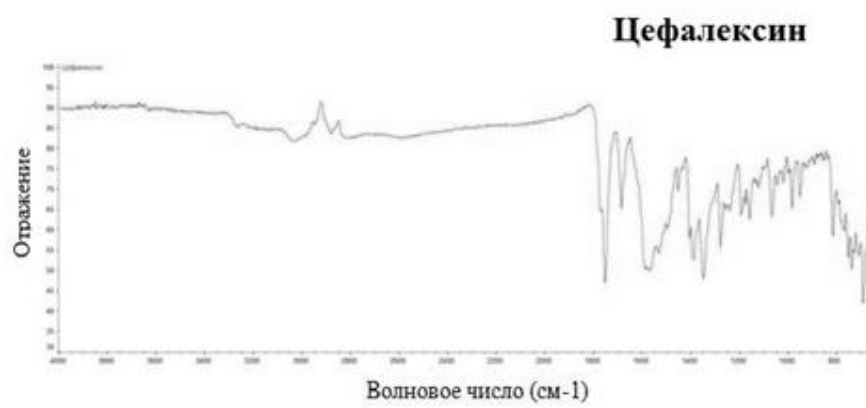
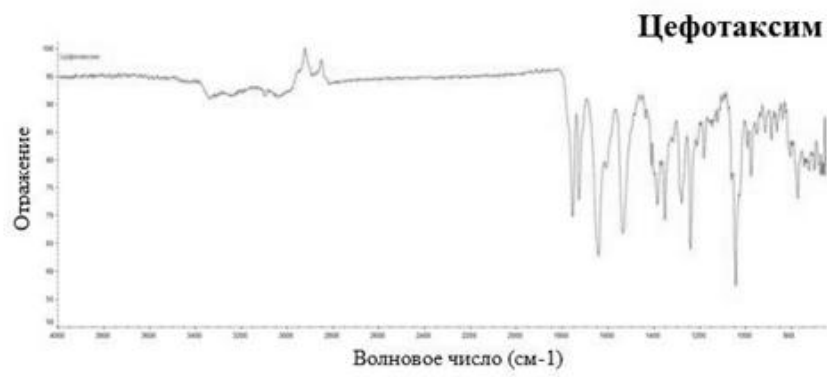
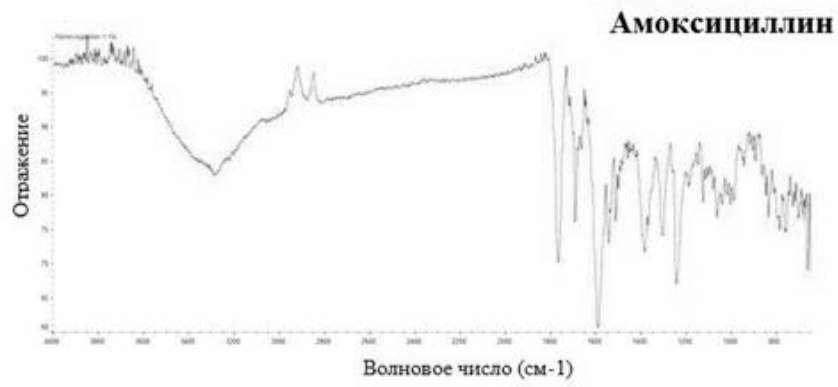
Благодаря наличию электроноакцепторных групп в  $\alpha$ -положении боковой цепи (например, у феноксиметилпенициллина) улучшается устойчивость  $\beta$ -лактамов к кислотам. Эти относительно кислотоустойчивые пенициллины преимущественно вводятся перорально. Из-за более низкой реакционной способности азота в дигидротиазининовом кольце цефалоспорины

проявляют большую устойчивость к кислотам по сравнению с пенициллинами.

### 3.2. ИК- и УФ-спектроскопическое исследование антибиотиков

Методы ИК- и УФ-спектроскопии применяли для установления подлинности  $\beta$ -лактамных антибиотиков (цефалоспоринов и пенициллинов) согласно Фармакопее Российской Федерации [18]. В настоящее время почти все современные фармакопеи рекомендуют проводить испытание на подлинность методом ИК-спектроскопии, применяя при стандартный образец данного лекарственного вещества. Совпадение характеристических полос двух спектров (стандартного и анализируемого образца) свидетельствует об идентичности данных веществ.

ИК-спектры образцов анализируемых  $\beta$ -лактамных антибиотиков получены при помощи пятилучевого ИК-Фурье спектрометра Nicolet 6700 THERMO SCIENTIFIC. Важнейшие полосы поглощения пенициллинов и цефалоспоринов в ИК области находятся в диапазоне  $1800 - 1500 \text{ см}^{-1}$ . В ИК-спектрах всех исследуемых  $\beta$ -лактамов обнаружены интенсивная полоса при  $1768 - 1750 \text{ см}^{-1}$  (соответствует поглощению  $\beta$ -лактамного кольца);  $1690 - 1645 \text{ см}^{-1}$  (валентные колебания связи  $\text{C}=\text{O}$  в амидной группе) (рис. 3.3, табл. 3.1). В ИК-спектре цефалексина наблюдаются полосы поглощения при  $1760 \text{ см}^{-1}$  (поглощение  $\beta$ -лактамного кольца),  $1690 \text{ см}^{-1}$  – колебания карбоксильной группы,  $1545 \text{ см}^{-1}$  – валентные колебания связи  $\text{C}=\text{C}$ .



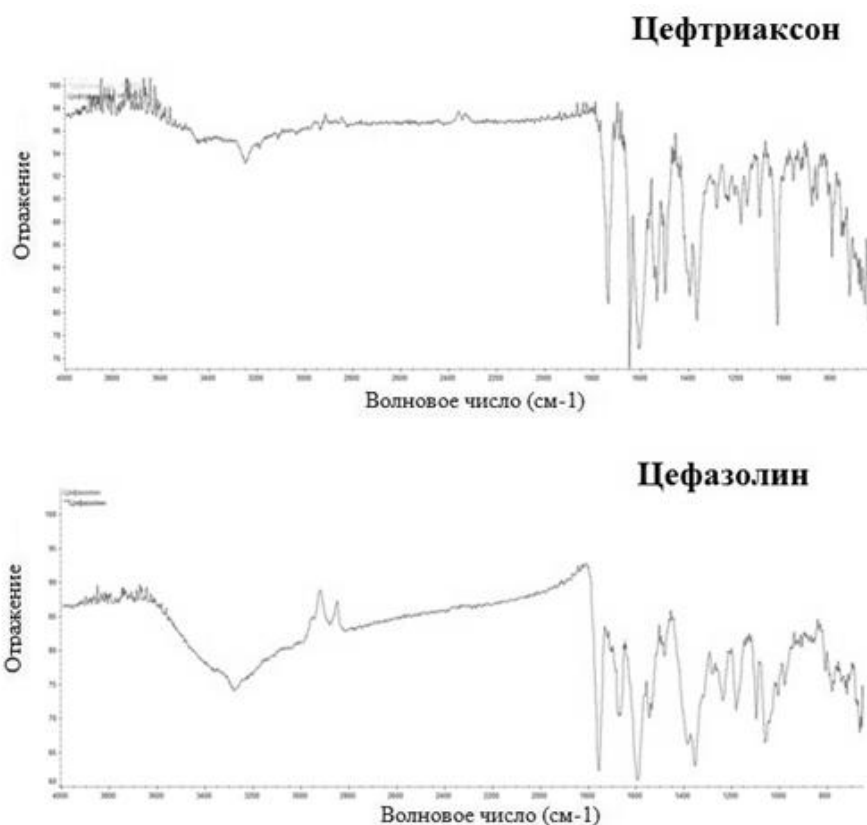


Рис. 3.3. ИК-спектры исследуемых  $\beta$ -лактамов

Таблица 3.1. Характеристические полосы поглощения исследуемых  $\beta$ -лактамов

Полоса, см <sup>-1</sup>	АМК	ЦФР	ЦФЛ	ЦФТ	ЦФТР	ЦФЗ
C=O ( $\beta$ -лактам)	1768	1758	1760	1760	1750	1759
C=O (амид)	1692	1667	1690	1650	1655	1672
C=C	1546	1543	1545	1543	1548	1546
ОН (фенол)	1384					
NH <sub>2</sub> (карбамат)		1335				
COO <sup>-</sup> (карбоксилат)				1730	1740	1386
C=O (карбамат)		1699				
C(O)N				1540	1540	
C-N группа						1062, 1099, 1184, 1238
C=N (оксим)		1642				

Зарегистрированы спектры поглощения водных растворов исследуемых  $\beta$ -лактамов (рис. 3.4). Установлено, что значения максимумов поглощения антибиотиков согласуются с литературными данными (табл. 3.2).

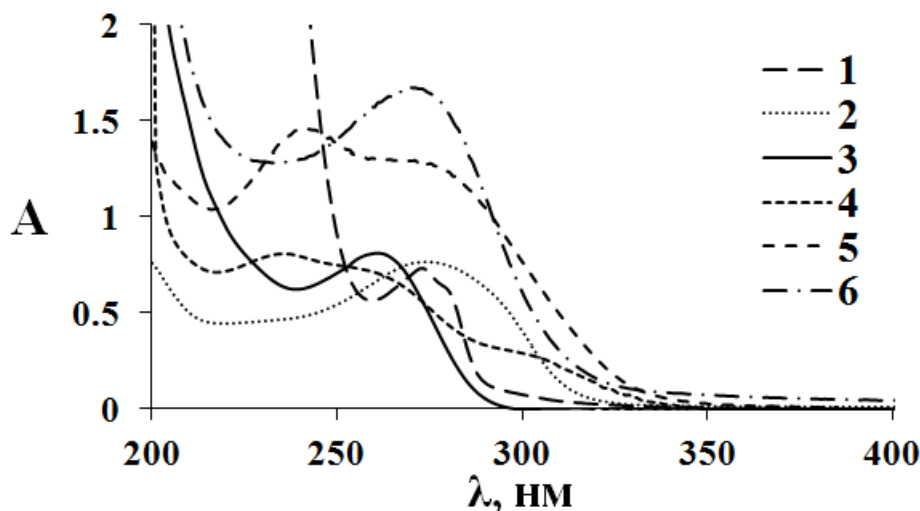


Рис. 3.4. Спектры поглощения водных растворов антибиотиков: 1 – АМК ( $5 \cdot 10^{-4}$ М), 2 – ЦФР ( $1 \cdot 10^{-5}$ М), 3 – ЦФЛ ( $5 \cdot 10^{-5}$ М), 4 – ЦФТ ( $5 \cdot 10^{-5}$ М), 5 – ЦФТР ( $2 \cdot 10^{-5}$ М), 6 – ЦФЗ ( $1 \cdot 10^{-4}$ М)

Таблица 3.2. Значения максимумов поглощения водных растворов антибиотиков

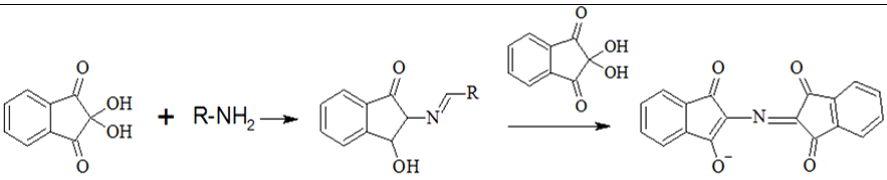
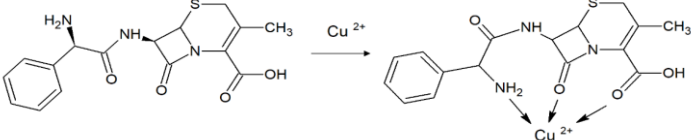
$\beta$ -лактам	АМК	ЦФР	ЦФЛ	ЦФТ	ЦФТР	ЦФЗ
$\lambda_{\max}$ , нм	273	278	262	235	241, 270	272
$\lambda_{\max}$ , нм (лит. данные)	273	278	262	235	240, 268	273
Источник	[98]	[99]	[100]	[101]	[98]	[102]

Таким образом, на основании данных методов УФ- и ИК-спектроскопии подтверждена подлинность применяемых в настоящем исследовании антибиотиков.

### 3.3. Типы индикаторных реакций, применяемых в работе

Предварительно исследовано *более 10* индикаторных реакций с реагентами органической и неорганической природы. В табл. 2 приведены типы выбранных индикаторных реакций. В настоящем исследовании предложено применение четырех индикаторных реакций для экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамов: взаимодействие с нингидрином, ДМАБ,  $\text{CuSO}_4$  и реактивом Фелинга (табл. 3.3).

Таблица 3.3. Типы индикаторных реакций

Система (тип реакции)	Реагент	Реакция
I (конденсация)	ДМАБ	$\text{R-NH}_2 + \text{N(CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CHO} \xrightarrow[\text{-H}_2\text{O}]{t^\circ, \text{H}^+} \text{N(CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH=N-R}$
II (окислительная конденсация)	Нингидрин	
III (окисление-восстановление)	Реактив Фелинга	$\text{Cu(OH)}_2 + 2\text{NaOOC-CH(OH)-CH(OH)-COONa} + \text{R-CHO} \rightarrow 2\text{CuOH} \downarrow + \text{R-COONa} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaOOC-CH(OH)-CH(OH)-COONa}$ $\text{CuOH} \rightarrow \text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
IV (комплексообразование)	$\text{Cu}^{2+}$	

**Система I.** Преимуществом реакции взаимодействия  $\beta$ -лактамов с ДМАБ является одностадийность, отсутствие токсичных реагентов, таких как  $\text{NaNO}_3$  и  $\beta$ -нафтол. Предложены тест-средства с иммобилизованными в фотографические плёнки ванилином и ДМАБ для фотометрического и визуального определения первичных ароматических аминов – новокаина и стрептоцида ( $\lambda_{\text{max}} = 455 \text{ нм}$ ) [103], со значениями ДОС ( $1.8 \cdot 10^{-4} - 2.3 \cdot 10^{-2}$ ) моль/л и ( $6 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-2}$ ) моль/л соответственно.

Реакция взаимодействия ДМАБ с цефуроксимом, цефтриаксоном и цефотаксимом ранее исследована с помощью метода спектрофотометрии [104]. Методика включает два этапа – реакцию диазотирования (при 0-5°C) и последующее взаимодействие с ДМАБ. Определены оптимальные условия проведения реакции в водном растворе (15-20 мин при 50-60°C в присутствии 0.0625 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), а также стехиометрическое соотношение реагентов (1:1). Установлено, что максимумы всех производных цефалоспоринов находятся в интервале 400-420 нм.

Изучена реакция взаимодействия цефотаксима натрия с ДМАБ в кислой среде и разработана спектрофотометрическая методика определения антибиотика на основе окрашенного продукта ( $\lambda_{\text{max}}$  398 нм) со значениями ДОС (2-10) мкг/мл [105].

Взаимодействие ДМАБ с цефотаксимом, с образованием окрашенного в желто-оранжевый цвет аддукта (на примере ЦФТ), представлена на рис. 3.5.

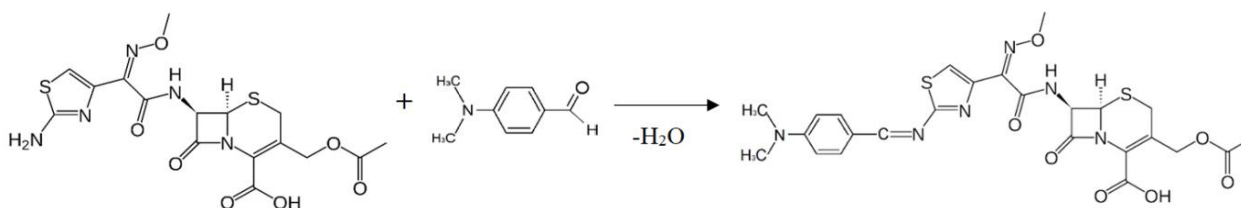


Рис. 3.5. Схема реакции взаимодействия цефотаксима с ДМАБ

**Система II.** Нингидрин (трикетогидринденгидрат) широко применяется при определении аминов, аминокислот и тиофена [90]. Нингидриновая реакция используется для качественного и количественного визуального определения  $\alpha$ -аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое) [106, 107]. Одним из преимуществ нингидриновой реакции является высокая контрастность (образование сине-фиолетового пурпура Руэманна).

McCaldin предположено [108], что реакции нингидрина с аминами, аминокислотами и иминокислотами протекают по одному и тому же механизму с образованием дикетогидриндилиден-дикетогидриндамина или

пурпура Руэмманна (*Ruemann's purple*). Исследование реакции взаимодействия  $\beta$ -лактамов с нингидрином в водных растворах [109, 110] подтверждает образование пурпура Руэмманна, а также молярное соотношение реагирующих реагентов 1:2.

На рис. 3.6 представлена предполагаемая схема взаимодействия  $\beta$ -лактамов с нингидрином, протекающая, вероятно, посредством окислительного дезаминирования первичной аминогруппы с последующей конденсацией восстановленного нингидрина с образованием окрашенного продукта реакции сине-фиолетового цвета с  $\lambda_{\max}$  550-570 нм.

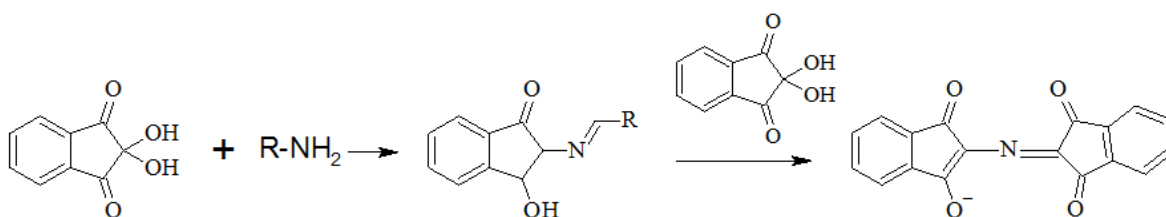


Рис. 3.6. Схема реакции взаимодействия  $\beta$ -лактамов с нингидрином

Индикаторная реакция с нингидрином также нами апробирована для экспрессного определения антибиотика группы аминогликозидов – гентамицина в диапазоне от 0.3 до 32 мг/мл [133].

**Система III.**  $\beta$ -Лактамы представляют собой соединения, которые имеют повышенную реакционную способность по отношению к нуклеофилам (например, гидроксид ионы, амины). Деграция  $\beta$ -лактамов обычно сопровождается раскрытием четырехчленного  $\beta$ -лактамного кольца. Это разложение может быть осуществлено в кислотный, нейтральной или щелочной средах. Ферментативный гидролиз, например,  $\beta$ -лактамазами, также приводит к раскрытию кольца и, следовательно, к потере биологической активности. Возможные реакции, приводящие к раскрытию  $\beta$ -лактамного кольца, показаны на рис. 3.7.



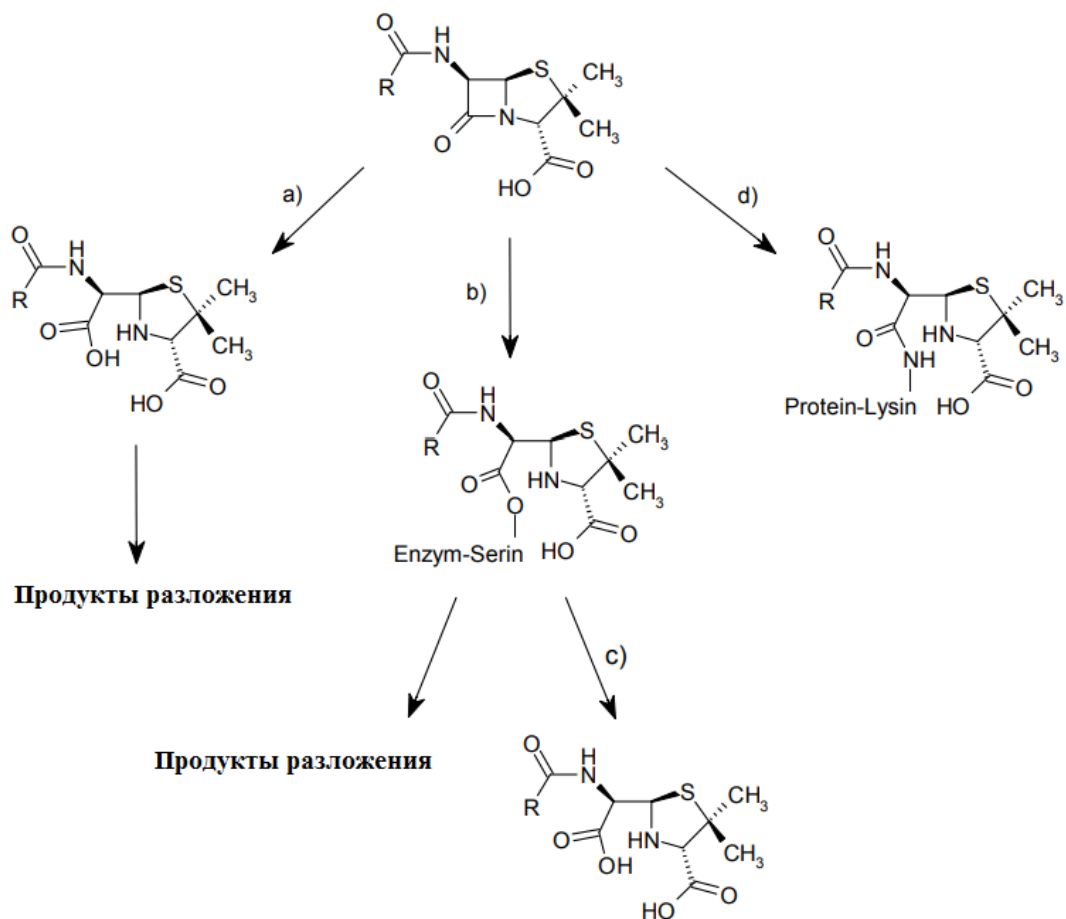


Рис. 3.7. Реакции приводящие к раскрытию  $\beta$ -лактамного кольца:  
 а) химический гидролиз, б) ферментативная реакция,  
 с) ферментативная реакция с  $\beta$ -лактамазой приводит к пеницилловой  
 кислоте, d) связывание с белками

Химическая деструкция антибиотиков сильно зависит от pH среды и может быть осуществлена как за счет нуклеофильной атаки, так и за счет электрофильного замещения. На рис. 3.8 показана реакция разложения пенициллина в щелочном растворе или в результате нуклеофильной атаки. Первоначально биологически неактивная пеницилловая кислота образуется путем раскрытия кольца.

