

УДК 543.422.3:[547.541.521+547.565]

ВИКОРИСТАННЯ ЕРІОХРОМ СИНЬОГО SE ЯК АНАЛІТИЧНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАНІЛАМІДІВ

М. Бойко^{1,2}, Т. Врублевська¹, О. Коркуна¹, Г. Тесляр²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних
препаратів та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, 79019 Львів, Україна,
boiko_maria@ukr.net

Розроблено нову методику спектрофотометричного визначення сульфаніламідів у готових лікарських формах з використанням *o,o'*-дигідроксизаміщеного азобарвника еріохром синього SE, яка ґрунтується на реакції азосполучення діазосоли сульфаніламіду з продуктом окисно-відновного руйнування барвника – хромотроповою кислотою з утворенням нової азосполуки. Обчислено спектрофотометричні характеристики аналітичних форм для десяти сульфаніламідів ($\bar{\epsilon}_{380}=(0,6-1,1)\cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹) та метрологічні характеристики розроблених методик (межі лінійності – від 14 до 80 мкг/мл).

Ключові слова: сульфаніламіди, еріохром синій SE, спектрофотометрія, лікарська форма.

Сульфаніламіди (СА) – група хімічних речовин, похідних 4-амінобензол-сульфонаміду, один з найстаріших класів синтетичних антибактеріальних засобів, які суттєво вплинули на можливість успішного вирішення проблеми боротьби з багатьма інфекційними захворюваннями. Хоча СА, як бактеріостатики, поступаються протимікробною активністю антибіотикам, проте виявляють меншу побічну дію. Незважаючи на існування активніших антибактеріальних препаратів, СА й надалі широко застосовують у лікуванні інфекційних патологій [1–4].

Для оцінки якості сульфаніламідних препаратів використовують спектрофотометричні, електрохімічні, титриметричні, флюорометричні та хроматографічні методи. Спектрофотометрія – один із традиційних методів кількісного аналізу СА. Методики спектрофотометричного визначення СА можна розділити на три групи: визначення за власним поглинанням в УФ-ділянці спектра [5–9], за продуктами азосполучення діазосолей СА з органічними реагентами [10–17] та прямої взаємодії СА з органічними речовинами різних класів [18–22]. Проте більшість методик має низку недоліків: аналітична реакція відбувається в жорстких умовах; важкодоступні реагенти доволі часто доводиться синтезувати; тривале нагрівання; використання токсичних органічних розчинників. Описані в літературі дані щодо оптимальних

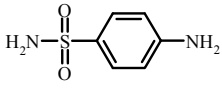
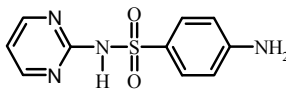
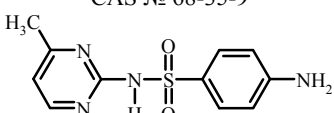
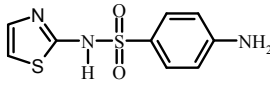
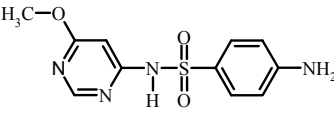
умов діазотування СА є досить суперечливими і дуже залежать від подальшої взаємодії з різними реагентами, що потребує їхнього уточнення для кожного конкретного визначення.

У літературі практично немає відомостей про використання барвників для визначення СА, хоча ці речовини є широко вживаними реагентами в аналітичній хімії. Раніше ми розробили методики спектрофотометричного визначення СА з використанням резорциновмісних азореагентів – кислотного моноазобарвника тропеоліну О [23, 24], гетероциклічних азореагентів 4-(2-піридилазо)-резорцину [25, 26] та 4-(2-тіазолілазо) резорцину [27], які мають високу чутливість та селективність щодо інших класів біологічно активних речовин. Крім них, подібну будову має група *o,o'*-дигідроксизаміщених азобарвників, у яких наявні дві *OH*-групи, що розміщені в *o*-положенні до азогрупи. Серед них – еріохром синій SE (ЕС SE), який зрідка використовують у неорганічному аналізі, зокрема, для концентрування магнію на модифікованому азобарвником силікагелі з подальшим визначенням його хроматографічним методом [28], для спектрофотометричного визначення кальцію [29] та титриметричного визначення цинку [30], і немає даних щодо використання цього реагенту в органічному аналізі. Ми з'ясували, що ЕС SE вступає у взаємодію з СА [31], тому ми дослідили умови взаємодії СА з цим *o,o'*-дигідроксизаміщеним азобарвником, щоб розробити нову спектрофотометричну методику визначення СА у готових лікарських формах із задовільними аналітичними характеристиками.

