



О.О. Тарханова, А.М. Постика, Ю.В. Монайкіна, С.О. Васюк, Д.І. Дочинець

Застосування солей тетразолію для кількісного визначення антибіотиків цефалоспоринового ряду

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, цефалоспоринові антибіотики, солі тетразолію, кількісне визначення, полярографія, квантово-хімічні розрахунки.

Ключевые слова:

спектрофотометрия, цефалоспориновые антибиотики, соли тетразолия, количественное определение, полярография, квантово-химические расчеты.

Key words: spectrophotometry, cephalosporin antibiotics, tetrazolium salts, quantitative determination, polarography, quantum-chemical calculations.

Запропоновані *n*-нітротетразолій фіолетовий та *n*-нітротетразолію хлорид як високочутливі реагенти для спектрофотометричного визначення цефалоспоринових антибіотиків. Розроблені методики є валідними та характеризуються високою чутливістю, точністю та простотою виконання. На основі результатів полярографічних досліджень і квантово-хімічних розрахунків встановлено основні закономірності між будовою досліджуваних сполук, їх відновними властивостями та здатністю вступати в реакцію з солями тетразолію.

Предложены *n*-нитротетразолий фиолетовый и *n*-нитротетразолия хлорид как высокочувствительные реагенты для спектрофотометрического определения цефалоспориновых антибиотиков. Разработанные методики валидны и характеризуются высокой чувствительностью, точностью и простотой выполнения. На основе результатов полярографических исследований и квантово-химических расчетов определены основные закономерности между строением исследуемых веществ, их восстановительными свойствами и способностью вступать в реакцию с солями тетразолия.

n-Nitrotetrazolium violet and *n*-nitrotetrazolium chloride are proposed as high sensitive reagents for the quantitative determination of cephalosporin antibiotics. The developed method is valid, highly sensitive, precise and simple. The main dependences between chemical structure of investigated antibiotics, their reducing properties and reaction ability were established according to the polarographic and quantum chemical analysis data.

Структурною основою цефалоспоринових антибіотиків є комбінована β-лактам-Δ³-дигідротіазінонова система. Для їх визначення застосовують спектральні, хроматографічні та електрохімічні методи [1]. Цефалоспоринові антибіотики згідно ДФУ (цефтриаксон, цефалексин, цефазолін, цефотаксим у субстанціях), Британської Фармакопеї (ВР) та Фармакопеї Сполучених Штатів (USP) (цефтриаксон, цефалексин, цефазолін, цефотаксим, цефоперазон, цефуроксим у субстанціях і в лікарських формах) визначають методом рідинної хроматографії [2–4]. Однак методи з використанням хроматографії не завжди доступні через те, що лабораторії з контролю якості ліків не оснащені спеціальною апаратурою. Отже, виникає необхідність звернутись до доступнішого способу, зокрема спектрофотометрії у видимій області спектра. Слід зазначити, що описані в науковій літературі спектрофотометричні методики кількісного визначення зазначених антибіотиків здебільшого вимагають значних витрат часу на виконання аналізу [5–8] або характеризуються невисокою чутливістю [9,10].

Солі тетразолію давно й успішно використовують у біохімічному та фармацевтичному аналізі завдяки їх окислювальним властивостям [11,12]. Так, тетразолій синій і 2,3,5-трифенілтетразолію хлорид є фармакопейними реагентами для визначення стероїдів у субстанціях і лікарських формах [3,4]. У здійсненому дослідженні застосовано нітропохідні солей тетразолію – *n*-нітротетразолію хлорид (*n*-НТХ) та *n*-нітротетразолій фіолетовий (*n*-НТФ). Останні є універсальними і дуже чутливими окислювальними реагентами з високим

редокс-потенціалом і стабільністю розчинів [13,14], але до сьогодні не знайшли застосування у фармацевтичному аналізі.

Мета роботи

Розробити зручні, економічні, високочутливі й експресні спектрофотометричні методики кількісного визначення антибіотиків цефалоспоринового ряду за реакціями з *n*-НТХ та *n*-НТФ та дослідити взаємозв'язок між структурою досліджуваних сполук, їх окислювально-відновними властивостями та реакційною здатністю солей тетразолію.

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження, застосовані реагенти та обладнання

Об'єктами дослідження були ФСЗ цефтриаксону натрієвої солі, цефазоліну натрієвої солі, цефалексину, цефотаксиму натрієвої солі, цефуроксиму натрієвої солі; лікарські засоби – капсули цефалексину 0,25 г/0,3005 г (ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод») серія 50307, порошки для приготування суспензій «Лексин 250» 5 мл/250 мг цефалексину та «Лексин 125» 5 мл/125 мг цефалексину («Аль-Хікма Фармасьютикалз», Йорданія) серії 1721 та 4242 відповідно, порошки для приготування ін'єкційних розчинів – цефтриаксону натрієва сіль 0,5 г та 1,0 г (ФФ «Дарниця») серії NX0070907 та NR0010606 відповідно; цефазоліну натрієва сіль 0,5 г та 1,0 г (ФФ «Дарниця») серії NZ0030307 та NC0010207 відповідно.