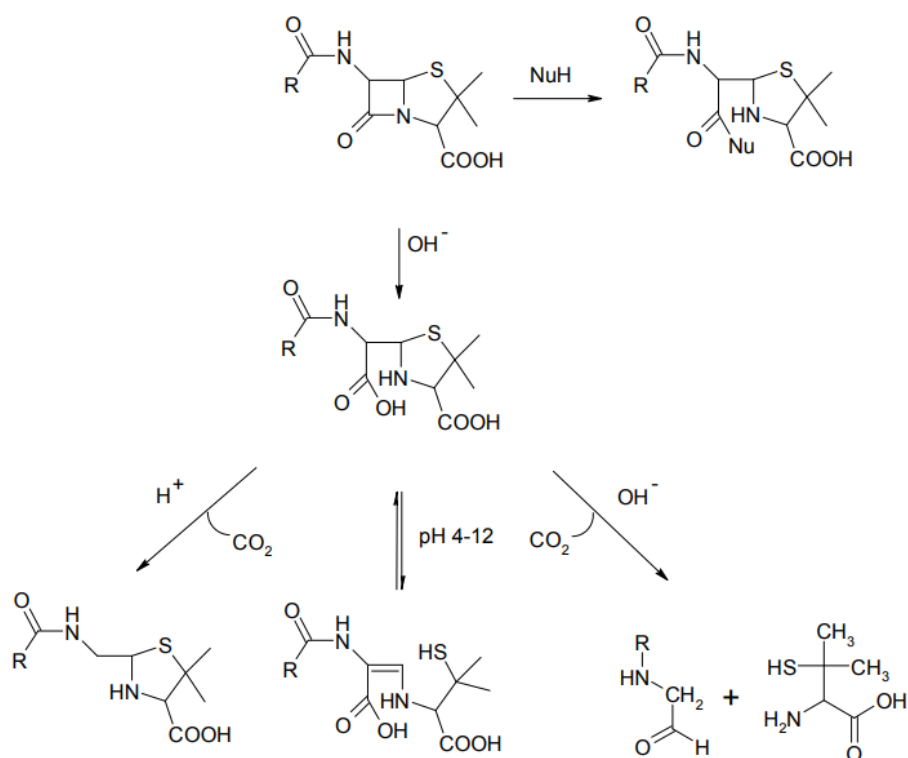


Рис. 3.8. Разложение  $\beta$ -лактамного кольца при нуклеофильной атаке

На рисунке 3.9 показано разложение  $\beta$ -лактамов в присутствии кислот (электрофильное замещение) на примере пенициллина.

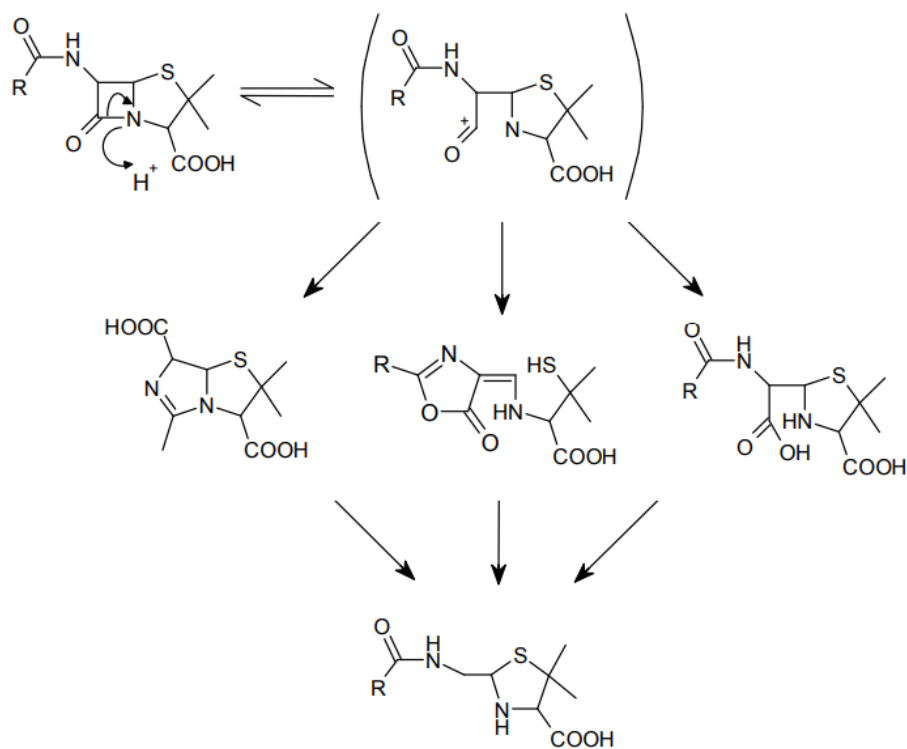


Рис. 3.9. Разложение  $\beta$ -лактамов в условиях электрофильного замещения

Реактив Фелинга (медно-тарtratный реактив или фелингова жидкость) представляет собой раствор  $\text{CuSO}_4$  и тарtrата калия-натрия в 10% растворе  $\text{NaOH}$ . Реакция с реактивом Фелинга (окисление глюкозы до глюконовой кислоты и восстановление из реактива оксида меди (I)) широко применяется в фармацевтической практике для определения ее в растворах для инъекций и таблетках. Упрощенно процесс окисления можно представить следующей схемой:  $\text{RCHO} + 2\text{Cu}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{RCOOH} + \text{Cu}_2\text{O} \downarrow + 2\text{H}_2\text{O}$

**Система IV.** В значительной степени способность  $\beta$ -лактамов к образованию комплексов с катионами металлов связана с их кислотно-основными свойствами, так как и в кислотно-основных реакциях и в реакциях комплексообразования участвуют, главным образом, амино- и карбоксильные группы антибиотиков. При этом, антибиотики аминокислотного типа проявляют более сильную комплексообразующую способность, чем антибиотики кислотного типа [111].

Авторами [112] исследовано два типа билигандных комплексов бензилпенициллина с ионами  $\text{Ni}(\text{II})$ ,  $\text{Zn}(\text{II})$ ,  $\text{Cd}(\text{II})$ ,  $\text{Fe}(\text{III})$  и  $\text{La}(\text{III})$ . Предложена структура комплексов (рис. 3.10) с октаэдрически координированными ионами металлов. Двухвалентные ионы (комплекс II) координируются через амидные и лактамные карбонилы и карбоксилатную группу пенициллина, тогда как трехвалентные ионы (комплекс I) координируются только через карбоксилатную группу и амидный карбонил.

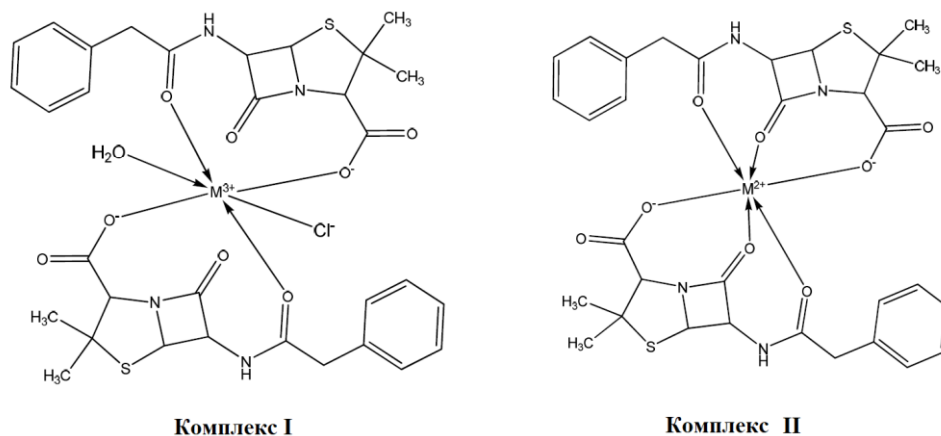
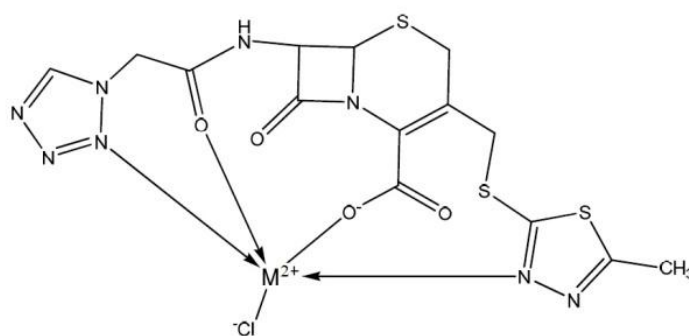


Рис. 3.10. Структурные формулы комплексных соединений бензилпенициллина с катионами металлов

Взаимодействие цефазолина с ионами переходных металлов (II) с образованием комплексов  $[M(\text{ЦФЗ})\text{Cl}]$ , где  $M = \text{Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Pd (II)}$  и  $[\text{Ag}_2(\text{ЦФЗ})_2\text{Cl}_2]$  изучено в работе [113]. Комплексные соединения были охарактеризованы физико-химическими и спектроскопическими методами. На основании данных ИК- и ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии сделано предположение, что ЦФЗ ведет себя как моноанионный тетрадентатный лиганд (рис. 3.11). Цефазолин-ионы координируются через атомы кислорода амидной и карбоксилатной группы атомы азота гетероциклов (комплекс III).



Комплекс III

Рис.3.11. Структурная формула комплекса цефазолина с катионами металлов

Циклическую вольтамперометрию применяли [114] для исследования реакции комплексообразования между различными цефалоспориновыми антибиотиками ионами  $\text{Cu (II), Cd (II)}$  и  $\text{Zn (II)}$ . Определен состав комплекса металл:лиганд для цефалексина и цефапирина равный 1:1, для цефуроксима и цефотаксима – 1:2 и соотношение 2:1 в случае комплексов цефтазидима.

Комплексы металлов тригидрата амоксициллина с  $\text{La (III), Ce (III), Sm (III)}$  и  $\text{Y (III)}$  были синтезированы авторами [115] с молярным соотношением 1:1. На основе методов элементного анализа, инфракрасной, УФ-видимой и флуоресцентной спектроскопии, термического анализа и сканирующей электронной микроскопии была предложена структура комплексов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что амоксициллин реагирует

с ионами металлов в виде тридентатных лигандов, координируя ион металла через amino-, иминогруппы и  $\beta$ -лактамыный карбонил.

Метод определения ампициллина, амоксициллина и цефалексина основанный на образовании комплексов с  $\text{Cu(II)}$ , предложен авторами [116]. Установлено, что в нейтральной среде (на фоне 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) образуются комплексы  $\text{Cu}_2\text{L}^{3+}$  зеленой окраски с полосами поглощения 640, 650 и 675 нм для ампициллина, амоксициллина и цефалексина соответственно.

Потенциометрическим методом авторами работы [117] исследовано комплексообразование  $\text{Cu(II)}$  с анионами ампициллина, амоксициллина и цефалексина. Обнаружены комплексы состава  $\text{CuL}^+$  и  $\text{Cu(OH)L}$ .

Исследована реакция взаимодействия шести цефалоспориновых антибиотиков (цефалексина, цефапирина, цефамандола, цефуроксима, цефотаксима и цефтазидима) с хлоридом кадмия [118] и цинка [119]. Полученные комплексы имели состав  $\text{Cd(ATB)Cl}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd(ATB)}_2\text{Cl}\cdot x\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Cd}_2(\text{ATB})\text{Cl}_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$ , где АТБ - соответствующий антибиотик,  $x = 1-3$ .

Взаимодействие восьми  $\beta$ -лактамыных антибиотиков с  $\text{Cu}^{2+}$  изучено авторами [96]. Установлено, что ампициллин, амоксициллин и цефалексин образуют устойчивые окрашенные комплексы с  $\text{Cu}^{2+}$ , при этом увеличивая растворимость  $\text{Cu}^{2+}$  в фосфатном буфере. Комплексы всех исследуемых антибиотиков (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин, цефалексин, цефаклор, цефтриаксон, цефтазидим, меропенем) имели состав 1:1.

На рис. 3.12. представлены полученные цветовые шкалы систем I - IV. Как видно, наиболее контрастная окраска характерна для системы II и III, переход окраски от белой к темно-фиолетовой и от светло-голубой к оливковой соответственно.

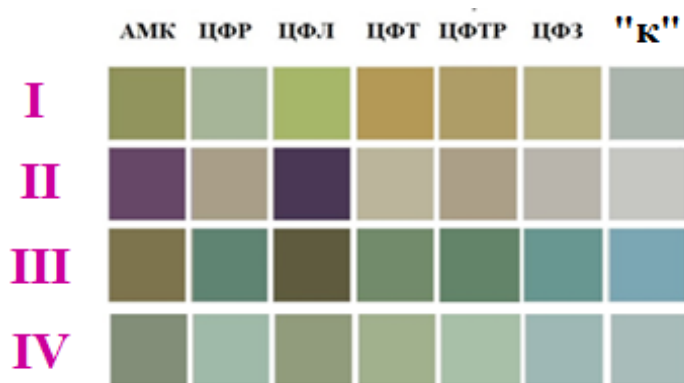


Рис. 3.12. Цветовые шкалы для систем I – IV

*Выбор индикаторной системы сопряжен с конкретной аналитической задачей. Так система I наиболее чувствительна, однако, не отличается высокой контрастностью. Система II напротив высококонтрастна, но требует дополнительной стадии нагревания. Для снижения времени и числа стадий экспресс-анализа предпочтительна либо система III, либо система IV, которые при этом малочувствительны.*

### **3.4. Оптимизация условий иммобилизации реагентов на целлюлозную матрицу**

Выбор твердого носителя/подложки в тест-методах – один из важных параметров в разработке способа анализа. Чтобы реализовать главное преимущество тест-методов – возможность экспрессного внелабораторного проведения анализа – важно подобрать носитель, на котором будет протекать аналитическая реакция. Сочетание подходящего носителя с закрепленным в нем (химическим или физическим способом) аналитическим реагентом приводит к формированию твердофазного реагента, который представляет собой тест-средство.

Несмотря на то, что в настоящее время бумажную основу в значительной степени вытесняют полимерные матрицы, целлюлозную бумагу по-прежнему широко применяют для иммобилизации реагентов. Вследствие низкой стоимости, хорошей поглотительной способности и биоразлагаемости бумагу активно применяют в качестве матрицы для

создания аналитических устройств с последующим визуально-колориметрическим, цветометрическим, флуоресцентным и электрохимическим детектированием различных аналитов [120].

Схематично иммобилизацию исследованных реагентов осуществляли, как показано ниже:



В настоящей работе оценку влияния различных условий при иммобилизации оценивали как визуально-колориметрически (сравнивая окраску тест-средств с контрольным образцом), так и цветометрически. Нами впервые предложен подход к цветометрической оценки окрашенных изображений тест-средств, путем сравнения значений интенсивностей цветовых параметров тестовых и контрольных образцов, т.е. расчете значений изменений интенсивностей ( $\Delta I_{\text{П}}$ ) цветовых параметров; а также в разработанных авторских программах по определению цветометрических характеристик изображений тест-средств.

Определены оптимальные условия иммобилизации реагентов из водных или спиртовых растворов при варьировании исходных концентраций реагентов ( $1 \cdot 10^{-3}$  -  $1 \cdot 10^{-1}$  М для нингидрина и ДМАБ), температуры высушивания (23-25, 80, 100°C), типа высушивания (на воздухе при комнатной температуре (23-25°C) либо в сушильном шкафу (сушильный шкаф «SNOL 58/350») в течение 10 мин), типа целлюлозной бумаги (фильтр «Синяя лента», «Белая лента», «Красная лента» с диаметром пор от 2-5 до 20-30 мкм (табл. 3.4)).

Таблица 3.4. Типы и некоторые характеристики обеззоленных фильтров

№	Марка фильтра	Фильтрующая способность, с	Диаметр, см	Пористость, мкм	Зольность фильтра, г
1	«Синяя лента»	не более 100	12.5	2-5	не более 0.00077-0.0016
2	«Белая лента»	не более 45	11	5-20	не более 0.00071-0.00078
3	«Красная лента»	не более 25	12.5	20-30	не более 0.00090-0.00101

Визуально оценивали однородность и равномерность окраски тест-средств. Установлено, что фильтры марки «Синяя лента» с минимальной пористостью обеспечивают наиболее равномерную окраску тест-средств [121, 122]. Тест-средства с иммобилизованным ДМАБ и нингидрином не приобретали окраски [123, 124], а с иммобилизованным реактивом Фелинга [125, 126, 127] и  $\text{CuSO}_4$  [128] тест-средства окрашивались в голубой и светло-голубой цвет соответственно.

Оптимальные концентрации реагентов при иммобилизации устанавливали по зависимостям  $\Delta I_{\text{П}}$  -  $c_{\text{реагента}}$  (рис. 3.13). Оптимальные концентрации реагентов выбирали таким образом, чтобы достичь максимальных значений  $\Delta I_{\text{П}}$  при минимальной его концентрации.

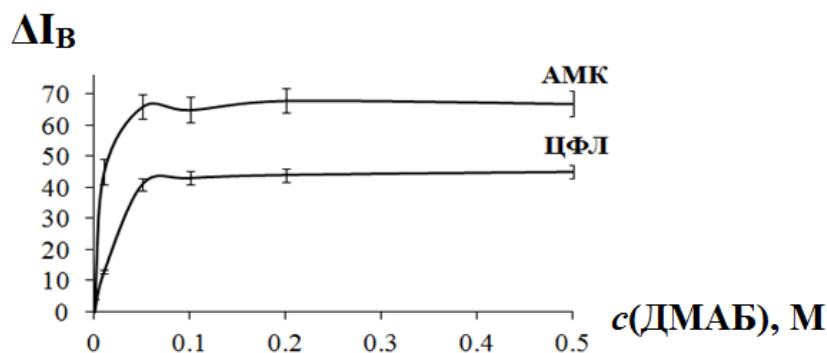


Рис. 3.13. Зависимость  $\Delta I_{\text{П}}$  -  $c(\text{ДМАБ}), c_{\text{антибиотика}} = 1 \text{ мг/мл}, 90^\circ\text{C}, 15 \text{ мин}$



Показано, что *тип, температура и время высушивания*, не влияют на цветовые характеристики ИБ, так как значения  $\Delta I_B$  в исследуемых системах в пределах доверительного интервала значительно не изменяется (табл. 3.5)

Таблица 3.5. Значения  $\Delta I_B$  систем III и IV при варьировании условий высушивания ИБ ( $c$  (ЦФЛ) = 4 мг/мл)

Система	Условия высушивания		
	23 - 25°C, 30 мин	80°C, 10 мин	100°C, 10 мин
III	60 ± 4	61 ± 3	64 ± 5
IV	27 ± 4	30 ± 5	28 ± 4

Так как при иммобилизации применяли спиртовые растворы ДМАБ и нингидрина, то высушивание ИБ проводили на воздухе (5-10 мин при 20-25°C) [129].

Для *оценки влияния ПАВ* применяли растворы трех типов ПАВ - катионного (цетилпиридиний хлорида (ЦПХ)), анионного ПАВ (додецилсульфата натрия (ДДС)), неионогенного ПАВ (оксиэтилированного алкилфенола (ОП-10)). На основе визуальной оценки установлено, что при добавлении ПАВ в систему  $\beta$ -лактам – реактив Фелинга происходит уменьшение контрастности окраски тест-средств по сравнению с контрольным образцом (в случае с ДДС и ЦПХ увеличение, в случае с ОП-10 уменьшение яркости окраски. При цветометрической оценке определяли значения изменений интенсивностей  $\Delta I_B$  ИБ для системы  $\beta$ -лактам – реактив Фелинга в присутствии и без ПАВ. Установлено, что значение  $\Delta I_{blue}$  в исследуемых системах без ПАВ больше, чем в присутствии поверхностно-активных веществ.

Таблица 3.6. Значения  $\Delta I_B$  в присутствии и без ПАВ ( $c = 4$  мг/мл)

Система	$\beta$ -лактам	Значения $\Delta I_B$			
		Без ПАВ	ДДС	ЦПХ	ОП-10
I	АМК	71 ± 6	36 ± 5	47 ± 5	56 ± 6
	ЦФЛ	51 ± 5	30 ± 6	16 ± 5	53 ± 3
	ЦФР	2 ± 6	8 ± 5	10 ± 6	5 ± 5
	ЦФТ	129 ± 5	111 ± 4	108 ± 6	123 ± 5
	ЦФЗ	21 ± 4	23 ± 5	20 ± 4	18 ± 4
	ЦФТР	15 ± 5	13 ± 4	18 ± 4	14 ± 5
II	АМК	51 ± 5	35 ± 4	37 ± 3	47 ± 5
	ЦФЛ	44 ± 6	37 ± 5	31 ± 4	38 ± 6
	ЦФР	20 ± 5	9 ± 5	18 ± 6	16 ± 5
	ЦФТ	15 ± 4	7 ± 5	16 ± 2	15 ± 6
	ЦФЗ	14 ± 4	10 ± 5	9 ± 4	11 ± 5
	ЦФТР	8 ± 4	4 ± 4	3 ± 5	6 ± 4
III	АМК	78 ± 4	40 ± 5	53 ± 6	45 ± 5
	ЦФЛ	85 ± 5	49 ± 4	70 ± 5	38 ± 5
	ЦФЗ	12 ± 5	12 ± 5	13 ± 5	15 ± 4
	ЦФТР	8 ± 4	10 ± 5	11 ± 3	7 ± 4
	ЦФР	6 ± 5	4 ± 3	-4 ± 5	1 ± 6
	ЦФТ	19 ± 5	12 ± 5	13 ± 6	5 ± 5
IV	АМК	39 ± 4	41 ± 3	36 ± 5	40 ± 4
	ЦФЛ	27 ± 3	25 ± 2	30 ± 5	31 ± 4
	ЦФР	15 ± 4	12 ± 5	17 ± 4	12 ± 3
	ЦФТ	10 ± 4	9 ± 4	7 ± 3	11 ± 5
	ЦФЗ	8 ± 4	9 ± 5	3 ± 4	6 ± 5
	ЦФТР	11 ± 4	8 ± 4	13 ± 6	9 ± 5

При добавление ПАВ в систему  $\beta$ -лактам – ДМАБ происходит уменьшение яркости окраски как контрольного, так и тест-образца, при этом уменьшается и контрастность окраски тест-средств по сравнению с контрольным образцом. Цветометрическая оценка значений изменений интенсивностей цветового параметра Blue в присутствии и без ПАВ показала, что наибольшие значения  $\Delta I_B$  ИБ определены для систем  $\beta$ -лактам – иммобилизованный ДМАБ без ПАВ.

