

УДК 543.422.3:543.63

ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ З ОСНОВНИМИ БАРВНИКАМИ

¹Шкумбатюк Р.С., ^{1,2}Базель Я.Р., ¹Мумряк С.В., ³Шкумбатюк О.Й.

¹Ужгородський національний університет, 88000, м.Ужгород, вул. Підгірна 46

²P.J. Šafárik University in Košice, Slovakia

³Львівський національний аграрний університет, 80381, Львівська обл.,
Жовківський р-н, м. Дубляни, вул. В.Великого, 1

Амоксицилін відносяться до класу напівсинтетичних пеніцилінів другого покоління (β -лактанів), який широко застосовуються у сучасній медичній практиці при інфекціях дихальної і сечовивідної систем, травного тракту, шкіри і м'яких тканин, при сепсисі та отиті [1,2]. А отже є потреба у пошуці та розробці нових методик його контролю у лікарських препаратах, біологічних рідинах, змивних водах та інших об'єктах.

Аналітична хімія таких фармацевтичних препаратів розвивається переважно шляхом розробки та вдосконалення різноманітних варіантів хроматографічних визначень [3,4]. Проте при аналізі певних лікарських форм, конкурувати поряд з хроматографією можуть електрохімічні (вольтамперометрія, йонометрія) та спектрофотометричні методи аналізу [5-11]. Суттєвою перевагою останніх є раціональний баланс хіміко-аналітичних характеристик методик (висока чутливість, селективність, відтворюваність) із простотою, поширеністю та доступністю обладнання, необхідного для вимірювання та інтерпретації аналітичного сигналу. До таких речовин, для яких спектрофотометричні методи аналізу можуть бути ефективними, можна віднести і амоксицилін. Його особливістю є те, що в залежності від умов проведення реакції (кислотності середовища), він може проявляти як кислотні так і основні властивості. Це створює умови для утворення сполук типу іонних асоціатів (ІА) із основними барвниками, які можуть

виступити ефективними аналітичними формами при визначенні таких речовин. Проте можливості таких методів аналізу залишаються практично не реалізованими.

Раніше нами було доведено ефективність використання основних барвників поліметинового ряду – стирилів як реагентів для екстракційно-фотометричного визначення 2,4,6-тринітрофенолу, 2,4- та 2,6-динітрофенолу, нітропохідних бензойної кислоти [9-11]. Як показали попередні дослідження, дані барвники придатні і для визначення амоксициліну.

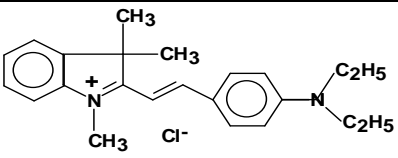
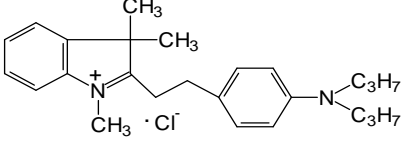
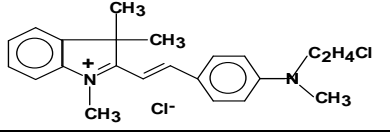
У літературі практично не описано методів спектрофотометричного визначення амоксициліну. Поодинокі публікації не підтвержені кількісними характеристиками методик, що не дає можливості оцінити їх хіміко-аналітичні та метрологічні показники.

Метою даної роботи було вивчити оптимальні умови утворення та екстракції ІА основних поліметинових барвників з амоксициліном, використанні вивчених ІА як ефективних аналітичних форм для екстракційно-фотометричного визначення амоксициліну, подальшому розширенні можливостей методів аналізу органічних речовин з використанням основних барвників.