Використовували реактиви і розчинники: 2-(4-нітрофеніл)-3,5-дифеніл-2Н-тетразолій хлорид (*n*-НТХ) кваліфікації хч, 2-(4-нітрофеніл)-5-феніл-3-(α-нафтил)

тетразолій хлорид (*n*-НТФ) кваліфікації хч, *n*-пропанол кваліфікації ч.д.а., ДМФА кваліфікації ч.д.а., 0,1М, 0,5М, 2М розчини NaOH, 0,1М, 2М розчини HCl.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, рН-метр-мілівольтметр рН-150М, полярограф РА-2 з записуючим пристроєм ХУ 4103, ваги електронні АВТ-120-5DM, мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення цефалексину, цефазоліну натрієвої солі та цефтриаксону натрієвої солі

Аліквотну частину – 0,08–0,20 мг розчину цефалексину у *n*-пропанолі, або 0,50–1,50 мг розчину цефтриаксону натрієвої солі у ДМФА, що містить 8% води, або 1,00–1,60 мг розчину цефазоліну натрієвої солі у *n*-пропанолі вміщують в мірну колбу ємністю 25,00 мл, додають 1,50 мл 0,1% розчину *n*-НТФ в *n*-пропанолі; 1,00 мл 0,1% розчину *n*-НТФ в ДМФА, 2,00 мл 0,1% розчину *n*-НТХ в *n*-пропанолі. До реакційної суміші у випадку цефалексину додають 0,1 мл 0,5М розчину NaOH, у випадку цефазоліну натрієвої солі – 0,1 мл 2М розчину NaOH та стабілізують за допомогою 2М розчину HCl: 0,1 мл та 0,2 мл відповідно. Отримані розчини доводять *n*-пропанолом до позначки. У випадку цефтриаксону натрієвої солі реакційну суміш нагрівають протягом 10 хв на водяній бані та доводять ДМФА до позначки. Оптичну густину вимірюють на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, за довжини хвилі 480 нм для цефалексину, 467 нм для цефтриаксону натрієвої солі та 487 нм для цефазоліну натрієвої солі. Як розчини порівняння використовують 0,014% розчин ФСЗ цефалексину в *n*-пропанолі, 0,130% розчин ФСЗ цефазоліну натрієвої солі в *n*-пропанолі та 0,100% розчин ФСЗ цефтриаксону натрієвої солі в ДМФА, що містить 8% води.

Визначення цефалексину, цефазоліну натрієвої солі та цефтриаксону натрієвої солі в лікарських формах

Точну наважку (г або мл) лікарського препарату (капсули, порошки для приготування ін'єкційних розчинів) з відповідним вмістом лікарської речовини вносять у мірну колбу і розчиняють у *n*-пропанолі або ДМФА

(табл. 1), доводять до позначки розчинником, ретельно перемішують. Аналізуючи порошки для приготування суспензій, спочатку готують суспензію, а потім беруть наважку (табл. 1). Аліквотну частину отриманого розчину аналізують за загальною методикою кількісного визначення. Паралельно проводять дослід з розчином порівняння. Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за типовою формулою.

Визначення потенціалу напівхвилі

Досліджувані субстанції (0,02% водні розчини) підлягали анодному окисненню в межах потенціалу від 0 до 1,5 В. Вольтамперограми лікарських речовин реєстрували зі швидкістю 10 мВ/с.

Розрахунок квантово-хімічних параметрів

У якості методу для розрахунку квантово-хімічних параметрів застосовували теорію функціоналу густини DFT. Оптимізацію геометрії для досліджуваних молекул обчислювали за допомогою програми Gaussian 03W [15]. При цьому використовували гібридний 3-параметричний функціонал Becke та обмінно-кореляційний функціонал Lee-Young-Parr (B3LYP/6-31G(d,p)), що передбачає застосування валентно-розщепленого базису з поляризаційними орбіталями – *d*-орбіталей для *p*-елементів та *p*-орбіталей для атомів гідрогену [16,17].

Результати та їх обговорення

Вибір оптимальних умов перебігу реакції солей тетразолію з цефалоспориновими антибіотиками

Для розробки способів кількісного визначення лікарських речовин на основі їх реакцій з солями тетразолію вивчали фактори, що впливають на характер спектра поглинання та повноту утворення продуктів реакції (величину оптичної густини), зокрема природа розчинника, кількість і порядок додавання реагентів, рН реакційної суміші, час перебігу реакції та стійкість продуктів реакції з часом.

