

На правах рукописи



**ПУЧКОВСКАЯ Евгения Сергеевна**

**ИНВЕРСИОННАЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЯ АЗИТРОМИЦИНА  
ДИГИДРАТА**

**02.00.02 — аналитическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата химических наук**

**Томск - 2006**

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии  
Томского политехнического университета

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор  
Карбаинов Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор  
Майстренко Валерий Николаевич

кандидат химических наук, с.н.с.  
Мордвинова Нина Михайловна

Ведущая организация:

Российский государственный университет  
нефти и газа имени И.М. Губкина (г. Москва)

Защита состоится « 15 » ноября 2006 г. в 14 часов 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при Томском политехническом университете (634050, г. Томск, пр. Ленина, 30)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского политехнического университета по адресу: ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан « 12 » октября 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук,  
доцент

 Гиндуллина Т.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Определение таких лекарственных форм как антибиотиков, чрезвычайно важно для оценки фармакологического действия и эффективности антибактериальной терапии, идентификации действующих веществ в лекарственных формах, а также его метаболитов в биологических матрицах. В последнее время много внимания уделяется синтезу новых форм антибиотиков. Таким примером служит азитромицин дигидрат, который является представителем антибиотиков макролидного ряда, однако, относится к отдельной подгруппе азалидов, за счет отличия в строении молекулы. Азитромицин относится к полусинтетическим антибиотикам второго поколения и обладает высокой микробиологической и клинической эффективностью в лечении ряда тяжелых инфекций дыхательных путей, кожи и мягких тканей, некоторых урогенитальных инфекций.

Еще одной проблемой, которая требует разработки новых, более чувствительных и селективных методов анализа, и, в частности, электрохимических методов, остается проблема фальсификации лекарственных препаратов. По различным данным доля поддельных медикаментов достигает в среднем 10-15% от общего оборота лекарственных средств.

Фальсифицированные продукты могут включать препараты с неточным составом, неправильными ингредиентами, без содержания или с недостаточным содержанием действующих веществ, или с поддельной упаковкой. По оценкам различных исследований, в настоящее время фальсификация идет в основном по пути уменьшения содержания действующего вещества в препарате.

Для выхода из сложившейся ситуации в последние 2 года были созданы нормативно-правовые базы для урегулирования контроля выпуска лекарственных средств. В связи с этим повышаются требования к методам контроля фармпрепаратов. Учитывая вышеперечисленное, необходим эффективный контроль за качеством выпускаемых препаратов, в состав которых входят антибиотики.

Это в свою очередь предъявляет повышенные требования к контролю за качеством лекарственных средств и совершенствованию методов количественного определения антибиотиков, в том числе группы макролидов.

Перед химиками-аналитиками ставится задача разработка новых, более совершенных методик анализа, позволяющих с высокой точностью и селективностью определять лекарственные вещества в более широких интервалах определяемых содержаний с небольшими материальными затратами.

При выборе инструментального метода контроля лекарственных средств учитываются ряд требований: возможность определения следов органических веществ, находящихся в пробе с минимальной погрешностью, достаточная селективность, отсутствие сложной процедуры пробоподготовки, возможность автоматизации методики, минимально возможное время исследования, достаточная универсальность (возможность многоэлементного анализа), минимальная массогабаритность оборудования.

В данной работе рассматриваются возможности вольтамперометрического определения антибиотиков макролидного ряда в различных объектах, на примере азитромицина дигидрата. Проводимые исследования направлены на увеличение чувствительности, серийности и экспрессности проводимых анализов.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является разработка методики количественного определения азитромицина дигидрата в биологических средах и фармпрепаратах, а также проведение теоретических и экспериментальных исследований его вольтамперометрического поведения.

Указанная цель обусловила постановку и решение следующих задач:

- исследовать электрохимическое поведение азитромицина дигидрата методом вольтамперометрии на стеклоуглеродном и ртутном пленочном электродах;
- исследовать рабочие условия вольтамперометрического поведения азитромицина дигидрата, а именно: оценить влияние различных факторов ( $E_s$ ,  $\tau_s$ , pH,  $w$ , природы растворителя, природы фонового электролита) на потенциал и величину тока окисления и восстановления азитромицина;
- с целью уточнения механизма, протекающего на электродах, провести квантово-химические расчеты структуры молекулы азитромицина, и сделать заключение о электрохимической активности наиболее реакционноспособной группы молекулы антибиотика в целом;
- определить некоторые физико-химические параметры электродной реакции ( $\beta n$ ,  $k_s$ ,  $n$ );
- для уточнения рабочих условий вольтамперометрического определения азитромицина дигидрата провести исследования оценки адсорбционной способности антибиотика как на ртутно-пленочном, так и на стеклоуглеродном электроде в широком интервале изменения его концентрации. Рассмотреть возможности метода ИВА в исследовании адсорбционных процессов на твердых электродах;
- разработать и метрологически аттестовать методику количественного определения азитромицина дигидрата в фармацевтических препаратах и биологических объектах.

#### **Научная новизна:**

- Впервые показана способность антибиотика-макролида азитромицина дигидрата окисляться на стеклоуглеродном электроде, а так же его способность к восстановлению на ртутно-пленочном электроде. Установлены рабочие условия его вольтамперометрического определения. Рассчитаны некоторые кинетические параметры данных реакций ( $\beta n$ ,  $k_s$ ,  $n$ ).
- Впервые выполнены квантово-химические расчеты для молекулы азитромицина и его радикальных форм с целью определения наиболее реакционноспособной группы.

