

УДК 615.213:543.421/.424

В. С. БОНДАР, О. В. БАГУЛЯ, І. О. НЕФЬОДОВ*

*Національний фармацевтичний університет, м. Харків***Житомирське обласне бюро судово-медичної експертизи, м. Житомир*

ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДИФЕНІНУ

Запропоновано методику кількісного аналізу дифеніну методом екстракційної фотометрії з використанням родаміну 6Ж, що дає можливість визначити дифенін у межах від 10 мкг до 140 мкг в пробі. Відносна невизначеність середнього результату становить від $\pm 6,15$ до $\pm 3,52$ %.

Ключевые слова: дифенін, родамін 6Ж, екстракційна фотометрія.

ВСТУП

Дифенін досить часто стає об'єктом досліджень в практичній роботі хіміків-токсикологів – в літературних джерелах є інформація про випадки гострих та летальних отруєнь дифеніном, в тому числі і в суміші з іншими ліками та алкоголем [9, 11, 12].

Серед сучасних методів, що застосовуються у хіміко-токсикологічному аналізі, широку увагу приділяють оптичним методам аналізу, зокрема екстракційній фотометрії [1, 2, 8, 10, 13, 14]. У зв'язку з цим ми розробили методику екстракційно-фотометричного визначення дифеніну з використанням ксантенового барвника родаміну 6Ж, який в практиці хіміко-токсикологічного аналізу використовують для ідентифікації похідних барбітурової кислоти [3, 4, 6].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі нами були використані дифенін фармакопейної чистоти та родамін 6Ж кваліфікації «ч. д. а.».

Для проведення досліджень використовували розчин дифеніну в 0,1% розчині натрій гідроксиду та 0,1 % розчин родаміну 6Ж.

Для встановлення значення рН, при якому має місце максимальний ступінь екстракції іонних асоціатів, було використано ряд універсальних буферних розчинів з рН від 2,0 до 12,0 [7] та 0,1 моль/л розчин натрій гідроксиду. Величини рН буферних розчинів контролювали за допомогою іономіру ЭВ-74.

Оптимальну кількість 0,1% розчину родаміну 6Ж розраховували за максимальним виходом

продукту реакції, тобто за максимальним світлопоглинанням.

Методика побудови градувального графіка для екстракційно-фотометричного визначення дифеніну. У мірну колбу місткістю 250,0 мл вносили 50,0 мг дифеніну, розчиняли у 0,1 % розчині натрій гідроксиду і доводили об'єм розчину 0,1 % розчином натрій гідроксиду до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 200 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину дифеніну 1 і доводили об'єм розчину 0,1 % розчином натрій гідроксиду до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 40 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 5,00; 10,00 та 20,00 мл стандартного розчину дифеніну 2 відповідно і доводили об'єми розчинів 0,1 % розчином натрій гідроксиду до позначки (розчини 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/мл відповідно). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 8,00; 10,00 та 14,00 мл стандартного розчину дифеніну 1 відповідно і доводили об'єми розчинів 0,1 % розчином натрій гідроксиду до позначки (розчини 6, 7 та 8 відповідно, концентрація 16, 20 та 28 мкг/мл відповідно).

У ряд ділительних ліжок вносили по 10,00 мл 0,1 моль/л розчину натрій гідроксиду, по 10,00 мл 0,1 % розчину родаміну 6Ж та по 5,00 мл розчинів дифеніну 3, 4, 5, 6, 7 та 8 відповідно. До отриманих сумішей додавали по 15,00 мл діетилевого етеру. Суміші у ділительних ліжках струшували протягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів.

Відбирали по 2 порції етерних шарів об'ємом 5,00 мл – для першої порції визначали оптичну

© С. М. Дроговоз, М. П. Тимофеев, Е. А. Калько, 2013

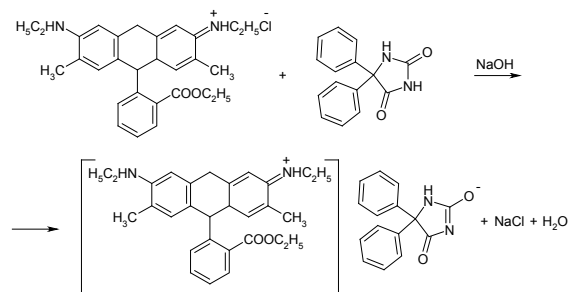
густину на спектрофотометрі СФ-46 у кюветі з товщиною шару 10 мм з кришкою ($\lambda = 525$ нм); до другої порції додавали 1,00 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі, після чого одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 в кюветі з товщиною шару 10 мм з кришкою ($\lambda = 540$ нм). Як розчин порівняння використовували діетиловий етер.