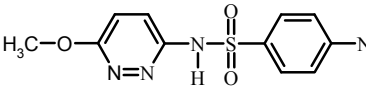
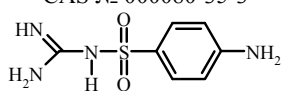
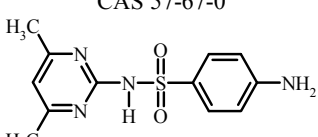
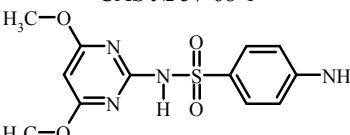
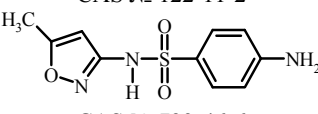
Вивчали взаємодію десяти найпоширеніших у лікарській практиці СА (табл. 1).

Таблиця 1

Фізико-хімічні характеристики сульфаніламідів

Структурна формула	Назва	Деякі характеристики [2-4]
1	2	3
 CAS № 63-74-1	Сульфаніламід, стрептоцид (САМ), 4-амінобензол сульфонамід	М = 172,2 г/моль; рК ₁ = — рК ₂ = 10,1
 CAS № 68-35-9	Сульфадіазин (СДА), 4-аміно- <i>N</i> -(2-піримідиніл) бензосульфонамід	М = 250,3 г/моль; рК ₁ = 2,49 рК ₂ = 6,48
 CAS № 127-79-7	Сульфамеразин (СМР), 4-аміно- <i>N</i> -(4-метил-2- піридиніл) бензосульфонамід	М = 264,3 г/моль; рК ₁ = — рК ₂ = 7,00
 CAS 72-14-0	Сульфатіазол (СТЗ), 4-аміно- <i>N</i> -(1,3-тіазол-2-іл) бензосульфонамід	М = 255,3 г/моль; рК ₁ = 2,62 рК ₂ = 7,37
 CAS 1220-83-3	Сульфамометоксин (СММ), 4-аміно- <i>N</i> -(5- метокси-2-піримідиніл) бензосульфонамід	М = 280,3 г/моль; рК ₁ = 2,51 рК ₂ = 7,28

Закінчення табл. 1

1	2	3
 <p>CAS № 000080-35-3</p>	Сульфаметоксипіридазин (СМП), 4-аміно- <i>N</i> -(6-метоксипіридазин-3-іл) бензосульфонамід	М = 280,3 г/моль; pK ₁ = — pK ₂ = 7,20
 <p>CAS 57-67-0</p>	Сульфагуанідин (СГН), 4-аміно- <i>N</i> -(діамінометилєн) бензосульфонамід	М = 214,2 г/моль; pK ₁ = 2,72 pK ₂ = 11,82
 <p>CAS № 57-68-1</p>	Сульфаметазин (СМТ), 4-аміно- <i>N</i> -(2,4-диметил-2-піридиніл) бензосульфонамід	М = 278,3 г/моль; pK ₁ = 2,65 pK ₂ = 7,58
 <p>CAS № 122-11-2</p>	Сульфадиметоксин (СДМ), 4-аміно- <i>N</i> -(2,6-диметокси-4-піримідиніл) бензосульфонамід	М = 310,3 г/моль; pK ₁ = 2,65 pK ₂ = 6,82
 <p>CAS № 723-46-6</p>	Сульфаметоксазол (СМО), 4-аміно- <i>N</i> -(5-метил-3-ізоксазоліл) бензосульфонамід	М = 253,3 г/моль; pK ₁ = 1,74 pK ₂ = 5,70

Розчини сульфаніламідів: сульфаметоксазолу, сульфаметазину, сульфамеразину, сульфадиметоксину, сульфатіазолу, сульфадіазину, сульфаметоксипіридазину, сульфамонетоксину, готували розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині натрій гідроксиду. Розчини сульфаніаміду готували розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині хлоридної кислоти; розчини сульфагуанідину – розчиненням точної наважки реактивів фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich у суміші 50 % 0,1 М розчину хлоридної кислоти та 30 % етилового спирту (96 %).