В якості основних реагентів нами були використанні основні барвники поліметинового ряду, хімічні та тривіальні назви яких приведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Використані барвники

Назва	Структурна формула	λ_{\max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$
Хлорид 2-[4'N,N'-диетил-аміностирил]-1,3,3-триметил-3H-індолю, Астразон фіолетовий 3R (АФ 3R)		548	8,0
Хлорид 2-[4'N,N'-дипропіл-аміностирил]-1,3,3-триметил-3H-індолю. (ДАТІ)		550	5,5
Хлорид 2-[4'N,N'-метил-хлор-етиламіно-стирил]-1,3,3-триметил-3H-індолю, Катіонний рожевий 2С (КР)		538	5,6

Дані барвники у водному розчині володіють інтенсивним забарвленням, є стійкі до дії світла і зміни кислотності середовища [10,11], тому мають високі потенційні можливості для екстракційно-фотометричного визначення деяких органічних речовин (переважно кислотної природи) у вигляді іонних асоціатів.

Експериментальна частина

Вихідні $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчини амоксициліну тригідрату готували розчиненням точної наважки препарату у дистильованій воді. Розчини з меншою концентрацією готували відповідним розведенням дистилатом вихідного розчину безпосередньо перед дослідженням. $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчини барвників готували розчиненням точної наважки препарату в дистильованій воді. Кислотність середовища регулювали за допомогою сульфатної кислоти, гідроксидів амонію, натрію чи калію та ацетатно-аміачними буферними розчинами.

Оптичні густини розчинів вимірювали на фотоколориметрі КФК-2МП, спектри світлопоглинання реєстрували на спектрофотометрах СФ-10 і СФ-46. Розчином порівняння служила дистильована вода. Кислотність середовища контролювали за допомогою рН-метра рН-121 із скляним електродом. Як електрод порівняння використовували хлорсрібний електрод ЕВЛ-1М3. Для швидкого розділення фаз після

екстракції використовували центрифугу ЦЛК-1. Для виявлення оптимальних умов утворення та екстракції ІА амоксициліну з пропонуваними барвниками вивчено вплив кислотності середовища, концентрації барвника, природи органічного розчинника, часу екстракції та інші фактори.

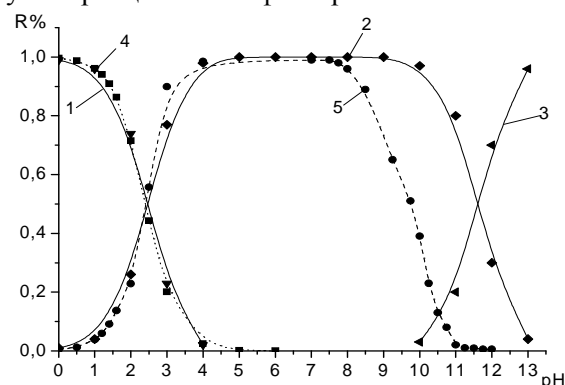


Рис. 1. Діаграма існування різних форм АФ 3R (1- HR^{2+} , 2- R^+ , 3- ROH) та амоксициліну (4- HA^+ , 5- A^-)

Одним із основних факторів, що буде впливати на можливість утворення та виділення ІА є концентрація водневих іонів у розчині. Це зрозуміло, адже в залежності від кислотності водної фази суттєво змінюється реакційна здатність обох учасників реакції – основного барвника та амоксициліну. Особливо даний чинник стосується амоксициліну, який в залежності від

кислотності середовища може проявляти як кислотні так і основні властивості (схема 1)