На основе данных цветометрической обработки (табл. 3.6) установлено, что значения изменений интенсивностей  $\Delta I_B$  ИБ для системы  $\beta$ -лактам – иммобилизованный нингидрин – ПАВ не превышали значения  $\Delta I_B$  для данной системы без ПАВ.

Оптимальные условия иммобилизации реагентов на твердую подложку представлены в табл. 3.7.

Таблица 3.7. Оптимальные условия иммобилизации реагентов на целлюлозную матрицу

Система	$c_{\text{реагента}}, M$	T, °C	Время, мин	Матрица	Цвет тест - средства
I	0.05	23 - 25	5	фильтр «Синяя лента»	белый
II	0.05				белый
III	0.1	80 - 85	голубой		
IV			светло - голубой		

Дальнейшие исследования в системах I – IV проводились с тест-средствами, полученными при найденных оптимальных условиях.

\*\*\*

Сравнительная характеристика реакционной способности аналитов позволила выбрать четыре типа индикаторных реакций: конденсации (*n*-диметиламинобензальдегид), окислительной конденсации (нингидрин), окисления – восстановления (реактив Фелинга) и комплексообразования (сульфат меди (II)) для получения окрашенных аналитических форм в целлюлозной матрице. Выбор индикаторной системы сопряжен с конкретной аналитической задачей. Так, система I наиболее чувствительна, однако, не отличается высокой контрастностью. Система II напротив высококонтрастна, но требует дополнительной стадии нагревания. Для снижения времени и числа стадий экспресс-анализа предпочтительна либо система III, либо система IV, которые при этом малочувствительны.

## ГЛАВА 4. Изучение особенностей взаимодействия $\beta$ -лактамов с иммобилизованными пара-диметиламинобензальдегидом, нингидрином, реактивом Фелинга, сульфатом меди (II) с применением цифровых технологий

### 4.1. Спектроскопическое исследование систем

Для изучения реакции взаимодействия исследуемых  $\beta$ -лактамов с нингидрином, ДМАБ, реактивом Фелинга и  $\text{CuSO}_4$  на поверхности твердой матрицы применяли метод спектроскопии диффузного отражения и спектрофотометрии в УФ-видимой области.

**Система I.** Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича-Кубелки-Мунка систем  $\beta$ -лактамов – ДМАБ представлены на рис. 4.1. Как видно из рисунка при добавлении антибиотиков в систему наблюдается появление широкой полосы в интервале 410 - 430 нм. В спектрах диффузного отражения систем АМК/ЦФЛ/ЦФР/ЦФТР – ДМАБ наблюдается появление широкой полосы в области 415 - 420 нм с наибольшей интенсивностью для амоксициллина и цефалексина и 425 - 430 нм для цефотаксима.

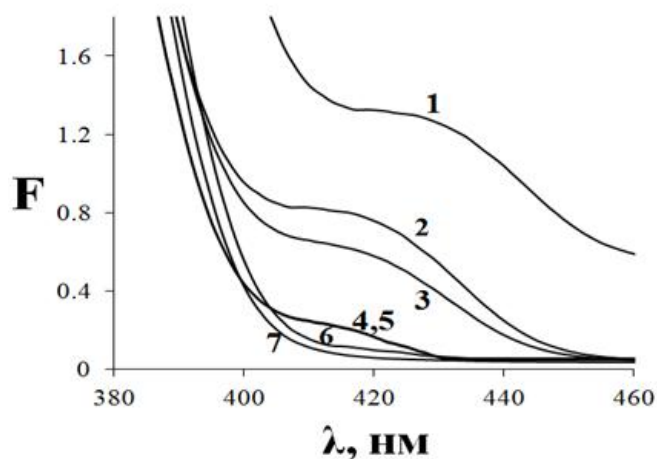


Рис. 4.1. Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича-Кубелки-Мунка для системы  $\beta$ -лактамов – ДМАБ (1 – ЦФТ, 2 – ЦФЛ, 3 – АМК, 4 – ЦФР, 5 – ЦФЗ, 6 – ЦФТР, 7 – ДМАБ;  $c = 4$  мг/мл,  $95^\circ\text{C}$ , 15 мин)

Значения  $\lambda$  азопроизводных  $\beta$ -лактамов находятся в диапазоне 400 – 430 нм в зависимости от условий проведения реакции с ДМАБ [112]. В табл. 4.1. представлены значения  $\lambda$  продуктов взаимодействия  $\beta$ -лактамов с ДМАБ в водных растворах и на поверхности твердой матрицы.

Таблица 4.1. Значения  $\lambda_{\max}$  продуктов взаимодействия  $\beta$ -лактамов с ДМАБ в водных растворах и на поверхности твердой матрицы

$\beta$ -лактамы	АМК	ЦФЛ	ЦФЗ	ЦФР	ЦФТ	ЦФТР
$\lambda$ , нм (СДО)	410-430	415-440	410-430	410-430	420-430	-
$\lambda$ , нм (СФМ, лит. данные)	-	-	-	420 [112]	400 [112]	420 [112]

Значения  $\lambda_{\max}$  азопроизводных  $\beta$ -лактамов в спектрах диффузного отражения и спектрах поглощения в водных растворах находятся в интервале 410 - 430 нм.

**Система II.** На рис. 4.2 представлены спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича-Кубелки-Мунка для систем АМК/ЦФЛ – иммобилизованный нингидрин. Значения  $\lambda_{\max}$  аналитических форм в спектрах диффузного отражения и спектрах поглощения в водных растворах (табл. 4.2) находятся в интервале 550 - 560 и 560 - 570 нм, а также при 400 и 410 нм для АМК и ЦФЛ соответственно [130, 131], что согласуется с данными литературы для аналогичных систем в водных растворах и на поверхности твердой матрицы [110, 132, 133].

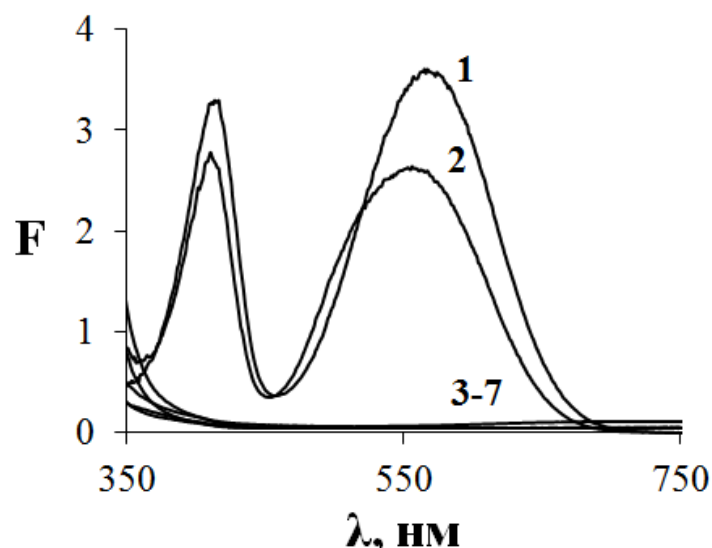


Рис. 4.2. Спектры диффузного отражения в виде функции Гуревича-Кубелки-Мунка системы II (1 - ЦФЛ, 2 - АМК, 3 – ЦФТ, 4 – ЦФР, 5 – ЦФЗ, 6 – ЦФТР, 7 – нингидрин;  $c = 8$  мг/мл,  $90^{\circ}\text{C}$ , 20 мин)

Таблица 4.2. Значения  $\lambda_{\text{max}}$  аналитических форм

$\beta$ -лактам	АМК	ЦФЛ
$\lambda_{\text{max}}$ , нм (СДО)	400; 550-560	400; 560-570
$\lambda_{\text{max}}$ , нм (СФМ)	400; 550-560	400; 550-560

В спектрах систем ЦФЗ, ЦФР, ЦФТР и ЦФТ - иммобилизованный нингидрин появление максимумов в области 350-750 нм не наблюдается. При этом цвет ИБ приобретал слабый розовый оттенок. Различный для исследованных  $\beta$ -лактамов характер взаимодействия, вероятно, можно объяснить особенностями строения исследуемых антибиотиков: у АМК и ЦФЛ первичная аминогруппа в боковой цепи молекулы, сопряжена с  $\text{C}=\text{O}$  группой; в молекулах ЦФТ и ЦФТР  $\text{NH}_2$ -группа расположена в тиазольном кольце; в молекуле ЦФР содержится карбаматная группа ( $\text{OC}(\text{O})\text{NH}_2$ ); при этом в молекуле цефазолина первичные аминогруппы вовсе отсутствуют (рис. 4.3).

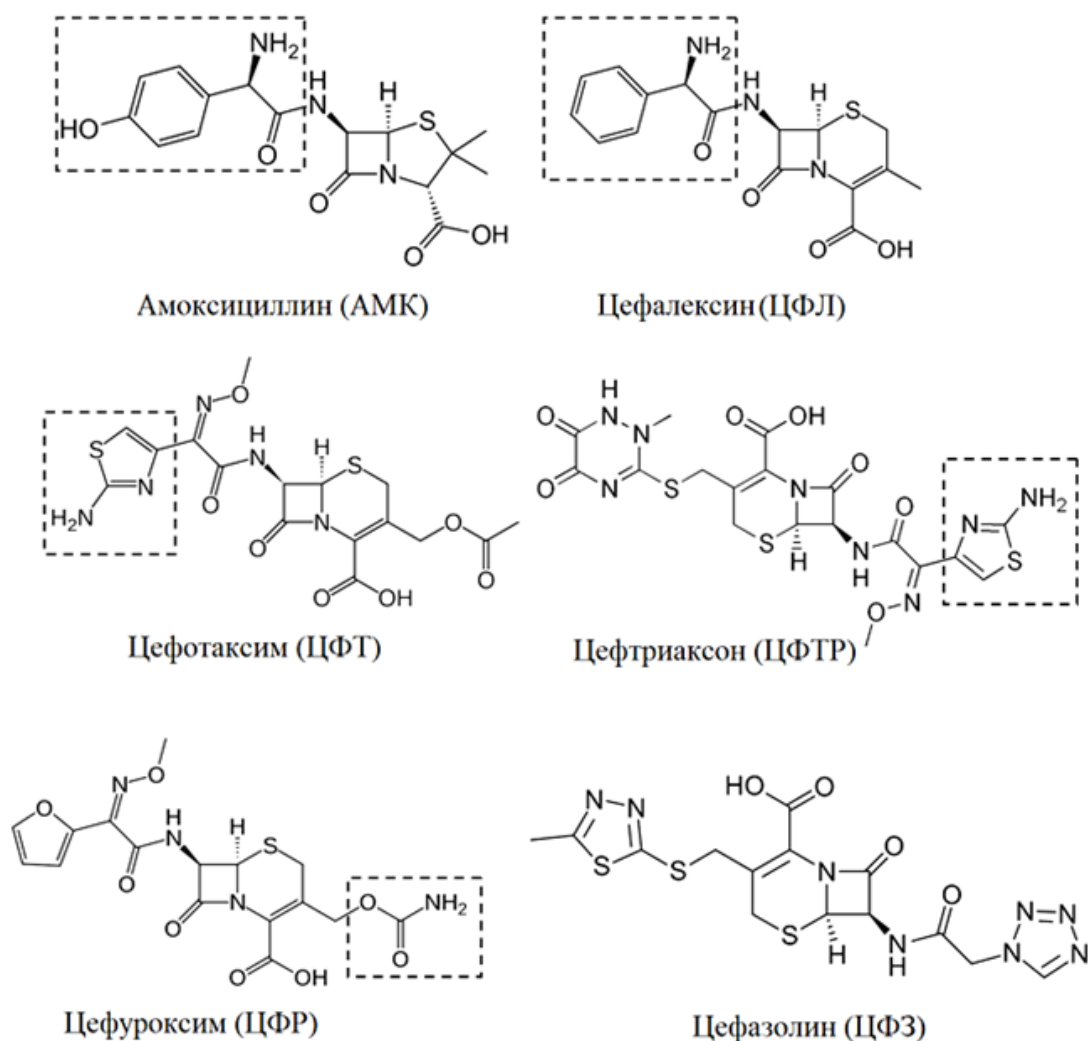


Рис. 4.3. Структурные особенности  $\beta$ -лактамовых антибиотиков (пунктирной линией выделены фрагменты молекул, содержащие  $\text{NH}_2$ -группу)

**Система III.** Реактив Фелинга вступает в реакцию окислительно-восстановительного типа и с  $\beta$ -лактамами, при этом система гетерогенна. В спектрах диффузного отражения наблюдается появление широкой полосы в интервале длин волн 650 - 750 нм (рис. 4.4).



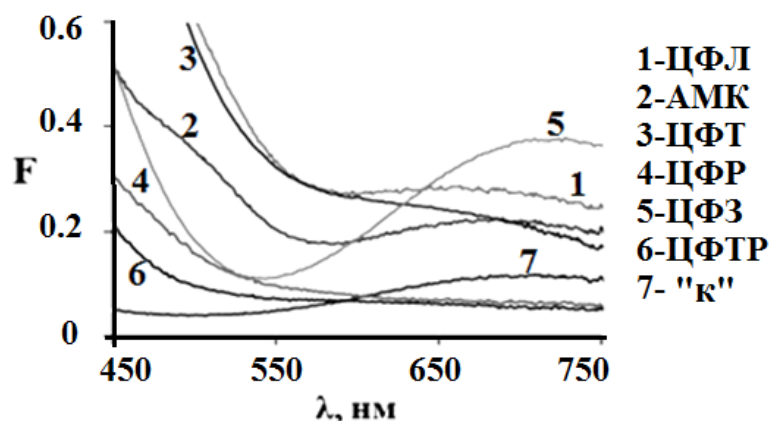
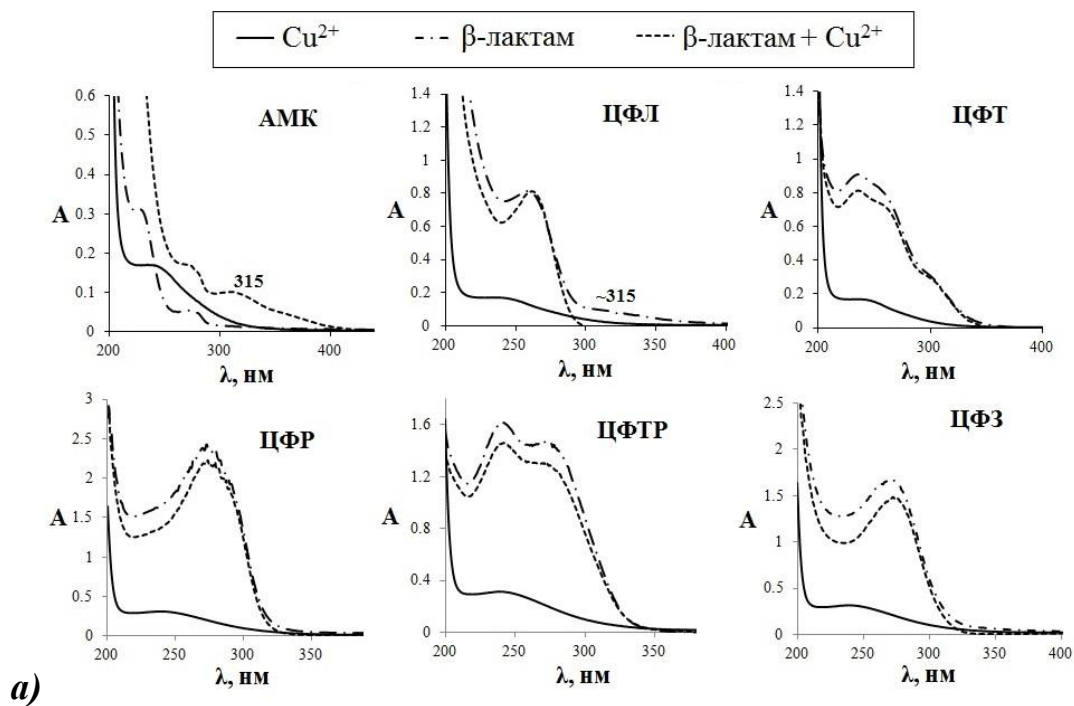


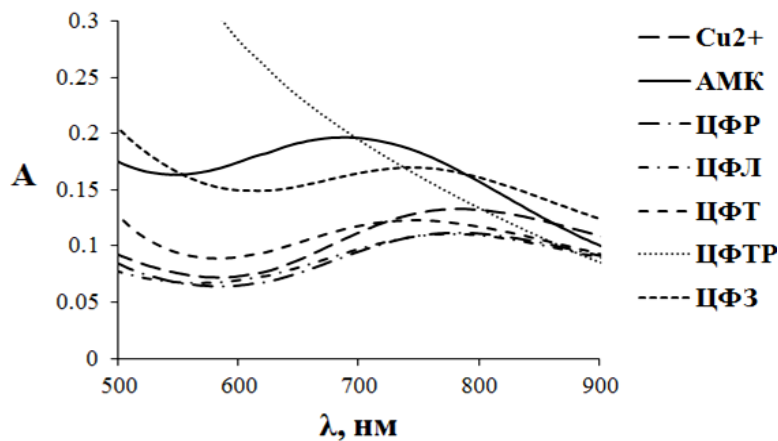
Рис. 4.4. Спектры диффузного отражения в виде функция Гуревича-Кубелки-Мунка для системы III ( $c_{\text{антибиотика}} = 16 \text{ мг/мл}$ )

При взаимодействии  $\beta$ -лактамов с иммобилизованным реактивом Фелинга цвет ИБ менялся с голубого на светло- либо темно-оливковый [134, 135, 136].

**Система IV.** Зарегистрированы спектры поглощения  $\beta$ -лактамных антибиотиков в присутствии ионов меди (II) при pH 7.4 (рис. 4.5 а). В УФ-области спектра только для АМК и ЦФЛ при добавлении ионов  $\text{Cu}^{2+}$  наблюдается появление широкого максимума с  $\lambda_{\text{max}} \sim 315 \text{ нм}$ , что вероятно объясняется участием  $\text{NH}_2$ -группы боковой цепи  $\beta$ -лактамов при взаимодействии с  $\text{Cu}^{2+}$ . Как отмечалось авторами [137, 138] координационные связи приводят к переходу с переносом заряда лиганд-металл ( $\text{Cu}^{2+}$ ) при  $\sim 310 \text{ нм}$ , что соответствует наблюдаемым максимумам поглощения. Ранее предполагалось, что  $\text{Cu}^{2+}$  образует тридентатный комплекс с цефалексином через аминные, карбоксилатные и карбонильные группы [112].



a)



б)



в)

Рис. 4.5. Спектры поглощения растворов  $\beta$ -лактамов ( $c(\text{AMK}, \text{ЦФЛ}, \text{ЦФТ}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ,  $c(\text{ЦФР}, \text{ЦФЗ}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ,  $c(\text{ЦФТР}) = 2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) в присутствии эквимольных количеств ионов меди (II) pH 7.4 (a); спектры поглощения растворов  $\beta$ -лактамов в присутствии эквимольных количеств ионов меди (II) pH 7.4 ( $c = 4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) (б); взаимодействие  $\beta$ -лактамов с ионов меди (II) (1 – AMK; 2 – ЦФР; 3 – ЦФЛ; 4 – ЦФТ; 5 – ЦФЗ; 6 – ЦФТР) (в)

На максимум при 273 нм для АМК, который возникает из-за запрещенного перехода  $\pi \rightarrow \pi^*$  в фенольном кольце [139], ионы меди не влияют. Основное структурное различие между АМК, ЦФЛ и другими четырьмя антибиотиками – это  $\text{NH}_2$ -группа в боковой цепи. Другой вероятный сайт связывания – N в амидной группе.

Спектры растворы  $\beta$ -лактамов в видимой области (рис. 4.5 б) в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$  имеют широкие максимумы при 660-680 нм для АМК, 650-670 нм для ЦФЛ, 700-720 нм для ЦФТ и 740-760 для ЦФР и ЦФТР. Окраска варьировалась от светло- до темно-зеленой (рис. 4.5 в). Появление максимума  $\sim 650$  нм авторами [140] было отнесено к d-d переходу в координационно-связанной  $\text{Cu}^{2+}$ .

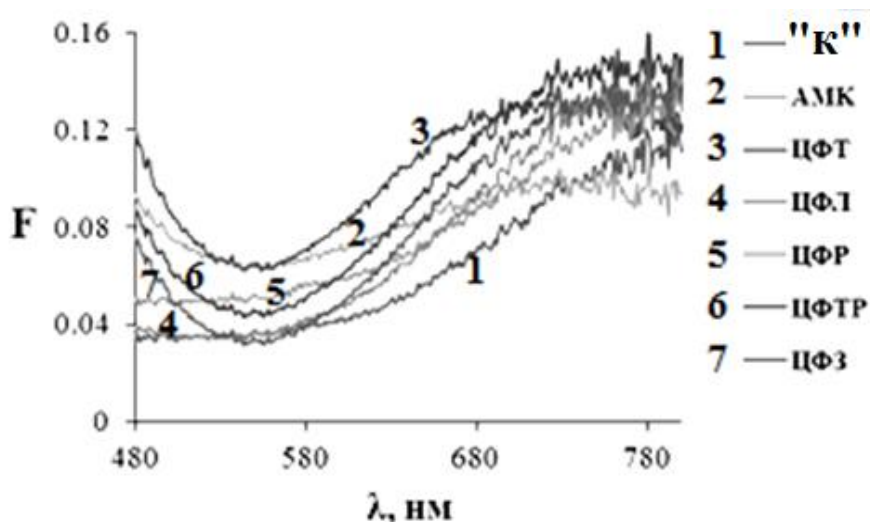


Рис. 4.6. Спектры диффузного отражения в виде функция Гуревича-Кубелки-Мунка для системы IV ( $c_{\text{антибиотика}} = 16$  мг/мл)

Соли меди (II) образуют с  $\beta$ -лактамами комплексные соединения. В отличие от электронных спектров поглощения,  $\lambda_{\text{max}}$  аналитических форм которых приведены в табл. 4.3, в спектрах диффузного отражения наблюдается появление широкой полосы в области 680 - 730 нм для всех анализируемых антибиотиков (рис. 4.6).