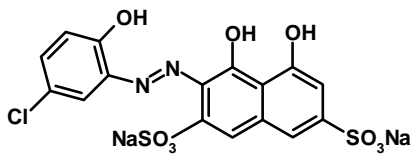
Розчини еріохром синього SE (табл. 2) готували розчиненням точної наважки реактиву фірми “Merck”, (вміст основної речовини не менше 95 %) у 50 % водно-етанольному розчині.

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 – розчиненням реактиву кваліфікації х.ч. у дистильованій воді.

Таблиця 2

Структурна формула та деякі характеристики *o,o'*-дигідроксизаміщеного азобарвника
 EC SE (С.І. 16680, CAS № 1058-92-0) [29, 30]

Формула	Характеристики
	Темно-синій порошок $pK_{H_3,Ind} = 3,9$; червоний $pK_{H_2,Ind^-} = 6,4$; червоний; $pH < 6$ $pK_{HInd^{2-}} = 11,5$; $\epsilon_{615} = 2,35 \cdot 10^4$ *; $pH = 10$; Ind^{3-} оранжевий; $pH > 12$

* Згідно з сертифікатом якості.

Світлопоглинання вимірювали на фотоколориметрі КФК-2 – УХЛ 4.2 (Україна) та сканувальних спектрофотометрах CARY.WIN – UV-VIS-50 (Varian, США) і SPECORD M-40 (Carl Zeiss Jena, Німеччина) в кюветках $l = 1$ см.

Значення pH вимірювали pH -метром PB 11 (Sartorius, Німеччина), та pH -150 М (РУП “Гомельський завод измерительных приборов”, Білорусь) з аргентум хлоридними електродами порівняння. Необхідне значення pH середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду.

Результати досліджень засвідчили, що жоден представник сульфаниламідного ряду безпосередньо не взаємодіє з EC SE. Однак діазосоли СА утворюють забарвлену сполуку з барвником у слабколужному середовищі. На рис. 1 показано електронні спектри світлопоглинання розчину азобарвника та продуктів його взаємодії з діазосолями СА. Для азобарвника характерний максимум світлопоглинання за 520 нм, а для продуктів аналітичної реакції – поява плеча світлопоглинання в межах 360–400 нм та зменшення максимуму поглинання самого барвника. Тому всі подальші дослідження проводили, вимірюючи оптичну густину розчинів за 380 нм. З'ясовано, що надлишок нітрит-іонів, який використовують для отримання солей діазонію, вступає в реакцію з барвником, значно зменшуючи максимум поглинання самого барвника. Тому нітрит-іони, що не вступили в реакцію з СА, необхідно усувати з реакційного середовища дією сечовини або сульфамінової кислоти.

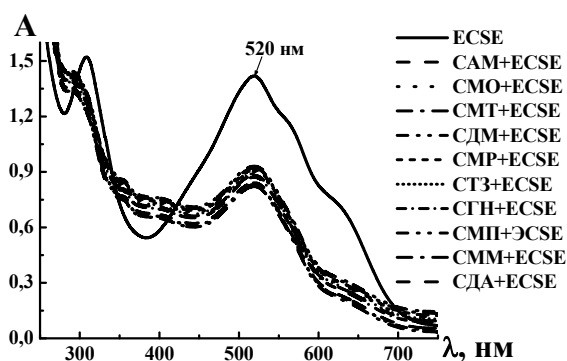


Рис. 1. Електронні спектри поглинання розчинів EC SE та продуктів його взаємодії з діазосолями СА. $C_{HCl} = 1,0$ М, $C_{CA} = 1,8 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 8,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{сечов} = 4,0 \cdot 10^{-2}$ М, $C_{ECSE} = 3,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{УВС} = 4,0 \cdot 10^{-3}$ М, $pH = 7,5$, $\lambda = 380$ нм

У табл. 3 наведено визначені експериментально оптимальні умови діазотування СА для отримання максимального аналітичного сигналу під час взаємодії їхніх діазосолей з ECSE.

