

УДК 543.422.3:[547.541.521+547.565]

М.Я. Бойко, Т.Я. Врублевская, О.Я. Коркуна, И.Я. Коцюмбас, Г.Ю. Тесляр

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 4-(2-ПИРИДИЛАЗО) РЕЗОРЦИНА

Львовский национальный университет им. Ивана Франко  
Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, г. Львов

Разработана новая методика количественного определения десяти сульфаниламидов (сульфаниламида, сульфамеразина, сульфаметазина, сульфадиметоксина, сульфамониметоксина, сульфаметоксазола, сульфатиазола, сульфатуанидина, сульфадиазина, сульфаметоксипиридазина). Методика основана на измерении светопоглощения цветного продукта ( $\lambda_{\max}=590\pm 5$  нм), образуемого в щелочной среде (рН=10,0–11,5) при взаимодействии диазосолей производных сульфаниламида с гетероциклическим азореагентом – 4-(2-пиридилазо) резорцином. Образующие дисазокрасители характеризуются эффективным молярным коэффициентом светопоглощения  $\epsilon_{595}\approx 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  и являются стабильными в течение 3 ч. Пределы определяемых концентраций составляют от 0,5 до 20,0 мкг/мл в зависимости от природы сульфаниламида. Разработанная методика успешно использована для определения содержания указанных сульфаниламидов в однокомпонентных лекарственных препаратах различных лекарственных форм.

### **Введение**

Применение в медицинской практике препаратов на основе сульфаниламидов (СА), позволяет успешно проводить лечения многих заболеваний, вызванных бактериальной инфекцией. Сульфаниламиды оказывают менее выраженное побочное действие на организм, хотя и уступают по противомикробной активности антибиотикам. Поэтому указанная группа лекарственных средств широко используется для лечения инфекционных патологий, несмотря на появление новых антибактериальных препаратов [1].

В связи с многообразием применяемых форм сульфаниламидных препаратов для оценки их качества используют разные методы и методики анализа. Спектрофотометрические методы были первыми, которые использовали для качественного, а позднее и количественного определения СА в разных объектах, в частности, лекарственных препаратах и биологических жидкостях. Преимуществом этих методик является довольно высокая чувствительность, простота исполнения анализа и экспрессность. Сегодня, несмотря на наличие титриметрических, хроматографических и вольтамперометрических методик определения СА, разработка новых спектрофотометрических методик их определения все еще остается актуальным вопро-

сом аналитической химии фармацевтических препаратов. Это обусловлено тем, что с одной стороны, в течение 50 последних лет на фармацевтическом рынке постоянно появляются новые лекарственные препараты, содержащие СА, а с другой – постоянно разрабатываются новые подходы к количественному определению этих субстанций с использованием продуктов химической модификации СА.

Можно выделить несколько групп такого рода спектрофотометрических методик определения СА. В УФ-спектрофотометрии в качестве аналитического сигнала используют оптическую плотность собственного поглощения СА в пределах длин волн от 245 до 280 нм [2–5]. Эти методики, являясь достаточно чувствительными, не селективные, поскольку в указанном участке спектра, кроме СА, свет поглощают многие органические соединения различного строения. С их помощью проводят спектрофотометрическое определение СА, в основном, в чистых субстанциях.

В спектрофотометрии видимой области используют химическую модификацию СА с образованием окрашенных производных, в частности, в реакциях их конденсации с органическими реагентами *p*-диметиламино-бензальдегидом [6], *o*-фталевым альдегидом [7], *p*-диметиламиноко-

ричным альдегидом [8], производными фуразана и фуроксазана [9], акридиновыми производными [10,11], ангидробисиндандионом-1,3 [12,13], 1,2-нафтохинон сульфонатом натрия [14], 5-нитробарбитуровой кислотой [15], п-бензохиноном [16], ализарином и его производными [17]. Разработанные методики с этими реагентами являются одностадийными, однако требуют, во-первых, использования органических растворителей, а во-вторых, во многих случаях — длительного нагревания на кипящей водяной бане. Для спектрофотометрического определения СА используют также их окрашенные производные, полученные в реакции азосочетания диазониевых солей СА с органическими реагентами N,N-диметил-1-нафтиламином [18], β-нафтолом [19], 3-α,β-дикарбоксиэтил-роданином [20], 3-аминофенолом [21], иминобензолом [22], 8-гидроксихинолином [23, 24], резорцином [25]. Реакция, лежащая в основе метода, является двустадийной, относительно длительной во времени, однако протекает в водной среде, и не требует использования специфических реагентов. Однако, условия приведения этой реакции с некоторыми реагентами, в частности с 3-аминофенолом, иминобензолом, 8-гидроксихинолином, резорцином очень жёсткие, поскольку диазотирование проводят в 10 М соляной или серной кислотах, в которых органические вещества могут разрушаться, особенно это касается анализа комбинированных лекарственных средств (например, СА — антибиотик). Продукты деградации могут мешать последующему азосочетанию с азореагентами, а такие исследования для комбинированных лекарственных средств в упомянутых работах отсутствуют.

С целью разработки альтернативной спектрофотометрической методики определения СА с хорошими метрологическими характеристиками нами предложена методика спектрофотометрического определения СА по измерению светопоглощения дисазокрасителей, полученных в реакциях азосочетания диазосолей СА с азореагентом 4-(2-пиридилазо) резорцином (ПАР).

ПАР (CAS № 1141-59-9) — гетероциклический азореагент, используемый в аналитической химии для определения большинства d- и f-металлов. В 80-х годах прошлого столетия большинство публикаций, связанных с ПАР, было посвящено разработке методик фотометрического определения лантаноидов, переходных и платиновых металлов [26–33]. Сейчас его чаще используют для определения ионов металлов с помощью жидкостной ионообменной хроматографии [34–37], для получения оптических биосенсоров [38–39], а также при концентрировании неорганических веществ [40–41]. В анализе органических веществ его применение довольно ограничено. Известно, что ПАР используют для электрохимического определения мочевой кислоты в мочеvine [42],

бергенина в таблетированных формах лекарственных средств и в мочеvine [43], а также в циклической вольтамперометрии с гладким графитовым электродом, покрытым поли-ПАР для определения гормона дофамина [44]. На получении полимолекулярного комплекса ПАР с ферментом лизоцимом основано флуориметрическое определение последнего [45]. С помощью ПАР проводят спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты [46]. ПАР с β-циклодекстраном образует супрамолекулярное соединение по механизму взаимодействия «гость—хозяин», что позволяет количественно определять β-циклодекстран [47].