Таблица 4.3. Значения  $\lambda_{\max}$  аналитических форм

$\beta$ -лактамы	АМК	ЦФЛ	ЦФЗ	ЦФР	ЦФТ	ЦФТР
$\lambda_{\max}$ , нм (СДО)	680 - 740	700 - 750	760 - 780	740 - 780	690 - 740	690 - 740
$\lambda_{\max}$ , нм (СФМ)	315; 680 - 720	315; 700 - 740	700 - 740	720 - 780	700 - 760	-

### *Синтез комплексных соединений $\beta$ -лактамов с $\text{CuSO}_4$*

Синтез комплексных соединений  $\beta$ -лактамов с  $\text{CuSO}_4$  проводили в соответствии с методиками [141, 142]. Для этого смешивали при комнатной температуре исследуемый раствор (10 мл) антибиотика (2 мМ) с 10 мл водного раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.0 мМ). Образующийся осадок фильтровали, промывали небольшим количеством дистиллированной воды и сушили.

Полученные комплексы были растворимы в ДМСО, не растворимы в этаноле, ацетоне, хлороформе и имели преимущественно зеленую окраску. В табл. 4.4 приведены предполагаемые формулы и данные элементного анализа синтезированных координационных соединений меди (II) с  $\beta$ -лактамными антибиотиками.

Таблица 4.4. Аналитические данные координационных соединений меди (II) с  $\beta$ -лактамами

Соединение	Молекулярная масса	Найдено (вычислено), %			
		C	H	N	S
$\text{Cu}(\text{ЦФЗ})_2$	972.6	34.21 (34.58)	2.82 (2.90)	22.42 (23.0)	18.96 (19.78)
$\text{Cu}(\text{ЦФР})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	948.3	40.11 (40.53)	3.62 (3.83)	11.55 (11.82)	6.24 (6.76)
$\text{Cu}(\text{ЦФТ})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1026.5	36.86 (37.46)	3.48 (3.73)	13.14 (13.65)	12.08 (12.49)

Таким образом, полученные данные подтверждают образование комплексных соединений при взаимодействии исследуемых  $\beta$ -лактамов с  $\text{CuSO}_4$ .

#### 4.2. Оптимизация условий взаимодействия $\beta$ -лактамовых антибиотиков с иммобилизованными реагентами с применением цифровых технологий

Оптимизацию реакций антибиотиков с иммобилизованными реагентами осуществляли с применением цифровых технологий, специализированного программного обеспечения, в том числе авторских программ обработки изображений по схеме:



В качестве цифровых технологий в настоящем исследовании применяли комплекс различных устройств и электронных ресурсов. Аналитический сигнал регистрировали 13-мегапиксельной камерой смартфона Redmi 6A, для чего тест-средства помещали в бокс и фотографировали. Цветометрическую обработку изображений тест-средств проводили в специализированном программном обеспечении Adobe Photoshop® (А), разработанной авторской online-программе по определению интенсивностей RGB-параметров (В) [146], а также в разработанном нами приложении к смартфону (С) [143].

### *Авторские программы по обработке изображений тест-средств*

К цифровым технологиям относят все виды технологий, связанных с применением компьютеров и портативных устройств (смартфонов, планшетов и т.д.). Также к цифровым технологиям относят и электронные инструменты, устройства и ресурсы, которые способны хранить, производить и обрабатывать информацию.

Динамичное развитие цифровых технологий способствует широкому внедрению при решении задач аналитической химии подходов метода компьютерной или цифровой цветометрии. Основа данного метода заключается в количественном описании цвета анализируемого объекта. Проведение анализа методом цифровой цветометрии включает в себя регистрацию аналитического сигнала с помощью цифрового устройства (фотокамеры, камеры смартфона, сканера и т.д.) и последующую обработку изображения в специализированной программе. К преимуществам применения метода цифровой цветометрии можно отнести простоту выполнения, экономичность, возможность хранения информации в электронном формате. В отличие от таких устройств, как, например, сканеры, веб-камеры и цифровые фотоаппараты, смартфоны не нуждаются в подключении к компьютеру для последующей обработки информации. А с помощью специализированных приложений смартфоны способны рассчитывать концентрацию определяемого компонента [144, 145].

Разработана авторская программа для математической обработки изображений тест-средств на веб-платформе с применением языков программирования php и JavaScript, а также разметки страницы html [146]. Так как программа расположена на удаленном сервере, все вычисления выполняются на сервере и не расходуют вычислительную мощность устройства. Программа оптимизирована для работы с браузерами различных типов, не требует специализированного программного обеспечения, зависящего от типа операционной системы.

Разработано авторское приложение по обработке изображений для смартфона на базе Android [147, 148]. Данная операционная система выбрана из-за простоты программирования и преимущества бесплатной лицензии. Для создания приложения применяли клиент-серверную архитектуру, которая позволяет использовать данные от разных клиентов, а также позволяет клиенту получать эти данные из той сети, где работает сервер (например: в сети интернет). Сервер представляет собой Java приложение, которое взаимодействует с клиентами и хранит свои данные в системе управления базами данных MySQL.

Аналитический сигнал может быть количественно описан с помощью цветовой модели RGB, а также с помощью моделей HSV, CMYK и CIE Lab. Цветовые параметры разных цветовых моделей имеют разные максимальные и минимальные значения, например, Red, Green и Blue параметры изменяются от 0 до 255 (в RGB модели), а параметр Hue от 0 до 360° (в HSV модели). По этой причине, в авторском приложении для построения градуировочных зависимостей применяются значения интенсивностей цветовых параметров в долях (интенсивность параметра / максимальная интенсивность; например, для Red, Green, Blue максимальная интенсивность = 255).

*Основными функциями, заложенными в программу являются:*

- ✓ возможность задавать единицы измерения концентрации аналита;
- ✓ возможность автоматического построения градуировочных зависимостей интенсивности цветовых параметров от концентрации аналита;
- ✓ сохранение градуировочных зависимостей интенсивности цветовых параметров от концентрации аналита;
- ✓ возможность автоматического получения результата количественного определения аналита в режиме реального времени (по сохраненным ранее стандартным градуировочным зависимостям).

Для получения градуировочных зависимостей необходимо загрузить изображение стандартной цветовой шкалы, после выбора окрашенной области тест-средства, приложение автоматически начнет расчет значений интенсивностей цветовых параметров и построение калибровочной кривой.

При загрузке изображения образца антибиотика с неизвестной концентрацией необходимо выделить окрашенную область, нажать «Confirm» и приложение автоматически выведет результат содержания антибиотика на экран смартфона (рис. 4.7).

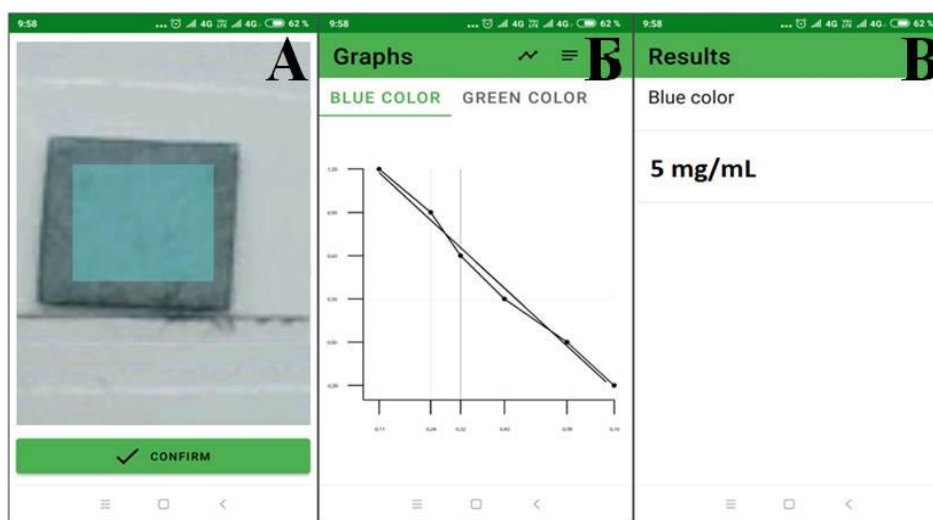


Рис. 4.7. Снимки экрана разработанного приложения для смартфона: экран обработки изображения (а), экраны с полученной градуировочной зависимостью (б) и окончательный результат (в)

Преимущества и необходимые требования, применяемых в исследовании программ, представлены в табл. 4.5.



Таблица 4.5. Основные опции и требования применяемых в исследовании программ

Опция/требования	А	В	С
1. Подходит для ПК и портативных устройства	+	+	-
2. Расчет значений RGB, CMYK, HSV – моделей	+	-	+
3. Не требует специализированного ПО	+	+	-
4. Получение зависимостей $I_{\text{канала}} - c$	-	-	+
5. Сохранение зависимостей $I_{\text{канала}} - c$	-	-	+
6. Расчет концентрации аналита в online - режиме	-	-	+

Установлено (табл. 4.6), что значения цветовых параметров, полученные в коммерческой программе (Adobe Photoshop®), а также разработанной авторской программе и приложении к смартфону идентичны.

Таблица 4.6. Адекватность цифровых технологий при регистрации некоторых цветовых параметров (ЦФЛ, система III)

Цветовой параметр	Программа		
	Adobe Photoshop®	Авторская программа по определению R, G, B-параметров	Приложения для смартфона
Red	83 ± 4	83 ± 5	83 ± 3
Green	103 ± 3	103 ± 4	103 ± 4
Blue	91 ± 4	91 ± 4	91 ± 4

В настоящем исследовании впервые проведена визуальная, а также с помощью метода цветометрии оценка различных условий (рН среды, времени и температуры проведения тест-реакции, ПАВ) при экспресс-определении  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Реализован новый подход к цветометрической обработке изображений тест-средств путем применения цифровых технологий, специализированного программного обеспечения, в

том числе авторского приложения для смартфона. А также предложен подход к цветометрической оценке окрашенных изображений тест-средств, путем сравнения значений интенсивностей цветовых параметров тест- и контрольных образцов, т.е. расчете значений изменений интенсивностей цветовых параметров ( $\Delta I_{\text{П}}$ ).

В литературе определение первичных ароматических аминов с образованием оснований Шиффа рекомендуется проводить в различных средах: при pH 2 [149], в 40% уксусной кислоте [150], а также в присутствии органических растворителей. Для определения оптимального значения pH на окраску тест-средств при взаимодействии  $\beta$ -лактам – иммобилизованный ДМАБ применяли ацетатно-аммиачные буферные растворы (pH 3.2 и 4.1), а также 0.1M HCl. Для этого на индикаторную бумагу с иммобилизованным ДМАБ наносили анализируемый раствор антибиотика в буферном растворе (pH 3.2, 4.1) либо в 0.1M HCl, далее тест-средства нагревали в течение 10 мин при 80°C. Установлено, что наиболее контрастная окраска тест-средств по сравнению с контрольным образцом наблюдается в присутствии 0.1M HCl как для амоксициллина, так и для цефалексина, цефуроксима и цефотаксима.

Таблица 4.7. Значения  $I_{\Delta B}$  ИБ при различных значениях pH (система I,  $c = 4$  мг/мл)

$\beta$ -лактам	$I_{\Delta B}$		
	pH 3*	pH 4*	pH 1**
АМК	45 ± 5	9 ± 5	66 ± 6
ЦФЛ	56 ± 5	50 ± 5	72 ± 5
ЦФР	21 ± 6	7 ± 5	26 ± 5
ЦФТ	43 ± 5	11 ± 6	67 ± 5
ЦФЗ	92 ± 5	89 ± 4	94 ± 5
ЦФТР	78 ± 4	82 ± 5	88 ± 4

\* ацетатно - аммиачный буферный раствор, \*\* HCl

Наибольшее значение  $I_{\Delta_B}$  (табл. 4.7), обнаружены для ИБ в присутствии 0.1М HCl для всех исследуемых  $\beta$ -лактамов. Поэтому дальнейшие исследования в системе I проводили в присутствии HCl.

Окраска тест-средств с иммобилизованным нингидрином в среде ацетатно-аммиачных буферных растворов изменяла с белой на фиолетовую, вероятно, вследствие взаимодействия нингидрина с компонентами буферной смеси (аммиак). Поэтому, основываясь на литературных данных [108], при проведении реакции  $\beta$ -лактамов с нингидрином применяли фосфатный буферный раствор с pH 7.4.

Проводили *оценку влияния pH* в системах III и IV, применяя ацетатно-аммиачные буферные растворы (pH 3, 7, 9) и фосфатно - солевой буферный раствор (PBS). На индикаторную бумагу с иммобилизованным реагентом наносили анализируемый раствор антибиотика в буферном растворе или дистиллированной воде. При добавлении буферных растворов в систему происходит уменьшение яркости окраски как контрольных, так и тестовых образцов. Изменение окраски контрольных образцов происходит, вероятно, вследствие взаимодействия иммобилизованного сульфата меди (II) с компонентами буферного раствора (образование аммиакатов меди).

При цветометрической оценке определяли значение  $\Delta I_B$  ИБ в системе III (на примере ЦФЛ) в различных буферных растворах (табл. 4.8). Установлено, что значение  $\Delta I_B$  в исследуемой системе без буферного раствора выше, чем в присутствии ацетатно-аммиачных буферных растворов с pH 3, 7, 9. Также принимая во внимания то, что реактива Фелинга является щелочным агентом (в состав входят тартрата Na-K и NaOH, pH раствора >11), дальнейшие исследования проводили применяя водные растворы исследуемых  $\beta$ -лактамов [151, 152].

Таблица 4.8. Значения  $\Delta I_B$  ИБ при различных значениях pH (система III,  $c=8$  мг/мл)

$\beta$ -лактамы	pH 4*	pH 7*	pH 9*	pH 7**
АМК	27 ± 5	31 ± 6	37 ± 5	39 ± 5
ЦФЛ	16 ± 6	18 ± 5	26 ± 6	25 ± 5
ЦФР	6 ± 5	7 ± 4	10 ± 5	13 ± 4
ЦФТ	31 ± 5	27 ± 5	37 ± 5	38 ± 5
ЦФТР	5 ± 5	3 ± 5	5 ± 5	8 ± 6
ЦФЗ	2 ± 4	1 ± 5	4 ± 4	5 ± 5

\* ацетатно - аммиачный, \*\* фосфатно - солевой буферный раствор (PBS)

Таблица 4.9. Значения  $\Delta I_B$  ИБ при различных значениях pH (система IV,  $c_{\text{антибиотика}} = 4$  мг/мл)

$\beta$ -лактамы	pH 4*	pH 7*	pH 9*	pH 7**
АМК	27 ± 5	31 ± 5	37 ± 5	39 ± 6
ЦФЛ	16 ± 4	18 ± 5	26 ± 6	25 ± 6
ЦФР	6 ± 5	7 ± 6	10 ± 5	13 ± 5
ЦФТ	31 ± 6	27 ± 5	37 ± 5	38 ± 6
ЦФТР	5 ± 5	3 ± 5	5 ± 6	8 ± 5
ЦФЗ	2 ± 5	1 ± 5	4 ± 6	5 ± 6

\* ацетатно - аммиачный, \*\* фосфатно - солевой буферный раствор (PBS)

В табл. 4.9 представлены значения изменения интенсивностей цветовых параметров модели RGB в системе IV. Как видно из данных табл., оптимальным (с наибольшими значениями изменений интенсивностей цветовых параметров) является применение PBS-буфера.

*Оценка влияния ПАВ.* Показано (табл. 4.10), что значительного влияния на цветовые характеристики ИБ с иммобилизованным на целлюлозной матрице реагентами обнаружено не было.

Таблица 4.10. Значения  $\Delta I_B$  ИБ в присутствии ПАВ ( $c = 4$  мг/мл)

Система	$\beta$ -лактам	$\Delta I_B$			
		Без ПАВ	ДДС	ЦПХ	ОП-10
I	ЦФЛ	$51 \pm 5$	$49 \pm 5$	$46 \pm 5$	$42 \pm 5$
	ЦФТ	$66 \pm 5$	$71 \pm 6$	$64 \pm 5$	$61 \pm 5$
II	АМК	$40 \pm 4$	$35 \pm 5$	$42 \pm 7$	$75 \pm 5$
	ЦФЛ	$74 \pm 5$	$74 \pm 5$	$72 \pm 5$	$86 \pm 6$
III	ЦФЛ	$25 \pm 5$	$29 \pm 5$	$30 \pm 5$	$23 \pm 5$
	ЦФР	$38 \pm 6$	$27 \pm 5$	$21 \pm 5$	$17 \pm 4$
IV	ЦФТ	$38 \pm 5$	$43 \pm 4$	$34 \pm 5$	$42 \pm 3$
	ЦФР	$17 \pm 5$	$19 \pm 4$	$16 \pm 3$	$14 \pm 5$

*Оценка влияния температуры и времени реакции:* для определения оптимального времени и температуры проведения тест-реакции в системе  $\beta$ -лактам – иммобилизованный ДМАБ строили зависимости изменения интенсивностей цветового параметра Blue ИБ по сравнению с контрольным (рис. 4.8 а, б). Как видно из рисунка, для исследуемых систем через ~25-30 мин при  $100^\circ\text{C}$  значения изменения интенсивностей параметра Blue максимальны, а ИБ имеют наиболее интенсивную окраску.

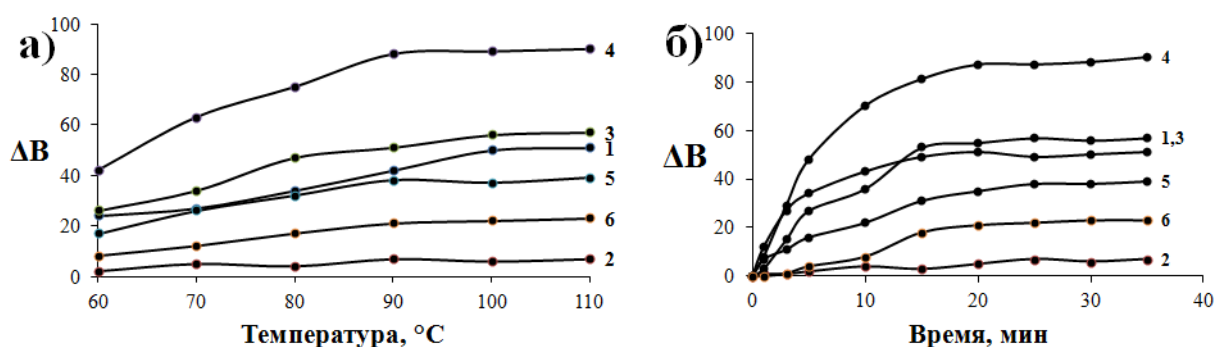


Рис. 4.8. Зависимости  $\Delta I_B$  от температуры (а) и от времени (б) нагревания ИБ: 1 – АМК, 2 – ЦФР, 3 – ЦФЛ, 4 – ЦФТ, 5 – ЦФТР, 6 - ЦФЗ (система I,  $c = 4$  мг/мл,  $0.1$  М HCl)

При определении оптимальных условий взаимодействия  $\beta$ -лактамов с нигдрином на поверхности целлюлозной матрицы исследовали влияние температуры и времени проведения реакции. Для определения оптимальной температуры проведения тест-реакции строили графики зависимостей изменения интенсивностей цветового параметра Green ( $\Delta I_G$ ) от температуры нагревания индикаторных бумаг по сравнению с контрольным образцом. Зависимость изменений интенсивностей параметра Green от времени и температуры нагревания тест-средств (рис. 4.9 а, б) показала, что через 15-20 мин их значения максимальны, а контрастность окраски при этом наибольшая.

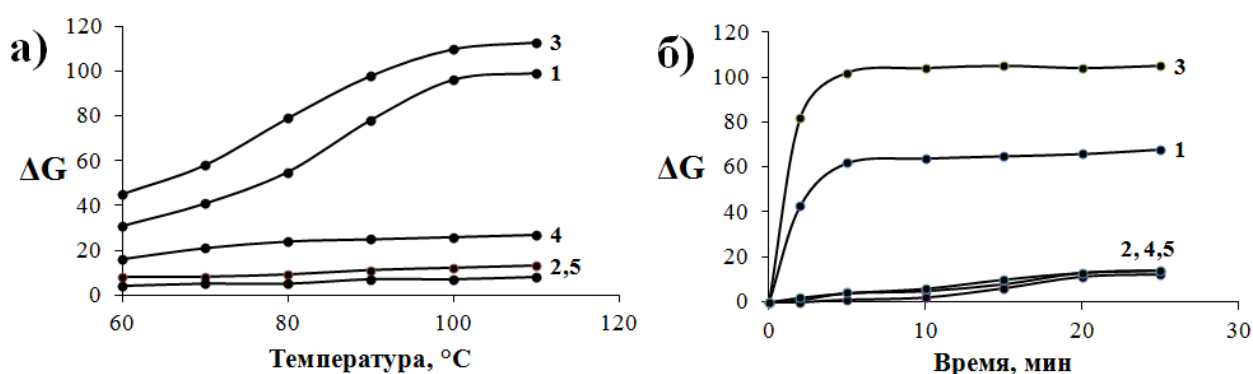


Рис.4.9. Зависимости  $\Delta I_G$  от температуры (а) и времени нагревания (б): 1 – АМК, 2 – ЦФР, 3 – ЦФЛ, 4 – ЦФТ, 5 – ЦФТР (система II,  $c = 4$  мг/мл, рН 7)

Оценка влияния времени проведения реакции (рис. 4.10 а, б) показала, что оптимальным для системы систем III и IV является 15 -20 мин для всех анализируемых антибиотиков.

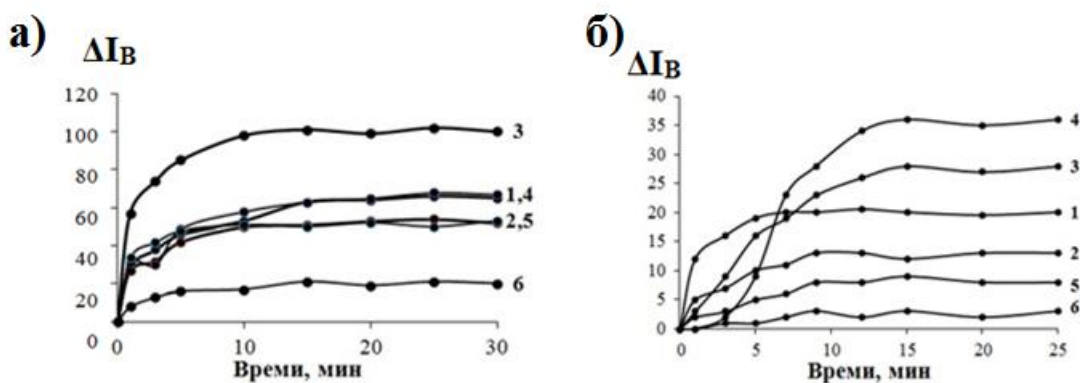


Рис.4.10. Зависимости  $\Delta I_B$  от времени проведения реакции в системе III (а) и IV (б): 1 – АМК, 2 – ЦФР, 3 – ЦФЛ, 4 – ЦФТ, 5 – ЦФТР ( $c = 4$  мг/мл)

В табл. 4.11 сведены оптимальные условия реакций в системах I – IV.