Таблиця 3

Оптимальні умови діазотування СА та одержання їхніх забарвлених сполук з ECSE і їхні спектрофотометричні характеристики

Концентрація HCl	1,0 моль/л
Концентрація NaNO ₂	>3-кратний надлишок до концентрації СА
Тривалість реакції	20 хв при 20°C (10 хв за 0 °C)
Концентрація сечовини	>50-кратний надлишок до NaNO ₂
Тривалість реакції	10 хв за 20 °C

Для визначення умов максимального виходу продуктів взаємодії діазосолей СА з ECSE досліджено вплив рН середовища на реакцію. З графіків рис. 2 бачимо, що максимальний вихід продуктів реакції для більшості діазосолей СА з ECSE простежується у нейтральному та слабколужному середовищі в межах рН від 6,5 до 9,0.

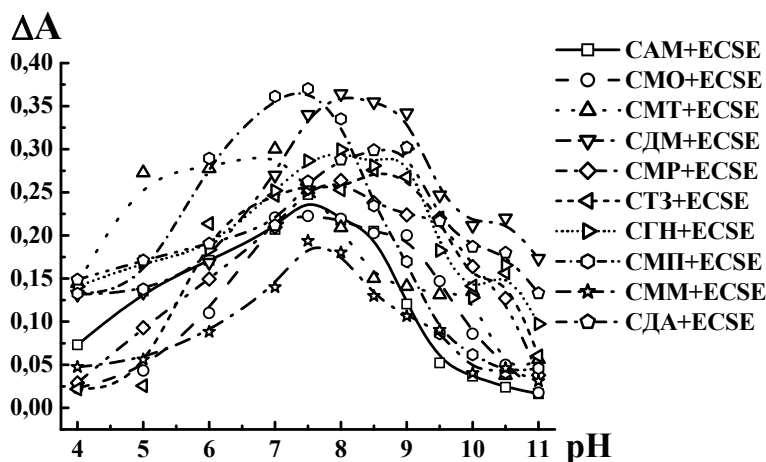


Рис. 2. Вплив кислотності середовища на зміну світлопоглинання продуктів реакції під час взаємодії діазосолей СА з ECSE. $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ECSE}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\lambda = 380 \text{ нм}$

Оскільки реакції між азобарвником та діазосолями СА відбуваються у слабколужному середовищі, то для пришвидшення процедури аналізу і поліпшення відтворюваності результатів їх треба проводити за наявності буферних розчинів. З метою підбору буферної суміші та створення стабільних умов для взаємодії діазосолей СА з ECSE досліджено вплив природи і концентрації різних аніонів та катіонів на максимальний вихід продуктів реакції (рис. 3).

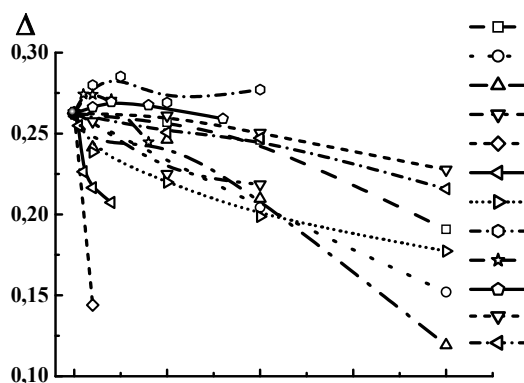


Рис. 3. Вплив природи та концентрації електролітів на взаємодію діазосолей СА з ECSE.
 $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ECSE}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,5$,
 $\lambda = 380 \text{ нм}$