Експериментально встановлено, що оптимальним розчинником для перебігу реакції цефалексину та цефазоліну натрієвої солі з солями тетразолію є *n*-пропанол. У випадку натрієвих солей цефтриаксону, цефуроксиму та цефотаксиму, що погано розчинні або не розчинні

Таблиця 1

Умови кількісного визначення лікарських речовин у складі лікарських препаратів

Лікарський препарат	Наважка	Розчинник	Ємність мірної колби для розчинення	Об'єм розчину для аналізу
За реакцією з <i>n</i> -НТФ				
Капсули цефалексину	0,0193-0,0481 г	<i>n</i> -пропанол*	100,0	0,50 мл
«Лексин 250»	т.н. ~0,5 мл	<i>n</i> -пропанол*	50,00	5,00 мл
«Лексин 125»	т.н. ~0,4 мл	<i>n</i> -пропанол*	50,00	0,50 мл
«Цефтриаксон» 0,5г	0,05-0,15 г	ДМФА*	100,0	1,00 мл
«Цефтриаксон» 1,0г	0,05-0,15 г	ДМФА*	100,0	1,00 мл
За реакцією з <i>n</i> -НТХ				
«Цефазолін» 0,5г	0,100-0,160 г	<i>n</i> -пропанол*	100,0	1,00 мл
«Цефазолін» 1,0г	0,100-0,160 г	<i>n</i> -пропанол*	100,0	1,00 мл

Примітки: * – розчиняють при нагріванні.

у *n*-пропанолі, реакцію відновлення солей тетразолію проводили у середовищі вода – *n*-пропанол. Наявність води в спиртовому реакційному середовищі, навіть у незначній кількості, уповільнювала реакцію та знижувала чутливість (рис. 1).

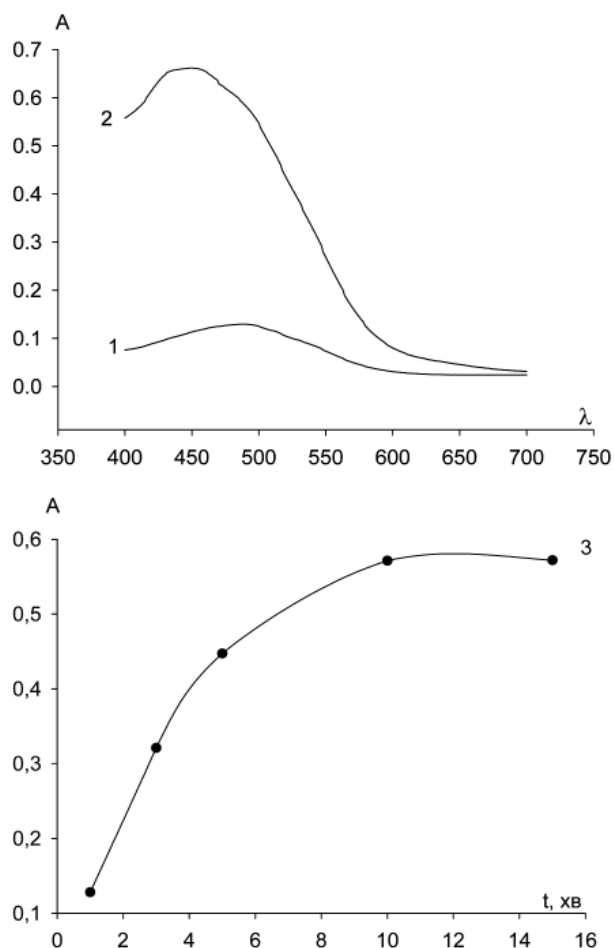


Рис. 1. Спектри поглинання продуктів реакції цефтриаксону натрієвої солі з *n*-НТФ у середовищі вода – *n*-пропанол (1) та вода – ДМФА (2). Залежність оптичної густини від часу нагрівання (3).

Значно кращі результати отримано при застосуванні середовища вода – ДМФА та нагріванні на водяній бані. Оптимальний час нагрівання (10 хв) встановлювали експериментально за максимальною оптичною густиною (рис. 1).

У випадку застосування в якості розчинника *n*-пропанолу виникала необхідність створювати лужну реакцію середовища.

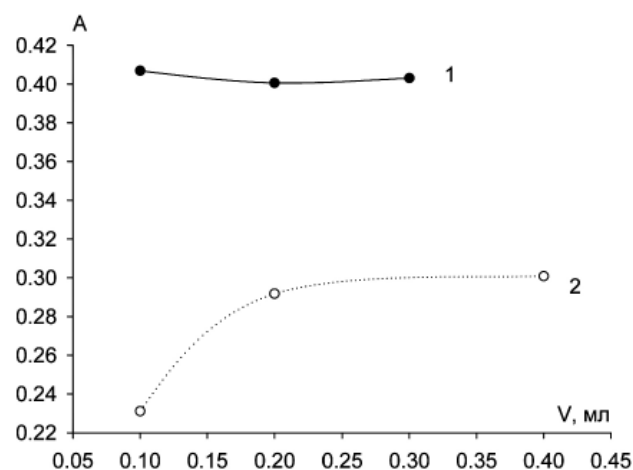


Рис. 2. Графіки залежності величини оптичної густини продуктів реакції цефалексину з *n*-НТФ від кількості водного розчину NaOH: 1 – 0,5 М, 2 – 0,1 М.

