

Використання азобарвника еріохром синьо-чорного R для визначення сульфаніламідів у готових лікарських формах

М.Я. Бойко^{1,2}, Т.Я. Врублевська², О.Я. Коркуна², Г.Ю. Тесляр¹

¹Лабораторія інструментальних методів контролю, Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, вул. Донецька, 11, 79019 Львів, Україна

²Кафедра аналітичної хімії, хімічний факультет, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна, e-mail: boiko_maria@ukr.net

Надішла: 15 січня 2014 р / Прийнята до друку: 26 червня 2014 р.

Встановлено умови взаємодії діазосолей сульфаніламідів з о,о'-дигідроксизаміщеним азобарвником еріохром синьо-чорним R. На основі цього, розроблено методику спектрофотометричного визначення сульфаніламідів у готових лікарських формах, що ґрунтується на реакції азосполучення діазосолей сульфаніламідів з продуктом окисно-відновного руйнування барвника – β-нафтолом з утворенням нової азосполуки. Обчислено спектрофотометричні характеристики аналітичних форм десяти сульфаніламідів з азобарвником ($\lambda=485$ нм, $\bar{\epsilon} \lambda=(1,1-2,3) \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹) та метрологічні характеристики розробленої методики (межі лінійності – від 6 до 64 мкг/мл).

M.YA. BOIKO, T.YA. VRUBLEVSKA, O.YA. KORKUNA, G.YU. TESLYAR. THE USE OF AZO DYE ERIOHROM BLUE-BLACK R FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF SULFANILAMIDES IN FINISHED DOSAGE FORMS. The conditions of sulphanilamide diazonium salt interaction with o,o'-dihydroxysubstituted azo dye eriohrom blue-black R have been established. The method of sulphanilamides spectrophotometric determination in finished dosage forms based on the azocoupling reaction of sulphanilamide diazonium salt with the product of the dye redox destruction, viz. β-naphthol, forming a new azo compound has been elaborated. The spectrophotometric characteristics of ten sulphanilamides analytical forms with azo dye ($\lambda=485$ nm, $\lambda=(1,1-2,3) \cdot 10^3$ L·mol⁻¹·cm⁻¹) and the validation parameters of the developed method (linearity range is 6–64 μg/ml) have been calculated.

Ключові слова: сульфаніламід, еріохром синьо-чорний R, спектрофотометрія, готові лікарські форми.

Key words: sulphanilamides, eriohrom blue-black R, spectrophotometry, finished dosage forms.

Вступ

Застосування в медичній практиці препаратів на основі сульфаніламідів (СА), дозволяє успішно проводити лікування багатьох захворювань, викликаних бактеріальними патогенами, особливо на ранніх стадіях захворювань. Синергічна дія СА та певних діамінопіримідинів, при їх доволі низькій токсичності, робить набагато ефективнішими такого типу комбіновані препарати. Тому зазначена група лікарських засобів широко використовується для лікування інфекційних патологій, незважаючи на наявність в арсеналі медиків інших класів антибактеріальних препаратів [1]. У зв'язку з різноманіттям лікарських форм сульфаніламідних препаратів для оцінки їх якості використовують різні методи аналізу. Перевагою спектрофотометричних цих методик, в порівнянні з іншими, є досить

висока чутливість, простота виконання аналізу та експресність. Методики спектрофотометричного визначення СА можна розділити на три групи: визначення за власним поглинанням в УФ-ділянці спектра [2-6], за продуктами прямої взаємодії СА з органічними речовинами різних класів [7-11] та реакції азосполучення діазосолей СА з органічними реагентами [12-19]. Проте, більшість методик характеризуються низкою недоліків. УФ-спектрофотометрія, при своїй чутливості, не є селективною, оскільки в зазначеній ділянці спектру, крім СА, світло поглинають багато органічних сполук різної будови. Методики розроблені на основі прямої взаємодії СА з органічними реагентами є одностадійними, однак вимагають використання органічних розчинників і, в багатьох випадках, тривалого нагрівання на киплячій

водняній бані. Реакції азосполучення діазосолей СА з органічними реагентами є двостадійними, відносно тривалими в часі, однак протікають у водному середовищі, і не вимагають використання специфічних реагентів. Недоліком є те, що умови приведення цих реакцій з деякими реагентами, зокрема з 3-амінофенолом [13], імінобензилом [14], 8-гідрокси-хіноліном [15], резорцином [16, 17] дуже жорсткі, оскільки діазотування пропонують проводити в 5–10 М хлоридній або сульфатній кислотах, в яких органічні речовини можуть руйнуватися, особливо це стосується аналізу комбінованих лікарських засобів (наприклад, СА – антибіотик). Продукти деградації можуть заважати подальшому азосполученню з реагентами, а такі дослідження для комбінованих лікарських засобів у згаданих роботах відсутні.

Раніше, нами розроблено методики спектрофотометричного визначення СА з використанням резорциновмісних азореагентів – кислотного моноазобарвника тропеоліну О [20], гетероциклічних азореагентів 4-(2-піридилазо)-резорцину [21] та 4-(2-тіазолілазо)резорцину [22]. В основі методик лежать реакції взаємодії діазосолей СА з азореагентами з утворенням забарвлених діазосполук. Методики характеризуються високою чутливістю та селективністю. Тоді ж було встановлено, що діазосоли СА взаємодіють також ще з одним класом барвників – *o,o'*-дгідроксизаміщеними, які є значно складнішими ніж раніше досліджені. Серед них, еріохром синьо-чорний R (ЕСЧ R) утворює забарвлену сполуку з діазосолями СА, що імовірно можна було б використати для їх визначення.

В аналітичній хімії ЕСЧ R застосовують здебільшого в аналізі неорганічних речовин для визначення іонів металів, використання ЕСЧ R в органічному аналізі менш поширене. Так, для спектрофотометричного визначення біологічно активних речовин піроксикаму та фолієвої кислоти [23], гемфіброзилу [24] у фармацевтичних препаратах використовують системи «азобарвник ЕСЧ R – поверхнево-активна речовина (додецил-диметиламоній бромід) – аналіт», в яких змінюються спектрофотометричні характеристики барвника, що дозволяє кількісно визначити лікарську складову. Методом проточно-інжекційного аналізу в поєднанні з релеївським розсіюванням з допомогою ЕСЧ R визначають білки – альбуміни сироватки крові людини та бика, а також імуноглобулін G людини [25].