Отримані дані свідчать, що аналітичний сигнал значно зростає за наявності тетраборат-іонів та універсальної буферної суміші (УБС); систему стабілізує наявність сульфат-, карбонат-, амоній-іонів; наявність катіонів кальцію та магнію, а також пірофосфат-іонів негативно впливає на реакцію і зменшує значення аналітичного сигналу. За оптимальних умов взаємодії ($\text{pH} = 6-9$) тетраборат-іони у концентраціях, за яких не знижують аналітичного сигналу, мають меншу буферну ємність, на відміну від УБС, тому в подальших дослідженнях ми використовували УБС з концентрацією $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Відомо, що певний надлишок реагенту сприяє зміщенню рівноваги реакції в бік утворення продуктів реакції, що дає змогу отримати максимальний вихід забарвленого продукту. З цих міркувань досліджено залежність світлопоглинання продуктів взаємодії діазосолей СА з ECSE від надлишку самого азореагенту. Як засвідчили результати досліджень, для оптимального виходу продуктів взаємодії діазосолей СА з ECSE необхідно використовувати 2-кратний надлишок азобарвника (рис. 4).

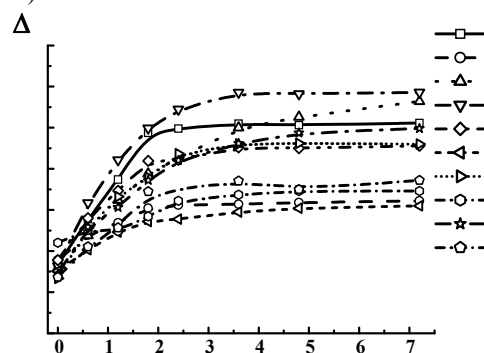


Рис. 4. Залежність виходу продуктів взаємодії діазосолей СА з ECSE від концентрації азореагенту. $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{AB}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$,
 $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,5$, $\lambda = 380 \text{ нм}$

Взаємодія між СА та ЕСSE відбувається у дві стадії, тому порядок змішування реагентів має важливе значення для максимального виходу кінцевих продуктів реакції. Результати дослідження впливу порядку додавання реагентів на значення аналітичного сигналу наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Вплив порядку додавання реагентів на взаємодію СА з ЕСSE; $C_{\text{HCl}}=1,0\text{M}$, $C_{\text{CA}}=1,8\cdot 10^{-4}\text{M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0\cdot 10^{-4}\text{M}$, $C_{\text{Сечов}}=4,0\cdot 10^{-2}\text{M}$, $C_{\text{АБ}}=3,6\cdot 10^{-4}\text{M}$, $C_{\text{УЕС}}=4,0\cdot 10^{-3}\text{M}$, $\text{pH}=7,5$, $\lambda=380\text{nm}$

Процес	Порядок додавання реагентів	$\Delta A_{\text{ЕСSE}}$
Діазотування	$[\text{HCl} + \text{CA} + \text{NaNO}_2]_{20\text{ хв}} + \text{Сечов.}$	0,247
	$[\text{CA} + \text{HCl} + \text{NaNO}_2]_{20\text{ хв}} + \text{Сечов.}$	0,243
	$[\text{HCl} + \text{NaNO}_2 + \text{CA}]_{20\text{ хв}} + \text{Сечов.}$	0,182
Взаємодія діазосоли СА з ЕСSE	$[\text{CA}_{\text{діаз.}} + \text{АБ} + \text{NaOH}] \rightarrow \text{pH}$	0,250
	$[\text{CA}_{\text{діаз.}} + \text{NaOH}] \rightarrow \text{pH} + \text{АБ}$	0,202

З табл. 4 бачимо, що максимальний вихід продукту реакції простежується, за умов діазотування СА, коли у розчин кислоти вносять аліквоту розчину СА, додають розчин натрій нітриту, після чого його надлишок усувають сечовиною. Хоча взаємодія між реагентами та солями діазонію СА відбувається у лужному середовищі, у разі початкового підлучення розчину діазосоли вона руйнується, не провзаємодіявши з реагентом. Взаємодію діазосоли СА з ЕСSE найефективніше проводити у такій послідовності: до кислого розчину діазосоли СА додають розчин азобарвника, буферний розчин і лише тоді розчин натрій гідроксиду до відповідного значення pH 7,5.