В литературе отсутствуют данные относительно использования ПАР для определения СА. Из наиболее близких к ПАР реагентов, предложенных для спектрофотометрического определения СА, используют резорцин и азокраситель тропеолин О. Диазосоли СА образуют с резорцином продукт азосочетания, максимум светопоглощения которого наблюдается при λ=500 нм [25]. Предложенный нами ранее для спектрофотометрического определения СА в лекарственных препаратах азокраситель тропеолин О образует с диазотированными СА дисазокрасители с максимумом светопоглощения при λ=595 нм [48]. Обе эти методики позволяют определять микрограммовые количества СА.

### **Экспериментальная часть**

#### *Реагенты*

Растворы СА (сульфаниламида (САМ), сульфамеразина (СМР), сульфаметазина (СМТ), сульфадиметоксина (СДМ), сульфамонотоксина (СММ), сульфаметоксазола (СМО), сульфатиазола (СТЗ), сульфатуанидина (СТН), сульфадиазина (СДА), сульфаметоксипиридазина (СМП)) готовили растворением точной навески реактивов фармакопейной чистоты фирмы «Sigma» в 0,1 М растворе гидроксида натрия. Все растворы хранили при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Растворы ПАР готовили растворением точной навески реактива фирмы «Merck» (содержание основного вещества не менее 99%) в дистиллированной воде.

Растворы нитрита натрия и тетрабората натрия готовили растворением точной навески реактива квалификации «ч.д.а.» в дистиллированной воде.

Рабочие растворы соляной кислоты готовили разбавлением концентрированной кислоты квалификации «х.ч.», а растворы гидроксида натрия — растворением реактива квалификации «х.ч.» в дистиллированной воде.

#### *Оборудование*

Спектрофотометрические измерения проводили с помощью фотоколориметра КФК-2-УХЛ 4.2 (Украина) и сканирующего спектрофотометра

CARY.WIN-UV-VIS-50 (Varian, США) в кюветках с толщиной поглощающего раствора  $\lambda=1$  см.

Величину рН измеряли при помощи рН-метра РВ 11 (Sartorius, Германия) с хлор-серебряным электродом сравнения. Необходимого значения кислотности среды достигали добавлением, соответственно, растворов соляной кислоты или гидроксида натрия.

**Результаты и их обсуждение**

Целью нашей работы было исследование условий взаимодействия азореагента ПАР с десятью наиболее распространенными СА, структурные формулы которых приведены в табл. 1.

Таблица 1  
Структурные формулы СА

Название	Структура
Сульфаниламид, стрептоцид (САМ), CAS 63-74-1	<chem>NC(=O)Nc1ccc(N)cc1</chem>
Сульфадiazин (СДА), CAS 68-35-9	<chem>NC(=O)Nc1ccc(N2C=CN=C2)cc1</chem>
Сульфамеразин (СМР), CAS 127-79-7	<chem>CC1=CN=C(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)N1</chem>
Сульфатиазол (СТЗ), CAS 72-14-0	<chem>NC(=O)Nc1ccc(N2C=NC=S2)cc1</chem>
Сульфаметазин, сульфадимезин (СМТ), CAS 57-68-1	<chem>CC1=CN=C(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)N1C</chem>
Сульфагуанидин (СГН), CAS 57-67-0	<chem>NC(=O)Nc1ccc(NC(=O)N)cc1</chem>
Сульфадиметоксин (СДМ), CAS 122-11-2	<chem>COc1cc(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)nc1OC</chem>
Сульфамонетоксин (СММ), CAS 1220-83-3	<chem>COc1cc(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)ncn1</chem>
Сульфаметоксазол (СМО), CAS 723-46-6	<chem>CC1=CN=C(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)O1</chem>
Сульфаметоксипиридазин (СМП), CAS 000080-35-3	<chem>COc1cc(NC(=O)Nc2ccc(N)cc2)ncn1</chem>

СА не взаимодействуют с азореагентом непосредственно. Однако, после диазотирования их первичной ароматической аминогруппы и образования соответствующих солей диазония, последние вступают в реакцию азосочетания с азореагентом в щелочной среде (рис. 1). При этом образуются

дисазокрасители, характеризующиеся новой полосой светопоглощения ( $\lambda_{max}=585-595$  нм), которая отличается от полос светопоглощения самого азореагента в условиях реакции ( $\lambda_{max}=340$  и 400 нм) (рис. 2).

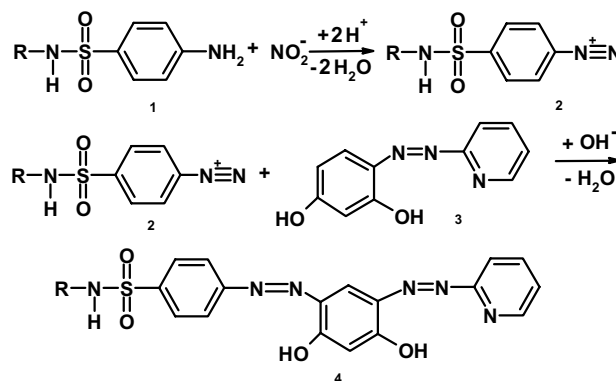


Рис. 1. Гипотетическая схема взаимодействия СА с ПАР

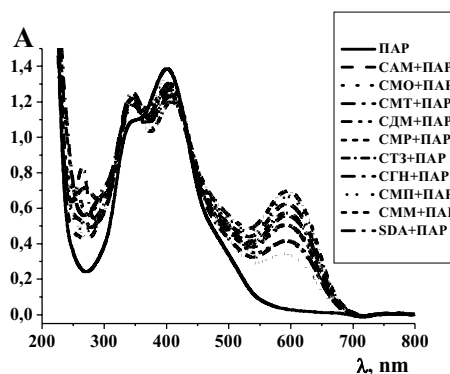


Рис. 2. Электронные спектры светопоглощения растворов ПАР и дисазокрасителей СА с ПАР.  $C(\text{HCl})=0,5$  М;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5}$  М;  $C(\text{СА})=8$  мкг/мл; рН=11,0;  $l=1$  см

В литературе приведены противоречивые данные относительно условий диазотирования СА, так, предлагается использовать соляную или серную кислоты с концентрационными пределами от 0,1 М до 10 М, а также проводить реакцию при низких температурах (в пределах  $0-5^{\circ}\text{C}$ ). Поэтому возникла необходимость исследовать факторы, влияющие на эффективность диазотирования: концентрацию и природу минеральной кислоты, температуру и длительность процесса диазотирования, концентрацию диазотирующего агента.