- Решена краевая задача для процесса электроокисления азитромицина на стеклоуглеродном электроде в анодной вольтамперометрии. Рассмотрены способы оценки кинетических параметров этого процесса.
- Теоретически и экспериментально исследован процесс адсорбции азитромицина на ртутно-пленочном и стеклоуглеродном электродах различными методами.
- Разработан алгоритм подготовки проб биологических объектов (сыворотка и плазма крови) для последующего определения следовых количеств азитромицина вольтамперометрическим методом.
- Впервые разработаны методики количественного химического анализа проб лекарственных препаратов (таблетки, капсулы) и биообъектов на содержание азитромицина дигидрата методом инверсионной вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде.

**Практическая значимость работы** определяется тем, что:

Разработана и метрологически аттестована методика количественного химического определения азитромицина дигидрата в лекарственных препаратах методом инверсионной вольтамперометрии. Способ количественного определения азитромицина дигидрата методом инверсионной вольтамперометрии защищен патентом РФ.

Методика количественного анализа азитромицина в биологических объектах (сыворотка крови, моча, ткани) нашла практическое применение в лаборатории молекулярной фармакологии НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН г. Томска, ветеринарных службах г. Кемерово, г. Томска, а также контролирующих лабораториях ЦСМ (г. Томска, г. Кемерово, г. Новосибирска).

**На защиту выносятся** следующие научные положения и выводы:

1. Рабочие условия вольтамперометрического определения азитромицина дигидрата на стеклоуглеродном и ртутно-пленочном электродах.
2. Возможный механизм электрохимической реакции азитромицина дигидрата, протекающей на электроде с учетом молекулярного строения, реакционной способности и материала электрода.
3. Параметры электродной реакции с участием антибиотика и его адсорбционная способность.
4. Вольтамперометрический способ оценки некоторых параметров адсорбции на примере азитромицина дигидрата.
5. Алгоритм методик количественного химического анализа лекарственных препаратов и биологических жидкостей (сыворотка и плазма крови) на содержание азитромицина методом инверсионной вольтамперометрии.

**Апробация результатов исследования.** Диссертация подготовлена на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета, где и проводилось ее обсуждение. Материалы отдельных разделов диссертационной работы и некоторые полученные результаты освещались на: VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока-2004» (Новосибирск, 2004); III Всероссийской научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (Томск, 2004); VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2004» (Уфа, 2004); 8th Korea-Russia International Symposium on Science and Technology (Tomsk, 2004); Всероссийской научной конференции с международным участием «Электроаналитика-2005» (Екатеринбург, 2005); II-ой школе-семинаре «Кватново-химические расчеты: структура и реакционная способность органических молекул» (Иваново, 2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, 7 тезисов докладов, получен 1 патент на изобретение РФ.

**Структура работы.** Работа объемом 126 страниц компьютерного текста, включая 31 рисунок и 12 таблиц, состоит из введения, пяти глав, выводов и приложения. Список литературы содержит 107 библиографических источников отечественных и зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении обосновывается актуальность темы исследования, указываются его цели и задачи, определяется состояние научной разработки проблемы, раскрываются научная новизна, формулируются основные положения, выносимые на защиту, аргументируется практическое значение работы, приводятся сведения об апробации результатов проведенных исследований.

Глава 1. представляет литературный обзор, в котором даны характеристики антибиотиков ряда макролидов и в частности азитромицина дигидрата. Приведена их классификация, рассмотрены особенности строения. Проведен анализ химических и физико-химических методов определения антибиотиков данной группы. Рассмотрены данные по полярографическому и вольтамперометрическому определению азитромицина дигидрата. Показано, что в последнее время различные варианты вольтамперометрии являются одними и перспективных методов анализа антибиотиков-макролидов. Они позволяют проводить анализ различных по составу и сложности объектов (в т.ч. биологические объекты: кровь, моча). В заключении обзора сформулированы задачи исследования.

В Главе 2. дана характеристика используемой аппаратуры, типов электродов, программного обеспечения. Изложена техника проведения эксперимента.

Глава 3. посвящена описанию выбора рабочих условий вольтамперометрического определения азитромицина дигидрата.

В работе впервые показана возможность использования стеклоуглеродных (СУ) и ртутно-пленочных (РП) электродов для количественного определения азитромицина.

Использование СУ электродов обусловлено высокой химической и электрохимической устойчивостью графита, широкой областью рабочих потенциалов, как в водных, так и в неводных средах, а также простотой механического обновления поверхности и требованиями техники безопасности.

На рисунке 1. представлена типичная вольтамперограмма окисления азитромицина на СУ электроде, снятая в дифференциально-импульсном режиме развертки потенциала.