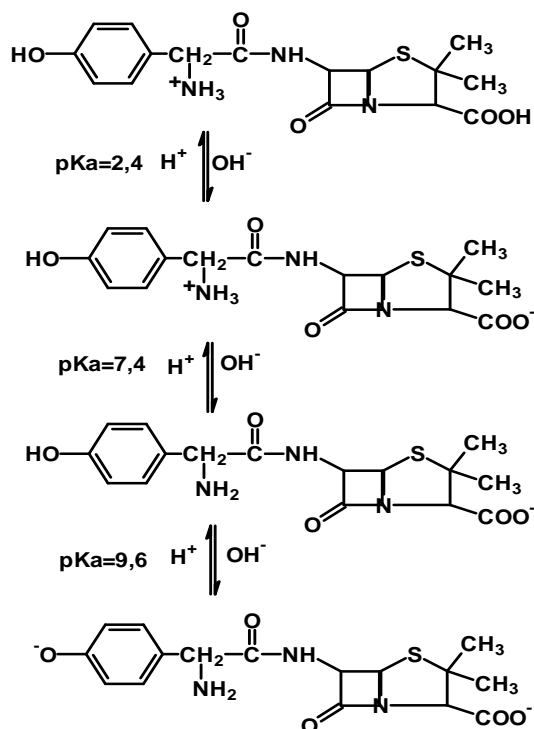


Схема 1. Вихід різних форм амоксициліну в залежності від кислотності середовища

Для утворення та можливої екстракції ІА у водній фазі необхідно створити умови домінування складових ІА: органічного аніону (A^-) та катіону барвника (R^+). Причому, утворення іонного асоціату можливе лише при таких значеннях рН, при яких обидва компоненти – і кислота, і основа знаходяться хоча б частково в іонізованому стані. Результати розподілу різних форм складових ІА, вираховані за даними їх констант протолізу [2-5] показують, що реакційно здатні однозарядні форми барвників (R^+) домінують у широких межах зміни кислотності середовища: від рН 1 до 11 (рис. 1). У той же час амоксицилін при рН вище 3 буде уже проявляти поряд з біполярними властивостями властивості слабкої кислоти. Тому ІА повинні утворюватися в досить широких межах широких межах зміни кислотності (від слабкислого до лужного середовища).

Отримані нами експериментальні дані підтверджують ці припущення. На рисунках 2-3. показано вплив кислотності середовища на утворення та екстракцію ІА амоксициліну

з дослідженими барвниками. Як бачимо, ІА утворюється та вилучається різними органічним розчинником в межах зміни кислотності середовища від рН 5 до 11. У всіх випадках криві проходять через максимум, положення якого відповідає значенням рН 7,5-9,5.

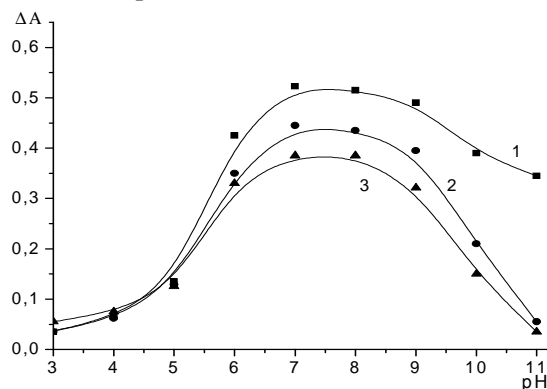


Рис 2. Вплив кислотності середовища на утворення та екстракцію бутилацетатом ІА амоксициліну

1 – ДАТІ; 2 – АФ-3R; 3 – КР;
 $C_{\text{амоксициліну}}=3 \cdot 10^{-5}$, $C_{R^+} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

При знайдених оптимальних значеннях кислотності середовища вивчали вплив концентрації барвника на утворення та вилучення утворених ІА. Для досягнення максимуму вилучення даного ІА необхідно створити концентрацію барвника $(3-8) \cdot 10^{-5}$ моль/л. Методом ізомольної серії встановлено, що співвідношення компонентів в утворених ІА $A^-:R^+ = 1:1$ (де R^+ – однозарядний катіон барвника, A^- – аніон амоксициліну).

Причому екстракційна здатність спадає з ростом розгалуженості їх молекул в ряду бензен > толуен > етилбензен > *o*-ксилен > *m*-ксилен > *n*-ксилен > ізоамілбензен; для естерів – пропілацетат > бутилацетат > амілацетат > ізо-амілацетат. Це в цілому співпадає також зі зменшенням їх параметрів розчинності за Гільдебрандом [121] (рис. 3).

В оптимальних умовах комплексоутворення та екстракції знято спектри світлопоглинання ІА амоксициліну з основними барвниками (рис. 4) та розраховано їх основні спектрофотометричні характеристики (табл.2).