Як видно з рис. 2, максимальне значення оптичної густини у випадку цефалексину спостерігається при додаванні 0,10 мл 0,5 М розчину NaOH, що відповідає рН 11,7. Використання концентрованішого лугу не призвело до збільшення оптичної густини. При використанні більш розведеного розчину NaOH (0,1 М) отримували продукт з майже вдвічі меншою величиною оптичної густини. Отже, наявність води в реакційній суміші уповільнює перебіг реакції та знижує величину оптичної густини, тому оптимальним є використання невеликої кількості, але більш концентрованого водного лугу.

Аналогічні результати отримано для інших цефалоспоринів.

Таблиця 2

Оптимальні умови перебігу реакції та аналітичні показники чутливості реакцій *n*-НТХ та *n*-НТФ з цефалексином (I), натрієвими солями цефазоліну (II), цефтриаксону (III), цефуроксиму (IV), цефотаксиму (V)

Параметр	<i>n</i> -НТХ					<i>n</i> -НТФ				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
λ_{max} , нм	486	487	449	480	488	480	483	467	480	481
Реагент (0,1%), мл	5,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,50	2,00	1,00	2,00	2,00
Розчинник	<i>n</i> -проп.	ДМФА	ДМФА	ДМФА	<i>n</i> -проп.	<i>n</i> -проп.	<i>n</i> -проп.	ДМФА	<i>n</i> -проп.	<i>n</i> -проп.
NaOH, мл	0,10 2М	-	-	-	0,10 0,5М	0,10 0,5М	0,10 0,5М	-	0,10 0,1М	0,10 0,5М
HCl, мл	0,20 2М	-	-	-	0,10 2М	0,10 2М	0,10 2М	-	0,10 0,1М	0,10 2М
Час, хв	-	10	10	10	5	5	-	10	5	5
Температура, °С	25	100*	100*	100*	25	25	25	100*	25	25
ϵ	$2,6 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$
C_{min} , мкг/мл	0,67	2,32	3,67	5,17	3,52	0,46	2,04	3,08	10,1	5,32

Примітка: * – реакційну суміш нагрівають на водяній бані.

Необхідну кількість реагенту встановлювали за максимальною величиною оптичної густини продуктів реакції. Оптимальним було використання 0,1% розчинів *n*-НТХ та *n*-НТФ у кількості 1,00–5,00 мл.

Для стабілізації оптичної густини отриманих продуктів взаємодії цефалоспоринових антибіотиків з солями тетразолію додавали водний розчин НСІ, який, нейтралізуючи надлишок NaOH, запобігав подальшому перебігу можливих побічних реакцій. Продукт реакції цефтриаксону натрієвої солі з *n*-НТФ, що утворювався в середовищі вода – ДМФА, не потребував стабілізації.

У випадку деяких лікарських речовин, зокрема цефалексину, цефуроксиму натрієвої солі, цефотаксиму натрієвої солі, реакція відновлення солей тетразолію перебігала у часі, тому встановлювали оптимальний час витримки розчинів після додавання луку.

Експериментально встановлені оптимальні умови проведення реакцій для кожної з досліджуваних сполук з *n*-НТХ та *n*-НТФ наведено у таблиці 2.

Розраховані значення молярних коефіцієнтів абсорбції та відкривальних мінімумів свідчать про високу чутливість реакцій солей тетразолію з досліджуваними лікарськими речовинами (табл. 2).

Експериментально встановлені оптимальні умови ре-

акції солей тетразолію (*n*-НТХ, *n*-НТФ) з цефалексином, цефазоліну натрієвою сіллю та цефтриаксону натрієвою сіллю покладено в основу розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення цих речовин у складі лікарських препаратів.

Визначення основних валідаційних характеристик

Лінійність визначали у межах концентрацій, у яких спостерігають підпорядкування закону Бера. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення стандартного розчину і визначали за наведеною загальною методикою. Виходячи з отриманих даних, будували графік залежності абсорбції від концентрації досліджуваної речовини та розраховували показники лінійної залежності (табл. 3).

Отримані згідно ДФУ числові показники лінійної залежності свідчать, що виконуються усі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методик підтверджується в обраних діапазонах концентрацій.

Прецизійність методик визначали для кожної лікарської форми на рівні збіжності. Для цього в кожному випадку проводили 9 паралельних визначень (3 наважки, 3 повтори), а за результатами розраховували метрологічні характеристики (табл. 4).