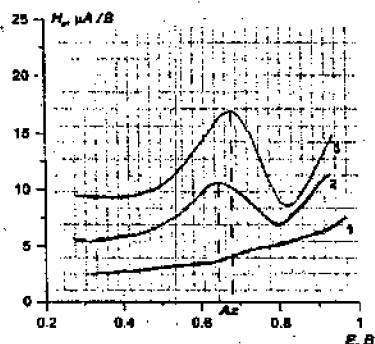


Рис.1. Вольтамперограмма окисления азитромицина дигидрата на СУ электроде 1 - фон 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;

$$2 - C_{Az} = 1,99 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л};$$

$$3 - C_{Az} = 2,98 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}.$$

$$\tau_s = 30 \text{ с}; w = 30 \text{ мВ/с}; E_s = 0,2 \text{ В}.$$

Результаты исследования различных фоновых электролитов показали, что, относительное стандартное отклонение ( $Sr$ ) не превышает 0,20 и 0,25 при регистрации анодных пиков соответственно на фонах 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и раствора буфера Бриттона-Робинсона pH 8,0 $\pm$ 9,0 для диапазона концентраций  $2,2 \cdot 10^{-10}$ – $3,0 \cdot 10^{-9}$  моль/л и  $Sr$  равно 0,13 для диапазона концентраций  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л. При этом более высокие значения тока окисления фиксировались на фоне гидрофосфата натрия (рис. 2.), что позволяет увеличить чувствительность метода.

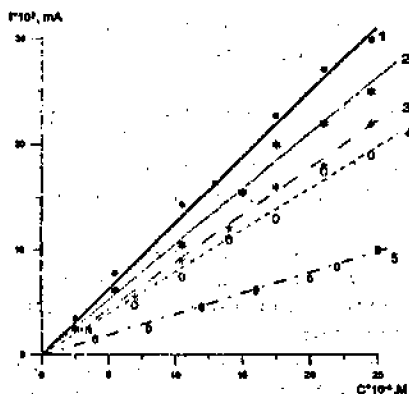


Рис. 2 Зависимость величины тока окисления азитромицина на СУЭ от концентрации на различных фоновых электролитах,  $\tau_s = 30$  с.

- 1 – 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- 2 – буфер Бриттона-Робинсона
- 3 – 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ ,
- 4 – 0,2 M  $\text{Na}_2\text{Cit}$ ,
- 5 – 0,05 M  $\text{NaOH}$ .

Анализ литературных данных и наши исследования показали, что азитромицин очень чувствителен к изменению pH среды. Увеличение pH раствора буфера Бриттона-Робинсона от 8,0 до 9,0 смещает потенциал пика окисления азитромицина в более положительную область потенциалов от 0,774 до 0,850 В (рис. 3).

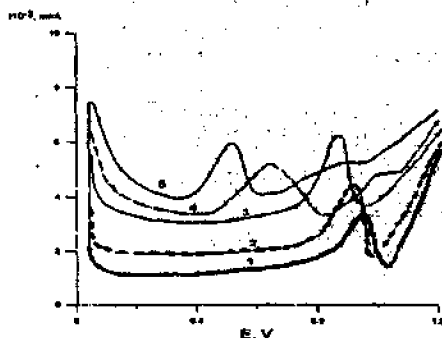


Рис. 3 Поляризационные кривые окисления на СУ электроде азитромицина при различных pH.

- pH 7,4 (1); pH 7,75 (2);
- pH 8,45 (3); pH 9,35 (4);
- pH 9,55 (5);  $W=30$  мВ/с,  $\tau_s=20$ с,
- $E_s=0,2$ В,
- $C_{AZ}=10^{-6}$  моль/л;

Кроме того, при pH больше 9,0 может регистрироваться дополнительный пик с  $E_p \approx 0,90$  В, что снижает разрешающую способность способа. При pH меньше 8,0 молекула азитромицина находится в ионизированном состоянии и поэтому окисляется при менее положительном потенциале. Значения pH 8,0+9,0 являются оптимальными для количественного химического определения азитромицина. В кислой среде при pH меньше 6 пик окисления не регистрируется, по-видимому, происходит распад молекул макролидов.

Азитромицин также восстанавливается на РП электроде. Вольтамперограмма восстановления азитромицина дигидрата на РП электроде представлена на рисунке 4.



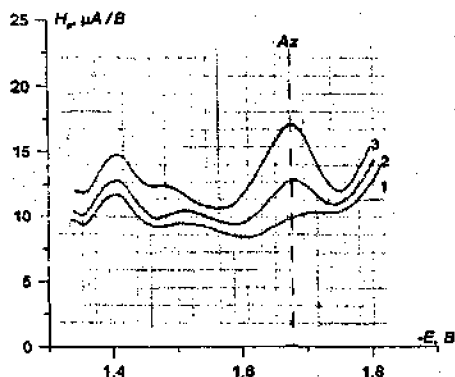


Рис.4 Вольтамперограмма восстановления азитромицина дигидрата на РП электроде

1 – фон 0,1 M  $Na_3Cit$ ;

2 –  $C_{Az} = 9,95 \cdot 10^{-8}$  моль/л;

3 –  $C_{Az} = 1,98 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

$\tau_s = 30$ с;  $w = 50$  мВ/с;  $E_s = -1,2$ В.

В качестве возможных фонов были рассмотрены преимущественно водные фоновые электролиты такие как: гидроксиды натрия и калия, натрий фосфорнокислый, буферные растворы Бриттона-Робинсона, ацетатный буфер, цитрат натрия и другие растворы pH которых имеет слабощелочной показатель. Однако, не все вышеперечисленные электролиты дают возможность получения прямой градуировочной зависимости в достаточно широком диапазоне концентраций азитромицина. Линейная зависимость градуировочного графика, представленных на рисунке 5, сохраняется в достаточно широком диапазоне концентраций  $3,4 \cdot 10^{-10} + 1,0 \cdot 10^{-8}$  моль/л только на фоне цитрата натрия. В связи, с чем он был выбран в качестве рабочего электролита.