Умовний молярний коефіцієнт поглинання (ϵ) при вилученні ІА різними

екстрагентами досягає значень $(0,14-0,66) \cdot 10^5$.

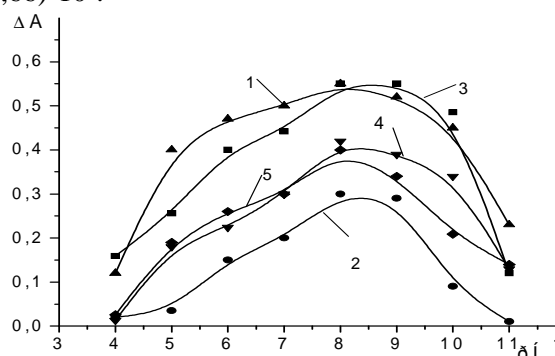


Рис. 3. Вплив природи органічного розчинника на вилучення ІА амоксициліну;

$C_{\text{амоксициліну}} = 3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{R^+} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $t_{\text{ек.}} = 50$ с, $l = 0,5$ см,

ДАТІ: 1-бутилацетат, 2-етилбензен, 3-пропілацетат;

КР 2С: 4-бензен, 5- пропілацетат.

За чутливістю визначення барвники ДАТІ та АФ 3R переважають відомі реагенти для визначення амоксициліну [16-20]. Одноразовою екстракцією вилучається (80–95)% речовини.

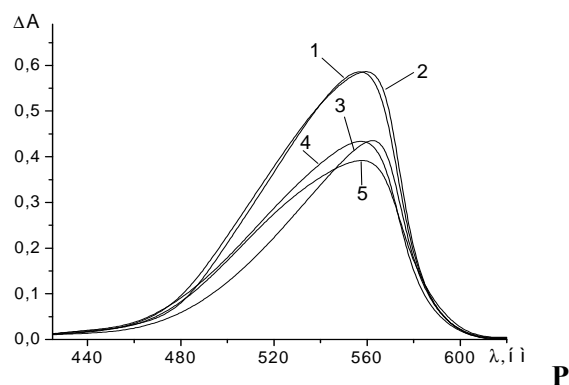


Рис. 4. Спектри поглинання ІА амоксициліну з основними барвниками

$C_{\text{амоксициліну}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{R^+} = 3 \cdot 10^{-5}$ моль/л. рН=8,5. $l = 0,5$ см

ОБ: 1, 3 – ДАТІ; 2, 4 – АФ 3R; 5 – КР 2С
1,2 –бутилацетат; 3,4 – толуен, 5 - бензен

Оптична густина екстрактів стійка щонайменше 1-3 год. Отриманні дані дозволили розробити нову ефективну методику екстракційно-фотометричного визначення амоксициліну.

Таблиця 2.

Основні хіміко-аналітичні характеристики ІА амоксициліну з основними барвниками

Екстрагент	Барвник	λ_{max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-5}$	A_K/A_x	R, %
Бензен	ДАТІ	560	0,46	16,6	88,0
Толуен	-	560	0,47	21,9	83,2
Бутилацетат	-	560	0,65	54,2	94,6
Амілацетат	-	570	0,23	16,7	88,9
о-Ксилен	-	560	0,14	8,3	76,3
Толуен:CHCl ₃ (3:2)	-	562	0,66	13,3	87,9
CCl ₄ :CHCl ₃ (3:2)	-	562	0,69	8,2	89,8
о-Ксилен:CHCl ₃ (3:2)	-	570	0,39	1,0	86,1
Толуен	АФ 3R	560	0,48	39,0	96,2
Бутилацетат	-	560	0,65	38,4	97,2
Пропілацетат	-	560	0,68	38,5	96,4
Ізоамілацетат	-	560	0,26	15,8	84,2
о-Ксилен:CHCl ₃ (3:2)	-	570	0,45	10,0	86,1
Толуен	КР	560	0,31	12,8	96,0
Бутилацетат	-	560	0,34	15,0	83,8
о-Ксилен:CHCl ₃ (3:2)	-	570	0,37	9,0	89,5

Методика визначення

Для екстракційно-фотометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах пропонується поліметиновий барвник ДАТІ. Екстракційно-фотометричний

метод визначення амоксициліну з використанням ДАТІ характеризується високою чутливістю та селективністю. Визначенню не заважають великі кількості сульфатів, фосфатів, нітратів, хлоридів,

бромідів, а також фталева, саліцилова, нітробензойні кислоти та ін.