Метою цієї роботи є дослідження взаємодії СА з ЕСЧ R для встановлення умов отримання стабільного аналітичного сигналу, встановлення імовірного хімізму взаємодії та розробки на цій основі нової альтернативної спектрофотометричної методики визначення СА із задовільними аналітичними характеристиками.

Експериментальна частина

У роботі використовували десять найпоширеніших у лікарській практиці СА (табл. 1).

Розчини СА: СМО, СМТ, СМР, СДМ, СТЗ, СДА, СМП, СММ готували розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99%) фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині натрій гідроксиду. Розчини САМ готували розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99%) фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині хлоридної кислоти. Розчини СГН готували розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99%) фірми Sigma-Aldrich у суміші 50% 0,1 М розчину хлоридної кислоти та 50% етилового спирту (96%).

Розчин натрій нітриту, сечовини, сульфамінової кислоти готували розчиненням точної наважки реактиву кваліфікації «ч.д.а.» у дистильованій воді. Робочі розчини хлоридної кислоти готували розведенням концентрованої кислоти кваліфікації «х.ч.», а розчини натрій гідроксиду готували розчиненням реактиву кваліфікації «х.ч.» у дистильованій воді.

Розчини ЕСЧ R (табл. 2) готували розчиненням точної наважки реактиву фірми «Merck», (вміст основної речовини не менше 95%) у 50% водноетанольному розчині.

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючих спектрофотометрах CARY. WIN – UV-VIS-50 (Varian, США) і SPECORD M-40 (Carl Zeiss Jena, Німеччина) в кюветах $l=1$ см.

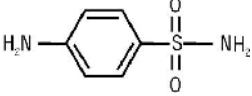
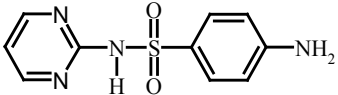
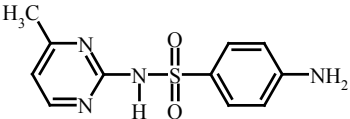
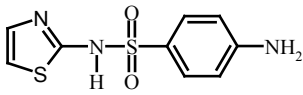
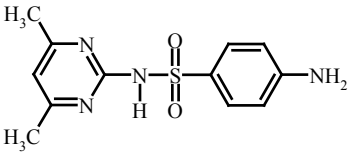
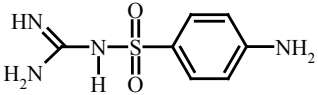
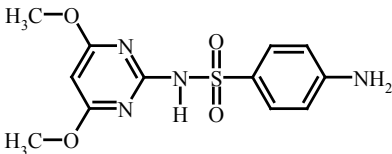
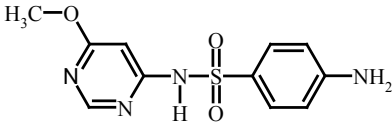
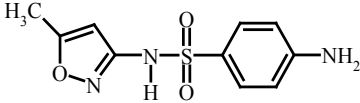
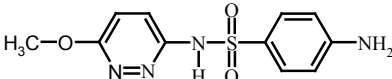
Величину рН вимірювали з допомогою рН-метра РВ 11 (Sartorius, Німеччина) з аргентумхлоридним електродом порівняння. Необхідне значення рН середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду. Потенціометричне титрування проводили використовуючи потенціометр рН-150 М з платиновим індикаторним електродом ЕПЛ-02 та аргентумхлоридним електродом порівняння ЭВЛ-1М4 (РУП «Гомельський завод измерительных приборов», Білорусь).

Вольтамперометричні дослідження проводили на осцилополярографі ЦПА модель 03 та комп'ютеризованій установці з триелектродною коміркою (робочий електрод – р.к.е., допоміжний – Pt, електрод порівняння – хлорсрібний) з лінійною розгорткою потенціалу від -0,2 до -1,75 В за таких заданих умов: швидкість розгортки потенціалу – 2,0 мВ/с, затримка накладання напруги – 4,0 с. Вольтамперограми реєстрували за кімнатної температури (~20°C). Розчинений кисень усували з досліджуваних розчинів за допомогою барботування очищеним аргоном впродовж 15 хв.

Результати досліджень та їх обговорення

Електронні спектри світлопоглинання продуктів взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R. Проведені дослідження взаємодії СА показали, що лише діазотовані СА утворюють забарвлені

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики сульфаніламідів

Структурна формула	Назва	Деякі характеристики [34-36]
 CAS № 63-74-1	Сульфаніламід, стрептоцид (САМ), 4-амінобензолсульфонамід	M = 172.2 г/моль; pK ₁ = — pK ₂ = 10.1
 CAS № 68-35-9	Сульфадіазин (СДА), 4-аміно-N-(2-піримідиніл)- бензолсульфонамід	M = 250.3 г/моль; pK ₁ = 2.49 pK ₂ = 6.48
 CAS № 127-79-7	Сульфамеразин (СМР), 4-аміно-N-(4-метил-2-піридиніл)- бензолсульфонамід	M = 264.3 г/моль; pK ₁ = — pK ₂ = 7.00
 CAS № 72-14-0	Сульфатіазол (СТЗ), 4-аміно-N-(1,3-тіазол-2-іл)- бензолсульфонамід	M = 255.3 г/моль; pK ₁ = 2.62 pK ₂ = 7.37
 CAS № 57-68-1	Сульфаметазин (СМТ), 4-аміно-N-(2,4-диметил-2-піридиніл)- бензолсульфонамід	M = 278.3 г/моль; pK ₁ = 2.65 pK ₂ = 7.58
 CAS № 57-67-0	Сульфагуанідин (СГН), 4-аміно-N-(діамінометилен)- бензолсульфонамід	M = 214.2 г/моль; pK ₁ = 2.72 pK ₂ = 11.82
 CAS № 122-11-2	Сульфадиметоксин (СДМ), 4-аміно-N-(2,6-диметокси-4- піримідиніл)-бензолсульфонамід	M = 310.3 г/моль; pK ₁ = 2.65 pK ₂ = 6.82
 CAS № 1220-83-3	СульфамонOMETOKCИH (СММ), 4-аміно-N-(5-метокси-2-піримідиніл)- бензолсульфонамід	M = 280.3 г/моль; pK ₁ = 2.51 pK ₂ = 7.28
 CAS № 723-46-6	Сульфаметоксазол (СМО), 4-аміно-N-(5-метил-3-ізокса-золіл)- бензолсульфонамід	M = 253,3 г/моль; pK ₁ = 1.74 pK ₂ = 5.70
 CAS № 000080-35-3	Сульфаметоксипіридазин (СМП), 4-аміно-N-(6-метоксипіридазин-3-іл)- бензолсульфонамід	M = 280.3 г/моль; pK ₁ = — pK ₂ = 7.20