Относительное стандартное отклонение для указанного диапазона концентраций изменяется от 0,28 до 0,10.

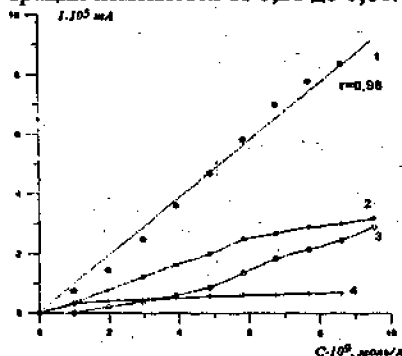


Рис 5. Зависимость высоты катодного тока азитромицина от его концентрации на различных фонах:

1- 0,1 M  $Na_3Cit$ ;

2 - 0,01 M  $NaOH$ ;

3-0,1 M  $Na_2HPO_4$ ;

4- 0,05 M  $Na_2B_4O_7$ ,

$\tau_s = 60$  с.

Для улучшения метрологических характеристик аналитического сигнала были проведены исследования зависимостей предельного тока азитромицина от потенциала электролиза, времени электролиза, а также скорости изменения потенциала развертки.

Результаты исследований по выбору рабочих условий ВА определения азитромицина представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Рабочие условия вольтамперометрического определения азитромицина

Параметры измерений	Значения параметров	
Электроды	ртутно-пленочный	стеклоуглеродный
Используемая система	2-ух электродная	3-х электродная (вспомогательный электрод - СУ)
Фоновый электролит	0,1M Na <sub>2</sub> Cit (pH 6,0 + 7,0)	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 8,0+9,0)
Потенциал электроконцентрирования	-1,2 В	0,2 В
Диапазон развертки потенциалов	от -1,2 В до -2,0 В	от 0,2 В до 1,8 В
Время электролиза	30 + 120 с	30+ 60 с
Скорость развертки потенциала	50 + 60 мВ/с	20+30 мВ/с
Потенциал пика	-(1,55 + 1,75) В	0,65+0,75 В

В Главе 4. рассмотрены вопросы теории процессов разряда ионизации азитромицина дигидрата на различных типах электродов, а также сделана их опытная проверка.

В первой части главы были проведены вольтамперометрические исследования процессов разряда ионизации. Изучение обратимости процессов электроокисления азитромицина проводили по экспериментальным данным, для расчета которых использовали известные в литературе критерии и метод циклической вольтамперометрии.

Установлено, что процесс электроокисления антибиотика протекает необратимо, что подтверждает вид кривой представленной на рисунке 6.

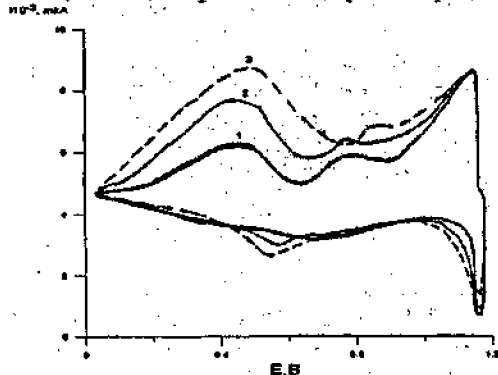


Рис. 6 Циклические вольтамперограммы азитромицина дигидрата на фоне 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1- $C_{02}=1,00 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  
 2- $C_{02}=1,99 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  
 3 -  $C_{02}=2,98 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  
 $w=30$  мВ/с;  $t_s=20$ с;  $E_s=0,2$  В;  
 СУЭ дисковый диаметр 5 мм.

Здесь, при катодной развертке мы наблюдаем четко выраженный сигнал, а при анодной развертке пик выражен не четко. Основным параметром обратимо-

сти процесса является разница потенциалов между катодным и анодным пиком. В случае электроокисления азитромицина на СУ электроде эта разница составляет более 30 мВ, что так же говорит в пользу необратимого процесса.

Для изучения кинетических параметров процесса окисления азитромицина на стеклогуглеродном электроде был применен как «традиционный» метод (анализ полулогарифмических зависимостей), так и метод инверсионной вольтамперометрии.

Эффективные коэффициенты переноса ( $\beta_p$ ) электродного процесса были рассчитаны, как из полулогарифмических зависимостей ( $E - f \ln \left( \frac{I}{I_0 - I} \right)$ ), так и по зависимости потенциала максимума тока окисления азитромицина от логарифма скорости изменения потенциала ( $E - f \ln w$ )

Расчет  $\beta_p$  по этим зависимостям дает вполне согласующиеся друг с другом результаты:

$$\beta_p \text{ из графика } E - f \ln \left( \frac{I}{I_0 - I} \right)$$

0,19

$$\beta_p \text{ из графика } E - f \ln w$$

0,2

По полученным и описанным нами ранее результатам, мы сделали вывод, что реакция электроокисления азитромицина является электрофильной. Роль электрофильного реагента с электрофильным дефицитом выполняет анод, а роль субстрата – молекула азитромицина, структурная формула которой приведена на рисунке 7.