Експеримент виконували тричі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

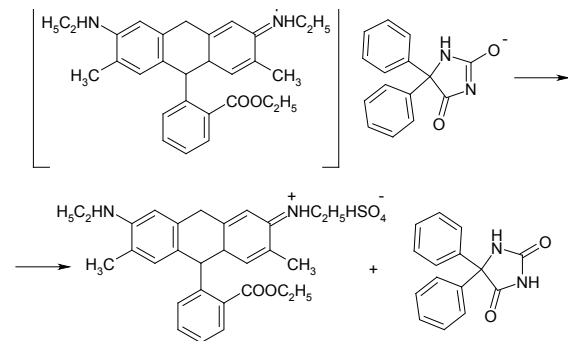
Нами встановлено, що 0,1 % розчин родаміну 6Ж в лужному середовищі з дифеніном утворює іонні асоціати, що екстрагуються органічними розчинниками, при цьому органічний шар забарвлюється в жовтогарячий колір.

Реакцію утворення іонного асоціату дифеніну з родаміном 6Ж можна подати схемою:



При використанні таких органічних розчинників як хлороформ і діетиловий етер (найчастіше застосовують в хіміко-токсикологічному аналізі) встановлено, що родамін 6Ж не екстрагується діетиловим етером з водних розчинів, і тому не заважає кількісному визначенню дифеніну, в той час як хлороформ не може бути використаний у подальшому з цією метою.

Для підвищення чутливості методу етерний шар руйнували додаванням до нього 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі:



При цьому одержували інтенсивне червоно-фіолетове забарвлення, що пов'язане з вивільненням родаміну 6Ж.

Оптичну густину етерних розчинів іонних асоціатів дифеніну з родаміном 6Ж досліджували як до їх руйнування – для цього випадку $\lambda=525$ нм, так і після руйнування – для цього випадку $\lambda=540$ нм.

Попередньо встановлено, що ступінь екстракції іонних асоціатів дифеніну з родаміном 6Ж діетиловим етером набуває максимуму при рН = 9,0 і залишається стабільним з його підвищенням – для максимального спрощення процедури проведення кількісного визначення при подальших дослідженнях для створення потрібного значення рН середовища рекомендовано використовувати 0,1 моль/л розчин натрій гідроксиду.

Встановлено оптимальну кількість 0,1 % розчину родаміну 6Ж, необхідну для проведення кількісного визначення дифеніну – 10,00 мл.

Для встановлення діапазону лінійності розробленої методики кількісного визначення дифеніну використовували серію стандартних розчинів дифеніну; за результатами виміру оптичної густини будували градувальні графіки 1 та 2 – до руйнування іонних асоціатів ($\lambda=525$ нм) та після ($\lambda=540$ нм) відповідно.

Отриманим градувальним графікам відповідають рівняння прямих (1) та (2) відповідно виду $y = bx + a$ [5], що мають вигляд:

$$A = 0,006660 \cdot C + 0,038333, \quad (1)$$

$$A = 0,009567 \cdot C + 0,01464, \quad (2)$$

де A – оптична густина розчину іонних асоціатів родаміну 6Ж з дифеніном;

C – вміст дифеніну в пробі, мкг.

Метрологічну характеристику [5] отриманих градувальних залежностей наведено в табл. 1.

Після перевірки значущості коефіцієнта a [5] в рівняннях (1) та (2) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду: $y = b'x$.

Оптична густина розчинів іонних асоціатів родаміну 6Ж з дифеніном підпорядковується закону світлопоглинання Бугера–Ламберта–Бера в інтервалі концентрацій від 20 до 140 мкг ($\lambda=525$ нм) та від 10 до 100 мкг ($\lambda=540$ нм) дифеніну в пробі.

Отримані градувальні графіки та рівняння прямих (1) та (2) було використано для розрахунку вмісту дифеніну в модельних розчинах.

Отримані дані наведено в табл. 2 та 3.

**МЕТРОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГРАДУЮВАЛЬНИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ
ОПТИЧНОЇ ГУСТИНИ РОЗЧИНІВ ІОННИХ АСОЦІАТИВ РОДАМІНУ 6Ж
З ДИФЕНІНОМ ВІД ВМІСТУ ДИФЕНІНУ ($Y = VX + A$), ОТРИМАНИХ
МЕТОДОМ ЕКСТРАКЦІЙНОЇ ФОТОМЕТРІЇ ($N = 15; P = 0,95$)**

№	r	b	a	S ²	Δb	Δa
1	0,9970	0,006660	0,03833	0,00048660	0,00028810	0,025110
2	0,9998	0,009567	0,01464	0,00002604	0,00008218	0,004999

Таблиця 2

**РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСТРАКЦІЙНО-
ФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ДИФЕНІНУ У МОДЕЛЬНИХ
РОЗЧИНАХ ($\lambda = 525 \text{ нм}; L = 10 \text{ мм}$)**

Внесено дифеніну в пробу, мкг	Оптич- на гус- тина	Знайдено дифеніну		Метрологічна характеристика ($n = 5; P = 0,95$)
		мкг	%	
20,00	0,161	18,42	92,10	$\bar{X} = 98,73$ $S = 4,89$ $S\bar{X} = 2,19$ $\Delta\bar{X} = 6,07$ $\epsilon = \pm 6,15\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} =$ $= 98,73 \pm 6,07$
40,00	0,298	38,99	97,48	
80,00	0,591	82,98	103,73	
100,00	0,727	103,40	103,40	
140,00	0,942	135,69	96,92	

З даних, які наведено у табл. 2 та 3, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні дифеніну методом екстракційної фотометрії становить $\pm 6,15\%$ та $\pm 3,52\%$ відповідно.