Для аналізу медичні препарати готують наступним чином.

Розчини для ін'єкцій. Вміст ампули із амоксициліном об'ємом 3 мл ретельно переносять у мірну колбу на 250 мл та доводять об'єм розчину до риски. Відбирають аліквоту 10 мл, переносять в колбу на 100 мл і доводять об'єм розчину до риски дистильованою водою. Аналізують 5 паралельних проб.

Таблетки. Таблетку або вміст капсули розтирають до порошкоподібного стану, зважують, розчиняють у ~100 мл дистильованої воді та відокремлюють від твердих нерозчинних частинок фільтруванням. Розчин переносять у колбу на 250 мл та доводять об'єм до риски. Відбирають аліквоту 10 мл, переносять в колбу на 100 мл та доводять об'єм розчину до риски дистильованою водою. Аналізують 5 паралельних проб.

Аналізуемий розчин вносять у градуйовані пробірки з притертими пробками, додають 1,5 мл $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину ДАТІ, 1 мл аміачно-ацетатного буферного розчину з рН 8 і доводять об'єм дистильованою водою до 5 мл. Вміст пробірок перемішують, а тоді додають 5 мл бутилацетату й екстрагують на протязі 40 секунд. Після розділення фаз екстракт відділяють, центрифугують і вимірюють оптичну густину на фотоколориметрі КФК-2МП при $\lambda_{\text{эф.}}=540$ нм в кюветі з $l=0,5$ см відносно дистильованої воді. Вміст амоксициліну визначають за калібрувальним графіком, побудованим аналогічно або розраховують із рівняння прямої ($A=0,070+0,017C_{\text{ам}}$). Закон Бера справджується в інтервалі зміни концентрації амоксициліну 0,1–14,6 мкг/мл. Межа виявлення становить 0,09 мкг/мл. Відносне стандартне відхилення (S_r) при визначенні 0,5–73 мкг амоксициліну складає 0,020–0,048.

Отримані експериментально результати добре узгоджуються із вмістом амоксициліну у дозованих лікарських формах згідно специфікації.

Літератури

1. Туркевич М., Владзімірська О., Лесик Р. Фармацевтична хімія (стероїдні гормони, їх синтетичні замінники і гетероциклічні сполуки як лікарські засоби). Підручник. Вінниця: НОВА КНИГА, 2003. -464с.

2. Государственная Фармакопея Украины / Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр». -1-е изд.: Пер. с укр. –Харьков: Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр», 2004. -672с.

3. Байерман К. Определение следов органических веществ. М.: Мир, 1987. -464с.

4. Yashin Ya. I., Yashin A. Ya/ Analysis of Food Products and Beverages Using High-Performance Liquid Chromatography and Ion Chromatography with Electrochemical Detectors // Journal of Analytical Chemistry. – 2004. –V.59, -N-12, -P.1121-1127.

5. Muralikrishna U, Murty JA. Spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and fruit juices // Analyst. -1989. -V.114, -№ 3. -P.407-415.

6. Rat'ko AA, Stefan-van Staden RI. Determination of baclofen enantiomers in pharmaceutical formulations using maltodextrin-based enantioselective, potentiometric membrane electrodes // Farmaco. -2004. -V.59, -№ 12, -P.993-1000.

7. Liu ZH, Wen ML, Yao Y, Xiong J Plastic membrane electrode for the potentiometric determination of pethidine hydrochloride in pharmaceutical preparations // Fresenius J Anal Chem. -2000. -V.368, -№4. -P.335-342.