*Влияние концентрации и природы кислоты*

Как показали результаты исследований (рис. 3), максимальный выход продуктов азосочетания всех исследуемых СА с ПАР наблюдается, если диазотирование проводить в среде соляной кислоты в концентрационных пределах от 0,5 М до 1,0 М. Использование серной, фосфорной и

уксусной кислот не позволяет получить максимальное количество диазосоли СА и, как следствие, дисазокрасителя.

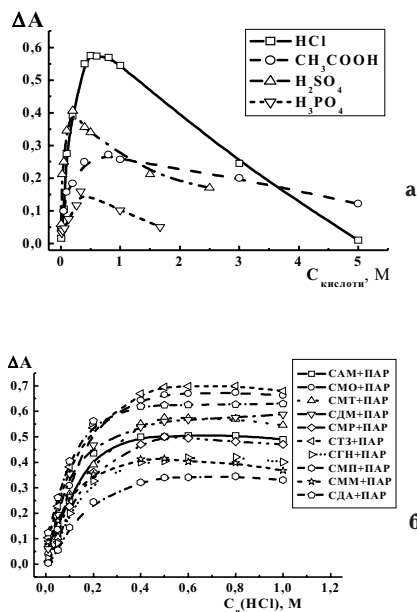


Рис. 3. Влияние природы (соляной, сульфатной, ацетатной, фосфатной) (а) и концентрации соляной кислоты (б) на взаимодействие СА с ПАР.  $C(\text{CA})=8$  мкг/мл;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5}$  М;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1$  см;  $\lambda_{\text{max}}=590$  нм

Такая закономерность объясняется механизмом реакции диазотирования, которая происходит в несколько стадий, вследствие чего, в зависимости от используемой кислоты, образуются разные по силе диазотирующие частицы. Одной из важных стадий является образование катиона нитрозила, взаимодействующего на последующей стадии еще с одним ионом нитрита, образуя оксид азота(III), который и является наиболее активным диазотирующим агентом [49]. В зависимости от используемой на первой стадии кислоты, образуются нитрозил хлорид, либо нитрозил ацетат, либо нитрозил фосфат, которые с различной активностью вступают в последующую стадию реакции. Активнее всего взаимодействует нитрозил хлорид, и таким образом, выход диазосоли СА является наибольшим в среде соляной кислоты (рис. 3). Использование других кислот не позволяет получить максимальный выход диазосоли, поэтому, принимая во внимание полученные экспериментальные результаты, диазотирование СА в дальнейших исследованиях осуществляли в среде 0,5 М соляной кислоты.

*Определение оптимальной концентрации нитрита натрия*

Было исследовано влияние концентрации нитрита натрия, как диазотирующего реагента, на максимальный выход диазосоль СА и соответствующих им дисазокрасителей. Как показали ре-

зультаты исследований, приведенные на рис. 4, оптимальным для диазотирования является больше, чем десятикратный избыток нитрита натрия относительно концентрации СА (концентрация свыше  $2 \cdot 10^{-4}$  М).

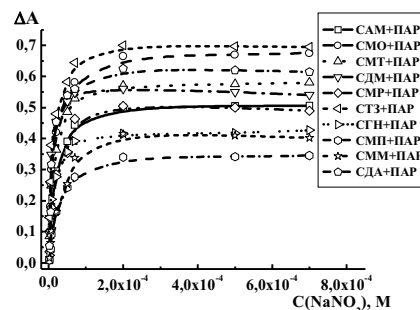


Рис. 4. Влияние концентрации натрия нитрита на взаимодействие СА с ПАР.  $C(\text{HCl})=0,5$  М;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5}$  М;  $C(\text{CA})=8$  мкг/мл;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1$  см;  $\lambda_{\text{max}}=590$  нм

*Влияние температуры и длительности процесса диазотирования*

Для процесса диазотирования большое значение имеет температурный режим реакции, поскольку, с одной стороны, скорость реакции возрастает с ростом температуры среды, но с другой полученные продукты диазотирования более стабильны при низких температурах. Следовательно, температура реакции должна быть компромиссом влияния выше упомянутых факторов [49]. Из литературных источников известно, что реакцию образования диазосоли, как правило, проводят при низких температурах. Мы исследовали влияние температуры реакции диазотирования на выход конечного продукта — дисазокрасителя. Результаты исследований показали, что влияние температуры в пределах от 0 до 20 °С является незначительным (рис. 5).

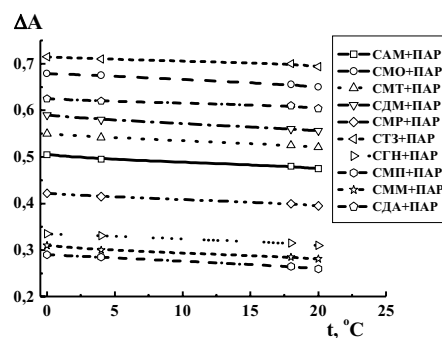


Рис. 5. Влияние температуры реакции диазотирования на выход конечного продукта — дисазокрасителя.

$C(\text{HCl})=0,5$  М;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5}$  М;  $C(\text{CA})=8$  мкг/мл;  $\text{pH} 11,0$ ;  $l=1$  см

Для получения максимального выхода диазосоль СА мы исследовали длительность про-

цесса их диазотирования при температурах 0°C и 20°C (рис. 6). Установлено, что протекание реакции при температуре ледяной бани позволяет сократить длительность стадии диазотирования до 10 мин, поскольку быстрее достигается максимальный выход диазосоли и продукта азосочетания соответственно, в то время как при комнатной температуре такой же выход диазосоли достигается через 25–30 мин.

Поскольку незначительная потеря чувствительности определения за счет неполного превращения реагентов не влияет на характер зависимостей, в дальнейших исследованиях диазотирование проводили при комнатной температуре в течении 25 мин.

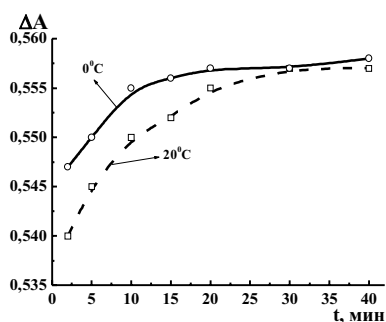


Рис. 6. Влияние длительности реакции диазотирования при двух температурных режимах на выход дисазокрасителя СМТ с ПАР.  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $C(\text{СМТ})=8 \text{ мкг/мл}$ ;  $\text{pH} 11,0$ ;  $l=1 \text{ см}$

Полученные нами оптимальные условия диазотирования СА сопоставимы с условиями полученными для системы СА-Тр О [48].