Таблиця 3

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
Цефалексин			
$b \pm (s_b)$	1,170 ± (0,01880)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,01400 ± (0,01100)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,03501$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	1,022	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
Цефтриаксону натрієва сіль			
$b \pm (s_b)$	0,1731 ± (0,002900)	–	–
$a \pm (s_a)$	-0,00170 ± (0,01200)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,03816$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	1,356	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	0,9996	$\geq 0,9994$	відповідає
Цефазоліну натрієва сіль			
$b \pm (s_b)$	0,1670 ± (0,002900)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0063 ± (0,01550)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,04929$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,6103	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	0,9995	$\geq 0,9969$	відповідає

Таблиця 4

Визначення збіжності результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у готових лікарських формах (n=9, p=0,95)

Лікарська форма	Вміст	Метрологічні характеристики					
		\bar{x}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{\bar{x}}$	$\Delta_{AS}\%$
За реакцією з <i>n</i> -НТФ							
Капсули цефалексину	0,25	0,247	$3,09 \cdot 10^{-3}$	1,25	2,32	0,961	2,80
«Лексин 250»	0,25г/5мл	0,249	$4,15 \cdot 10^{-3}$	1,67	3,11	1,28	4,80
«Лексин 125»	0,125г/5мл	0,110	$2,18 \cdot 10^{-3}$	1,99	3,70	1,67	4,80
«Цефтриаксон» 0,5 г	0,5г	0,511	$8,17 \cdot 10^{-3}$	1,60	2,98	1,23	3,20
«Цефтриаксон» 1,0 г	1,0г	1,04	0,0148	1,42	2,64	1,09	3,20
За реакцією з <i>n</i> -НТХ							
«Цефазолін» 0,5 г	0,5г	0,502	$8,05 \cdot 10^{-3}$	1,60	2,98	1,23	3,20
«Цефазолін» 1,0 г	1,0г	0,989	0,0155	1,57	2,92	1,21	3,20

Таблиця 5

Визначення правильності методик із застосуванням модельних сумішей

Модельні суміші	\bar{Z}	RSD	Δ_z	$ \bar{Z} - 100 $	$0,32 \cdot \Delta_{As}$
«Цефазолін» 0,5 г	100,0	1,39	1,07	0	1,024
«Цефазолін» 1,0 г	99,71	1,07	0,824	0,29	1,024
«Цефтриаксон» 0,5 г	100,4	0,973	0,750	0,4	1,024
«Цефтриаксон» 1,0 г	100,1	1,06	0,817	0,1	1,024

Таблиця 6

Визначення правильності методом домішок

Препарат	Взято, мг/100 мл	Домішка, мг/100 мл	Знайдено*, мг/100 мл	Z'	$\bar{Z} \pm \Delta_z$	$ \bar{Z} - T $
«Лексин-250»	0,400	0,224	0,621	100,2	99,47±0,715	0,530
	0,400	0,336	0,759	103,1		
	0,400	0,360	0,728	95,79		
«Лексин-125»	0,352	0,360	0,712	100,0	99,79±0,493	0,21
	0,352	0,224	0,573	99,48		
	0,352	0,336	0,687	99,85		
Капсули цефалексину	0,360	0,336	0,697	99,86	100,9±0,932	0,9
	0,360	0,224	0,591	101,2		
	0,360	0,360	0,731	101,5		

Примітка: * – середнє для 3 визначень.

Встановлено, що у всіх випадках одnobічний довірчий інтервал Δ_x , не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, тому методики є точними на рівні збіжності.

Результати визначень можна вважати *правильними*, якщо систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу.

Для таких лікарських засобів, як «Цефазолін» 0,5 г, «Цефазолін» 1,0 г, «Цефтриаксон» 0,5 г, «Цефтриаксон» 1,0 г готували по 3 модельні суміші, тричі проводили визначення з кожною з модельних сумішей (всього 9). Для порошків для приготування суспензій «Лексин-250» та «Лексин-125», капсул цефалексину при визначенні правильності застосовували метод добавок. Для цього пробу розділяли на 3 рівні частини, до кожної додавали різні кількості розчину порівняння компонента, що визначався, та аналізували тричі. Експериментально отримані значення кількості діючої речовини («знайдено») виражали у відсотках (Z) від доданої кількості, розраховували середнє \bar{Z} та тестували статистично відносно теоретичного значення 100% (табл. 5, 6).

Оскільки у всіх випадках $|\bar{Z} - 100| \leq \Delta_z$, тобто 95% довірчий інтервал \bar{Z} включає теоретичне значення 100%, різниця $|\bar{Z} - 100|$ є статистично незначущою та виключає наявність систематичної похибки.

Взаємозв'язок між структурою досліджуваних сполук та їх фізико-хімічними властивостями

При виборі лікарських речовин, що можуть бути визначені за реакцією з солями тетразолію, враховували, що позитивну реакцію мають давати сполуки, що виявляють відновні властивості, зокрема β -лактамі антибіотики (пеніциліни та цефалоспорины). Однак антибіотики пеніцилінового ряду, на відміну від цефалоспоринів, не вступали в реакцію з солями тетразолію. Для пояснення отриманих результатів здійснено додаткові дослідження відновних властивостей цих сполук за допомогою методу вольтамперометрії.