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

Співвідношення компонентів у сполуках діазотованих СА з ЕСSE визначали методом ізомольних серій (рис. 5). Хоча відомо, що метод ізомольних серій використовують для систем метал-органічний реагент, проте в літературі є дані про застосування цього методу для систем з двома органічними сполуками, у якій одна є аналітом, а інша – реагентом [32]. Результати свідчать про співвідношення компонентів у реакційній суміші під час взаємодії діазотованих СА з азобарвником у середньому – 2:3. Отримані результати доводять, що у цьому випадку відбувається не просте приєднання реагентів, а ймовірно окисно-відновна взаємодія діазосоли СА з азобарвниками та можлива реакція за участю утворених продуктів, що потребує окремого вивчення. Ці співвідношення відображають не склад сполук, а лише оптимальне співвідношення компонентів у реакційному середовищі.

З огляду на визначені умови взаємодії СА з азобарвником, а також впливу нітрит-іонів на самі азобарвники ми припустили наявність окисно-відновного процесу між діазосолями СА та ЕСSE. У випадку окисно-відновної реакції необхідно з'ясувати, чи бере в ній участь кисень, що завжди наявний у реакційному середовищі. Для цього ми дослідили взаємодію СА з ЕСSE за наявності кисню повітря та у безкисневому середовищі. Розчинений кисень з розчинів речовин, що реагують, а також з самої реакційної суміші видаляли барботуванням аргону впродовж 15 хв безпосередньо перед підведенням кислотності середовища до необхідного значення в герметичному пристрої. Отримані спектри світлопоглинання показано на рис. 6.

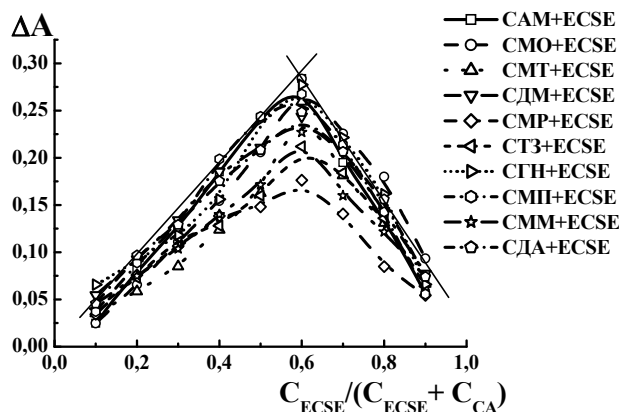


Рис. 5. Визначення співвідношення компонентів у системах сульфаніламід – азобарвник. $C_{HCl} = 1,0 M$, $C_{NaNO_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} M$, $C_{Cechov} = 4,0 \cdot 10^{-2} M$, $C_{CA} + C_{ECSE} = 4,8 \cdot 10^{-4} M$, $C_{ybc} = 4,0 \cdot 10^{-3} M$, $pH = 7,5$, $\lambda = 380 nm$

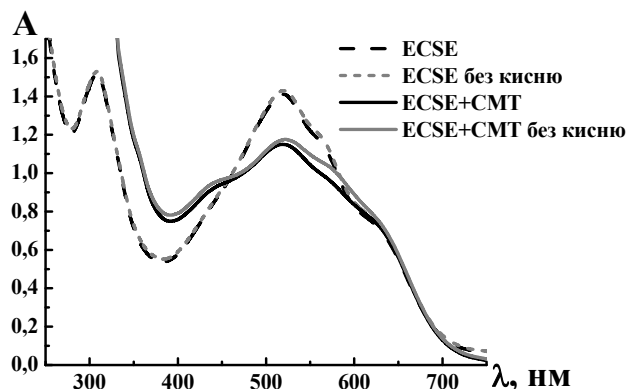


Рис. 6. Електронні спектри поглинання розчинів ECSE та продуктів їхньої взаємодії з діазосіллю CMT, отриманих за наявності та без розчиненого кисню. $C_{HCl} = 1,0 M$, $C_{CA} = 1,8 \cdot 10^{-4} M$, $C_{NaNO_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} M$, $C_{Cechov} = 4,0 \cdot 10^{-2} M$, $C_{ECSE} = 3,6 \cdot 10^{-4} M$, $C_{ybc} = 4,0 \cdot 10^{-3} M$, $pH = 7,5$