*Влияние кислотности среды, природы и концентрации электролитов*

Как правило, реакцию азосочетания с фенольными соединениями проводят в слабощелочной среде при  $\text{pH}=9-10$ . Однако, с поскольку с одной стороны, диазоний-катион сравнительно слабый электрофил, который способен сочетаться лишь с ионом фенолята, но не со слабодиссоциированной молекулярной формой фенола, а с другой — в сильнощелочной среде концентрация диазониевого иона сильно снижена из-за образования не способного к азосочетанию диазотата [49]. Поэтому, с целью получения максимального выхода продукта азосочетания, необходимо определить оптимальное значение  $\text{pH}$  среды для конкретной реакции, а также концентрацию азореагента.

Как следует из характера спектров светопоглощения дисазокрасителя СМТ–ПАР (рис. 7,б) продукт азосочетания образуется, начиная с  $\text{pH}=9,5$ . Однако, при  $\text{pH}=11,5$  меняется характер спектра, максимум светопоглощения как дисазокрасителя, так и самого реагента сдвигается с 400 нм до 470 нм (рис. 7,а), что приводит к уменьшению

контрастности реакции и, соответственно, чувствительности определения СА (рис. 7,в). Как следствие, максимальный выход продукта азосочетания наблюдается в пределах  $\text{pH}=10-11,5$ , что является характерным для азосочетания ароматических диазосолей с резорциновой группой азосоставляющей [50]. Оптимальным значением является  $\text{pH}=11,0$ . В этих условиях, согласно [51–52], ПАР находится в растворе в форме однократно диссоциированного иона, который может пребывать в азили или хинонгидазо-форме, при этом ионы в азо-форме значительно превышают количество ионов в хинонгидазо-форме. С диазосолями СА способна реагировать только азо-форма реагента, поскольку только в этой форме существования иона ПАР происходит согласованная ориентация азосочетания азосоставляющей (ПАР) с диазосоставляющей (диазотированный СА).

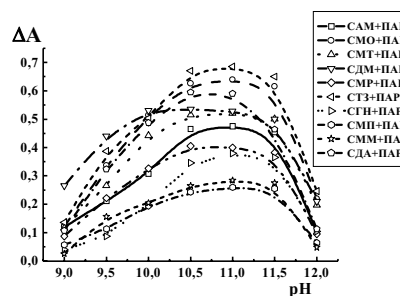
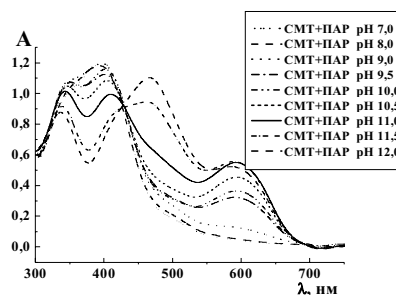
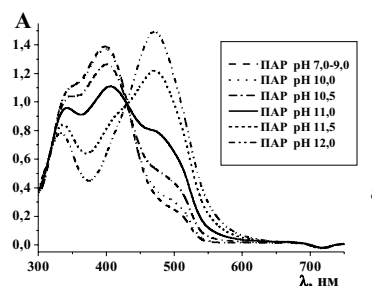


Рис. 7. Влияние кислотности среды на азосочетание диазосолей СА с ПАР: а — электронные спектры светопоглощения азореагента ПАР; б — электронные спектры светопоглощения дисазокрасителя ПАР с СМТ; в — зависимость образования дисазокрасителей от  $\text{pH}$  среды.  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ,  $C(\text{СА})=8 \text{ мкг/мл}$ ;  $l=1 \text{ см}$ ,  $\lambda_{\text{max}}=590 \text{ нм}$

Для определения стабильных условий для реакции азосочетания, поддержания оптимального значения рН среды и для повышения экспрессности методики определения СА с участием ПАР следовало подобрать буферную смесь. С этой целью мы исследовали влияние природы, а также концентрации различных ионов на максимальный выход дисазокрасителей в реакции азосочетания.

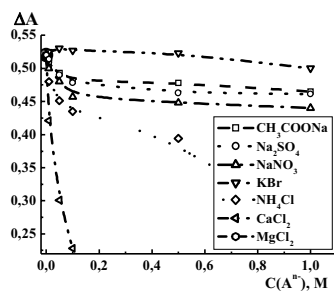


Рис. 8. Влияние природы и концентрации электролитов на взаимодействие СА с ПАР в процессе реакции азосочетания.  $C(\text{CA})=4$  мкг/мл;  $C(\text{NaNO}_2)=2,5 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{TrO})=2,5 \cdot 10^{-5}$  М;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1$  см;  $\lambda_{\text{max}}=590$  нм

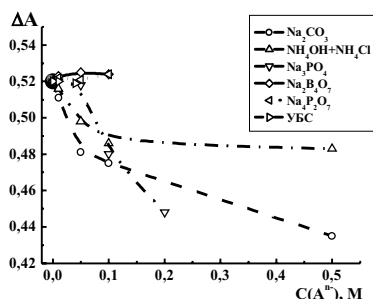


Рис. 9. Влияние природы и концентрации электролитов на взаимодействие СА с ПАР в процессе реакции азосочетания.  $C(\text{CA})=4$  мкг/мл;  $C(\text{NaNO}_2)=2,5 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{TrO})=2,5 \cdot 10^{-5}$  М;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1$  см;  $\lambda_{\text{max}}=590$  нм

Как показали результаты исследований, природа аниона или катиона, как и его концентрация, играют важную роль при взаимодействии СА с ПАР. Установлено, что такие анионы, как ацетат, сульфат, нитрат, карбонат, фосфат и катионы — аммоний и кальций негативно влияют на выход продукта взаимодействия СА с ПАР, тогда как присутствие бромидов или пиррофосфата не влияет на протекание реакции. А вот тетраборат натрия и универсальная буферная смесь (УБС), как оказалось, стабилизируют систему и незначительно повышают аналитический сигнал. В дальнейшем мы использовали 0,1 М раствор тетрабората натрия, в качестве буферного раствора.

*Влияние концентрации азосоставляющей на реакцию азосочетания диазосоединений СА*

Для большинства продуктов реакции азосочетания характерно взаимодействие исходных компонентов в эквимолярных количествах. Однако, определенный избыток одного из реагентов спо-

собствует смещению равновесия реакции в сторону образования продуктов реакции, что дает возможность получить максимальный выход окрашенного продукта. Поэтому мы исследовали зависимость величины светопоглощения образующегося дисазокрасителя от избытка ПАР.