Отримані значення потенціалів напівхвиль для пеніцилінів і цефалоспоринів були дуже близькими, що свідчить про приблизно рівні відновні властивості (табл. 7). Отже, відсутність реакції солей тетразолію з пеніцилінами не може бути пояснена різною відновною здатністю. Оскільки окислення цефалоспоринових і пеніцилінових антибіотиків має перебігати за гетероатомом сірки дигідротіазинового чи тіазолідинового кілець, фактором, що, на нашу думку, значно впливає на перебіг даної реакції, є стеричні утруднення в молекулах досліджуваних сполук. Зокрема, наявність у антибіотиків пеніцилінового ряду двох метильних груп у 2 положенні запобігає окисленню тіазолідинової сірки.

Таблиця 7

Значення потенціалів напівхвиль $E_{1/2}$ похідних пеніциліну та цефалоспоринів

Сполука	$E_{1/2}$	Сполука	$E_{1/2}$
Ампіцилін	0,8317	Цефтриаксону натрієва сіль	0,8487
Амоксицилін	0,8784	Цефуроксиму натрієва сіль	0,8120
Цефалексин	0,8625	Цефотаксиму натрієва сіль	0,8228
Цефазоліну натрієва сіль	0,9225		

Надалі досліджено зв'язок між реакційною здатністю досліджуваних лікарських речовин та їх структурними характеристиками, отриманими на основі квантово-хімічних розрахунків з використанням програми Gaussian 03W, метод V3LYP/6-31G(d,p).

Серед розрахункових параметрів здатність речовини окислюватись характеризує енергія ВЗМО. У якості експериментального показника, що безпосередньо характеризує відновні властивості, використано потенціал напівхвилі. Так, отримана кореляційна залежність між полярографічно встановленою величиною $E_{1/2}$ та розрахунковою $E_{ВЗМО}$ в ряду цефалоспоринів характеризувалась коефіцієнтами кореляції R 0,9853, що свідчить про наявність лінійної залежності між досліджуваними величинами. Відповідну регресійну пряму та рівняння лінійної регресії наведено на *рис. 3*.

Реакційну здатність досліджуваних речовин крім $E_{ВЗМО}$ можуть характеризувати такі розрахункові індекси, як величина енергетичної щілини $E_{ВЗМО}-E_{НВМО}$, жорсткість η (характеризує термодинамічну стабільність молекули), електронегативність χ (*табл. 8*), а також локальні дескриптори – орбітальні коефіцієнти f (показують розподіл молекулярних орбіталей по атомах у молекулі й,

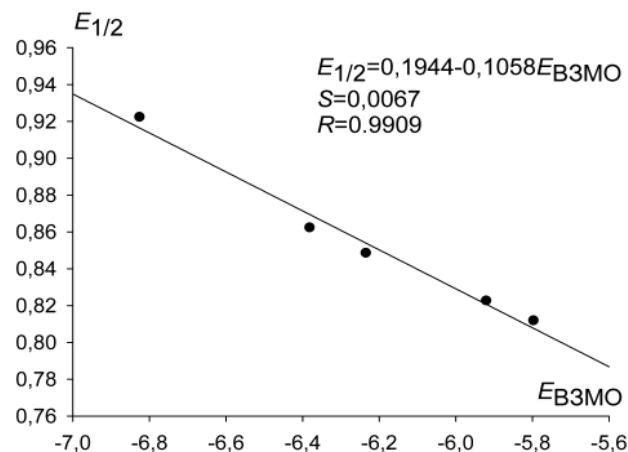


Рис. 3. Регресійна пряма залежності потенціалу напівхвилі ($E_{1/2}$) від енергії ВЗМО ($E_{ВЗМО}$) в ряду цефалоспоринів.

у такий спосіб, визначають найімовірніший напрямок реакції). Оскільки взаємодія солей тетразолію з досліджуваними сполуками може перебігати за сіркою дигідротіазинового циклу або гетерилтіометильної групи у положенні 3, враховано орбітальні коефіцієнти саме цих атомів (*рис. 4*).