сполуки з ЕСЧ R, для електронних спектрів поглинання яких характерна поява нового максимуму світлопоглинання при $\lambda_{\text{max}} = 485$ нм,

величина оптичної густини якого пропорційна концентрації СА у досліджуваному розчині (рис. 1). Було встановлено, що надлишок нітрит-іонів, який

використовується для отримання діазосолей, взаємодіє з азобарвником, і на спектрах проявляється зменшенням абсорбції при їх λ_{max} , маскуючи таким чином взаємодію з діазосолями СА. Тому нітрит-іони, що не провзаємодіяли з СА, слід усувати з реакційної суміші за допомогою сечовини.

Отримані в результаті реакції забарвлені продукти найімовірніше утворюються внаслідок окисно-відновного процесу між діазотованими СА та азобарвником. Сіль діазонію може окиснювати азобарвник і руйнувати його з виділенням N_2 та забарвлених продуктів деградації, які в свою чергу можуть взаємодіяти між собою або з діазосіллю СА [29].

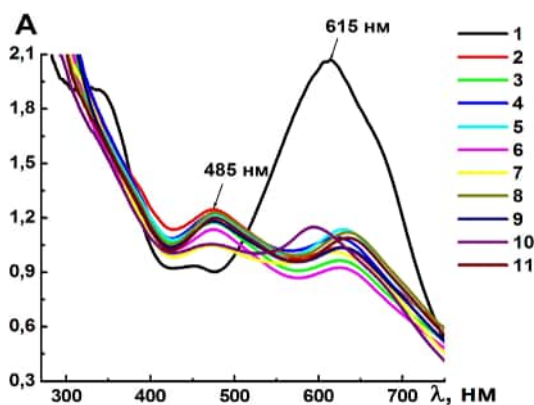


Рис. 1. Електронні спектри поглинання розчину 1 - ЕСЧ R та продуктів його взаємодії з діазосолями СА: 2 – САМ, 3 – СМО, 4 – СМТ, 5 – СДМ, 6 – СМР, 7 – СТЗ, 8 – СГН, 9 – СМП, 10 – СММ, 11 - СДА. $C_{HCl} = 1.0 \text{ M}$, $C_{CA} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{NaNO_2} = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{Сечов.} = 4.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{ЕСЧR} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{УБС} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $pH = 8.0$, $\lambda = 485 \text{ nm}$.

Встановлення оптимальних умов діазотування СА. Для отримання максимального виходу продуктів взаємодії СА з азобарвником було перевірено умови діазотування СА та руйнування надлишку нітрит-іонів. Результати досліджень показали, що максимальний вихід продуктів взаємодії СА з ЕСЧ R спостерігається при проведенні реакції діазотування у хлоридній або сульфатній кислотах в концентраційних межах від 0.5 M до 1 M, тоді як використання фосфатної та ацетатної кислот не дозволяє отримати такого результату. Для діазотування необхідно використовувати понад 3-кратний надлишок натрій нітриту відносно концентрації СА при тривалості реакції 20 хв за температури 20°C та руйнувати надлишок нітрит-іонів 50-кратним надлишком сечовини при тривалості реакції 10 хв за температури 20°C.

Вплив кислотності середовища на взаємодію діазотованих СА з ЕСЧ R. Для встановлення умов максимального виходу продуктів взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R було досліджено вплив pH середовища на реакцію азосполучення (рис. 2).

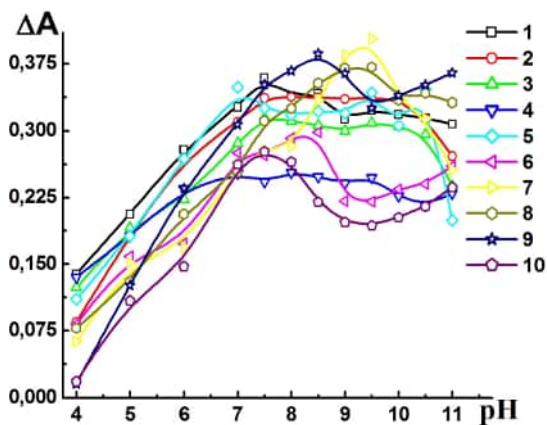


Рис. 2. Вплив кислотності середовища на світлопоглинання продуктів взаємодії ЕСЧ R з діазосолями СА: 1 – САМ, 2 – СМО, 3 – СМТ, 4 – СДМ, 5 – СМР, 6 – СТЗ, 7 – СГН, 8 – СМП, 9 – СММ, 10 - СДА. $C_{HCl} = 1.0 \text{ M}$, $C_{CA} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{NaNO_2} = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{Сечов.} = 4.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{ЕСЧR} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{УБС} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\lambda = 485 \text{ nm}$

З даних рис. 2 видно, що максимальний вихід продуктів реакції для більшості діазосолей СА з ЕСЧ R спостерігається у слаболужному середовищі в межах pH від 7 до 10. У лужному середовищі в межах pH від 7 до 13, згідно з літературними даними, ЕСЧ R у водних розчинах знаходиться у формі однократно дисоційованого іона, причому в умовах взаємодії зі солями діазонію азо-форма барвника переважає над гідразо-формою [30–33].

В кислому середовищі взаємодія між діазотованими СА та азобарвником не відбувається, оскільки фенольні та нафтолові сполуки здатні до азосполучення в лужному середовищі [34, 35]. Наступні дослідження проводили при pH 8.0.

З метою підбору буферної суміші та створення стабільних умов для взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R було досліджено вплив природи і концентрації різних аніонів, катіонів та універсальної буферної суміші (УБС) на максимальний вихід продуктів реакцій (рис. 3).