8. Mostafa G.A. Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of scopolamine in some pharmaceutical formulations // Anal Sci. -2002. -V.18, -№ 12. -P.1335-1343.

9. Базель Я.Р., Шкумбатьок Р.С., Воронич О.Г. Применение полиметиновых красителей для экстракционного разделения и спектрофотометрического определения нитрофенолов // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т.61, №3. –С.255-260.

10. Shkumbatiuk R., Bazel Ya.R., Andruch V., Török M. Investigation of 2-[(E)-2-(4-diethylaminophenyl)-1-ethenyl]-1,3,3-trimethyl-3H-indolium as a New Highly Sensitive Reagent for the Spectrophotometric Determination of Nitrophenols // Anal. Bioanal Chem. -2005. -V.382, №6. -P.1431-1437.

11. Шкумбатьок Р.С., Базель Я.Р. Екстракційно-фотометричне визначення нитрофенолів у суміші // Укр.хім.журн. – 2004. – Т.70, №3. –С.60-64.

12. Kümmerer R., Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from

hospitals and into effluent // *Clin. Microbiol. Infect.* - 2007. -V.9, -P.1203-1214.

13. El-Dien F.A, Mohamed G.G, Farag E.Y. Spectrophotometric determination of flucloxacillin and dicloxacillin in pure and dosage forms. *Spectrochim // Acta A Mol Biomol Spectrosc.* -2006. -V.64; -№1. -P.210-215.

14. Magda Y. El-Mammi. Spectrophotometric determination of flucloxacillin in pharmaceutical preparations using some nitrophenols as a complexing agent // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* -2003. - V.59, -№ 4. -P.771-776

15. Reagent Li, Quanmin;Yang, Zhanjun. Study of Spectrophotometric Determination of Amoxicillin Using Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonate as the Chemical Derivative Chromogenic // *Analytical Letters.* -2006. - V 39, - № 4. -P.763-775.

16. El-Shafie F. S., Gad-Kariem E. A., Al-Rashood K. A., Al-Khamees H. A., El-Obeid H. A. Colorimetric Method for the Determination of Ampicillin and Amoxicillin // *Analytical Letters.* - 1996. -V29, № 3. - P.381 - 393.

17. Devani MB, Patel IT, Patel TM. Spectrophotometric determination of amoxycillin and its dosage forms // *J Pharm Biomed Anal.* -1992 - №10. -P.355-363

18. H. D. Revanasiddappa, B. Manju and P. G. Ramappa. Spectrophotometric Method for the Determination of Ritodrine Hydrochloride and Amoxicillin // *Analytical Sciences.* -1999. -V.15 (1), -N. 7 -p.661-665.

19. Hesham Salem and Gamal A. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics. // *Saleh Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* -2002. -V.28, № 6. - P.1205-1213.

20. T. S. Al-Ghabsha, M. Q. Al-Abachi and Ahmad K. Ahmad. Indirect spectrophotometric microdetermination of paracetamol using chloranil // *Microchemical Journal.* -1987, V.35, № 1, -P.66-69.

21. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии -М.: Химия, 1989. -448 с.

22. Аналитическая химия синтетических красителей / Под. ред. К.Венкатарамана. Пер. с англ. -Л.: Химия, 1979. -576 с.

23. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Руддик Д., Тупс Э. Органические растворители -М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1958. -519 с.

24. Райхардт Т.Х. Растворители в органической химии -Л.: Химия, -1973. -150 с.

EXTRACTION-FOTOMETRIC DETERMINATION AMOXICILLIN WITH BASIC DYES

Shkumbatiuk R.S., Bazel Ya.R., Mymrjk S.V., Shkumbatiuk O.J.

The features of an extraction micro amounts of amoxicillin ion-assotiation (IA) with cyanyn dyes. The ifect of an acidity of medium, nature and concentration of a dye, nature of an organic solvent has been studied on formation and extraction of IA of amoxicillin; optimal conditions have been found. The new highty sensitive and selectiv procedure was proposed for the extraction-photometric determination of amoxicillin.