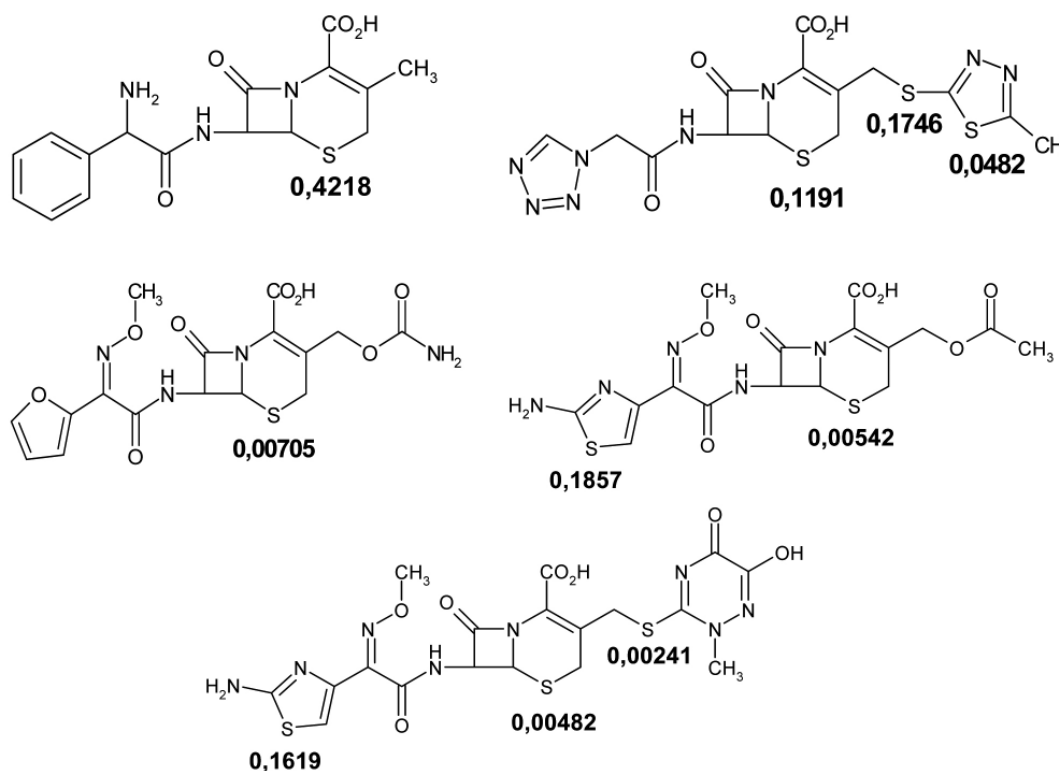


Рис. 4. Значення орбітальних коефіцієнтів на атомах сірки деяких цефалоспоринових антибіотиків.

Таблиця 8

Глобальні індекси реакційної здатності в ряду цефалоспоринів

	$E_{ВЗМО}$, eV	$E_{НВМО}$, eV	ΔE , eV	η	χ
Цефалексин	-6,3808	-1,7132	4,6676	4,6676	4,047
Цефазоліну натрієва сіль	-6,8260	-2,4289	4,3970	4,3971	4,6245
Цефтриаксону натрієва сіль	-6,2352	-2,0735	4,1617	4,1617	4,1544
Цефуросиму натрієва сіль	-5,7977	-1,9350	3,8627	4,0077	3,9171
Цефотаксиму натрієва сіль	-5,9209	-1,9132	4,0077	3,8627	3,8664

Таблиця 9

Кореляційна матриця індексів реакційної здатності для цефалоспоринів

	ϵ (n-НТХ)	ϵ (n-НТФ)	$E_{\text{ВЗМО}}$	ΔE	η	χ	fS_{max}^*	$fS_{\text{дигідротіаз.}}^{**}$
ϵ (n-НТХ)	1							
ϵ (n-НТФ)	0,9961	1						
$E_{\text{ВЗМО}}$	-0,4536	-0,4442	1					
ΔE	0,9255	0,9172	-0,7569	1				
η	0,8812	0,9000	-0,7225	0,9484	1			
χ	0,1045	0,1064	-0,9268	0,4681	0,4872	1		
fS_{max}^*	0,9550	0,9264	-0,4394	0,8906	0,7540	0,06991	1	
$fS_{\text{дигідротіаз.}}^{**}$	0,9681	0,9710	-0,4401	0,8967	0,8981	0,1181	0,8813	1

Примітка: * – максимальний орбітальний коефіцієнт на атомі сірки в молекулі; ** – орбітальний коефіцієнт на атомі дигідротіазинової сірки.

У реакціях з солями тетразолію показником, що характеризує реакційну здатність досліджуваних сполук, може бути значення молярного показника поглинання (ϵ). Для виявлення кореляційних взаємозв'язків між отриманими індексами реакційної здатності та молярним показником поглинання розраховано кореляційну матрицю (табл. 9).

Кореляційний аналіз дозволив виявити наявність лінійної залежності між молярними показниками поглинання цефалоспоринів за реакцією з n-НТХ і n-НТФ та енергетичною щільністю (табл. 9).