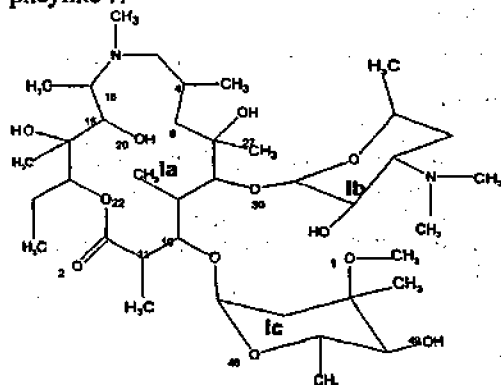


Рис. 7 Азитромицин дигидрат ( $C_{33}H_{72}N_2O_{12} \cdot H_2O$ ):  
9-Deoxy-9a-aza-9a-methyl-9a-homocerythromycin A dehydrate  
(1a-15-членное лактонное кольцо;  
1b-дезозамин; 1c-кладиноза)

Во второй части данной главы, предложен вероятный механизм процесса, протекающего на СУ электроде. Предположения основываются на данных квантово-химических расчетов, проведенных по полуэмпирическому методу PM3 (программа HyperChem 6.0). Анализируя значения теплот образования субстрата, его катион- и анион – радикалов, а также значения энергии ионизации ( $E_{\text{ВЗМО}}$ , эВ) и энергии сродства к электрону ( $E_{\text{ПВМО}}$ , эВ) (табл. 2) мы делаем вывод что, у име

небольшие значения  $E_{\text{ВЗМО}}$  азитромицин относительно легко должен принимать на эти орбитали электроны, образуя анион – радикалы. Об этом же свидетельствуют и данные по изменению теплоты образования анион – радикала по сравнению с катион радикалом, а также сравнительные результаты значений энергий  $E_{\text{ВЗМО}}$  и  $E_{\text{ВЗМО}}$ . Энергия ВЗМО, отображая потенциал ионизации, соответствует достаточно высокой энергетической области (-8,86, эВ). Изложенное выше, позволяет судить в целом о большой устойчивости анион – радикала по сравнению с катион – радикалом азитромицина.

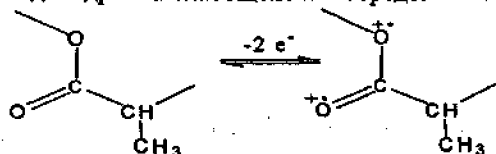
Для определения наиболее электрохимически активной группы в структуре антибиотика, которая вероятнее всего будет вступать в реакцию, был проведен анализ полученных результатов по распределению зарядов на соответствующих атомах. Соответствующие данные представлены в диссертации.

Таблица 2.

Значения теплоты образования, энергии ионизации, энергии сродства к электрону

Соединение	Теплота образования, $\Delta H$ , кДж/моль	Изменение теплоты образования, $\Delta(\Delta H)$ , кДж/моль	Энергия ионизации, $E_{\text{ВЗМО}}$ , эВ	Энергия сродства к электрону, $E_{\text{ВЗМО}}$ , эВ
Азитромицин	-2298.9	-	-8.87	1.20
Катион-радикал азитромицина	-1522.2	776.6	-	-
Анион-радикал азитромицина	-2358.9	-60.1	-	-

Третья часть теоретического раздела диссертационной работы представляет описание математической модели процесса окисления азитромицина дигидрата на СУ электроде. На основании квантово-химических расчетов структуры молекулы антибиотика можно предположить следующую схему электроокисления азитромицина дигидрата в слабощелочной среде:



Проанализировав закономерности изменения исходного продукта в условиях нестационарной диффузии и необратимого электродного процесса, а так же используя полулогарифмические зависимости, были проведены расчеты коэффициента переноса ( $\beta$ ), а также средних значений констант скоростей (табл. 3.)

Таблица 3.

Кинетические параметры процесса окисления азитромицина на СУ электроде

Кинетические параметры	Способы расчета кинетических параметров	
	По данным полулогарифмических зависимостей	По данным метода ИВА
$(\beta n)$	0,19	0,17
$k_2, \text{дм}^3/\text{с}$	$1,84 \cdot 10^{-8}$	$2,14 \cdot 10^{-10}$

Заниженные значения константы скорости, полученные по данным метода ИВА (в нашем случае на два порядка) (табл. 3.) можно объяснить следующим образом. Во-первых, следует учитывать возможность адсорбции посторонних веществ на поверхности электрода и, как следствие, блокировку части его поверхности; и, во-вторых, неполным растворением вещества, полученного в ходе электрохимических превращений, за время съемки ВА кривых.

Изучению процесса адсорбции посвящен четвертый раздел Главы 4. Здесь исследована адсорбционная способность азитромицина дигидрата как на РПЭ, так и на СУЭ. В последнем случае, т.е. на СУ электроде, такая оценка сделана только методом инверсионной вольтамперометрии. Что же касается РП электрода, то адсорбция азитромицина изучена тремя различными способами: методом двойного обратного интегрирования, по методу, предложенному С.Г. Майрановским, а также, используя, метод ИВА.