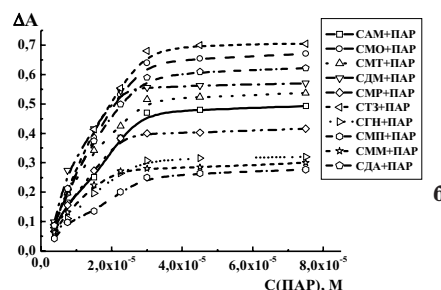
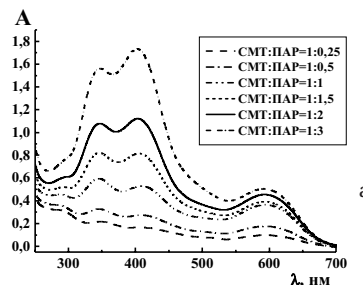


Рис. 10. Зависимость светопоглощения продукта азосочетания диазосоединения СА с ПАР от концентрации азореагента.  $C(\text{HCl})=0,5$  М;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4}$  М;  $C(\text{CA})=8$  мкг/мл;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1$  см;  $\lambda_{\text{max}}=590$  нм

Согласно кривой насыщения (рис. 10,б) максимальный выход окрашенного продукта достигается при двукратном избытке азореагента и не изменяется с дальнейшим увеличением его концентрации. Из характера спектров светопоглощения дисазокрасителя СМТ—ПАР (рис. 10,а) видно, что избыток реагента приводит к незначительному возрастанию светопоглощения при  $\lambda=590$  нм, что связано с сильным увеличением двух других максимумов светопоглощения при  $\lambda=340$  и  $400$  нм, присущих самому азореагенту.

Соотношение компонентов в соединении СА—ПАР устанавливали методами насыщения и изомолярных серий (рис. 10,б; 11,а; 11,б).

Оба этих метода указывают на образование дисазокрасителя с соотношением СА:ПАР=1:1. Состав изомолярного раствора, электронный спектр которого (рис. 11,а) проходит через изобестическую точку, также соответствует поглощению компонентов в соотношении 1:1. На основе параметров полученной изомолярной кривой рассчитаны эффективные молярные коэффициенты светопоглощения (табл. 2).

трофотометрические характеристики определения СА приведены в табл. 2.

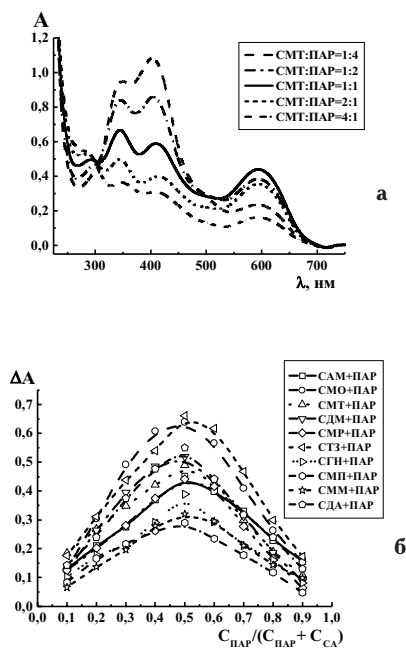


Рис. 11. а – Электронные спектры светопоглощения изомолярной серии растворов СА–ПАР.  
б – Зависимость интенсивности светопоглощения дисазокрасителей СА–ПАР от состава изомолярного раствора.  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C(\text{СА}+\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1 \text{ см}$ ;  $\lambda_{\text{max}}=590 \text{ нм}$

### Стабильность продукта взаимодействия СА с ПАР

Результаты исследования стабильности образованных продуктов азосочетания – дисазокрасителей, показаны на примере СМТ.

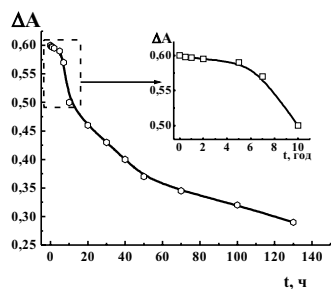


Рис. 12. Стабильность светопоглощения продукта азосоединения диазосоли СМТ с ПАР.  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C(\text{СМТ})=8 \text{ мкг/мл}$ ,  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1 \text{ см}$ ;  $\lambda_{\text{max}}=590 \text{ нм}$

Как видно с рис. 12, продукт взаимодействия ПАР с СМТ стабилен на протяжении первых 2–3 ч, а в течение 4–5 дней разрушается на 50%.

### Количественное определение СА в модельных растворах

На основе полученных данных об условиях максимального выхода продукта взаимодействия СА с ПАР, разработана спектрофотометрическая методика их определения. Метрологические и спек-

Таблица 2  
Спектрофотометрические и метрологические характеристики определения СА с использованием ПАР.  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH}=11,0$ ;  $l=1 \text{ см}$ ;  $n=5$ ;  $\rho=0,95$

Параметры/Характеристики	Синий									
	САМ	СМО	СМТ	СДМ	СМР	СТЗ	СГН	СМП	СММ	СДА
Цвет	587–594	592–597	591–597	591–595	591–595	595–601	587–592	590–593	591–595	
$\Delta\lambda_{\text{max}}$ , нм	1,0–16,0	1,0–13,0	1,0–14,0	1,0–15,0	1,0–16,0	0,5–12,0	1,0–20,0	1,0–17,0	1,0–14,0	
Стабильность, ч	0,31	0,19	0,22	0,26	0,25	0,17	0,32	0,28	0,19	
Область линейности, мкг/мл	1,02	0,63	0,72	0,87	0,82	0,56	1,07	0,92	0,63	
Предел обнаружения, $C_{\text{мин}}$ , мкг/мл	3,0	1,9	1,6	1,6	1,9	1,7	2,4	1,9	1,8	
Предел определения, $C_{\text{н}}$ , мкг/мл	0,9	2,0	1,9	1,8	1,6	2,3	1,4	1,3	2,0	
Молярный коэффициент светопоглощения, $\epsilon_{595} \times 10^{-4}$ , $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$	0,062	0,075	0,072	0,065	0,062	0,085	0,048	0,061	0,073	
Коэффициент $b$ в уравнении графика	0,016	0,016	0,008	0,007	0,014	0,019	0,016	0,013	0,011	
Коэффициент $a$ в уравнении графика	0,9996	0,9998	0,9998	0,9993	0,9997	0,9997	0,9996	0,9993	0,9995	
Коэффициент корреляции (R)										

Правильность спектрофотометрической методики определения СА с ПАР проверяли методом «введено—найдено» на модельных растворах различного состава способом сравнения (табл. 3)