Таблица 4.11. Оптимальные условия реакций  $\beta$ -лактамов с иммобилизованными реагентами

Система	pH	Время, мин	Температура, °C
I	1	25 - 30	90 - 100
II	7	20 - 25	100 - 110
III	10	15 - 20	25
IV	7	15 - 20	25

### 4.3. Оценка влияния условий регистрации параметров цветности и типа фоторегистрирующего устройства

Смартфоны являются одними из наиболее распространенных фоторегистрирующих устройств, благодаря простоте применения, портативности, возможности хранения информации, а также возможности проводить цветометрическую оценку в online-режиме без подключения к дополнительному оборудованию. В настоящем исследовании для оценки влияния типа фоторегистрирующего устройства применяли различные марки смартфонов (Redmi 6A, Lenovo K6 Power), а также офисный планшетный сканер (Epson). Изображения тест-средств регистрировали без применения специализированных устройств, а также в боксе для фотографирования (с двумя полосками светодиодного освещения (5V, 1A)).

В табл. 4.12 представлены уравнения регрессии градуировочных зависимостей, а также значения изменения интенсивностей параметра Blue, полученных при варьировании типа и условий фотографирования (ЦФЛ – система I).

Таблица 4.12. Варьирование условий фотографирования и типа фоторегистрирующего устройства ( $\Delta I_B$  ЦФЛ – система I)

Устройство	$I_{C0} - I_{Ci} = \Delta I$	Уравнение $\Delta I_B - lgc; r^2$
Камера смартфона Redmi 6A	$170 - 105 = 65^*$	$y = -33x + 140; 0.98$
	$192 - 128 = 64$	$y = -33x + 160; 0.98$
Камера смартфона Lenovo K6 Power	$200 - 134 = 66^*$	$y = -32x + 170; 0.97$
	$168 - 107 = 61$	$y = -33x + 140; 0.97$
Сканер EPSON	$255 - 189 = 66$	$y = -33x + 220; 0.98$

\*Фотобокс  $22 \times 23 \times 24$  см с двумя полосками светодиодного освещения (5V, 1A)

Как видно из полученных данных, значения изменения интенсивностей параметра Blue, а также полученные уравнения градуировочных зависимостей одинаковы в пределах доверительного интервала (значения  $\Delta I$  от 61 до 66). Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что ни тип фоторегистрирующего устройства, ни условия фотографирования значительно не влияют на полученные результаты.

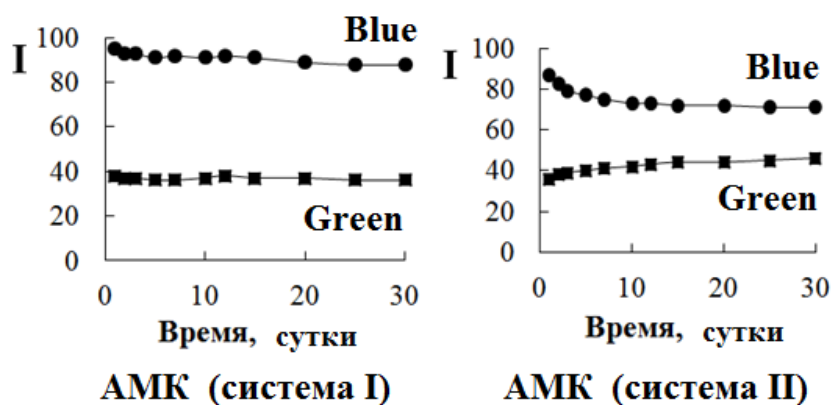


Рис. 4.11. Оценка стабильности окраски тест-средств (зависимость  $I_{\text{канала}}$  – время)

Оценка стабильности ИБ (рис. 4.11) показала, что значения интенсивностей параметров (на примере АМК – система I/II) тест-средств значительно не изменяются в течении как минимум 30 дней.



\*\*\*

Для изучения особенностей взаимодействия антибиотиков с иммобилизованными реагентами применен цветометрический подход, состоящий в регистрации изменений интенсивностей соответствующих параметров ( $\Delta I_{\Pi}$ ) наряду с методами видимой, УФ-спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения, который позволяет выявить закономерности формирования соответствующих аналитических форм.

## ГЛАВА 5. Колориметрическое определение $\beta$ -лактамов в лекарственных препаратах

### 5.1. Визуальные способы

#### *Построение цветовой шкалы. Влияние цветового фона*

Концентрации  $\beta$ -лактамов для приготовления цветовой шкалы (рис. 5.1) подбирали таким образом, чтобы ширина шага шкалы позволяла бы визуально распознавать изменение окраски двух ближайших концентраций, а также не приводила бы к большой погрешности определения. В результате был выбран оптимальный шаг, при котором каждая последующая концентрация отличается от предыдущей в два раза [153].

Цветной фон при визуальном определении придает образцам дополнительный оттенок. В работе [154] предложено располагать образцы тест-шкалы на фоне, цвет которого является строго дополнительным к цвету тест-образцов. Однако, вследствие широкого диапазона концентраций при определении  $\beta$ -лактамов, значения насыщенности цвета тест-средств изменяются также в широком интервале: так, для системы ЦФЛ – иммобилизованный нингидрин от 3% до 23%, для системы ЦФЗ – иммобилизованный ДМАБ от 48% до 140%. Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали ахроматический, универсальный по отношению ко всем цветам белый фон, т.к. он не придает тест-образцам дополнительного оттенка и не мешает визуальному определению.

МГ/МЛ	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16
АМК								
ЦФЛ								
ЦФТ								
ЦФТР								
ЦФЗ								
ЦФР								

МГ/МЛ	0	0.5	1	2	4	8	16
АМК							
ЦФЛ							
ЦФТ							
ЦФТР							
ЦФР							

МГ/МЛ	0	1	2	4	8	16
АМК						
ЦФР						
ЦФЛ						
ЦФТ						
ЦФТР						
ЦФЗ						

МГ/МЛ	0	1	2	4	8	16
АМК						
ЦФР						
ЦФЛ						
ЦФТ						
ЦФТР						
ЦФЗ						

Рис. 5.1. Цветовые шкалы для визуального определения  $\beta$ -лактамов

### ***Метрологические характеристики в тест-методах анализа***

Подходы к оценке метрологических характеристик для методик визуального тестирования существенно отличаются от расчетов в инструментальных методах анализа. Методология, основные подходы и способы экспериментальной оценки метрологических характеристик в тест-методах рассмотрены в работах [155 - 159].

Основными метрологическими характеристиками методик обнаружения с бинарным откликом являются интервал ненадежности (ИН) и предел обнаружения (ПрО) аналита.

### ***Интервал ненадежности и предел обнаружения аналита***

Качественной характеристикой тест-методики является предел обнаружения (limit of detection,  $c_{\min}$ , ПрО) – «наименьшее содержание аналита, при котором он может быть обнаружен по данной методике анализа вещества или материала с заданной доверительной вероятностью» [160].

Зависимости вероятности обнаружения аналита ( $P(c)$ ) от его концентрации («Кривые эффективности») применяются для оценки достоверности методик с визуальной индикацией согласно [91]. При оценке предела обнаружения определяют *интервал ненадежности* – интервал концентраций аналита, в котором имеются положительные и отрицательные результаты наблюдений о появлении/изменении окраски анализируемого образца по сравнению с контрольным ( $0 < P(c) < 1$ ).

Вероятность обнаружения вычисляют по формуле :

$$P(c_i) = n_i/N_i,$$

где  $n_i$  – число положительных наблюдений,  $N_i$  – общее число испытаний для концентрации  $c_i$ . *Предел обнаружения* определяют, как правую границу интервала ненадежности, то есть концентрацию, при превышении которой вероятность ошибки I рода (вероятность ложного заключения об отсутствии аналита) меньше 1%.

В настоящей работе определение интервала ненадежности и предела обнаружения  $\beta$ -лактамов проводили способом, ранее применявшимся для различных тест-систем [91]. Предварительно с помощью группы независимых наблюдателей устанавливали интервал ненадежности для анализируемых систем [161, 162]. Так, например, для системы ЦФЛ – ИРФ [163], вблизи значения нижней границы цветовой шкалы (0.5 мг/мл) готовили три тест-шкалы с концентрациями цефалексина 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6 мг/мл. С помощью группы независимых наблюдателей ( $n = 15$ ) оценивали присутствие или отсутствие изменения окраски по сравнению с контрольным образцом. Строили зависимость вероятности обнаружения от концентрации ЦФЛ (рис. 5.2). Предел визуального обнаружения определяли, как концентрацию цефалексина, соответствующую вероятности обнаружения 0.99. Предел визуального обнаружения составил 0.4 мг/мл [164]. Интервал ненадежности (ИН) тест-реакции (вероятности обнаружения от 0.05 до 0.99) составил 0.2 – 0.4 мг/мл.

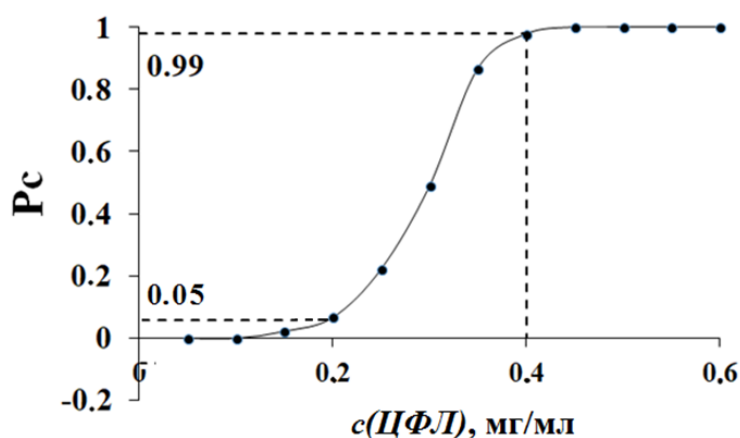


Рис. 5.2. Зависимость вероятности обнаружения цефалексина от его концентрации (мг/мл) в интервале ненадежности

Для проверки гипотезы о законе распределения строили зависимости функций нормального, логнормального, экспоненциального распределений и распределения экстремального значения первого рода (Вейбулла) от концентрации (логарифма концентрации) цефалексина и определяли коэффициенты корреляции полученных уравнений прямых (табл. 5.1).

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что эмпирические распределения частот обнаружения ЦФЛ с использованием индикаторных бумаг на основе реактива Фелинга наиболее близки к функции экспоненциального распределения ( $r^2 = 0.997$ ) и функции распределения Вейбула ( $r^2 = 0.993$ ). Полученные значения коэффициентов корреляций уравнений прямых составляли  $\geq 0.88$ , что подтверждает согласованность экспериментальных данных с функциями распределения и правильность выбранного диапазона ИН.

Таблица 5.1. Функции распределения, испытанные при аппроксимации зависимости  $P_c$  от концентрации ЦФЛ (ЦФЛ, система III)

Функция распределения	Линейная закономерность	Коэффициент корреляции
Нормальное	$\Psi [P(c)]$ от $c$	0.95
Логнормальное	$\Psi [P(c)]$ от $lnc$	0.88
Экспоненциальное	$\Psi [\ln(1/(1-P(c)))]$ от $c$	0.99
Экстремального значения первого рода (Вейбулла)	$\Psi [\ln(\ln(1/(1-P(c))))]$ от $lnc$	0.99

Соответствующие зависимости вероятностей обнаружения антибиотиков от их концентрации в интервале ненадежности для систем I-IV представлены на рис. 5.3.

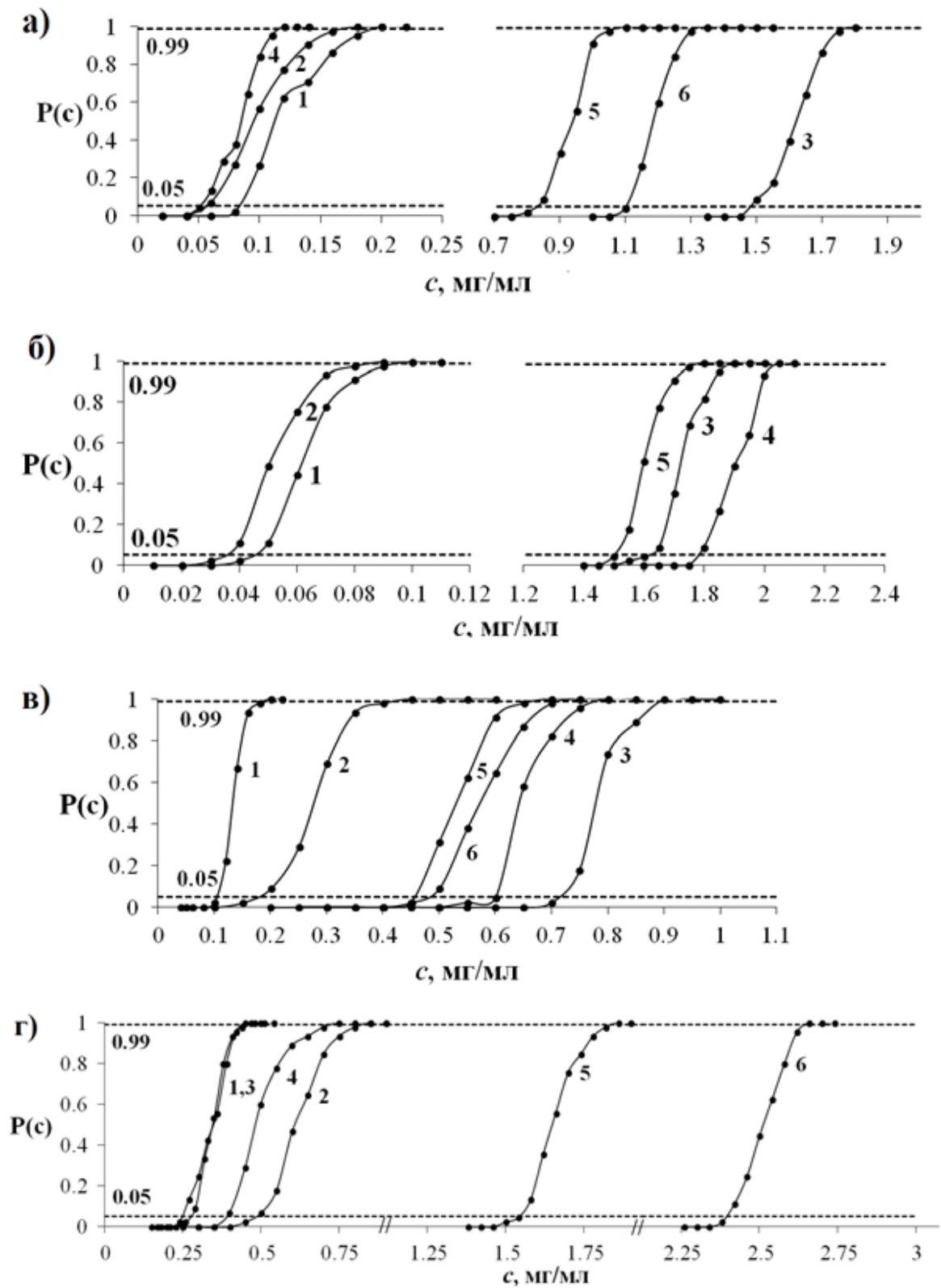


Рис. 5.3. Зависимости вероятностей обнаружения антибиотиков от их концентрации (мг/мл) в интервале ненадежности в системе I (а), II (б), III (в), IV (г) (АМК – 1, ЦФЛ – 2, ЦФР – 3, ЦФТ – 4, ЦФТР – 5, ЦФЗ – 6)

Значения интервалов ненадежности индикаторных реакций, а также значений ПрО при визуальном определении  $\beta$ -лактамов представлены в табл. 5.2. Как видно из полученных данных, наименьшие значения предела обнаружения при визуальном определении получены для системы II (для АМК и ЦФЛ 0.10 и 0.09 мг/мл со значениями ДОС 0.25 – 16 и 0.25 – 8.0 мг/мл соответственно).

Оценены основные метрологические характеристики разработанных экспресс-методик с визуальной индикацией аналитов. Установлены диапазоны определяемых содержаний (от 0.13 до 16 мг/мл), интервалы ненадежности индикаторных реакций (от 0.03 до 1.99 мг/мл), а также пределы обнаружения (от 0.09 до 2.7 мг/мл)  $\beta$ -лактамов при их визуально-колориметрическом определении. Полученные в оптимальных условиях цветовые шкалы далее применяли для цветометрического определения  $\beta$ -лактамов.



Таблица 5.2. Некоторые метрологические характеристики визуального определения  $\beta$ -лактамов

Аналит	Система	Диапазон определяемых содержаний, мг/мл	Интервал ненадежности, мг/мл	Предел обнаружения, мг/мл
АМК	I	0.25 - 16	0.08 - 0.19	0.19
	II	0.25 - 16	0.05 - 0.10	0.10
	III	0.50 - 16	0.12 - 0.18	0.18
	IV	0.50 - 16	0.25 - 0.43	0.43
ЦФЛ	I	0.25 - 8.0	0.06 - 0.17	0.17
	II	0.25 - 8.0	0.03 - 0.88	0.09
	III	0.50 - 8.0	0.20 - 0.40	0.40
	IV	1.0 - 8.0	0.46 - 0.84	0.84
ЦФР	I	2.0 - 16	1.5 - 1.7	1.7
	II	2.0 - 16	1.6 - 1.9	1.9
	III	1.0 - 16	0.72 - 0.90	0.90
	IV	0.50 - 16	0.28 - 0.45	0.45
ЦФТ	I	0.13 - 16	0.05 - 0.12	0.12
	II	2.0 - 16	1.7 - 1.9	1.9
	III	1.0 - 16	0.62 - 0.78	0.78
	IV	1.0 - 16	0.42 - 0.72	0.72
ЦФТР	I	1.0 - 16	0.82 - 1.0	1.0
	II	2.0 - 16	1.5 - 1.8	1.8
	III	0.50 - 16	0.45 - 0.65	0.65
	IV	4.0 - 16	1.5 - 1.9	1.9
ЦФЗ	I	2.0 - 16	1.1 - 1.3	1.3
	III	1.0 - 16	0.48 - 0.70	0.68
	IV	4.0 - 16	2.4 - 2.7	2.7

## 5.2. Цветометрические варианты

### *Построение градуировочных зависимостей интенсивность цветового параметра – концентрация аналита*

Применение различных цветовых моделей в химическом анализе широко распространено [165]. В настоящем исследовании изображения тест-средств обрабатывали цветометрически, анализируя цветовые модели RGB (Red – Green – Blue), HSV (Hue – Saturation – Value) и CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, Key). Строили зависимости интенсивностей цветовых параметров от  $c/lgc$  и выбирали оптимальный цветовой параметр по чувствительности ( $tg\alpha$ ) и коэффициенту регрессии для каждой из анализируемых систем  $\beta$ -лактам – иммобилизованный реагент.

Согласно [166] в зависимости от типа методики (визуальная либо инструментальная), применяют разные способы определения ПО. Для методик с инструментальной оценкой результата анализа, *предел обнаружения* определяют по соотношению сигнал/шум либо по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика. Применяя последний подход, предел обнаружения находят по формуле:

$$PrO = 3.3 \cdot S/b,$$

где  $S$  – стандартное отклонение аналитического сигнала;  $b$  – коэффициент чувствительности (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Таким образом, предел обнаружения при цветометрическом определении  $\beta$ -лактамов определяли, применяя значения тангенса угла наклона градуировочных зависимостей  $I - c/lgc$ .

Диапазоны линейности, уравнения градуировочных зависимостей, значения  $PrO$ , а также  $r^2$  при цветометрическом определении  $\beta$ -лактамов представлены в табл. 5.3, полученные с помощью авторской программы и/или Adobe Photoshop® (см. также 4.2).

Таблица 5.3. Некоторые характеристики методик определения  $\beta$ -лактамов (авторская программа и/или Adobe Photoshop®)

Аналит	Параметр	ДОС, мг/мл	Уравнение $\Delta I_{\Pi} - lgc$	$r^2$	ПрО, мг/мл
Система I					
АМК	I <sub>B</sub>	0.25 - 16	$y = -26x + 110$	0.98	0.13
ЦФЛ		0.25 - 8.0	$y = -33x + 140$	0.98	0.13
ЦФТР		0.50 - 16	$y = -46x + 140$	0.98	0.25
ЦФР		2.0 - 16	$y = -35x + 180$	0.95	0.34
ЦФТ		0.13 - 16	$y = -51x + 130$	0.99	0.10
ЦФЗ		1.0 - 16	$y = 46x + 170$	0.94	0.28
Система II					
АМК	I <sub>G</sub>	0.13 - 1.0	$y = -33.4x - 1.15$	0.99	0.15
		0.50 - 16	$y = -90x + 160$	0.99	0.09
ЦФЛ		0.13 - 1.0	$y = 69x - 4.5$	0.99	0.12
		0.50 - 8.0	$y = 92x + 63$	0.99	0.09
ЦФТР	I <sub>B</sub>	2.0 - 16	$y = -2.0x + 150$	0.97	1.5
ЦФР		2.0 - 16	$y = -2.3x + 160$	0.99	1.3
ЦФТ		2.0 - 16	$y = -17x + 170$	0.97	0.49
Система III					
АМК	I <sub>B</sub>	0.25 - 16	$y = -67x + 130$	0.99	0.17
ЦФЛ		0.25 - 16	$y = -96x + 140$	0.99	0.10
ЦФТР		0.25 - 16	$y = -51x + 150$	0.96	0.16
ЦФР		1.0 - 16	$y = -83x + 190$	0.99	0.12
ЦФТ		0.50 - 16	$y = -67x + 170$	0.99	0.15
	I <sub>H</sub>	1.0 - 16	$y = -89x + 190$	0.98	0.11
ЦФЗ	I <sub>B</sub>	1.0 - 16	$y = -60x + 190$	0.96	0.20
Система IV					
АМК	I <sub>B</sub>	0.25 - 16	$y = -35x + 150$	0.98	0.24
ЦФЛ		0.50 - 8.0	$y = -31x + 160$	0.97	0.37
ЦФТР	I <sub>H</sub>	2.0 - 16	$y = -46x + 210$	0.95	0.19
ЦФР	I <sub>B</sub>	0.25 - 8.0	$y = -5.8x + 170$	0.97	0.42
ЦФТ		0.25 - 16	$y = -33x + 180$	0.95	0.31
ЦФЗ	I <sub>R</sub>	4.0 - 16	$y = -2.2x + 170$	0.98	2.2

При цветометрическом определении  $\beta$ -лактамов наибольшая чувствительность наблюдалась для ЦФТР, ЦФТ, ЦФЗ (система I), АМК и ЦФЛ (система II), для ЦФЛ, ЦФР и ЦФТ (система III) и для АМК, ЦФЛ, ЦФТ и ЦФТР (система IV).