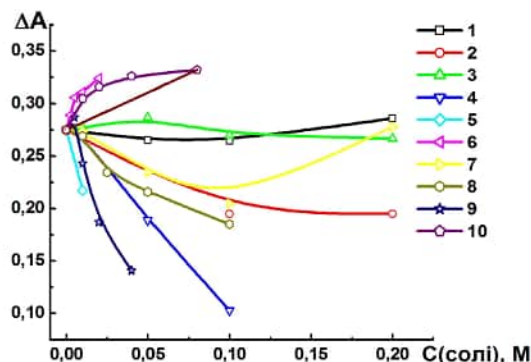


Рис. 3. Вплив природи і концентрації 1 – NH_4Cl , 2 – $NaNO_3$, 3 – Na_2SO_4 , 4 – $CaCl_2$, 5 – $MgCl_2$, 6 – $Na_2B_4O_7$, 7 – Na_2CO_3 , 8 – Na_3PO_4 , 9 – $Na_2P_2O_7$, 10 – УБС, на взаємодію діазосолей СА з ЕСЧ R. $C_{HCl} = 1.0 \text{ M}$, $C_{CA} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{NaNO_2} = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{Сечов.} = 4.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{ЕСЧR} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $pH = 8.0$, $\lambda = 485 \text{ nm}$.

Отримані дані свідчать, що аналітичний сигнал значно зростає у присутності тетраборат-іонів та УБС; систему стабілізує присутність сульфат-, карбонат-, амоній-іонів; присутність катіонів кальцію та магнію, а також пірофосфат-іонів негативно впливає на реакцію і зменшує значення аналітичного сигналу. Оскільки в оптимальних умовах взаємодії (рН=8.0) тетраборат-іони володіють меншою буферною ємністю, на відміну від УБС, то у наступних дослідженнях ми використовували УБС з концентрацією $4.0 \cdot 10^{-3}$ М.

Вплив концентрації азобарвника ЕСЧ R на його взаємодію з діазосолями СА. Досліджено залежність світлопоглинання продуктів взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R від надлишку самого реагента. Як показали результати досліджень, для оптимального виходу продуктів взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R необхідно використовувати 6-кратний надлишок азобарвника (рис. 4).

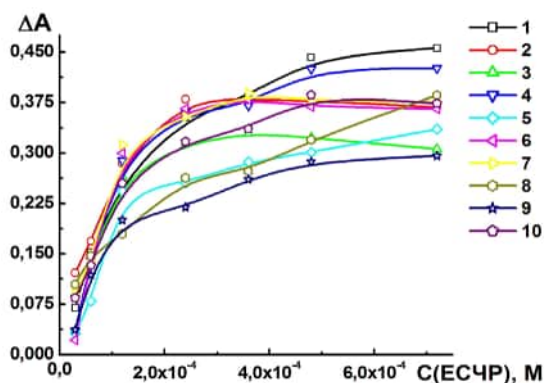


Рис. 4. Залежність виходу продуктів взаємодії ЕСЧ R з діазосолями СА: 1 – САМ, 2 – СМО, 3 – СМТ, 4 – СДМ, 5 – СМР, 6 – СТЗ, 7 – СГН, 8 – СМП, 9 – СММ, 10 – СДА від концентрації азореагента. $C_{\text{HCl}} = 1.0$ М, $C_{\text{CA}} = 6.0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 8.0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{Сечов.}} = 4.0 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{\text{ЕСЧ R}} = 3.6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{УБС}} = 4.0 \cdot 10^{-3}$ М, рН=8.0, $\lambda = 485$ нм.

Дослідження стабільності продуктів взаємодії СА з ЕСЧ R показало, що значення аналітичного сигналу не змінюється впродовж 20 хв, після чого ΔA починає повільно зменшуватись.

Спектрофотометричне дослідження продукту взаємодії діазосоли СА з ЕСЧ R. У процесі руйнування азогрупи ЕСЧ R можливе утворення двох частинок β -нафтолу, одна з яких містить замісник сульфогрупу (схема 1):

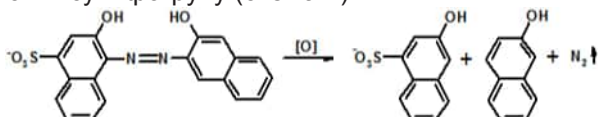


Схема 1. Схема руйнування ЕСЧ R під час окиснення.

З літературних даних відомо про азосполучення діазосолей СА з β -нафтолом, а продукт, що утворюється при цьому характеризується максимумом світло-

поглинання при 485 нм [12]. Наявність сульфогрупи у продуктах деструкції ЕСЧ R дезактивує її як азоскладову, тому з електрофільними сполуками може взаємодіяти лише незаміщений β -нафтол [34, 35]. Нами було перевірено чи може вступати в реакцію діазосіль СМТ з β -нафтолом власне в умовах її взаємодії з *o,o'*-ди-гідроксизаміщеним азобарвником (рис. 5).

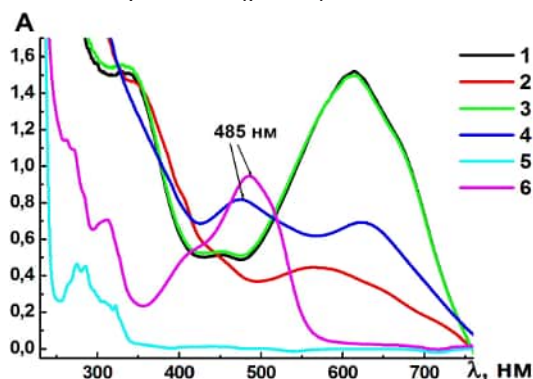


Рис. 5. Електронні спектри поглинання розчинів ЕСЧ R, β -нафтолу та продуктів їх взаємодії з діазосіллю СМТ: 1 – ЕСЧ R, 2 – NO_2^+ ЕСЧ R, 3 – $(\text{NO}_2^+ + \text{Сечов.}) + \text{ЕСЧ R}$, 4 – $(\text{СМТ} + \text{NO}_2^+ + \text{Сечов.}) + \text{ЕСЧ R}$, 5 – $(\text{NO}_2^+ + \text{Сечов.}) + \beta$ -нафтол, 6 – $(\text{СМТ} + \text{NO}_2^+ + \text{Сечов.}) + \beta$ -нафтол. $C_{\text{HCl}} = 1.0$ М, $C_{\text{СМТ}} = 6.0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 8.0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{Сечов.}} = 4.0 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{\text{ЕСЧ R}} = 3.6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\beta\text{-нафтол}} = 1.2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{УБС}} = 4.0 \cdot 10^{-3}$ М, рН 8.0.