Таблица 3

Результаты спектрофотометрического определения СА с ПАР в модельных растворах;  $C(\text{HCl})=0,5 \text{ M}$ ;  $C(\text{NaNO}_2)=4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ;  $C(\text{ПАР})=6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $C(\text{СМТ})=8 \text{ мкг/мл}$ ,  $\rho\text{H}=11,0$ ;  $l=1 \text{ см}$ ;  $n=5$ ;  $P=0,95$

Сульфаниламид	Введено, мкг	Найдено, $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ , мкг	$S_r$
САМ	100	100±2	0,011
СМО		100±1	0,007
СМТ		100±2	0,014
СДМ		100±1	0,008
СМР		100±2	0,010
СТЗ		100±2	0,012
СГН		100±2	0,011
СМП		100±2	0,013
СММ		100±2	0,014
СДА		100±2	0,015

Полученные результаты указывают на то, что погрешность определения СА по разработанной методике не превышает погрешности спектрофотометрического метода и может быть применена для анализа реальных объектов.

*Определение СА в однокомпонентных лекарственных средствах*

Пробоподготовка таблеток и порошка для определения СА. Навеску порошка, или порошка растертых таблеток, соответствующей лекарственной формы (таблетки, порошки), содержащую 200 мг СА согласно номинальному содержанию вносят в мерную колбу объемом 100,0 мл. Для получения вытяжки СА добавляют 50 мл 0,1 М гидроксида натрия, перемешивают в течение 10 мин и доводят содержимое колбы до метки 0,1 М раствором гидроксида натрия. Полученную смесь тщательно перемешивают и фильтруют сквозь складчатый фильтр средней плотности (белая лента) в коническую колбу, получая исходный раствор. Рабочий раствор СА готовят разбавлением исходного раствора в 5 раз, для чего 5,0 мл полученного раствора вносят в мерную колбу емкостью 25,0 мл, доводят объем содержимого колбы 0,1 М раствором гидроксида натрия до метки и перемешивают. Полученный рабочий раствор содержит предположительно 200 мкг/мл СА. Для анализа отбирают аликвоту раствора объемом 1,0 мл. Определение содержания сульфаниламида проводят в соответствии с методикой его определения с ПАР.

Пробоподготовка мази и суппозитория для определения СА. В химический стакан номиналь-

ным объемом 100 мл вносят навеску лекарственной формы (мази, суппозитория), которая содержит 200 мг СА согласно заявленному содержанию, добавляют 50 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и нагревают на водяной бане при 50°C до полного растворения мази в течение 10 мин. Для отделения расплавленного вазелина используют складчатый беззольный фильтр средней плотности. Полученную смесь фильтруют в мерную колбу объемом 100,0 мл, подогревая постоянно стакан в горячей водяной бане, для избегания застывания раствора вазелина. Промывают фильтр горячим раствором 0,1 М соляной кислоты несколько раз и доводят содержимое колбы тем же раствором до метки (исходный раствор). Рабочий раствор СА готовят разбавлением полученного раствора в 5 раз, как и в случае таблеток и порошка.

Методика определения СА с ПАР. В мерную колбу объемом 25 мл вносят 5,0 мл 0,5 М соляной кислоты, аликвоту исследуемого раствора в пределах 1,0–20,0 мкг/мл (конечная концентрация), добавляют 1,0 мл  $1,25 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  раствора нитрита натрия. После перемешивания, смесь выдерживают в течение 10 мин в ледяной бане, добавляют 0,5 мл  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  раствора ПАР и 2,5 мл 0,1 М раствора тетрабората натрия, нейтрализуют раствором гидроксида натрия до  $\rho\text{H}=11,0$ . Измерение интенсивности светопоглощения исследуемого раствора, относительно холостого раствора, проводят при  $\lambda=590 \text{ нм}$ ,  $l=1 \text{ см}$ . Концентрацию СА находят способом сравнения или при помощи градуировочного графика.

Результаты определения СА в порошках и мази, СМТ в суппозитории, СДМ в таблетках в однокомпонентных лекарственных и ветеринарных препаратах приведены в табл. 4. Все вспомогательные вещества, которые входят в состав анализируемых лекарственных форм, не мешают определению СА с ПАР, поскольку, благодаря химическому строению, не взаимодействуют с азореагентом в условиях реакции.

Как видно из приведенной таблицы, полученные результаты определения СА с ПАР хорошо согласуются с результатами, полученными фармакопейным нитритометрическим методом, а также соответствуют содержанию СА, указанному производителем. В то же время, разработанная методика характеризуется простотой, экспрессностью и высокой воспроизводимостью. Более того, по чувствительности, эта реакция не уступает наиболее чувствительным известным спектрофотометрическим реакциям, лежащим в основе определения СА.

### Выводы

Полученные результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что разработанная нами методика определения СА с использованием ПАР в реакции азосочетания выгодно отличается от подобных методик, описанных в литера-



Результаты спектрофотометрического определения СА с ПАР в лекарственных и ветеринарных препаратах. С(НСI)=0,5 М; С(NaNO<sub>2</sub>)=4,0·10<sup>-4</sup> М; С(ПАР)=6,0·10<sup>-5</sup> М; С(СА)=8 мкг/мл, рН=11,0; l=1 см; n=5; Р=0,95

Определяемый сульфаниламид (регламентированное содержимое в препарате)	Установленное содержимое			
	Нитритометрически согласно с Британской фармакопеей [53]		Спектрофотометрически с ПАР	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S <sub>r</sub>	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S <sub>r</sub>
"Сульфадиметоксин" таблетки ОАО «Борщаговский химико-фармацевтический завод» (вспомогательные вещества – крахмал, желатин, аэросил, кальций стеарат)				
Сульфадиметоксин (500,0±50,0 мг/табл)	501±8	0,013	499±8	0,013
"Присыпка для лечения инфицированных ран" ООО «Укрветпромпочтач» г. Бровары (вспомогательные вещества – йодоформ, борная кислота, сахароза)				
Сульфаниламид (150,0±15,0 мг/г)	147±3	0,016	149±3	0,014
"Присыпка для ран с ксероформом 5%" «O.L.KAR-АгроЗоовет-Сервис» г. Шаргород (вспомогательные вещества – ксероформ, цинк оксид, тальк, крахмал)				
Сульфаниламид (50,0±5,0 мг/г)	50±1	0,020	50±1	0,012
"Мазь стрептоцидовая 10%" ГУ НПФ Бровафарма, г. Бровары (вспомогательное вещество – вазелин)				
Сульфаниламид (100,0±10,0 мг/табл)	100±2	0,019	100±2	0,012
"Свечи внутриматочные пенообразующие" ООО Базальт г. Киев (вспомогательные вещества – лактоза, крахмал, тальк, аэросил, целлюлоза, кальций стеарат, NaHCO <sub>3</sub> , ПЭГ-400, лимонная кислота)				
Сульфаметазин (4,0±0,2%)	3,9±0,2	0,029	3,9±0,1	0,022