Однак характер залежності є зворотнім, тобто термодинамічно стійкіші системи виявили більшу активність відносно до солей тетразолію. Надалі виявилось, що у найбільш стабільних молекул, зокрема цефалексину та цефазоліну, молекулярна орбіталь сконцентрована на атомах дигідротіазинової сірки чи гетерилтіометильної групи, що й зумовило вищі значення молярної абсорбції. У випадку цефтриаксону та цефотаксиму порівняно високі орбітальні коефіцієнти виявлено на атомі сірки тіазольного циклу, що має низку реакційну здатність внаслідок його ароматичності. Отже, лінійну залежність спостерігали між показником чутливості реакції цефалоспоринів з солями тетразолію та локальними орбітальними коефіцієнтами дигідротіазинової сірки, а

також максимальними орбітальними коефіцієнтами на атомі сірки в молекулі: $\epsilon=87232 \cdot f(S_{\text{max}}) - 3271$, $R=0,9264$, $S=6080,7$ та $\epsilon=75358 \cdot f(S_{\text{дигідротіаз.}}) + 4910$, $R=0,9710$, $S=3865$ – за реакцією з n-НТФ; $\epsilon=53536,5 \cdot f(S_{\text{max}}) + 1062,5$, $R=0,9439$, $S=3211,6$ та $\epsilon=45568 \cdot f(S_{\text{дигідротіаз.}}) + 6153$, $R=0,9747$, $S=2172$ – за реакцією з n-НТХ.

Отже, цефалоспоринові антибіотики мають дуже різну реакційну здатність, оскільки значно різняться за своїми замісниками. Вирішальну роль для прогнозування реакційної здатності в цьому випадку відіграють орбітальні коефіцієнти внаслідок різного розподілу ВЗМО по атомах.

Висновки

Визначено оптимальні умови перебігу реакцій нітропохідних солей тетразолію з цефалоспориновими антибіотиками та розроблено доступні, чутливі, валідні методики аналізу деяких цефалоспоринів у складі сучасних лікарських препаратів. На основі результатів полярографічних досліджень і квантово-хімічних розрахунків встановлено основні закономірності між будовою цефалоспоринових антибіотиків, їх відновними властивостями та здатністю вступати в реакцію з солями тетразолію. Показано, що на реакційну здатність досліджуваних сполук суттєвий вплив мають стеричні фактори.

Список літератури

1. El-Shaboury S.R. Analysis of cephalosporin antibiotics / El-Shaboury S.R., Saleh G.A., Mohamed F.A., Rageh A.H. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 45, №1. – P. 1–19.
2. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.
3. United States Pharmacopeia 26. – USP Convention Inc. – Rockville, 2003.
4. British Pharmacopeia. – Her Majesty's Stationery Office. – London, 2000.
5. Salem H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt / Salem H., Askal H. // J. of Pharm. and Biom.l Anal. – 2002. – Vol. 29, №1–2. – P. 347–354.
6. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins / Saleh G.A., Askal H.F., Radwan M.F., Omar M. A. // Talanta. – 2001. – №54. – P. 1205–1215.
7. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations / Salem H. // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 515. – P. 333–341.
8. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins using oxidized quercetin reagent / Saleh G. A., El-Shaboury S. R., Mohamed F.A., Rageh A.H. // Spectrochim. Acta A. – 2009. Vol. 73, №5. – P. 946–954.
9. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics / Salem H., Saleh G.A. // J. of Pharm. and Biom.l Anal. – 2002. – Vol. 28, №6. – P. 1205–1213.

10. Spectroscopic analytical study for the charge-transfer complexation of certain cephalosporins with chloranilic acid / Saleh G.A., Askal H.F., Darwish I.A., El-Shorbagi A.N. // Anal. Sci. – 2003. – Vol. 19, №2. – P. 281–287.
 11. *Nineham A.W.* The chemistry of formazans and tetrazolium salts / *Nineham A.W.* // Chem. Rev. – 1955. – Vol. 55, №2. – P. 355–483.
 12. *Zhivich A.B.* Tetrazolium salts (review) / *Zhivich A.B., Koldobskii G.I., Ostrovskii V.A.* // Chem. Heterocycl. Comp. – 1990. – V. 26, №12. – P. 1319–1328.
 13. *Belyakovich A.G.* Tetrazolium method for studying the catalytic properties of oxidoreductases in cellular organelles immobilized on glass surfaces / *Belyakovich A.G.* // Anal. Biochem. – 1983. – V. 131, №2. – P. 404–409.
 14. Colorimetric method of sequential determination of several dehydrogenases in a smear of human leukocytes // *Beliakovich A.G., Lakhina L.V., Pankratova E.V.* et al. – Vopr. Med. Khim. – 1987. – V. 33, №3. – P. 118–120.
 15. Gaussian 03, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
 16. *Lee C.* Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / *Lee C., Yang W., Parr R.G.* // Phys. Rev. B – 1988. – Vol. 37, №2. – P. 785–789.
 17. *Becke A.D.* Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange / *Becke A.D.* // J. Chem. Phys. – 1993. – Vol. 98, № 7. – P. 5648–5652.
-

Відомості про авторів:

Тарханова О.О., к. фарм. н., асистент каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Постика А.М., магістрант каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Монакіна Ю.В., асистент каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Васюк С.О., д. фарм. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Дочинець Д.І., к. фарм. н., доцент каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Адреса для листування:

Тарханова Ольга Олександрівна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. аналітичної хімії ЗДМУ.

Тел.: (0612) 34 21 81.

E-mail: tarkhanova@gmail.com

Надійшла в редакцію 29.12.2011 р.