Встановлено, що утворена сполука вступає у реакцію азосполучення з діазосіллю СМТ, а утворений продукт взаємодії СМТ з β -нафтолом характеризується максимумом світлопоглинання за 485 нм (рис. 5). Отже, максимум світлопоглинання, що спостерігається на ЕСП продуктів взаємодії СА з ЕСЧ R при 470–485 нм є максимумом світлопоглинання продукту взаємодії діазосоли СА з продуктом руйнування цього барвника, тобто з β -нафтолом. Це дає підстави зробити припущення про повільне окиснення азобарвника та швидке азосполучення непрореагованої діазосоли СМТ з продуктами окиснення ЕСЧ R, а саме з β -нафтолом з утворенням нової азосполуки. Таким чином, частина діазосоли СА витрачається на окиснення азогрупи барвника, а частина на утворення нових азосполук з продуктами окисно-відновної реакції. Однак, за однакових умов реакції їх частки в обох процесах постійні, що дало можливість розробити ефективні методики визначення СА за участю ЕСЧ R.

Потенціометрія СА з ЕСЧ R. Для підтвердження окисно-відновної взаємодії між СА та ЕСЧ R проведено редокс-титрування діазосоли СМТ розчинами ЕСЧ R (рис. 6) в умовах його спектрофотометричного визначення. Для цього у мірних колбах місткістю 25 мл отримували діазосіль СМТ, відповідно до умов максимального їх виходу та додавали різну кількість розчинів ЕСЧ R

з початковою концентрацією $C_{\text{ЕСЧ R}} = 1.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ і створювали оптимальне значення рН середовища. Потенціал заміряли після встановлення його постійного значення.

Під час титрування діазосолей СА простежується значне зниження потенціалу системи при додаванні азобарвника ($\Delta E = 200 \text{ мВ}$), спостерігається стрибок, що дозволяє стверджувати про окисно-відновну взаємодію діазосолей СМТ з ЕСЧ R, в результаті чого азогрупа барвника окиснюється та руйнується з виділенням N_2 , а утворені продукти деструкції вступають в реакцію азосполучення з діазосолями СА.

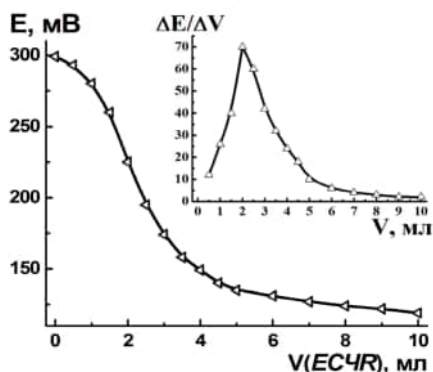


Рис. 6. Інтегральна та диференціальна криві окисно-відновного титрування діазосолей СМТ розчином ЕСЧ R. $C_{\text{HCl}} = 1.0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 1.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1.75 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов.}} = 0.875 \text{ M}$, $C_{\text{ЕСЧ R}} = 1.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, рН 8.0.

Вольтамперометрія СА з ЕСЧ R. Попередньо було перевірено полярографічну активність реагентів, що беруть участь в реакції взаємодії СА з ЕСЧ R (рис. 7 (1)). Встановлено, що в умовах максимального виходу продуктів реакції – сечовина та нітрит-іони не є полярографічно активними, про що свідчить відсутність піків на полярограмах процесу їх відновлення. Що стосується СМТ та його діазосолей, то на полярограмах спостерігається два піки – при -0.50 V та -1.41 V . В слабо-лужному середовищі (рН=8,0), де відбувається взаємодія СА з ЕСЧ R, сполуки, які містять первинну ароматичну аміногрупу (СА) або їх діазосолей, можуть взаємодіяти між собою з утворенням азосполук [34-36]. Піки на полярограмах відповідають відновленню утворених таким чином азогруп.

Результати полярографічного дослідження ЕСЧ R та продуктів їх взаємодії з діазосолями СА наведено на рис. 7 (2). На вольтамперограмі відновлення азобарвника ЕСЧ R спостерігається два піки відновлення азогрупи – при -0.59 V та -0.75 V . Присутність сечовини не впливає на полярографічні характеристики азобарвника. Однак, під дією нітрит-іонів висота піку відновлення азобарвника при -0.59 V зменшується, а пік при -0.75 V перетворюється в широке плече, що свідчить про руйнування азогрупи барвника. Під дією сечовини надлишок нітриту повністю

руйнується і полярограма відновлення азобарвника відповідає полярограмі відновлення азобарвника за відсутності нітрит-іонів.

Вигляд полярограми відновлення продукту взаємодії діазосолей СМТ з ЕСЧ R має аналогічний характер до полярограми взаємодії барвника з нітритом – зменшується висота піку при -0.60 V та перетворюється на широке плече пік при -0.75 V . Це свідчить про ідентичний вплив як нітрит-іонів, так і діазосолей СМТ на азобарвник, а саме – руйнування азогрупи барвника під дією обох реагентів. Потенціал піку відновлення азогрупи продукту взаємодії діазосолей СМТ з β -нафтолом рівний -0.55 V , однак сила струму її відновлення дуже мала, а на полярограмі продукту пік відновлення надлишку ЕСЧ R є значно вищим, тому маскує пік відновлення новоутвореної азосполуки.

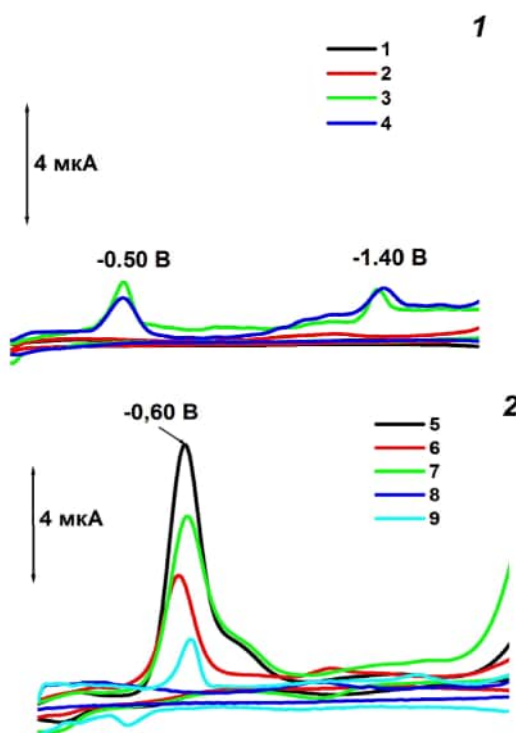


Рис. 7. Полярограми процесів відновлення: 1 – Сечов, 2 - NO_2^- , 3 – СМТ, 4 – СМТ+ NO_2^- , 5 - ЕСЧ R, 6 – NO_2^- +ЕСЧ R, 7 – (СМТ+ NO_2^- +Сечов.)+ЕСЧ R, 8 – β -нафтол, 9 – (СМТ+ NO_2^- +Сечов.)+ β -нафтол. $C_{\text{HCl}} = 1.0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов.}} = 4.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ЕСЧ R}} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, рН 8.0.