туре тем, что используются: водная среда реакции, сравнительно мягкие условия, а также доступный, довольно высокой чистоты и недорогой реагент. Эта методика определения СА с ПАР характеризуется к тому же хорошими метрологическими параметрами и может весьма успешно конкурировать с самыми чувствительными спектрофотометрическими методиками определения СА.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч. Учебной пособие. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.
2. Анализ глазных пленок сложного состава / Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В., Суранова А.В., Лутцева И.И., Евдокимова В.В., Герасимова Г.А. // Хим.-фарм. журн. – 1983. – № 11. – С.1389-1394.
3. Тираспольская С.Г., Назарова Л.Е., Скибина В.В. Анализ лекарственных форм, содержащих сульфаниламидные препараты и димедрол // Фармация. – 1984. – № 1. – С.67-69.
4. Simultaneous determination of sulphathiazole and sulphaniamide in pharmaceuticals by derivative spectrophotometry / J.J.V. Nevado, T.F. Salinas, F.I. De Orbe Payas, L.F. Capitanvallveys // J. Pharm. Biomed. Analysis. – 1991. – Vol.9. – № 2. – P.117-122.
5. Разработка методов анализа глазных пленок, содержащих сульфацилнатрий / Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В., Суранова А.В., Лутцева И.И., Евдокимова В.В. // Хим.-фарм. журнал. – 1982. – № 3. – С.109-112.
6. Owen Morris C.J. The determination of sulphaniamide and its derivatives // Biochem. J. – 1941. – Vol.35. –

№ 8-9. – P.952-959.

7. Vaid F.H.M., Aminuddin M., Mehmood K. o-Phthalaldehyde based spectrophotometric determination of sulfonamides // Pakist. J. Pharm. Sci. – 2004. – Vol.17. – № 2. – P.77-84.

8. Клокова Е.В., Дмитриенко С.Г. Спектрофотометрическое определение сульфаниламидов по реакции конденсации с *n*-диметиламинокоричным альдегидом // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2008. – Т.49. – № 5. – С.339-343.

9. Спектрофотометрическое и хроматографическое определение сульфаниламидов в биологических жидкостях и лекарственных формах / М.И. Евгеньев, С.Ю. Гармонов, Л.Ш. Шакирова, Ф.С. Левинсон // Журн. аналит. химии. – 2000. – Т.55. – № 8. – С.888-895.

10. Гайдукевич О.М., Сидом Б.М., Безуглий В.Д. Фотометричне визначення стрептоциду, анестезину та новокаїну в лікарських формах // Фарм. журн. – 1978. – № 1. – С.63-67.

11. Гайдукевич О.М., Бородай І.В. Фотометричне визначення лікарських препаратів за допомогою 9-хлоракридину // Фарм. журн. – 1980. – № 6. – С.23-26.

12. Петренко В.В. Спектрофотометрическое определение некоторых сульфаниламидов по реакции с биндоном // Журн. аналит. химии. – 1980. – Т.35. – № 1. – С.200-202.

13. Петренко В.В., Дерюгина Л.И. Количественное определение сульфалена // Фармация. – 1983. – № 4. – С.38-40.

14. Количественное определение сульфаниламидных препаратов / С.А. Филипева, Л.Н. Стрелец, В.В. Петренко, В.П. Буряк // Фармация. – 1987. – № 6. – С.39-42.

15. Садивский В.М., Петренко В.В. Количественное

определение сульфаниламидных препаратов // Фармация. — 1993. — № 3. — С.53-54.

16. *Mohamed I.A.M., Askal H.F., Saleh G.A.* Use of *p*-benzoquinone for the spectrophotometric determination of certain sulphonamides // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* — 1991. — Vol.9. — № 7. — P.538.

17. *Amin A.S., El-Sayed G.O., Issa Y.M.* Application of alizarine derivatives as chromogenic reagents for the spectrophotometric determination of some sulfa drugs // *Microchem. J.* — 1995. — Vol.51. — P.367-373.

18. *Bratton A.C., Marshall E.K.* A new coupling component for sulfanilamide determination // *J. Biol. Chem.* — 1939. — Vol.128. — P.537-550.

19. *Попов Д.М., Литвин А.А.* Фотоколориметрическое определение анестезина, новокаина и стрептоцида в сложных лекарственных формах // *Хим.-фарм. журн.* — 1980. — № 10. — С.108-111.

20. *Минка А.Ф., Шкадова А.Ф., Копійчук І.І.* Фотоколориметричне визначення сульфаниламідних препаратів // *Фарм. журн.* — 1987. — № 1. — С.38-40.

21. *3-Aminophenol* as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives / *Nagaraja P., Yathirajan H.S., Raju C.R., Vasantha R.A., Nagendra P., Hemantha K.M.S.* // *Il Farmaco.* — 2003. — Vol.58. — P.1295-1300.

22. *Iminodibenzyl* as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives / *P. Nagaraja, K.R. Sunitha, R.A. Vasantha, H.S. Yathirajan* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2002. — Vol.53. — P.187-192.

23. *A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations* / *P. Nagaraja, S.D. Naik, A. Sherestha, A. Shivakumar* // *Acta Pharm.* — 2007. — Vol.57. — P.333-342.

24. *Ellaihy M.M., EL-Khateeb S.Z., El-Tarras M.F.* Calorimetric Microdetermination of Some Sulfa Drugs // *Microchem. J.* — 1986. — Vol.33. — P.168-171.

25. *Rapid spectrophotometric determination of sulphonamide derivatives with resorcinol* / *P. Nagaraja, K.R. Sunitha, R.A. Vasantha, H.S. Yathirajan* // *Indian. J. Pharm. Sci.* — 2002. — Vol.644. — P.391-393.

26. *Иванов В.М., Бусев А.И., Богданович Л.И.* Раздельное спектро-фотометрическое определение рутения и осмия при совместном присутствии с применением 4-(2-пиридилазо) резорцина // *Вестн. моск. ун-та. Сер. Химия.* — 1971. — № 2. — С.197-200.

27. *Иванов В.М., Горбунова Г.Н.* Фотометрическое определение платины 4-(2-пиридилазо) резорцином // *Журн. аналит. химии.* — 1980. — Т.35. — № 12. — С.2363-2368.