В табл. 5.4 представлены уравнения градуировочных зависимостей, полученные с помощью авторского приложения для смартфона.

Как видно из полученных данных, наибольшая чувствительность наблюдается для АМК, ЦФЛ, ЦФР в системе I, для ЦФР и ЦФТ в системе II, для ЦФЛ, ЦФТР и ЦФЗ в системе III, для АМК, ЦФЛ и ЦФТ в системе IV.

Таблица 5.4. Некоторые характеристики методик определения  $\beta$ -лактамов (авторское приложение для смартфона)

Аналит	I/255	Уравнение $I_{\Pi/255}-lgc$	$r^2$
Система I			
АМК	Blue	$y = - 10x + 3.9$	0.98
ЦФЛ		$y = - 7.2x + 4.0$	0.97
ЦФР		$y = - 7.0x + 5.1$	0.95
ЦФТ		$y = - 5.0x + 2.4$	0.99
ЦФТР		$y = - 5.4x + 3.3$	0.98
ЦФЗ		$y = - 5.3x + 3.1$	0.94
Система II			
АМК	Green	$y = 2.8x - 1.1$	0.99
ЦФЛ		$y = 2.8x - 1.2$	0.99
ЦФР	Blue	$y = - 8.5x + 5.2$	0.92
ЦФТ		$y = - 14x + 8.8$	0.96
ЦФТР		$y = - 7.5x + 4.8$	0.94
Система III			
АМК	Blue	$y = - 3.9x + 1.8$	0.99
ЦФЛ		$y = - 2.6x + 1.1$	0.99
ЦФР		$y = - 3.4x + 2.8$	0.97
ЦФТ		$y = - 3.8x + 3.1$	0.99
ЦФТР		$y = - 4.8x + 2.9$	0.96
ЦФЗ		$y = - 4.8x + 2.8$	0.92
Система IV			
АМК	Blue	$y = - 7.1x + 3.8$	0.98
ЦФЛ		$y = - 7.9x + 5.2$	0.97
ЦФР		$y = - 4.2x + 29$	0.97
ЦФТ		$y = - 6.7x + 5.3$	0.97
ЦФТР	Red	$y = - 5.3x + 4.1$	0.95

### 5.2.1 Построение лепестковых диаграмм

Значения интенсивностей цветовых параметров моделей RGB, HSV и CMYK также применяли при построении лепестковых диаграмм (ЛД). Лепестковая диаграмма представляет значения каждой категории данных по осям, начинающимся в центре и заканчивающимся на внешнем кольце диаграммы [167]. Обычно ЛД имеют шесть зон, каждая из которых представляет независимую категорию данных. Отдельные оси преобразуют цифровые значения данных (взятых из таблиц) в графический формат.

В настоящей работе показана возможность применения лепестковых диаграмм при цветометрическом определении  $\beta$ -лактамов. Для этого по полученным ранее цветовым шкалам построены профили лепестковых диаграмм в координатах цветовых параметров моделей RGB, CMYK, HSV.

Комбинации профилей ЛД шести анализируемых  $\beta$ -лактамов для четырех исследуемых индикаторных реакций представлены на рис. 5.4. Как видно из рисунка, каждому из антибиотиков соответствует свой индивидуальный отпечаток, состоящий из комбинации профилей ЛД [168, 169]. Так, например, для АМК и ЦФЛ комбинация профилей ЛД значительно отличается от остальных  $\beta$ -лактамов, вследствие высоких значений параметра  $H$  ( $\sim 290$ ) в системе  $\beta$ -лактамов – иммобилизованный нингидрин. Профиль ЛД системы  $\beta$ -лактамов – иммобилизованный ДМАБ наибольший для ЦФТ и ЦФЛ, наибольший вклад в геометрию ЛД вносят параметры  $S$ ,  $B$  и  $V$ . Для системы III наибольший вклад в геометрию ЛД вносят цветовые параметры  $B$ ,  $G$  и  $K$ ; при этом наименьшая площадь ЛД характерна для АМК и ЦФЛ, а наибольшая для ЦФР и ЦФЗ. Аналогичный характер значений размеров профилей площадей ЛД, а также вклад цветовых параметров в геометрию ЛД и в системе  $\beta$ -лактамов – иммобилизованный  $CuSO_4$ . Таким образом, различный характер профилей ЛД, наряду с визуальной оценкой, может послужить для качественного соотнесения исследуемых  $\beta$ -лактамов.

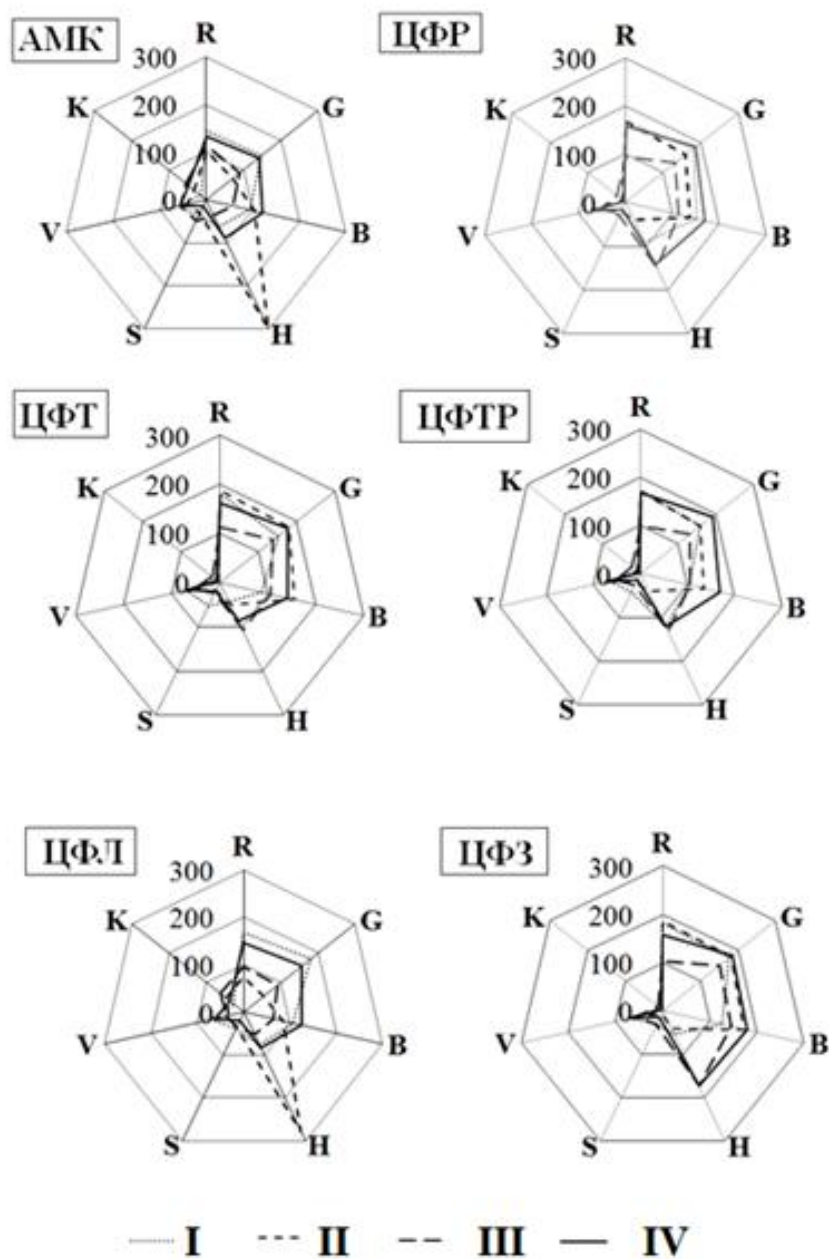


Рис. 5.4. Профили ЛД исследуемых  $\beta$ -лактамов для систем I – IV  
 ( $C_{\text{антибиотика}} = 8 \text{ мг/мл}$ )

Рассчитывали периметр ( $P_{\text{лд}}$ ) и площадь ( $S_{\text{лд}}$ ) профилей ЛД в MS Excel по формулам :

$$P_{\text{лд}} = \Sigma \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cdot \cos(ab)},$$

$$S_{\text{лд}} = \Sigma (1/2 a \cdot b \cdot \sin(ab)),$$

где  $a, b$  – стороны треугольника,  $\cos(ab)$  – косинус угла между сторонами  $a, b$ ,  $\sin(ab)$  – синус угла между сторонами  $a, b$ .

На рис. 5.5 представлены профили лепестковых диаграмм в координатах цветовых параметров R, G, B, C, M, K, V для системы II (на примере ЦФЛ и АМК). Как видно из рисунка, при увеличении концентрации антибиотика уменьшаются значения интенсивностей цветовых параметров R, G, B, K и V, значения интенсивностей цветовых параметров C и M увеличиваются, при этом наибольший вклад в геометрию профиля вносят значения параметров модели Red – Green – Blue.

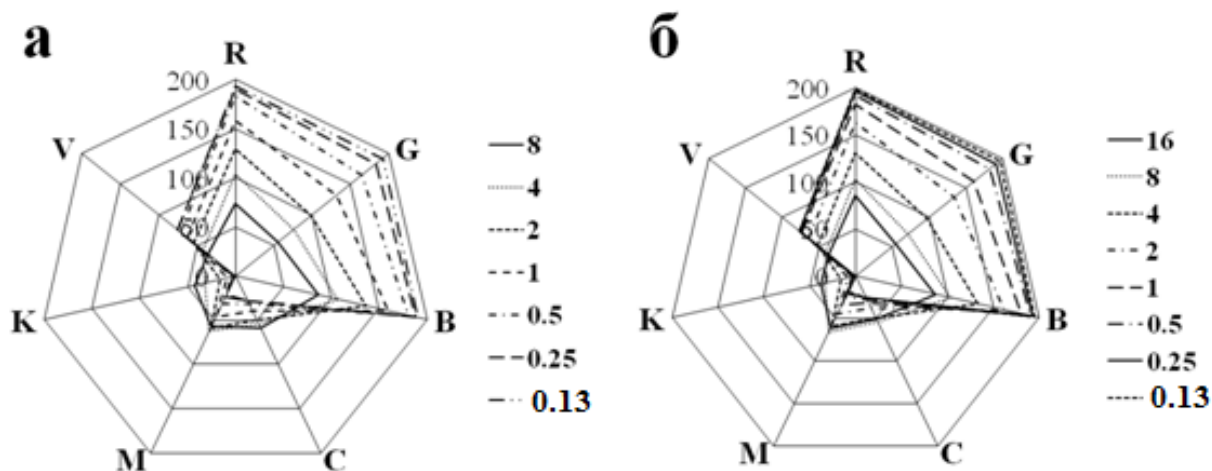


Рис. 5.5. Профили лепестковых диаграмм в координатах цветовых параметров R, G, B, C, M, K, V систем ЦФЛ (а), АМК (б) (система II;  $c$ , мг/мл)

Профили лепестковых диаграмм системы ЦФЛ – система III в координатах цветовых параметров R, G, B, H, S, V, K, а также соответствующие зависимости площади и периметра ЛД от концентрации антибиотика представлены на рис. 5.6. Наибольший вклад в геометрию профилей ЛД вносят цветовые параметры G, B и H.



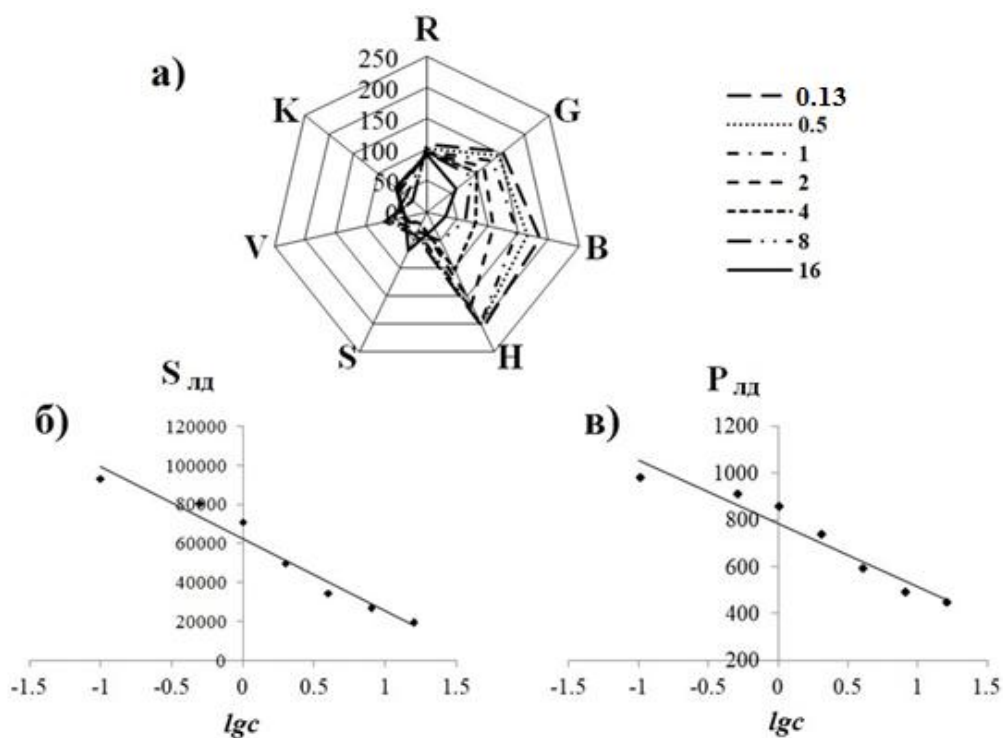


Рис. 5.6. Профили лепестковых диаграмм системы ЦФЛ – система III в координатах цветковых параметров R, G, B, H, S, V, K для концентраций ЦФЛ от 0.13 до 16 мг/мл (а), зависимости площади (б) и периметра (в) от  $lgc$

Диапазоны линейности, уравнения градуировочных зависимостей, значения  $PrO$ , а также  $r^2$  при цветотрическом определении  $\beta$ -лактамов с помощью лепестковых диаграмм представлены в табл. 5.5.

Применение значений  $P_{лд}$  и  $S_{лд}$  в ряде случаев позволяет снизить значение предела обнаружения (например, в системе I для ЦФЛ с 0.13 до 0.01 мг/мл, для ЦФР с 0.34 до 0.03 мг/мл) по сравнению с цветотрической методикой применения зависимостей интенсивностей отдельного цветкового параметра от  $c/lgc$ .

Таблица 5.5. Некоторые характеристики цветометрических методик определения  $\beta$ -лактамов с помощью ЛД ИБ

Аналит	Параметр	ДОС, мг/мл	ПрО, мг/мл
<b>Система I</b>			
АМК	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 8	0.11
ЦФЛ	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 8.0	0.01
ЦФТР	$P_{\text{лд}}$	0.25 - 16	0.21
ЦФР	$P_{\text{лд}}$	0.25 - 16	0.03
ЦФТ	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.02
	$P_{\text{лд}}$	0.13 - 8.0	0.01
ЦФЗ	$S_{\text{лд}}$	1.0 - 16	0.25
<b>Система II</b>			
АМК	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.09
	$P_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.10
ЦФЛ	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 8.0	0.04
ЦФТР	$S_{\text{лд}}$	2.0 - 16	1.4
ЦФР	$S_{\text{лд}}$	1.0 - 16	0.92
ЦФТ	$P_{\text{лд}}$	2.0 - 16	0.34
<b>Система III</b>			
АМК	$P_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.04
ЦФЛ	$S_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.09
	$P_{\text{лд}}$	0.13 - 16	0.04
ЦФТР	$S_{\text{лд}}$	0.25 - 16	0.14
ЦФР	$S_{\text{лд}}$	0.50 - 16	0.11
ЦФТ	$P_{\text{лд}}$	0.50 - 16	0.11
ЦФЗ	$P_{\text{лд}}$	1.0 - 16	0.19
<b>Система IV</b>			
АМК	$P_{\text{лд}}$	0.25 - 16	0.03
ЦФЛ	$P_{\text{лд}}$	0.50 - 8.0	0.11
ЦФТР	$S_{\text{лд}}$	1.0 - 16	0.18
ЦФР	$S_{\text{лд}}$	0.25 - 8.0	0.09
ЦФТ	$S_{\text{лд}}$	0.25 - 16	0.06
ЦФЗ	$P_{\text{лд}}$	4.0 - 16	2.1

Определены основные метрологические характеристики разработанных экспресс-методик. Показано, что значения  $PrO$  при инструментальной (цветометрическом определении с помощью зависимостей интенсивностей цветовых параметров, значений площади и периметра ЛД от  $c/lgc$ ) ниже, по сравнению с визуальной детекцией. При этом, применение значений  $P_{лд}$  и  $S_{лд}$  позволяет в ряде случаев снизить значение предела обнаружения по сравнению с цветометрической методикой применения зависимостей интенсивностей отдельного цветового параметра от концентрации соответствующего антибиотика.

### **5.3. Оценка влияния мешающих компонентов**

Лекарственные препараты (таблетки, капсулы и т.д.) обычно содержат различные вспомогательные компоненты, такие как микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), стеарат магния (СМ), карбонат магния, диоксид кремния, желатин, крахмал картофельный (КК), сахароза и другие. В настоящем исследовании проведена оценка влияния на проведение экспресс-определения  $\beta$ -лактамов с помощью ИБ трех компонентов, которые широко применяют при производстве таблетированных форм лекарственных средств: талька, стеарата магния, крахмала картофельного и микрокристаллической целлюлозы [170]. Для этого цветометрически анализировали окраску ИБ смесей анализируемых антибиотиков с выбранными вспомогательными компонентами. В табл. 5.6 представлены изменения значения интенсивностей параметра  $Blue$  в присутствии вспомогательных компонентов, а также их смеси во всех четырех индикаторных системах (на примере системы АМК – иммобилизованный реагент).

Таблица 5.6 Оценка влияния некоторых компонентов ЛП, на примере АМК для систем I-IV

Компонент	с	$\Delta I_B$			
		I	II	III	IV
Тальк	1%	2 ± 4	1 ± 4	3 ± 3	1 ± 4
Стеарат магния	1%	3 ± 5	0 ± 2	5 ± 4	3 ± 3
Микрокристаллическая целлюлоза	5%	1 ± 5	2 ± 5	2 ± 5	2 ± 4
Крахмал картофельный	20%	3 ± 4	1 ± 4	4 ± 3	0 ± 5
Смесь компонентов + АМК	4 мг/мл	63 ± 3	59 ± 3	51 ± 5	39 ± 4
АМК	4 мг/мл	62 ± 4	60 ± 3	49 ± 4	37 ± 3

Так как значения изменения интенсивностей параметра Blue при определении антибиотиков, а также их смесей со вспомогательными компонентами одинаковы в пределах погрешности, можно сделать вывод о том, что анализируемые компоненты (тальк, стеарат магния, крахмал картофельный и микрокристаллическая целлюлоза) не мешают проведению экспресс-определения  $\beta$ -лактамов с помощью разработанных ИБ.

#### 5.4. Оценка правильности результатов

Предложены методики визуального и цветометрического (в том числе с применением разработанных авторских программ) определения  $\beta$ -лактамов, которые реализованы на лекарственных средствах: «Амоксициллин» (таблетки, 250 мг, «АВВА Рус», Россия), «Аксосеф» (Цефуросим) (таблетки, 250 мг, «Nobel Ilac Sanayii ve Ticaret Anonim Sirketi», Турция), «Цефалексин» (капсулы, 500 мг, «Немофарм», Сербия). Результаты определения содержания антибиотиков в ЛП с помощью разработанных экспресс-способов представлены в табл. 5.7.

Таблица. 5.7. Результаты определения содержания антибиотиков в лекарственных препаратах

Заявлено в препарате, мг	Найдено, мг								
	Визуальная оценка	Цветометрическая оценка							
		Авторское приложение	S <sub>r</sub>	Photoshop	S <sub>r</sub>	Авторская программа	S <sub>r</sub>	S <sub>лд</sub>	S <sub>r</sub>
<b>Система I</b>									
«АМК», 250	250 ± 50	240 ± 25	0.10	245 ± 20	0.15	255 ± 25	0.09	260 ± 20	0.12
«ЦФР», 250	250 ± 50	230 ± 25	0.13	235 ± 35	0.11	230 ± 25	0.11	240 ± 35	0.14
«ЦФЛ», 500	500 ± 100	520 ± 45	0.11	490 ± 40	0.17	480 ± 50	0.10	485 ± 40	0.11
<b>Система II</b>									
«АМК», 250	250 ± 50	240 ± 25	0.11	225 ± 30	0.09	230 ± 25	0.09	225 ± 25	0.08
«ЦФЛ», 500	500 ± 100	485 ± 50	0.08	525 ± 25	0.04	470 ± 40	0.10	515 ± 50	0.10
<b>Система III</b>									
«АМК», 250	250 ± 50	235 ± 30	0.08	235 ± 30	0.09	235 ± 30	0.09	235 ± 25	0.08
«ЦФР», 250	250 ± 50	245 ± 25	0.11	235 ± 50	0.14	235 ± 50	0.14	245 ± 25	0.10
«ЦФЛ», 500	500 ± 100	480 ± 50	0.09	460 ± 50	0.10	460 ± 50	0.10	465 ± 60	0.08
<b>Система IV</b>									
«АМК», 250	250 ± 50	255 ± 20	0.15	260 ± 20	0.13	250 ± 20	0.14	260 ± 30	0.16
«ЦФР», 250	250 ± 50	265 ± 20	0.16	250 ± 35	0.14	255 ± 30	0.17	255 ± 35	0.15
«ЦФЛ», 500	500 ± 100	510 ± 40	0.15	500 ± 45	0.18	500 ± 50	0.19	495 ± 45	0.15

Относительная погрешность определения исследованных  $\beta$ -лактамов с помощью разработанных экспресс-методик, в том числе с помощью авторского приложения для смартфона, не превышает 20%. Найденные в препаратах содержания амоксициллина, цефуроксима и цефалексина согласуются с заявленными интервалами содержаний определяемых компонентов и находятся в диапазоне (225 - 262) мг для АМК, (229 - 268) мг для ЦФР («Аксосеф») и (477 - 525) мг для ЦФЛ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные экспресс-методики можно применять для полуколичественного определения данных  $\beta$ -лактамных антибиотиков.