Результати спектрофотометричного дослідження продуктів взаємодії ЕСЧ R з діазосолями СА повністю узгоджуються з результатами вольтамперометричних і потенціометричних досліджень та дозволяють запропонувати гіпотетичну схему взаємодії СА з ЕСЧ R – окиснення азобарвника під дією солі діазонію СА з наступним азосполученням непрореагованих діазосолей СА з β -нафтолом, що утворюється у результаті руйнування азобарвника (схема 2).

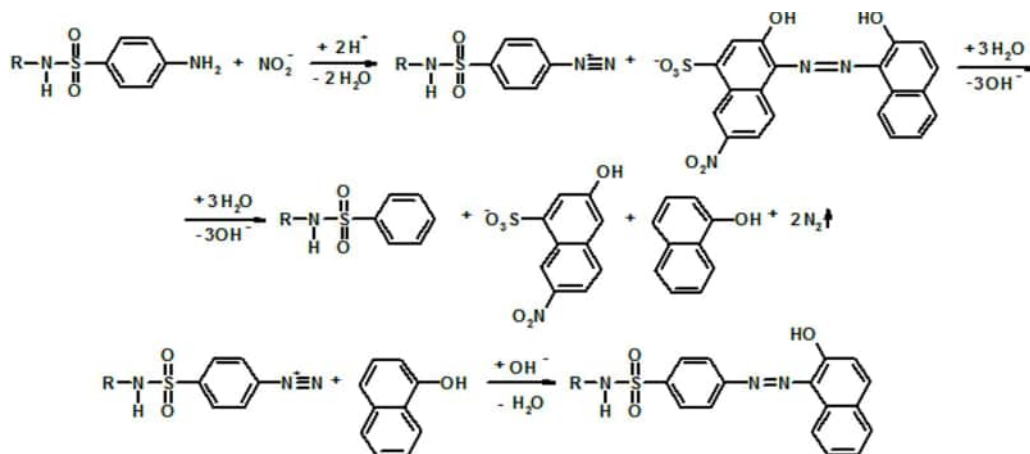


Схема 2. Гіпотетична схема взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R.

Спектрофотометричні та метрологічні характеристики визначення СА з ЕСЧ R. Встановлено, що величина аналітичного сигналу при визначенні СА з ЕСЧ R лінійно залежить від концентрації аналіту у розчині. Спектрофотометричні та метрологічні характеристики розроблених методик спектрофотометричного визначення десяти СА з ЕСЧ R наведено у табл. 2.

Існує кореляція між будовою СА та чутливістю їх визначення з ЕСЧ R. З схеми 3 видно, що найчутливішим є визначення СДМ, СМТ, які містять шестичленні гетероцикли з двома атоматами Нітрогену та двома замісниками метокси- або метил-радикалами, які виявляють +М-ефект [29, 34, 35]. Менш чутливим є визначення тих СА, що містять шестичленний гетероцикл з одним замісником (метил-радикал) – СМР або без замісників – СДА. З меншою чутливістю визначають СТЗ та СМО, молекули яких містять п'ятичленні гетероцикли з двома різними гетероатомами – Нітрогеном та

Сульфуром у першому випадку, та Нітрогеном і Оксигеном у другому. Ще менш чутливим є визначення СА, які містять у структурі шестичленні гетероцикли з двома атомами Нітрогену, та мають один замісник метоксил-радикал. З найменшою чутливістю визначаються САМ та СГН, як не мають гетероциклічних замісників.

Спектрофотометричне визначення СА у лікарських препаратах. Розроблені методики спектрофотометричного визначення СА з ЕСЧ R нами успішно використано для встановлення вмісту СА у однокомпонентних препаратах двох лікарських форм – таблеток та супозиторії. Результати визначення вмісту СА у лікарських засобах наведено в табл. 3.

Методика визначення СА з ЕСЧ R. До мірної колби об'ємом 25 мл вносять 5.0 мл 1.0 М хлоридної кислоти, аліквоту досліджуваного розчину в межах 8 – 64 мкг/мл (кінцева концентрація) СА, додають 0.5 мл 5.0 · 10⁻² М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв

Таблиця 2. Спектрофотометричні та метрологічні характеристики визначення СА з використанням ЕСЧ R. $C_{HCl} = 1.0 M$, $C_{NaNO_2} = 2.4 \cdot 10^{-3} M$, $C_{Сечов.} = 0.12 M$, pH 8.0, $\lambda = 475 \text{ nm}$, $n = 5$, $P = 0,95$

СА	$\epsilon \cdot 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Лінійність $C_{СА}$, мкг/мл	Рівняння графіка, $C_{СА}$, мкг/мл	$C_{мін}$, мкг/мл	$C_{н7}$, мкг/мл	R^2
САМ	1.1	11 – 64	$\Delta A = 0.008 + 0.013 \cdot C$	3.72	11.2	0.9998
СМО	2.1	7 – 64	$\Delta A = 0.003 + 0.016 \cdot C$	2.42	7.26	0.9992
СМТ	2.3	7 – 64	$\Delta A = 0.014 + 0.016 \cdot C$	2.51	7.54	0.9990
СДМ	2.1	6 – 64	$\Delta A = 0.023 + 0.014 \cdot C$	3.31	6.94	0.9993
СМР	1.4	14 – 64	$\Delta A = 0.004 + 0.013 \cdot C$	4.85	14.5	0.9995
СТЗ	1.9	7 – 64	$\Delta A = 0.009 + 0.014 \cdot C$	2.38	7.13	0.9993
СГН	1.1	15 – 64	$\Delta A = 0.010 + 0.012 \cdot C$	5.03	15.1	0.9997
СМП	1.3	15 – 64	$\Delta A = 0.026 + 0.011 \cdot C$	5.25	15.7	0.9991
СММ	1.3	14 – 64	$\Delta A = 0.019 + 0.012 \cdot C$	4.98	14.9	0.9995
СДА	1.8	7 – 64	$\Delta A = 0.011 + 0.016 \cdot C$	2.45	7.36	0.9996