28. *Badi V.A., Arun K.D.* 4-(2-Pyridylazo) resorcinol as a sensitive reagent for vanadium, niobium, and tantalum // *Microchem. J.* — 1967. — Vol.12. — № 2. — P.162-167.

29. *Pakalns P., Ivanfy A.B.* Spectrophotometric determination of niobium in zirconium with 4-(2-pyridylazo) resorcinol // *Analyt. Chim. Acta.* — 1968. — Vol.41. — P.139-145.

30. *Sommer L., Ivanov V.M., Novotnб H.* The reaction of uranyl ions with 4-(2-pyridylazo) resorcinol // *Talanta.* — 1967. — Vol.14. — № 3. — P.329-343.

31. *Sommer L., Novotnб H.* Complexation of aluminium, yttrium, lanthanum and lanthanides with 4-(2-pyridylazo) resorcinol (par) // *Talanta.* — 1967. — Vol.14. — № 4. — P.457-471.

32. *Nonova D., Evtimova B.* Complexing of iron(II) and iron(III) by 4-(2-pyridylazo) resorcinol // *J. Inorganic and Nuclear Chemistry.* — 1973. — Vol.35. — № 10. — P.3581-3586.

33. *iroki M., Herak M.J.* Extraction of gallium-4-(2-pyridylazo) resorcinol complexes // *J. Inorganic and Nuclear Chemistry.* — 1977. — Vol.39. — № 1. — P.127-129.

34. *Modification of 4-(2-pyridylazo) resorcinol postcolumn reagent selectivity through competitive equilibria with chelating ligands* / *A.C. Co, A.N. Ko, L. Ye, C.A. Lucy* // *J. Chromatography A.* — 1997. — Vol.770. — № 1-2. — P.69-74.

35. *Vachirapatana N., Doble P., Haddad P.R.* On-line preconcentration of niobium(V) and tantalum(V) as 4-(2-pyridylazo) resorcinol-citrate ternary complexes in geological samples by ion interaction high-performance liquid chromatography // *J. Chromatography A.* — 2000. — Vol.885. — № 1-2. — P.369-375.

36. *Flow-injection in-line complexation for ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography of some metal-4-(2-pyridylazo) resorcinol chelates* / *S. Srijaranai, S. Chanpaka, C. Kukusamude, K. Grudpan* // *Talanta.* — 2006. — Vol.68. — № 5. — P.1720-1725.

37. *Jano P.* Reversed-phase liquid chromatography of metal chelates of 4-(2-pyridylazo) resorcinol: retention model and its verification // *Analyt. Chim. Acta.* — 2000. — Vol.414. — № 1-2. — P.113-122.

38. *Yusof N.A., Ahmad M.* A flow cell optosensor for determination of Co(II) based on immobilised 2-(4-pyridylazo) resorcinol in chitosan membrane by using stopped flow, flow injection analysis // *Sensors and Actuators B.* — 2002. — Vol.86. — № 2-3. — P.127-133.

39. *Ensaifi A.A., Fouladgar M.* Development of a mercury optical sensor based on immobilization of 4-(2-pyridylazo) resorcinol on a triacetylcellulose membrane // *Sensors and Actuators B.* — 2006. — Vol.113. — № 1. — P.88-93.

40. *Complexes of Zn(II) and Cd(II) with 4-(2-pyridylazo) resorcinol sorbed on sephadex QAE: characterization and theoretical study* / *M.F. Molina, J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, R. El Bergmi* // *Analyt. Chim. Acta.* — 1999. — Vol.389. — № 1-3. — P.281-290.

41. *Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR)* / *H. Feng, T. Wang, S. Fong, Y. Li* // *Food Chemistry.* — 2003. — Vol.81. — № 4. — P.607-611.

42. *A polymer film modified sensor for voltammetric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid and its application in urine* / *A. Liu, W. Chen, L. Huang, X. Lin* // *Chem. Pharm. Bulletin.* — 2008. — Vol.56. — № 12. — P.1665-1669.

43. *Electrochemical study of bergenin on a poly(4-(2-pyridylazo) resorcinol) modified glassy carbon electrode and its determination in tablets and urine* / *Chen J., Zhang J., Zhuang Q., Zhang S., Lin X.* // *Talanta.* — 2007. — Vol.72. —

№ 5. — P.1805-1810.

44. *Electrocatalytic* oxidation and determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid at a poly (4-(2-pyridylazo) resorcinol) modified glassy carbon electrode / Chen J., Zhang J., Wan H., Zhang S., Lin X. // *Electroanalysis*. — 2007. — Vol.19. — № 5. — P.612-615.

45. *Photochemical* behavior of lysozyme-4-(2-pyridylazo) resorcinol polymolecular complex and its analytical applications / Yue Q., Song Z., Dong F., Liu Y., Shao X. // *J. Fluorescence*. — 2007. — Vol.17. — № 5. — P.505-511.

46. Qian C., Diao G. Synthesis and characterization of inclusion complex of 4-(2-pyridylazo) resorcinol with  $\beta$ -cyclodextrin // *Chem. J. Internet*. — 2004. — Vol.6. — № 5. — P.22-31.

47. Arya S.P., Jain P. Colorimetric determination of ascorbic acid in pharmaceuticals using UVI-4-(2-pyridylazo) resorcinol complex // *J. Ind. Chem. Soc.* — 2002. — Vol.79. — № 1. — P.95-96.

48. *Application* of sulphanilamides disazo dyes with Tropaeolin O for simple, rapid and sensitive spectrophotometric assay of medicines / M. Boiko, T. Vrublevska, O. Korkuna, G. Teslyar // *Spectrochimica Acta. A*. — 2011. — Vol.79A. — № 2. — P.325-331.

49. Цоллингер Г. Химия азокрасителей. Пер. с нем. под ред. Б.А. Порай-Кошина. — Л.: Гос. науч.-техн. изд. хим. лит.: Ленинград, 1960. — 364 с.

50. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. Учеб. для вузов. — М.: Химия. 1977. — 592 с.

51. Иванов В.М. Гетероциклические азосоединения как аналитические реагенты: теория действия, закономерности комплексообразования, аналитическое применение. Дис...д-ра хим. наук: 02.00.02. — М.: МГУ, 1984. — 399 с.

52. Иванов В.М. Гетероциклические азотсодержащие азосоединения. — М.: Наука, 1982. — 230 с.

53. *The British Pharmacopoeia (BP)* / Intern. Ed. — London: H.M. Stationary Office, 2006.

Поступила в редакцию 16.01.2012