### ***Определение $\beta$ -лактамов спектрофотометрическим методом***

Для оценки правильности в качестве независимого метода применяли метод спектрофотометрии. Для отделения вспомогательных веществ из растворов препаратов применяли способ фильтрования. Для приготовления раствора цефалексина с концентрацией 1 мг/мл, навеску препарата массой 0.0283 г, содержащую 0.0250 г цефалексина растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды ~5-7 мл и фильтровали через складчатый фильтр с синей лентой. Осадок на фильтре промывали дистиллированной водой (до 25 мл). Далее измеряли оптическую плотность исследуемых растворов антибиотиков в максимуме поглощения при длине волны 262 нм (для ЦФЛ), 278 нм (для ЦФР [171]) и 273 нм (для АМК) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду.

На рис. 5.7 представлены спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов цефалексина, амоксициллина и цефуроксима (мкг/мл) в диапазоне 200–400 нм, а также соответствующие градуировочные зависимости оптической плотности от концентрации антибиотика.

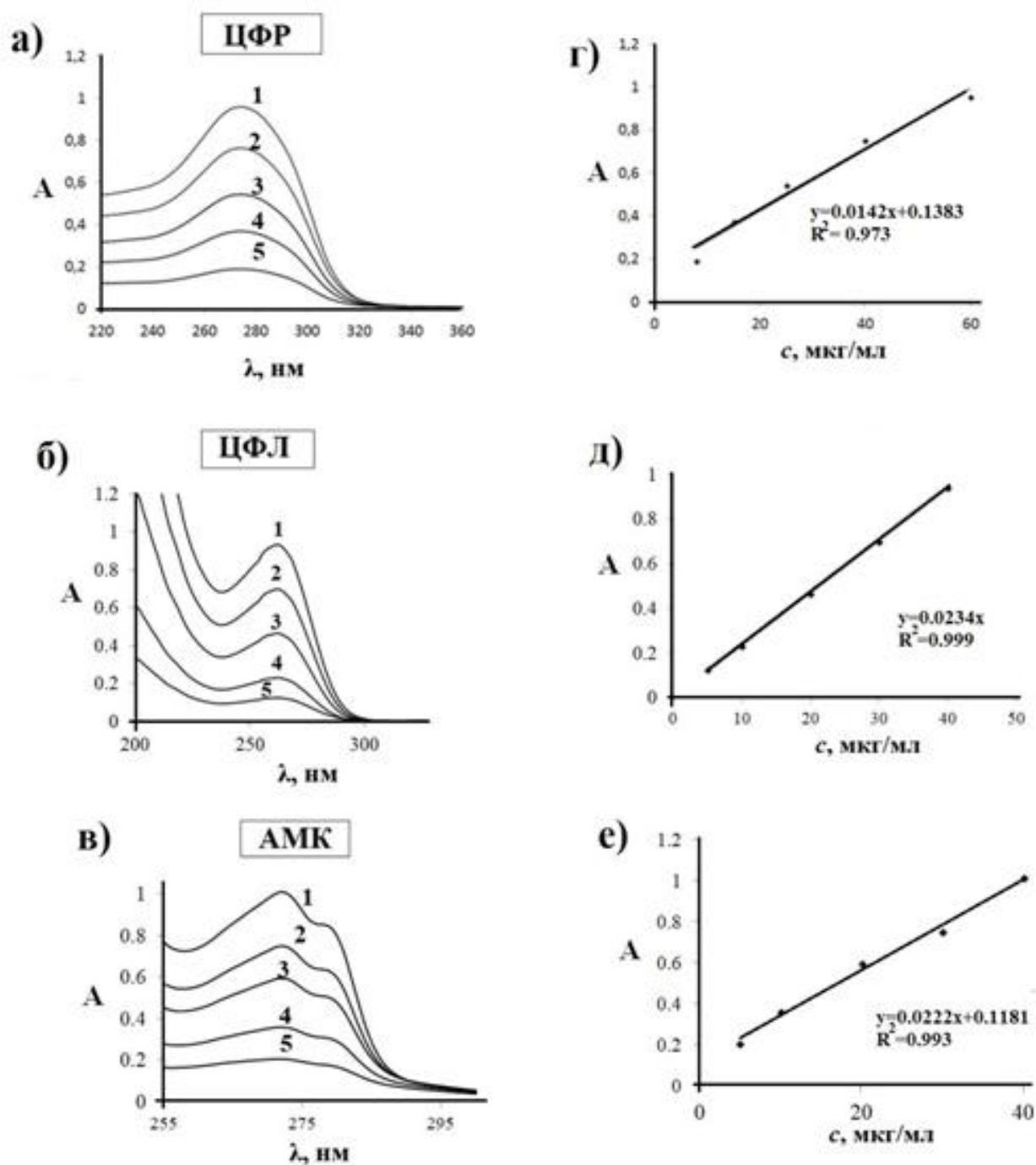


Рис. 5.7. Спектры поглощения свежеприготовленных водных растворов  $\beta$ -лактамов при различных концентрациях для ЦФР: 60 (1), 40 (2), 25 (3), 15 (4), 8 (5) мкг/мл (а); ЦФЛ: 40 (1), 30 (2), 20 (3), 10 (4), 5 (5) мкг/мл (б); АМК: 40 (1), 30 (2), 25 (3), 10 (4), 5 (5) мкг/мл (в); зависимость оптической плотности от концентрации ЦФР при  $\lambda_{\max}$  278 нм, мкг/мл (г); ЦФЛ при 262 нм (д); АМК при 273 нм (е)

В таблице 5.8 представлены результаты определения содержания антибиотиков в лекарственных препаратах независимым спектрофотометрическим методом.

Таблица 5.8. Результаты определения содержания антибиотиков в лекарственных препаратах независимым спектрофотометрическим методом ( $n = 3, P = 0.95$ )

Заявлено в препарате, мг	Найдено, мг	$S_r$
«АМК», 250	$245 \pm 10$	0.04
«Аксосеф (ЦФР)», 250	$246 \pm 20$	0.03
«ЦФЛ», 500	$480 \pm 30$	0.05

Таким образом, найденные значения содержания анализируемых лекарственных препаратов, определенные с помощью метода спектрофотометрии, находятся в интервалах, заявленных производителями (для АМК от 235 до 255 мг, для ЦФР от 227 до 265 мг и для ЦФЛ от 450 до 510 мг).

***Проверка правильности разработанных экспресс-методик способом «введено-найденно»***

Проверку правильности разработанных экспресс-методик осуществляли способом «введено-найденно» (табл. 5.9 - 5.11). Как видно из таблицы, значения относительного стандартного отклонения ( $S_r$ ) для разработанных экспресс-методик находятся в диапазоне от 7% до 19%.



Таблица. 5.9. Контроль правильности способом «введено - найдено»\*  
(n = 3; P = 0.95)

Аналит	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S <sub>r</sub>	Аналит	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S <sub>r</sub>
Система I				Система III			
АМК	7.0	7 ± 1	0.11	АМК	10	10 ± 1	0.09
ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.09	ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.11
ЦФР	10	10 ± 1	0.10	ЦФР	10	10 ± 1	0.09
ЦФТ	10	10 ± 1	0.12	ЦФТ	10	10 ± 1	0.12
ЦФТР	10	10 ± 1	0.14	ЦФТР	10	10 ± 1	0.10
ЦФЗ	10	11 ± 1	0.18	ЦФЗ	10	10 ± 2	0.17
Система II				Система IV			
АМК	10	10 ± 1	0.13	АМК	10	10 ± 1	0.18
ЦФЛ	7.0	7.1 ± 0.8	0.11	ЦФЛ	10	10 ± 1	0.17
				ЦФР	10	10 ± 2	0.16
				ЦФТ	10	11 ± 1	0.19

\*значения параметра *Blue* определены в авторском приложении

Таблица. 5.10. Контроль правильности способом «введено - найдено»\*  
(n = 3; P = 0.95)

Аналит	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S <sub>r</sub>	Аналит	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S <sub>r</sub>
Система I				Система III			
АМК	7.0	7 ± 1	0.12	АМК	10	10 ± 1	0.08
ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.13	ЦФЛ	7.0	7.0 ± 0.9	0.10
ЦФР	10	10 ± 1	0.16	ЦФР	10	10 ± 1	0.07
ЦФТ	10	10 ± 1	0.09	ЦФТ	10	10 ± 1	0.13
ЦФТР	10	10 ± 1	0.17	ЦФТР	10	9 ± 1	0.12
ЦФЗ	10	11 ± 1	0.16	ЦФЗ	10	10 ± 2	0.16
Система II				Система IV			
АМК	10	10 ± 1	0.12	АМК	10	10 ± 1	0.19
ЦФЛ	7.0	7.1 ± 0.9	0.14	ЦФЛ	10	10 ± 1	0.17
				ЦФР	10	10 ± 1	0.17
				ЦФТ	10	11 ± 1	0.19

\*значения параметра *Blue* определены в программе Adobe Photoshop

Таблица. 5.11. Контроль правильности способом «введено - найдено»\*  
(n = 3; P = 0.95)

Аналит	Введено, мг/мл	Найдено , мг/мл	S <sub>r</sub>	Аналит	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S <sub>r</sub>
Система I				Система III			
АМК	7.0	7 ± 1	0.11	АМК	10	10 ± 1	0.07
ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.15	ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.09
ЦФР	10	10 ± 1	0.16	ЦФР	10	10 ± 1	0.10
ЦФТ	10	10 ± 1	0.07	ЦФТ	10	10 ± 1	0.18
ЦФТР	10	10 ± 2	0.19	ЦФТР	10	10 ± 1	0.14
ЦФЗ	10	10 ± 1	0.16	ЦФЗ	10	9 ± 1	0.16
Система II				Система IV			
АМК	10	10 ± 1	0.14	АМК	10	10 ± 1	0.15
ЦФЛ	7.0	7 ± 1	0.10	ЦФЛ	10	11 ± 1	0.16
				ЦФР	10	10 ± 1	0.18
				ЦФТ	10	11 ± 2	0.16

\*значения параметра *Blue* определены в авторской программе по обработке RGB - параметров

\*\*\*

Относительная погрешность определения исследованных  $\beta$ -лактамов с помощью разработанных экспресс-методик и предложенных авторских программы и приложения для смартфона не превышает 20%. Найденные в препаратах содержания амоксициллина, цефуроксима и цефалексина согласуются с заявленными содержаниями определяемых антибиотиков. Разработанные экспресс-методики рекомендованы для полуколичественного определения  $\beta$ -лактамных антибиотиков.

## ВЫВОДЫ

1. Для экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков (амоксициллина, цефуроксима, цефалексина, цефотаксима, цефтриаксона и цефазолина) предложены 4 типа реакций: конденсации (*n*-диметиламинобензальдегид), окислительной конденсации (нингидрин), окисления – восстановления (реактив Фелинга) и комплексообразования (сульфат меди (II)) с образованием соответствующих окрашенных аналитических форм в целлюлозной матрице.
2. Цветометрически (по значениям  $\Delta I_{\text{П}}$ ) установлены оптимальные условия иммобилизации реагентов на твердую подложку при варьировании концентрации реагентов, времени, pH, температуры, ПАВ: 80 - 85°C, 10 мин для реактива Фелинга и  $\text{CuSO}_4$  (0.1 М); 23 - 25°C, 5 мин для ДМАБ (0.1 М) и для нингидрина (0.1 М), фильтр «Синяя лента».
3. Исследованы особенности взаимодействия  $\beta$ -лактамов с иммобилизованными реагентами и установлены оптимальные условия взаимодействия в исследуемых системах: система I (25 - 30 мин, 90 - 100°C, 0.05 М HCl), система II (20 - 25 мин, 100 - 110°C, pH 7.4), система III (25°C, 15 - 20 мин), система IV (25°C, 15 - 20 мин, pH 7.4).
4. Предложены оригинальные методики экспресс-определения некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков в лекарственных препаратах в диапазоне 0.13 - 16 мг/мл, относительная погрешность цветометрического определения не превышала 20%.
5. Разработано авторское приложение для обработки изображений тест-средств для смартфона, позволяющее исследователю в режиме реального времени получать результат количественного определения аналита.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Арзамасцев А. П. Фармацевтическая химия. М.: Гэотар. Медицина, 2004. 640 с.
2. Распоряжение правительства РФ от 23 октября 2017 г. № 2323-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2018 г.».
3. Egorov A. M., Ulyashova M. M., Rubtsova M. Y. Inhibitors of  $\beta$ -lactamases. New life of  $\beta$ -lactam antibiotics // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. P. 1292-1309.
4. Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 29. №. 9. P. 1038-1049.
5. Kahsay G. et al. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014. Vol. 87. P. 142-154.
6. Шведене Н. В., Боровская С. В. Ионметрическое определение  $\beta$ -лактамных антибиотиков // *ЖАХ*. 2003. Т. 58. №. 11. С. 1208-1214.
7. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic  $\beta$ -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations // *Analytica chimica acta*. 2004. Vol. 515. №. 2. P. 333-341.
8. Mohamed G. G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2001. Vol. 24. №. 4. P. 561-567.
9. Kuhlin J. et al. Mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs // *Clinical Mass Spectrometry*. 2018. V 221. P. 1277-1284.
10. Kaczmarek M., Idzikowska A., Lis S. Europium-sensitized chemiluminescence of system tetracycline– $H_2O_2$ –Fe(II)/(III) and its application to the determination of tetracycline // *J. of Fluorescence*. 2008. Vol.18. № 6. P. 1193-1197.

- 
11. Roberts J. A., Taccone F. S., Lipman J. Understanding PK/PD // Intensive care medicine. 2016. Vol. 42. №. 11. P. 1797-1800.
  12. Verdier M. C. et al. Simultaneous determination of 12  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011. Vol. 55. №. 10. P. 4873-4879.
  13. Veillette J. J. et al. A simple and rapid RP-HPLC method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in human plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016. Vol. 131. P. 80-86.
  14. Carlier M. et al. Exploration of the pre-analytical stability of  $\beta$ -lactam antibiotics in plasma and blood—implications for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2015. Vol.53. №. 9. P. e227-e230.
  15. Pinder N. et al. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics—Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2017. Vol.143. P. 86-93.
  16. Bourget P. et al. How to minimize toxic exposure to pyridine during continuous infusion of ceftazidime in patients with cystic fibrosis? // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014. Vol. 58. №. 5. P. 2849-2855.
  17. Lara F. J. et al. Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2012. Vol.38. P. 52-66.
  18. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1-3. М.; 2015.
  19. Sun L. et al. Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry // Food chemistry. 2016. Vol. 192. P. 313-318.
  20. ul Ain N. et al. Colorimetric detection of amoxicillin based on querecetagetin coated silver nanoparticles // Sens. Actuators B Chem. 2018. Vol. 265. P. 617-624.

- 
21. Pollap A. et al. Sensitive Voltammetric Amoxicillin Sensor Based on TiO<sub>2</sub> Sol Modified by CMK3type Mesoporous Carbon and Gold Nanoparticles // *Electroanalysis*. 2018. Vol. 30. №. 10. P. 2386-2396.
22. Kumar N. et al. Gold-palladium nanoparticles aided electrochemically reduced graphene oxide sensor for the simultaneous estimation of lomefloxacin and amoxicillin // *Sens. Actuators B Chem.* 2017. Vol. 243. P. 658-668.
23. Chullasat K. et al. A facile optosensing protocol based on molecularly imprinted polymer coated on CdTe quantum dots for highly sensitive and selective amoxicillin detection // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. Vol. 254. P. 255-263.
24. Huong V. T., Hoang V. D. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanate in combined tablets by non-derivative and derivative UV spectrophotometric techniques // *Int. J. PharmTech Res.* 2009. Vol. 1. P. 1173-1181.
25. Wu S. G., Lai E. P. C., Mayer P. M. Molecularly imprinted solid phase extraction–pulsed elution–mass spectrometry for determination of cephalexin and  $\alpha$ -aminocephalosporin antibiotics in human serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. Vol. 36. №. 3. P. 483-490.
26. Patel S.A. et. al. Spectrophotometric methods for the estimation of Cephalexin in tablet dosage forms // *Indian. J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 68. P. 278-280.
27. Elbashir A.A., Ali S.M., Aboul-Enein H.Y. Optimization and validation of spectrofluorimetric method for determination of cefadroxile and cefuroxime sodium in pharmaceutical formulations // *Luminescence*. 2013. Vol. 28. P. 490-495.
28. Amir S.B., Hossain M.A., Mazid M.A. Development and validation of UV spectrophotometric method for the determination of cefuroxime axetil in bulk and pharmaceutical formulation // *J. Sci. Res.* 2014. Vol. 6. №. 1. P. 133-141.
29. Derayea S. M. et al. New valid spectrofluorimetric method for determination of selected cephalosporins in different pharmaceutical formulations using safranin as

---

fluorophore // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2016. Vol. 153. P. 655-660.

30. Legrand T. et al. Simultaneous determination of eight  $\beta$ -lactam antibiotics, amoxicillin, cefazolin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, cloxacillin, oxacillin, and piperacillin, in human plasma by using ultra-high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016. Vol. 60. №. 8. P. 4734-4742.

31. Wang L. F., Peng J. D., Liu L. M. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics // Analytica chimica acta. 2008. Vol. 630. №. 1. P. 101-106.

32. Ziarrusta H. et al. Determination of fluoroquinolones in fish tissues, biological fluids, and environmental waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2017. Vol. 409. P. 6359-6370.

33. Ткаченко М. Л., Жнякина Л. Е., Космынин А. С. Физико-химические исследования твердых смесей кофеина и парацетамола // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. №. 8. С. 34-36.

34. Золотов Ю. А., Иванов В. М., Амелин В. Г. Химические тест-методы анализа. М.: Едиториал УРСС, 2002. 304 с.

35. Островская В. М., Запорожец О. А., Будников Г. К., Чернавская Н. М. Вода. Индикаторные системы М.: ФГУП ВТИИ, 2002. 266 с.

36. Островская В.М., Запорожец О.А., Будников Г.К., Чернавская Н.М. Вода. Индикаторные системы. М.: ВИНТИ РАН, 2002. 265с.

37. Амелин В.Г., Колодкин И.С. Целлюлозная бумага с химически иммобилизованным 1-нафтиламином для экспрессного тест-определения нитритов, нитратов и ароматических аминов // Журн. аналит. химии. 2001. Т.56. №2. С. 206-212.

- 
38. Маячкина Н. В., Чугунова М. В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2009. №. 1. С. 84-93.
- 39 . Кальницкая О.И. Методы определения антибиотиков // Молочная промышленность. 2008. № 6. С. 82–83.
40. Кулапина О. И., Михайлова М. С., Кулапина Е. Г. Ионметрическое определение цефуроксима и цефуроксим аксетила в биологических и лекарственных средах // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. №. 3. С. 40-46.
41. Кулапина О. И., Макарова Н. М., Кулапина Е. Г. Потенциометрические сенсоры для определения некоторых цефалоспориновых антибиотиков в биологических и лекарственных средах // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. №. 4. С. 399-399.
- 42 . Патент РФ № 2188421 С2, 27.08.2002. // Способ экспрессного определения антибиотиков биологическим методом. Леви М. И., Сучков Ю. Г. 2002.
43. Бызова Н. А. и др. Иммунохроматографический метод экспрессного определения ампициллина в молоке и кисло-молочных продуктах // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. №. 6. С. 685-685.
- 44 . Коновалова О. Ю., Логинова Л. П. Особенности протекания индикаторной реакции на первичные ароматические амины в желатиновой пленке // Методы и объекты хим. анализа. 2008. Т. 3. №. 2. С. 147-156.
- 45 . Логинова Л. П., Коваленко О.Ю. Метрологические характеристики обнаружения восстановителей с реагентами, иммобилизованными в желатиновой плёнке // Вест. ХНУ. Сер. Химия. 2007. № 770. Вып. 15. С. 90-98.
46. Оскотская Э. Р. и др. Цветометрическое и тест-определение тетрациклина и доксициклина в молоке и молочных продуктах после сорбционного



---

концентрирования на химически модифицированном алюмосиликате // Вестн. МГУ. Сер. Хим. 2016. Т. 57. №. 5. С. 350-355.

47. Логинова Л. П., Нестеренко О. Ю., Кудрис И. В. Идентификация нитроксолина с использованием гексацианоферратов (II) кобальта (II) и меди (II), иммобилизованных в желатиновой пленке // Вест. ХНУ. Сер. Химия. 2005. № 669. Вып.13. С. 93-99.

48. Meyer U. J. et al. Automated stand-alone flow injection immunoanalysis system for the determination of cephalexin in milk // Analyst. 1999. Vol. 124. №. 11. P. 1605-1610.

49. Beloglazova N.V., Eremin S.A. Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalexin // Anal. Bioanal. Chem. 2015. Vol. 407. № 28. P. 8525-8532.

50. Chen S. et al. A phosphorescent probe for cephalexin consisting of mesoporous thioglycolic acid-modified Mn: ZnS quantum dots coated with a molecularly imprinted polymer // Mikrochim. Acta. 2020. Vol. 187. №. 1. P. 40.

51. Иванов В. М., Кузнецова О. В. Химическая цветометрия: возможности метода, области применения и перспективы // Усп. Химии. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.

52. Hirayama E. et al. Visual and colorimetric lithium ion sensing based on digital color analysis // Analytical chemistry. 2000. Vol.72. №. 3. P. 465-474.

53. Рудакова Л. В., Васильева А. П., Шведов Г. И., Поплавская Е. В. Цифровые технологии для определения цветности и белизны лекарственных средств // Фармацевтические технологии и упаковка. 2012. Т. 215. №2. С. 38-40.

54. Чеботарев А. Н., Снигур Д. В. Цветометрическое изучение кислотно-основных свойств кверцетина в водных растворах // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. №. 1. С. 53-53.

55. Погоцкая А. А., Бузук Г. Н. Применение сканера и компьютерных программ цифровой обработки изображений для количественного

---

определения алкалоидов в листьях макалей сердцевидной. Вестник фармации. 2009. Т. 46. №4. С. 32-38.

56. Байдичева О. В., Рудаков О. Б., Хрипушин В. В. Цифровой метод определения цвета пива // Пиво и напитки. 2008. №. 6. С. 44-45.

57. Кучменко Т. А., Погребная Д. А., Хрипушин В. В. Новые инструментальные методы оценки органолептических показателей молока // Аналитика и контроль. 2012. № 3. 2012. С. 289-298.

58. Чеботарев А. Н. Снигур, Д. В., Ефимова, И. С., Бевзюк, Е. В. Исследование протолитических равновесий в растворах красителей с использованием функции полного цветового различия // Украинский химический журнал. 2013. №. 79. № 1. С. 18-21.