ЕСЧR+CMT

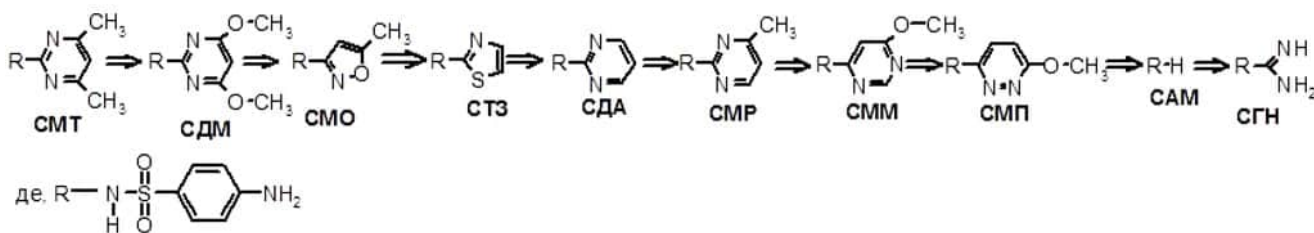


Схема 3. Ряд чутливості визначення десяти СА з ЕСЧ R.

при кімнатній температурі, додають 0.5 мл 2.5 М розчину сечовини, перемішують і витримують впродовж 10 хв при кімнатній температурі для руйнування надлишку нітриту, додають 1.5 мл $6.0 \cdot 10^{-3}$ М водного розчину ЕСЧR, вносять 2.5 мл 0.04 М розчину УБС, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 8.0 та доводять вміст колби до риски водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно “холостого” розчину проводять при $\lambda = 485$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію СА знаходять способом порівняння або за допомогою градувального графіка.

Пробопідготовка таблеток для визначення СА. У фарфоровій ступці розтирають двадцять таблеток до порошку, відбирають наважку, що містить 100 мг СА, вносять до мірної колби місткістю 100 мл, додають 50 мл 0.1 М розчином натрій гідроксиду для отримання витяжки СА, перемішують впродовж 10 хв. та доводять вміст колби до риски тим самим розчинником. Отриману суміш перемішують і фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості у конічну колбу. Фільтрат використовують для аналізу.

Пробопідготовка супозиторію для визначення СА. Наважку супозиторію, що містить 100 мг СА, вносять в хімічну склянку, додають 50 мл розчину 0.1 М натрій гідроксиду. Суміш нагрівають на водяній бані при температурі $\sim 80^\circ\text{C}$ не менше 10 хв до повного розплавлення мазі. Отриману суміш фільтрують крізь паперевий складчастий фільтр (біла стрічка) у мірну колбу об’ємом 100 мл (склянку зі сумішшю, до закінчення фільтрування, утримують у гарячій водяній бані для уникнення застигання препарату). Фільтр промивають декілька разів гарячим розчином 0.1 М натрій гідроксиду. Фільтрат охолоджують і доводять вміст колби до риски тим самим розчинником і використовують для аналізу.

Результати аналізів, наведені в табл. 3 свідчать, що одержані дані вмісту СА у лікарських засобах розробленою методикою з використанням ЕСЧ R добре корелюють з вмістом СА, заявленим виробником, а також з результатами, отриманими згідно з відповідною технічною документацією на зазначені препарати, а саме методом нітритометричного титрування. Значення S_r не перевищують типових значень похибок у спектрофотометрії.

Таблиця 3. Результати спектрофотометричного визначення СА з ЕСЧ R в однокомпонентних лікарських та ветеринарних препаратах $C_{\text{HCl}} = 1.0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 6.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{сечов.}} = 4.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ЕСЧR}} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, рН = 8.0, $\lambda = 485$ нм; $n = 5$, $P = 0,95$.

Визначуваний сульфаніламід (регламентований вміст у препараті)	Встановлений вміст $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ (S)	
	методом нітритометричного титрування	спектрофотометрично з ЕСЧ R
«Свічки внутрішньоматкові з сульфадимезином» супозиторій ТОВ Базальт, м. Київ (допоміжні речовини – поліетиленгліколь, пропіленгліколь)		
Сульфадимезин (300±30 мг/г)	298±11 (0.032)	300±16 (0.034)
«Стрептоцид» таблетки ВАТ «Дарниця» м.Київ (допоміжні речовини – крохмаль, желатин, аеросил, кальцій стеарат)		
Сульфаніламід (500±50 мг/табл)	504±16 (0.027)	492±24 (0.035)

Висновки

Проведені дослідження дозволили встановити умови взаємодії діазосолей СА з ЕСЧ R та на цій основі розробити альтернативну методику спектрофотометричного їх визначення. Хоча методика і поступається деяким відомим за простотою та експресністю, однак дана робота спрямована показати, що при взаємодії таких складних сполук як діазосоли СА та о,о'-дигідроксизаміщені азобарвники можливе утворення продуктів, які є стабільними аналітичними формати. Розроблена методика ефективно застосована для аналізу готових лікарських форм сульфаниламідних препаратів таблеток та супозиторію, і не вимагає розділення їх компонентів.