Опытные данные, полученные по методу двойного обратного интегрирования, свидетельствуют о том, что в щелочных растворах имеет место аннионный тип адсорбции азитромицина. Потенциал десорбции антибиотика находится на отрицательной ветви электрокапиллярной кривой (рис. 8).

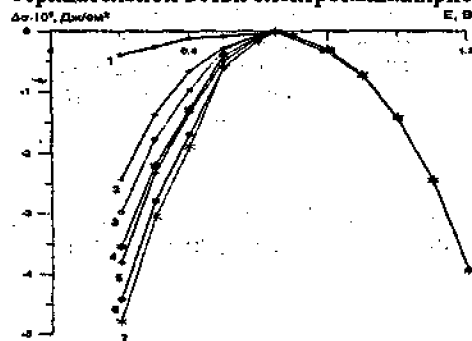


Рис. 8 Зависимость изменения величины поверхностного натяжения от потенциала РП электрода на фоне 0,1 М NaOH:

- 1 – фон 0,1 М NaOH;
- 2 –  $C_{Az}=0,01 \cdot 10^{-6}$  моль/л;
- 3 –  $C_{Az}=0,03 \cdot 10^{-6}$  моль/л;
- 4 –  $C_{Az}=0,05 \cdot 10^{-6}$  моль/л;
- 5 –  $C_{Az}=0,08 \cdot 10^{-6}$  моль/л;
- 6 –  $C_{Az}=0,1 \cdot 10^{-6}$  моль/л;
- 7 –  $C_{Az}=0,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л.

В таблице 4 приведены результаты расчетов параметров адсорбции, величина которых показывает вклад адсорбционной составляющей в величину предельно тока восстановления азитромицина дигидрата с РП электрода.

Таблица 4.  
Параметры процесса адсорбции азитромицина дигидрата на РП электроде  
(метод двойного обратного интегрирования)

Фон	Потенциал, В	$k$ , $\text{дм}^3/\text{моль}$	$\Gamma_{\infty}$ , $\text{моль}/\text{м}^2$	$\Delta G_A$ , $\text{кДж}/\text{моль}$
0,1 М NaOH	-0,3	$2,39 \cdot 10^7$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^4$
0,1 М $\text{Na}_2\text{SO}_4$	-0,2	$0,20 \cdot 10^7$	$6,25 \cdot 10^{-6}$	$4,6 \cdot 10^4$
0,1 М $\text{NH}_4\text{Cl}$	-0,3	$6,53 \cdot 10^{11}$	$3,93 \cdot 10^{-8}$	$6,02 \cdot 10^4$

Для расчета величин адсорбции была применена изотерма Ленгмюра на том основании, что экспериментальные данные были получены при достаточно низких концентрациях, при которых возможно не учитывать действие специфической адсорбции, а также взаимодействие ПАОВ по Фрумкину.

Метод, предложенный Майрановским, был применен для случая, когда раствор содержит достаточно большие концентрации ПАОВ. Содержание азитромицина в растворе составляло  $(0,5 \pm 2,0) \cdot 10^{-3}$  моль/л. Расчеты по данному методу, сводились к построению зависимости  $\frac{d \ln C}{d\Theta} = f(\Theta)$  (рис. 9), которая дает представление об изотерме, описывающей адсорбционные процессы, протекающие с учетом взаимодействия между адсорбированными частицами (изотерма Фрумкина, Хилла де Бура или Парсонса).

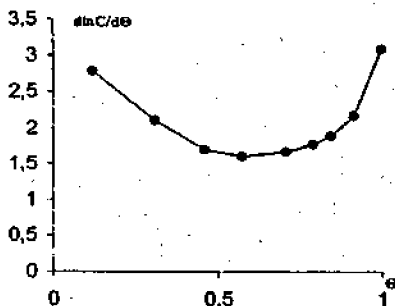


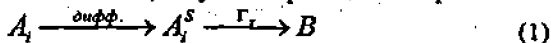
Рис. 9 Данная зависимость есть уточняющий экспериментальный критерий (в зависимости от того какому значению  $Q$  соответствует минимум кривой) показывает, каким уравнением описывается процесс адсорбции (Фрумкина, Парсонса, Хилла де Бура).

В данном случае процесс описывается изотермой Фрумкина. Что согласуется с теоретическими данными о наличии специфической адсорбции при больших концентрациях ПАОВ.

Предложенный способ исследования процесса адсорбции методом ИВА, в достаточной степени может применяться как для обратимых, так и необратимых процессов, которые возможны как на «жидких» (РПЭ), так и на «твердых» (СУЭ) электродах.

Сущность предложенной модели для вольтамперометрического исследования адсорбции ПАОВ (на примере азитромицина дигидрата) сводится к следующему:

Согласно механизму реакции (1), модель включает предшествующую стадию адсорбции ПАОВ на поверхности электрода, которая, являясь более электрохимически активной, вступает в реакцию с образованием продукта В.