59. Амелин В. Г., Шаока З. А. Ч., Большаков Д. С. Микроэкстракционно-цветометрическое определение анионных ПАВ в природных и сточных водах // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2020. Т. 86. №. 12. С. 5-14.

60. Амелин В. Г., Ганькова О. Б. Фенолкарбоновые кислоты трифенилметанового ряда, иммобилизованные на тканях из искусственных и натуральных волокон, для тест-определения алюминия, бериллия и катионных ПАВ // Журнал аналитической химии. 2007. Т. 62. №. 3. С. 318-323.

61. Басаргин Н. Н. Оскотская, Э. Р., Грибанов, Е. Н., Кузнецов, Е. В. Цветометрическое определение марганца (II) в природных и сточных водах после предварительного концентрирования полимерным сорбентом // Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67. №. 1. С. 38-38.

62. Доронин С. Ю. и др. Концентрирование и тест-определение ионов тяжелых металлов с применением модифицированного нановолокна на основе полиакрилонитрила // Журн. аналит. химии. 2020. Т. 75. № 7. С. 597-605.

63. Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. – Litres. 2022.

- 
64. Suzuki Y., Suzuki K. Optical Sensors for Ions and Protein Based on Digital Color Analysis // Springer Ser. Chem. Sens. Biosens. 2005. Vol. 3. P. 343-365.
65. Шульц Э. В., Моногарова О. В., Осколок К. В. Цифровая цветометрия: аналитические возможности и перспективы использования // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2019. Т. 60. № 2. С. 79-87.
66. Зяблов А.Н., Жиброва Ю.А., Селеменев В.Ф. Цифровая обработка изображений. Достоинства и недостатки // Сорбц. и хроматограф. процессы. 2006. Т. 6. Вып. 6. С.1424-1429.
67. García A. et al. Mobile phone platform as portable chemical analyzer // Sensors and Actuators B: Chemical. 2011. Vol. 156. №. 1. P. 350-359.
68. Shin J. et al. Mobile diagnostics: next-generation technologies for in vitro diagnostics // Analyst. 2018. Vol. 143. №. 7. P. 1515-1525.
69. A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests // Sensors and Actuators B. 2014. Vol. 196. P. 156-160.
70. Рудаков О.Б., Пономарев А.Н., Полянский К.К., Любарь А.В. Жиры. Химический состав и экспертиза качества. М: ДеЛи принт. 2005. 312с.
71. Апяри В. В., Дмитриенко С. Г. Применение цифрового фотоаппарата и компьютерной обработки данных для определения органических веществ с использованием диазотированного пенополиуретана // Журн. аналит. химии. 2008. Т. 63. №. 6. С. 581-588.
72. Моногарова О.В., Осколок К.В., Апяри В.В. Цветометрия в химическом анализе. // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. №. 11. С. 857–867.
73. Milić N., Novaković D., Kašiković N. Measurement uncertainty in colour characterization of printed textile materials // Journal of Graphic Engineering and Design. 2011. Vol. 2. № 2. P. 16.
74. Peng J. et al. A rapid, sensitive and selective colorimetric method for detection of ascorbic acid // Sensors and Actuators B: Chemical. 2015. Vol. 221. P. 708-716.

- 
75. Lin B. et al. Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone // *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. Vol. 100. P. 482-489.
76. Porto I. S. A. et al. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry // *Microchemical Journal*. 2019. Vol. 149. P. 104031
77. Wongniramaikul W., Limsakul W., Choodum A. A biodegradable colorimetric film for rapid low-cost field determination of formaldehyde contamination by digital image colorimetry // *Food chemistry*. 2018. Vol. 249. P. 154-161.
78. Mahato K., Chandra P. Paper-based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone // *Biosensors and Bioelectronics*. 2019. Vol. 128. P. 9-16.
79. Martinkova P. et al. Fast and simple glucose assay based on filter paper as enzymes carrier using phone camera detection // *Chemical Papers*. 2018. Vol. 72. №. 11. P. 2719-2728.
80. Чапленко А. А. и др. Сорбционно-цветометрическое определение действующих веществ в лекарственной субстанции тетрациклина гидрохлорида и в растворе для инъекций цианокобаламина // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. №. 3. С. 134-137.
81. Хорохордина Е.А., Харитонова Л.А., Рудакова Л.В. Селективное цветометрическое определение двухатомных фенолов в водоемах // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015. №. 4. С. 41-45.
82. Hao A. Y. et al. A smartphone-combined ratiometric fluorescence probe for specifically and visibly detecting cephalexin // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. Vol. 249. P. 119310.
83. Lamarca R.S., de Lima Gomes P.C.F. A low cost method for carbamazepine, ciprofloxacin and norfloxacin determination in pharmaceutical formulations based on spot-test and smartphone images // *Microchemical Journal*. 2020. Vol. 152. P. 104297.

- 
84. Chuen H.J. et al. Paper-based glucose biosensing system utilizing a smartphone as a signal reader // *BioChip J.* 2014. Vol. 8. P. 218-226.
85. Амелин В. Г., Чалави Ш. З. А., Большаков Д. С., Третьяков А. В. Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хемометрического анализа при определении тетрациклинов в лекарственных препаратах // *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология.* 2022. Т. 65. № 7. С. 17-27.
86. Черноусова О. В., Рудаков О. Б. Цифровые изображения в аналитической химии для количественного и качественного анализа // *Химия, физика и механика материалов.* 2019. №. 2. С. 55-125.
87. Kangas M.J. et al. An improved comparison of chemometric analysis for the identification of acids and bases with colorimetric sensor arrays // *International Journal of Chemistry.* 2018. Vol. 10. P. 36-55.
88. Feng L. et al. Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals // *Analytical Chemistry.* 2010. Vol. 82. № 22. P. 9433-9440.
89. Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V. Multisensory digital colorimetry to identify and determination of active substances in drugs // *Sensors and Actuators, B: Chemical.* 2019. Vol. 299. P. 126909.
90. Feigl F. *Spot tests in organic analysis*, Elsevier Publishing Company. Amsterdam, 1960. 675 p.
91. Холин Ю.В. Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логинова Л.П. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом. Х.: Тимченко. 2008. 128 с.
92. Егоров Н.С. *Основы учения об антибиотиках.* М.: Издательство МГУ, Наука, 2004. 524 с.
93. Машковский М.Д. *Лекарственные средства.* М: Новая волна, 2006. 1206 с.
94. Verdon, E. in L.M.L Nollet, F. Toldra (Eds.), *Handbook of Muscle Food Analysis*, CRC Press, Boca Raton. 2009. P. 855-947

- 
95. Finholt P., Jürgensen G., Kristiansen H. Catalytic effect of buffers on degradation of penicillin G in aqueous solution // *Journal of pharmaceutical sciences*. 1965. Vol. 54. № 3. P. 387-393.
96. Hou J. P., Poole J. W.  $\beta$ -Lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1971. Vol. 60. № 4. P. 503-532.
97. Алексеев В.Г., Демская Е.В., Милашс Е.А, Иголкин В.В Кислотно-основные свойства амоксицилина // *Журнал общей химии*. 2005. Т. 75. № 7. С. 1211-1214.
98. Božić B. et al. Coordination and redox interactions of  $\beta$ -lactam antibiotics with  $\text{Cu}^{2+}$  in physiological settings and the impact on antibacterial activity // *Free Radic. Biol. Med*. 2018. Vol. 129. P. 279-285
99. Shelke S. et al. Development and validation of UV spectrophotometric method of Cefuroxime Axetil in bulk and pharmaceutical formulation // *Asian. J. Research Chem*. 2009. Vol. 2. № 2. P. 222-224.
100. Campíns-Falcó P. et al. Comparative study on the determination of cephalexin in its dosage forms by spectrophotometry and HPLC with UV-vis detection // *Microchimica Acta*. 1997. Vol. 126. № 3. P. 207-215.
- 101 . Alarfaj N. A. et al. Exploiting of Green Synthesized Metal Oxide Nanoparticles for Spectrophotometric Determination of Levofloxacin, Cephalexin, and Cefotaxime Sodium in Commercial Products // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11. №. 5. P. 1099.
- 102 . Sadri M., Arab Sorkhi S. Preparation and characterization of CS/PEO/cefazolin nanofibers with in vitro and in vivo testing // *Nanomedicine Res. J*. 2017. Vol. 2. № 2. P. 100-110.
103. Loginova L. P., Konovalova O. Y. Test films for test-determinations on the base of reagents, immobilized in gelatinous gel // *Talanta*. 2008. Vol. 77. № 2. P. 915-923.

- 
104. Adegoke O. A., Quadri M. O. Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azo dye formation with p-dimethylaminobenzaldehyde // Arab. J. Chem. 2016. Vol. 9. P. S1272-S1282.
105. Rind F. M. A. et al. Spectrophotometric determination of cefotaxime Sodium using 4-dimethylaminobenzaldehyde as a Derivatizing reagent // Sci.In. (Lahore). 2009. Vol. 21. № 3. P.177-182.
- 106 . Савицкий Н. И., Легостева А. Б. Исследование аминокислотного профиля *zingiber officinale* (*zingiberaceae*) методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2. С. 208-212.
107. Crumpler H. R., DENT C. E. Distinctive test for  $\alpha$ -amino-acids in paper chromatography // Nature. 1949. Vol. 164. №. 4167. P. 441-442.
108. McCaldin D. J. The chemistry of ninhydrin // Chemical Reviews. 1960. Vol. 60. № 1. P. 39-51.
109. Wani Y. B., Patil D. D. An experimental design approach for optimization of spectrophotometric method for estimation of cefixime trihydrate using ninhydrin as derivatizing reagent in bulk and pharmaceutical formulation // Journal of Saudi Chemical Society. 2017. Vol. 21. P. S101-S111.
- 110 . Raza A., Ijaz A. S., Ahmad S. Development and application of spectrophotometric method for the determination of cefaclor in pharmaceutical formulations // Química Nova. 2009. Vol 32. № 5. P. 1180-1183.
- 111 . Алексеев В.Г. Бионеорганическая химия пенициллинов и цефалоспоринов. Тверь: Тверск. гос. ун-т, 2009. 40 с.
112. Anacona J. R., Figueroa E. M. Synthesis and characterization of metal complexes with penicillin // Journal of coordination chemistry. 1999. Vol. 48. № 2. P. 181-189.
113. Anacona J. R., Alvarez P. Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of cefazolin // Transition metal chemistry. 2002. Vol. 27. № 8. P. 856-860.

- 
114. El-Maali N. A. et al. Voltammetric analysis of Cu (II), Cd (II) and Zn (II) complexes and their cyclic voltammetry with several cephalosporin antibiotics // *Bioelectrochemistry*. 2005. Vol. 65. № 2. P. 95-104.
115. Refat M. S. et al. Synthesis, thermal and spectroscopic behaviors of metal–drug complexes: La (III), Ce (III), Sm (III) and Y (III) amoxicillin trihydrate antibiotic drug complexes // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. Vol. 128. P. 427-446.
116. Issopoulos P. B. Spectrophotometric determination of cephalixin, cephradine, ampicillin and amoxicillin using copper (II) acetate as a completing agent // *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 1988. Vol. 6. P. 321-327.
117. Лапшин С. В., Алексеев В. Г. Комплексообразование меди (II) с ампициллином, амоксициллином и цефалексином // *Журнал неорганической химии*. 2009. Т. 54. № 7. С. 1127-1130.
118. Osman A. H. et al. Spectral, thermal, and photochemical studies on certain first, second, and third generation cephalosporin antibiotics and their Cd (II) complexes // *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry*. 2002. Vol. 32. № 4. P. 763-781.
119. Aly A. et al. Thermal and photochemical behaviour of Zn (II) complexes of some cephalosporins // *Journal of thermal analysis and calorimetry*. 2004. Vol. 75. № 1. P. 159-168.
120. Nery E. W., Kubota L. T. Sensing approaches on paper-based devices: a review // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2013. Vol. 405. № 24. P. 7573-7595.
121. Кожина Е.С., Тумская А.В., Косырева И.В. Индикаторные бумаги для определения цефотаксима // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием*. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2021. С.122-125.



- 
122. Карякина А.С., Маракаева (Тумская) А.В. Тест-оценка содержания цефуроксима в моделях сточных вод // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020» [Электронный ресурс] / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. М.: МАКС Пресс, 2020.
123. Тумская А.В., Косырева И.В. Применение метода цифровой цветометрии при экспресс-определении некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков // Сборник тезисов докладов / XI Всероссийская конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященная 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича (АСиДВ-11) (16-20 августа, 2021 г., Новосибирск) [Электронный ресурс] / под ред.: Цыганковой А.Р., Сапрыкина А.И. Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2021. С.113.
124. Каратеева Е.Д., Аникина А.И., Кожинова Е.С., Тумская А.В., Косырева И.В. Тест-определение цефотаксима, цефтриаксона и цефалексина с помощью иммобилизованного пара-диметиламинобензальдегида // Сб. научных статей «Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Выпуск 24». Саратов. 2022. С. 50-52
125. Маракаева А.В. Тест-определение некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков с помощью реактива Фелинга // Материалы XXVI научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2019". М.: Издательство «Перо», 2019. С. 54
126. Маракаева А.В., Косырева И.В. Индикаторные бумаги для экспресс-определения амоксициллина // Тезисы докладов XI Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием. Пермь, 2019. С.112.
127. Карякина А.С., Тумская А.В. Экспресс-определение цефотаксима // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2022. – 72 МБ. [Электронное издание]. С.51.

- 
- 128 . Матора А.А., Наумов Е.В., Тумская А.В., Косырева И.В. Тест-определение цефатоксима с помощью иммобилизованного сульфата меди (II) // Сб. научных статей «Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Выпуск 24». Саратов. 2022. С. 53-55.
129. Маракаева А.В., Косырева И.В. Тест-определение амоксициллина в лекарственных препаратах // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19. Вып. 2. С. 146-151.
- 130 . Тумская А.В., Косырева И.В. Применение метода спектроскопии диффузного отражения при определении некоторых бета-лактамных антибиотиков // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2021: материалы Международного симпозиума и Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2021 / под ред. Г. В. Симоненко, В. В. Тучина. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2021. С. 29-32.
131. Тумская А.В., Косырева И.В. Экспресс-определение некоторых бета-лактамных антибиотиков // Журнал аналитической химии. 2022. Т. 77. № 8. С. 742-747.
132. Frutos P., Torrado S., Perez-Lorenzo M.E., Frutos G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. Vol. 21. № 6. P. 1149-1159.
133. Тумская А.В., Доронин В.С., Косырева И.В., Доронин С.Ю. Способы экспресс-определения гентамицина // Бутлеровские сообщения. 2021. Т. 67. № 8. С. 79-88.
134. Карякина А.С., Тумская А.В., Косырева И.В. Экспресс-определение амоксициллина в моделях сточных вод // Сборник научных трудов «Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Выпуск 23». Саратов. 2021. С. 29-33.
- 135 . Карякина А.С., Наумов Е.В., Тумская А.В., Косырева И.В. Тест-определение цефазолина в лекарственных препаратах // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник

---

науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2021. С.118-121.

136. Давиденко С.А., Маракаева А.В. Тест-определение цефалексина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020» [Электронный ресурс] / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. М.: МАКС Пресс, 2020.

137. Anacona J. R., Rodriguez I. Synthesis and antibacterial activity of cephalixin metal complexes // Journal of Coordination Chemistry. 2004. Vol. 57. № 15. P. 1263-1269.

138. Faggi E. et al. Copper (II) complexes of macrocyclic and open-chain pseudopeptidic ligands: synthesis, characterization and interaction with dicarboxylates // Dalton Transactions. 2015. Vol. 44. № 28. P. 12700-12710.

139. E. Pretsch, P. Buhlmann, M. Badertscher, Structure Determination of Organic Compounds, 4th ed, Springer-Verlag, Berlin, 2009.

140. Mesu J. G. et al. New insights into the coordination chemistry and molecular structure of copper (II) histidine complexes in aqueous solutions // Inorganic chemistry. 2006. Vol. 45. № 5. P. 1960-1971.

141. Ogorevc B. et al. A spectroscopic and polarographic investigation of the complexation of cefazolin with copper (II) ions // Inorganica chimica acta. 1985. Vol. 108. № 1. P. L3-L6.

142. Osman A. H. et al. An investigation of the Cu (II) complexes of certain cephalosporin antibiotics: spectral, thermal, and photochemical studies // Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry. 2002. Vol. 32. № 7. P. 1289-1300.

143. Тумская А.В., Логинов И.В., Тумский Р.С., Косырева И.В. Разработка и применение приложения для смартфона при экспресс-определении  $\beta$ -лактамных антибиотиков // Материалы международной научной конференции «Компьютерные науки и информационные технологии». Саратов: ООО Издательство «Научная книга», 2021. С. 179-182.

- 
144. Wang T. T. et al. A feasible image-based colorimetric assay using a smartphone RGB camera for point-of-care monitoring of diabetes // *Talanta*. 2020. Vol. 206. P. 120211.
145. Tyburski E. A. et al. Disposable platform provides visual and color-based point-of-care anemia self-testing // *The Journal of clinical investigation*. 2014. Vol. 124. № 10. P. 4387-4394.
146. Габидулина М.К., Говорухин В.А., Доронин С.Ю., Косырева И.В., Ли Е.П., Маракаева А.В., Такшаитова Э.И. Программа для обработки цветометрических параметров тест-средств в химическом анализе // *Материалы междунар. науч. конф. «Компьютерные науки и информационные технологии»*. Саратов: Издат. центр «Наука». 2018. С. 93-95.
147. Tumskaiia A.V., Loginov I.V., Tumskiy R.S., Kosyreva I.V. Simple and rapid determination of cephalixin by digital colorimetry using a laboratory-developed smartphone application // *Instrumentation Science & Technology*. 2022. Vol. 50. № 2. P. 190-202.
148. Тумская А.В., Косырева И.В. Применение цифровых технологий для экспресс-определения  $\beta$ -лактамов // *Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России (26-30 сентября 2022, г. Москва)* / М.: ОНТИ ГЕОХИ РАН. 2022. С. 239.
- 149 . Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. 360 с.
- 150 . Беляков А.А., Мельникова Л.В., Куренко Л.Т. Унифицированное стандартное вещество для фотометрического определения ароматических аминов и изоцианатов // *Заводск. Лаборатория*. 1987. Т. 53. № 4. С. 6-8.
- 151 . Буканова В.А., Скородумова Е.А., Маракаева А.В., Косырева И.В., Кожина Л.Ф. Тест-определение лекарственных препаратов на уроках химии // *Сборник научных трудов «Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Выпуск 22»*. Саратов. 2020. С. 88-91.

- 
152. Скородумова Е.А., Маракаева А.В., Косырева И.В. Тест - определение цефуроксима // Сборник научных трудов «Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Выпуск 22». Саратов. 2020. С. 79-82.
153. Наумов Е.В., Карякина А.С., Матора А.А., Тумская А.В., Косырева И.В. Экспресс-определение цефазолина и цефотаксима // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2022. – 72 МБ. [Электронное издание]. С.76.
154. Экспериандова Л.П., Химченко С.В. Ряд Фибоначчи в тест-анализе и граница зрительного восприятия // Методы и объекты хим. анализа. 2008. Т. 3. № 1. С. 113-116.
155. Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом, Харьков, 2008. 127 с.
156. Никитина Н. А., Решетняк Е. А., Гавриленко Н. А. Метрологические характеристики визуально-тестового определения железа (II, III) с фенантролином, иммобилизованным в полиметакрилатную матрицу // Известия ТПУ. 2008. №3. С. 43-45.
157. Решетняк, Е. А., Никитина, Н. А., Холин, Ю. В., Светлова, Н. В., Островская, В. М. О достоверной оценке метрологических характеристик тестового анализа // Вестн. ХНУ. Сер. Химия. 2003. № 596. С. 90-100.
158. Абраменкова О.И., Амелин В.Г. Расчет предела обнаружения в химических тестметодах анализа, использующих принципы планарной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2009. Т. 64. № 11. С. 1213.
159. Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Кармазина В. Э. Влияние материала носителя на предел обнаружения при визуальном тестировании // Вестн. ХНУ. 2007. № 770. Вып. 15(38). С. 119.

- 
160. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 52361-2018 «Контроль объекта аналитический. Термины и определения». – [Действующий от 2018-06-22] – М.: Стандартиформ, 2018.
- 161 . Маракаева А.В., Демешко И.А., Карякина А.С., Косырева И.В. Экспериментальная оценка предела визуального обнаружения при тест-определении амоксициллина // Химия биологически активных веществ: межвузовский сборник научных трудов II Всероссийской конференции с международным участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2019. С. 48-49.
162. Тумская А.В., Косырева И.В. Визуальная оценка предела обнаружения при тест-определении некоторых  $\beta$ -лактамов // Сборник тезисов докладов / XI Всероссийская конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященная 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича (АСиДВ-11) (16-20 августа, 2021 г., Новосибирск) [Электронный ресурс] / под ред.: Цыганковой А.Р., Сапрыкина А.И. Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2021. С.154.
163. Давиденко С.А., Маракаева А.В., Косырева И.В. «On-site» определение цефалексина с помощью тест-средств на основе иммобилизованного реактива Фелинга // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2020. С. 80-82.
164. Тумская А. В., Косырева И. В. Экспресс-определение цефалексина // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21. Вып. 3. С. 260-266.
165. Suzuki Y., Suzuki K. Optical Sensors for Ions and Protein Based on Digital Color Analysis // Springer Ser. Chem. Sens. Biosens. 2005. Vol. 3. P. 343-365.

- 
- 166 . Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
- 167 . Романова И. К. Современные методы визуализации многомерных данных анализ, классификация, реализация, приложения в технических системах // Наука и образование. МГТУ им. Н.Э. Баумана. Электрон. журн. 2016. № 3. С. 133-167.
- 168 . Маракаева А.В. Применение лепестковых диаграмм в тест-методах анализа // Материалы XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке». Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2019. С. 258.
169. Маракаева А.В., Косырева И.В. Экспресс-оценка содержания некоторых  $\beta$ -лактамных антибиотиков в лекарственных формах // Химия биологически активных веществ: межвузовский сборник научных трудов II Всероссийской конференции с международным участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2019. С. 50-51.
- 170 . Marakaeva A.V., Kosyreva I.V. Express analysis of amoxicillin via colorimetric testing // Chemical Papers. 2020. Vol. 74. P. 2381-2388.
- 171 . Маракаева А.В., Косырева И.В. Визуально-колориметрическое и цветометрическое определение цефуроксима // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20. Вып. 1. С. 16-23.