Література

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч. Учебное пособие. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: МЕДпресс-информ, 2007. С. 309–311.
2. Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В., Суранова А.В., Лутцева И.И., Евдокимова В.В. Разработка методов анализа глазных пленок, содержащих сульфаниламиды натрий. Хим.-фарм. журнал. 1982, № 3, 109–112.
3. Sadagora Ramanujam V.M., Gowda N.M., Trieff N.M., Legator M.S. Ultraviolet spectrophotometric assay of *p*-aminobenzenesulfonamides. *Microchem. J.* 1980, 25(3), 295–300.
4. Беликов В.Г., Степанюк С.Н., Байкова Г.Ф. Унификация спектрофотометрического анализа сульфаниламидных препаратов. Фармация. 1980, 29(3). 37–40.
5. Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Суранова А.В., Триус Н.В., Лутцева И.И., Евдокимова В.В., Герасимова Г.А. Анализ глазных пленок сложного состава. Хим.-фарм. журнал. 1983, №11, 1389–1394.
6. Тираспольская С.Г., Назарова Л.Е., Скибина В.В. Анализ лекарственных форм, содержащих сульфаниламидные препараты и димедрол. Фармация. 1984, 33(1), 67–69.
7. Vaid F.H.M., Aminuddin M., Mehmood K. *o*-Phthalaldehyde based spectrophotometric determination of sulfonamides. *Pakist. J. Pharm. Sci.* 2004, 17(2), 77–84.
8. Клокова Е.В., Дмитриенко С.Г. Спектрофотометрическое определение сульфаниламидов по реакции конденсации с *p*-диметиламинокоричным альдегидом. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008, 49(5), 339–343.
9. Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Левинсон Ф.С. Спектрофотометрическое и хроматографическое определение сульфаниламидов в биологических жидкостях и лекарственных формах. Журн. аналит. химии. 2000, 55(8), 888–895.
10. Ogoda Onah J., Eromi Odeiani J. Simultaneous spectrophotometric determination of sulfadoxine and pyrimethamine in pharmaceutical formulations. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2002, 30(3), 851–857.
11. Vijaya Raja G., Bala Sekaran C., Siva Kumari P., Parveen S.K., Mahesh P.V.S. Simple and rapid methods for the analysis of sulfonamide bacteriostatic antibiotic in dosage forms. *Orient. J. Chem.* 2008, 24(3), 1021–1024.
12. Shamsa F., Amani L. Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceuticals by visible and UV spectrophotometry. *Iranian J. Pharm. Res.* 2006, 1(1), 31–36.
13. Nagaraja P., Yathirajan H.S., Raju C.R., Vasantha R.A., Nagendra P., Hemantha Kumar M.S. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. *Il Farmaco.* 2003, 58(12), 1295–1300.
14. Nagaraja P., Sunitha K.R., Vasantha R.A., Yathirajan H.S. Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002, 53(1), 187–192.
15. Nagaraja P., Naik S.D., Sherestha A., Shiva-kumar A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. *Acta Pharm.* 2007, 57(3), 333–342.
16. Vijaya Raja G., Bala Sekaran C., Siva Kumari P. Simple and rapid methods for the analysis of sulfonamide bacteriostatic antibiotic in dosage forms. *Orient J. Chem.* 2008, 24(3), 1021–1024.
17. Nagaraja P., Sunitha K.R., Vasantha R.A., Yathirajan H.S. Rapid spectrophotometric determination of sulphonamide derivatives with resorcinol. *Indian J. Pharm. Sci.* 2002, 644(4), 391–393.
18. Nagaraja P., Yathirajan H.S., Sunitha K.R., Vasantha R.A. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. *J. AOAC Int.* 2002, 85(4), 234–250.
19. Sabry S.M. Enhanced spectrophotometry of sulfonamides with novel 2-acetylbutyrolactone derivatives. *Anal. Lett.* 2006, 39(13), 2591–2615.
20. Boiko M., Vrublevska T., Korkuna O., Teslyar G. Application of sulphanilamides disazo dyes with Tropaeolin O for simple, rapid and sensitive spectrophotometric assay of medicines. *Spectrochim. Acta A.* 2011, 79A(2), 325–331.
21. Бойко М., Врублевская Т., Коркуна О., Коцюмбас И., Тесляр Г. Спектрофотометрическое определение производных сульфаниламида с использованием 4-(2-пиридилазо) резорцина. Вопросы химии и химтехнологии. 2012, №2, 116–126.
22. Стоколоса Л.Я., Костюк І.М., Бойко М.Я. 4-(2-тіазолілазо) резорцин – новий реагент для визначення сульфаниламідів в різних лікарських формах. Тези доп. XIII Всеукр. Конф. студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії». Київ, 2012, С. 171.

23. Amjadi M., Manzoori J.L., Farzampour L. A new methodology for pharmaceutical analysis based on the competitive aggregation in an amphiphilic system. *Curr. Pharm. Anal.* 2009, 5(4), 432–437.
24. Amjadi M., Manzoori J.L., Farzampour L. Development of a new analytical spectroscopic methodology based on the competitive aggregation in a dye-surfactant-drug system: application to the determination of gemfibrozil. *Spectroscopy*. 2008, 22(4), 309–317.
25. Zhao Y., Chang W., Ci Y. Rapid and sensitive determination of protein by light-scattering technique with eriochrome blue-black R. *Talanta*. 2003, 59(3), 477–484.
26. The Merck Index. 11-th, N.J., USA: *Merck&Co., Inc.*, 1989. P. 8871–8917.
27. European Pharmacopoeia. 7-th Ed. Strasbourg: *Council of Europe*, 2010. P. 3005–3016.
28. Червяков Д.К., Евдокимов П.Д., Вишкер А.С. Лекарственные средства в ветеринарии. Москва: Колос, 1970. С. 260–269.
29. Агрономов А.Е. Избранные главы органической химии: Учеб. Пособие для вузов. Москва: Химия, 1990. С. 424–462.
30. Ryan A., Laurieri N., Westwood I., Wang C.-J., Lowe E., Sim E. A novel mechanism of azoreduction. *J. Mol. Biol.* 2010, 400, 24–37.
31. Pirillo S., Ferreira M.L., Rueda E.H. The effect of pH in the adsorption of alizarin and eriochrome blue black R onto iron oxides. *J. Hazardous Materials*. 2009, 168(1), 68–178.
32. Тимошук С., Левицька Г. Вольтамперометричне відновлення солохромового темно-синього на ртутному крапельному електроді. Вісн. Львів. у-ту. Серія хім. 2004, 44, 127–132.
33. Issa I.M., Temerk Y.M., Issa I.M., Ghoneim M.M. The polarographic behavior of some azo-azomethine compounds in solution of varying pH at the DME. *Z. Phys. Chemie*. 1976, 257(2), 257–265.
34. Цоллингер Г. Химия азокрасителей. Пер.с нем. Порай-Кошиц Б.А. Ленинград: Госхимиздат, 1960. С. 160–169.
35. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. Москва: Химия, 1977. С. 237–245.
36. Венкатараман К. Химия синтетических красителей. Т. 3. Ленинград: Химия, 1974. С. 1890–1909.