В данном методе рассматривается и решается краевая задача для скорости образования адсорбционного слоя, когда лимитирующей стадией процесса образования является диффузия ПАОВ в поверхностный слой электрода (2).

$$\frac{\partial C_A(x,t)}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2 C_A(x,t)}{\partial x^2} \quad (2), \quad 0 \leq x \leq \infty.$$

$$\text{При } t=0, \quad C_A(x,0) = C_A^0 \quad (3);$$

$$t > 0, x \rightarrow \infty, \quad C_A(\infty,t) \rightarrow C_A^0 \quad (4)$$

Кроме того

$$D_A \frac{\partial C_A(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} = k^* \cdot C_A(l,t) \cdot \Gamma, \quad (5)$$

$$\Gamma_r = \int_0^t D_A \frac{\partial C_A(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} dt = \Gamma_\infty \frac{\kappa C_A^0}{1 + \kappa C_A^0} \quad (6)$$

Выражение для тока пика на электроде при постоянном потенциале электролиза имеет вид:

$$i = zFsD_A \frac{\partial C_A(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} \quad (7)$$

преобразуя это уравнения получаем:  $I = k_R S C_{B(t)}$  (8)

В уравнении (8) константа скорости необратимой реакции в катодном процессе записывается:  $k_R = k_{ca} \cdot \exp[-\alpha z F E / RT]$  (9).

На опыте из площади под катодным пиком оценивается величина концентрации,  $C_{B(t)}$ .

Зная эту величину, из (8) оценивается величина константы скорости,  $k_R$ , а из (10) находят концентрацию  $\Gamma_r$  и константу скорости  $k^*$ , в отдельности.

$$I = k_R S \left\{ \frac{V}{s} C_A^0 \left[ 1 + \left( \frac{4k^* l_0}{3\sqrt{\pi} D_A} \sqrt{t} - 1 \right) \right] \right\} \Gamma_r \quad (10)$$

Далее из опытных данных оценивается  $\Gamma_r = f(C_A^0)$ . После этого строят график в координатах:  $C_A^0/\Gamma_r = f(C_A^0)$ , обрабатывая который, находят другие параметры адсорбции

В данной схеме величину  $\Gamma_r$  предлагается оценивать из площади под вольтамперной кривой  $i=f(E)$ , полученной методами катодной вольтамперометрии с накоплением (КВАН) или анодной инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Единственное условие, которое при этом должно быть выполненным, это краевое условие (5).

Полученные данные по количественной оценке параметров адсорбции методов ИВА на стеклоуглеродном электроде представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Параметры процесса адсорбции азитромицина (метод ИВА)

Электрод	$k, \text{дм}^2/\text{моль}$	$\Gamma_{\infty}, \text{моль}/\text{см}^2$	$\Delta G_A, \text{Дж}/\text{моль}$
СУЭ	$4,79 \cdot 10^6$	$6,47 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^3$

Глава 5. посвящена возможностям метода инверсионной вольтамперометрии для определения азитромицина дигидрата в лекарственных препаратах и биологических объектах. В этой части диссертационной работы дана оценка мешающего влияния на аналитический сигнал азитромицина сопутствующих компонентов матрицы.

Как показывают литературные данные и проведенные нами исследования органические вещества, такие как: соединения водорастворимых витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, аскорбиновой, никотиновой кислоты, флавоноидов не оказывают значимого влияния на характер вольтамперограмм и на величину тока окисления или восстановления антибиотика в установленных рабочих условиях проведения электроодного процесса, а так же избыточные концентрации таких галоген-ионов, как  $\Gamma^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$ .

Основное мешающее влияние оказывают катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ... в связи с тем, что происходит образование комплексных соединений когда их соотношение в растворе достигает соотношения (2:1) и белковая составляющая при анализе биологических объектов (моча, кровь).

Определенные сложности для анализа антибиотика в крови создается связыванием азитромицина с белками плазмы, степень которой зависит от его концентрации в крови и может варьировать от 37 до 50%.

Для устранения этого влияния, перед анализом, проводили пробоподготовку, которая заключалась в удалении белковой части матрицы (путем денатурации) и дальнейшей экстракции антибиотика этанолом.

Для определения максимально допустимого объема подготовленной сыворотки для анализа азитромицина изучена зависимость тока антибиотика от объема сыворотки в фоновом электролите, определена нижняя граница определяемых со-



держаний антибиотика на фоне, содержащем максимально допустимый объем сыворотки.

В работе представлены методики определения азитромицина в лекарственных препаратах (таблетки «Сумамед») и в сыворотке крови. Правильность предложенных методик определялась по методу введено-найдено.

Таблица 6

Результаты вольтамперометрического определения азитромицина дигидрата в сыворотке крови ( $P = 0,95$ )

Определяемое вещество	№ пробы	n	Введено	Найдено	Sr
			$C$ , моль/л	$(C \pm \Delta)$ , моль/л	
Азитромицин дигидрат	1	4	$2 \cdot 10^{-5}$	$(2,03 \pm 0,24) \cdot 10^{-5}$	0,074
	2	4	$5 \cdot 10^{-7}$	$(3,90 \pm 0,76) \cdot 10^{-7}$	0,12
	3	6	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0,94 \pm 0,24) \cdot 10^{-7}$	0,25