Таким чином методика з використанням $\lambda = 540 \text{ нм}$ після руйнування іонних асоціатів більш чутлива та більш точна.

Доведено, що розроблену методику екстракційно-фотометричного визначення можна використовувати для кількісного визначення дифеніну, який виділено із біологічного матеріалу.

Таблиця 3

**РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСТРАКЦІЙНО-
ФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ДИФЕНІНУ У МОДЕЛЬНИХ
РОЗЧИНАХ ($\lambda = 540 \text{ нм}; L = 10 \text{ мм}$)**

Внесено дифені- ну в про- бу, мкг	Оптична густина	Знайдено дифеніну		Метрологічна характеристика ($n = 5; P = 0,95$)
		мкг	%	
10,00	0,115	10,49	104,90	$\bar{X} = 100,36$ $S = 2,85$ $S\bar{X} = 1,27$ $\Delta\bar{X} = 3,53$ $\epsilon = \pm 3,52\%$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} =$ $= 100,36 \pm 3,536$
20,00	0,201	19,48	97,40	
40,00	0,394	39,65	99,13	
80,00	0,788	80,84	101,05	
100,00	0,965	99,34	99,34	

ВИСНОВКИ

Розроблено методику кількісного аналізу дифеніну методом екстракційної фотометрії з використанням як реагента ксантенового барвника родаміну 6Ж, що утворює з дифеніном іонні асоціати. Запропонована методика дає можливість визначити від 10 мкг до 140 мкг дифеніну у пробі. Відносна невизначеність середнього результату становить від $\pm 6,15$ до $\pm 3,52\%$.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Болотов, В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення донор-мілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Вісн. фармації. – 2005. – № 4 (44). – С. 16–19.
2. Болотов В. В. Спрямований хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на дифенін / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: зб. наук. ст. – Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2007. – Вип. XX. – С. 14–22.
3. Булатов Л. И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / Л. И. Булатов, И. П. Калинин. – Л. : Химия, 1986. – 432 с.
4. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. – К. : Вища школа, 1989. – 429 с.
5. Дерфель К. Статистика в аналитической химии: пер. с нем. / К. Дерфель. – М. : Мир, 1994. – 268 с.
6. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Химия, 1975. – 360 с.
7. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – М. : Химия, 1989. – 448 с.
8. Application of multi-way analysis to UV-visible spectroscopy, gas chromatography and electronic nose data for wine ageing evaluation / N. Prieto, M. L. Rodriguez-Mández, R. Leardi [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2012. – Vol. 719. – P. 43–51.

9. Craig S. Phenytoin poisoning / S. Craig // *Neurocrit. Care.* – 2005. – Vol. 3 (2). – P. 161–170.
10. Krzek J. Spectrophotometric determination of bacitracin in bulk drug as dabsyl derivative in a range of visible light / J. Krzek, J. Piotrowska // *Acta. Pol. Pharm.* – 2011. – Vol. 68 (6). – P. 853–858.
11. Murphy J.M. Phenytoin intoxication / J.M. Murphy, R. Motiwala, O. Devinsky // *South Med. J.* – 1991. – Vol. 84 (10). – P. 1199–1204.
12. Phenytoin toxicity: a review of 94 cases / P. L. Curtis, R. Piibe, M. J. Ellenhorn [et al.] // *Vet. Hum. Toxicol.* – 1989. – Vol. 31 (2). – P. 164–165.
13. Ulu S. T. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of atomoxetine in pharmaceutical preparations / S. T. Ulu // *Pharmazie.* – 2011. – Vol. 66 (11). – P. 831–835.
14. Visible spectrophotometric method for amiodarone / A. Bosonceanu, G. Popa, G. Tivntaru, I. Popovici // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2012. – Vol. 116 (1). – P. 330 – 335.

УДК 615.213:543.421/424

В. С. Бондарь, А. В. Багуля, И. О. Нефедов

ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИФЕНИНА

Предложена методика количественного анализа дифенина методом экстракционной фотометрии с использованием родамина 6Ж, позволяющая определять дифенин в пределах от 10 мкг до 140 мкг в пробе. Относительная неопределенность среднего результата составляет от $\pm 6,15$ до $\pm 3,52$ %.

Ключевые слова: дифенин, родамин 6Ж, экстракционная фотометрия.

UDC 615.213:543.421/424

V. S. Bondar, O. V. Bagulya, I. O. Nefyodov

EXTRACTION PHOTOMETRIC DETERMINATION OF PHENYTOIN

The procedure of phenytoin quantitative analysis by the method of extraction photometry using rhodamine 6G allowed to determine phenytoin within the range from 10 mcg to 140 mcg in the sample has been developed. The relative uncertainty of mean result equals from ± 6.15 to ± 3.52 %.

Key words: phenytoin, rhodamine 6G, extraction photometry.

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Продольна, д. 36, кв. 129
Тел. (0572) 67-91-92

Надійшла до редакції:

15.04.2013