## ВЫВОДЫ

1. Установлены рабочие условия количественного определения азитромицина дигидрата методом вольтамперометрии с использованием стеклоуглеродного и ртутно-пленочного электрода. Сделана оценка предела обнаружения и нижней границы определяемых содержаний на стеклоуглеродном и ртутно-пленочном электроде. Значения  $C_{min,p}$  и  $C_n$  составляют соответственно  $1,84 \cdot 10^{-10}$  и  $2,19 \cdot 10^{-10}$  моль/л для СУ электрода для РП электрода эти значения составляют  $3,38 \cdot 10^{-10}$  и  $1,17 \cdot 10^{-9}$  моль/л соответственно.
2. Выполнены квантово-химические расчеты структуры молекулы азитромицина, которые позволили предложить наиболее вероятный механизм электрохимического превращения азитромицина дигидрата на стеклоуглеродном электроде.
3. Впервые была проведена оценка адсорбционной способности азитромицина дигидрата как на РП электроде, так и на СУ электроде. Оценка проводилась тремя различными способами: методом двойного обратного интегрирования, с помощью изотерм Ленгмюра и Фрумкина по способу, предложенному С.Г. Майрановским и используя метод ИВА. Найденны значения параметров адсорбции азитромицина.
4. Методами циклической вольтамперометрии установлено, что процесс электроокисления азитромицина на стеклоуглеродном электроде осложнен побочными процессами: как адсорбционными явлениями, так и предшествующими реакциями с участием органического вещества.
5. На основании полулогарифмических зависимостей, а также используя математическую модель, предложенную по результатам квантово-химических расче-

тов, были получены основные кинетические параметры процесса окисления азитромицина:  $\beta_n = 0,19 + 0,20$ ,  $k_s = 1,84 \cdot 10^{-8}$  л/моль·с (данные полулогарифмических зависимостей);  $\beta_n = 0,17$ ,  $k_s = 2,14 \cdot 10^{-10}$  л/моль·с (метод ИВА).

6. Дана оценка мешающего влияния сопутствующих неорганических анионов, катионов, органических веществ (витаминов, флавоноидов и других соединений) на величину тока окисления и восстановления азитромицина дигидрата. Установлены условия устранения мешающего влияния белков сыворотки и плазмы крови на аналитический сигнал антибиотика.
7. Разработана методика количественного химического анализа методом вольтамперометрии проб лекарственных препаратов (таблетки, капсулы). Проведена метрологическая аттестация вольтамперометрического определения азитромицина в биологических объектах в диапазоне концентраций  $5,0 \cdot 10^{-10} \pm 1,0 \cdot 10^{-9}$  моль/л.

#### По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Анисимова Л.С. Слепченко (Пучковская) Е.С., Слепченко Г.Б. Способ количественного определения азитромицина дигидрата методом инверсионной вольтамперометрии/ Патент РФ № 2241985; Приоритет 27.03.2003.; Регистрация в Госреестре 10.12.2004.
2. Слепченко Е.С., Карбаинов Ю.А., Слепченко Г.Б., Анисимова Л.С. Вольтамперометрическое исследование электрохимической активности азитромицина дигидрата. // Известия высших учебных заведений «Химия и химическая технология». - 2004. - Т.47, №9. - С.6-9.
3. Карбаинов Ю.А.Анисимова Л.С. Слепченко Е.С. К вопросу о вольтамперометрическом поведении некоторых макролидов.//Материалы VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока-2004» г. Новосибирск С. 10.
4. Пучковская Е.С. Вольтамперометрический контроль азитромицина дигидрата в фармпрепаратах // Материалы III Всерос. научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». Томск. Из-во ТПУ. 2004. С. 219-220.
5. Карбаинов Ю.А., Анисимова Л.С., Слепченко Е.С., Слепченко Г.Б. Изучение физико-химических закономерностей определения азитромицина методом вольтамперометрии // VI Всерос. конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2004». Уфа. 2004. С. 139-140.
6. Slepchenko G. B., Anisimova L. S., Fedorchuk V. A., Slechenko E. S. Voltammetric determination of drugs in complicated multicomponent systems, // 8th Korea-Russia International Symposium on Science and Technology. Korus 2004. – Tomsk, 2004. – V. 1. – P. 84-88.
7. В. А. Федорчук, В. Ф. Слипченко, Е. С. Пучковская, Л. С. Анисимова, Ю. А. Акенеев, Г. А. Шабала Количественное определение антибиотиков в

- пищевых продуктах, фармпрепаратах и биологических объектах // Всерос. Научная конференция с международным участием «Электроаналитика-2005». Екатеринбург. 2005. С.137.
8. Федорчук В.А., Пучковская Е.С., Анисимова Л.С. Слепченко Г.Б. Применение вольтамперометрии в анализе антибиотиков стрептомицина и азитромицина. // Изд-во РАН. Журнал аналитической химии. – 2005.- Т.60, № 6. – С. 586-591.
9. Пучковская Е.С., Карбаинов Ю.А. механизм электроокисления макролидных антибиотиков на твердых электродах// II-ая школа-семинар «Кватново-химические расчеты: структура и реакционная способность органических молекул» (доклад) Иваново. 2005 С.25-28.
10. Ю.А. Карбаинов, Е.С. Пучковская, С.Н. Карбаинова, Г.Б. Слепченко Вольтамперометрический способ исследования процесса адсорбции ПАОВ. // Известия ТПУ. – 2006. – Т.309, № 3. – С. 118 – 119.

Подписано к печати 9.10.2006. Формат 60х84/16. Бумага "Классика".

Печать RISO. Усл. печ. л. 1,11. Уч.-изд. л. 1.

Заказ 1090. Тираж 100 экз.

**ИЗДАТЕЛЬСТВО**  **ТПУ**, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