Одержані електронні спектри світлопоглинання (див. рис. 6) свідчать, що наявність кисню не впливає на взаємодію. Спектри азобарвника, отримані після видалення кисню з реакційного середовища, практично збігаються зі спектрами їхніх розчинів, через які не продували аргон. Спектри продуктів взаємодії, отримані таким самим способом, також практично збігаються. Отже, можна стверджувати, що кисень не бере участі в утворенні забарвлених сполук діазосолей CMT з ECSE, а окисно-відновна взаємодія з азобарвником зумовлена окиснювальними властивостями саме солей діазонію.

Оскільки спектрофотометричними дослідженнями з'ясовано, що співвідношення компонентів у досліджуваних системах не становить 1:1, і прямого сполучення СА з азобарвником не відбувається, то ймовірно між ними виникає редокс-реакція. Крім того, з'ясовано, що дія як нітрит-іонів, так і діазосолей СА на спектри ЕС SE є подібною: зменшується максимум світлопоглинання самого барвника – руйнується його хромофорна система, тобто азогрупа. Під дією нітрит-іонів та солей діазонію відбувається окиснення азогрупи, можливо, аж до повного її руйнування. Однак простежується також відмінність у дії діазосолей СА та нітрит-іонів під час взаємодії з ЕС SE: лише під дією солі діазонію з'являється плече світлопоглинання при 360–400 нм.

У процесі руйнування азогрупи ЕС SE можливе утворення двох сполук – *n*-хлорфенолу та хромотропової кислоти (4,5-дигідрокси-2,7-нафталіндисульфокислота) (рис. 7). З літературних даних відомо про азосполучення діазосолей СА з хромотроповою кислотою, а продукти, що утворюються в цьому випадку, мають максимуми світлопоглинання за 530 нм [33]. Хлор у *n*-хлорфенолі ускладнює електрофільне заміщення, оскільки має сильний негативний індуктивний ефект та малий позитивний мезомерний ефект, крім того, у молекулі наявна неузгоджена орієнтація замісників, тому електрофільне заміщення в ароматичному кільці малоймовірне. Тоді як інший продукт деструкції – хромотропова кислота – може вступати в реакцію азосполучення з діазоскладовою. Ми перевірили, чи може вступати в реакцію діазосіль СМТ з хромотроповою кислотою власне в умовах її взаємодії з ЕС SE.

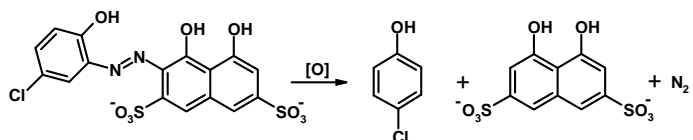


Рис. 7. Схема руйнування еріохрому синього SE під час окиснення

З'ясовано, що хромотропова кислота вступає в реакцію азосполучення з діазосіллю СМТ, а утворений продукт має широке плече світлопоглинання в межах довжин хвиль 360–410 нм (рис. 8, 1). Літературні дані щодо відсутності взаємодії діазосолей СА з *n*-хлорфенолом підтвержені експериментально. З даних, зображених на рис. 8, 2, бачимо, що ЕСП власне *n*-хлорфенолу і за наявності діазосолі СМТ практично збігаються, що свідчить про те, що взаємодії між ними нема. Під час взаємодії ЕС SE з діазосолями СА плече світлопоглинання, яке спостерігають на ЕСП продуктів, зумовлене поглинанням продукту взаємодії діазосолі СМТ з хромотроповою кислотою (див. рис. 8,3).

Спектрофотометричні та метрологічні характеристики сполук СА з ЕС SE підсумовано в табл. 5. Виявлено, що аналітичний сигнал у разі визначення десяти СА з ЕС SE лінійно залежить від концентрації аналіту в розчині в межах концентрацій від 14–23 до 80 мкг/мл для різних СА.

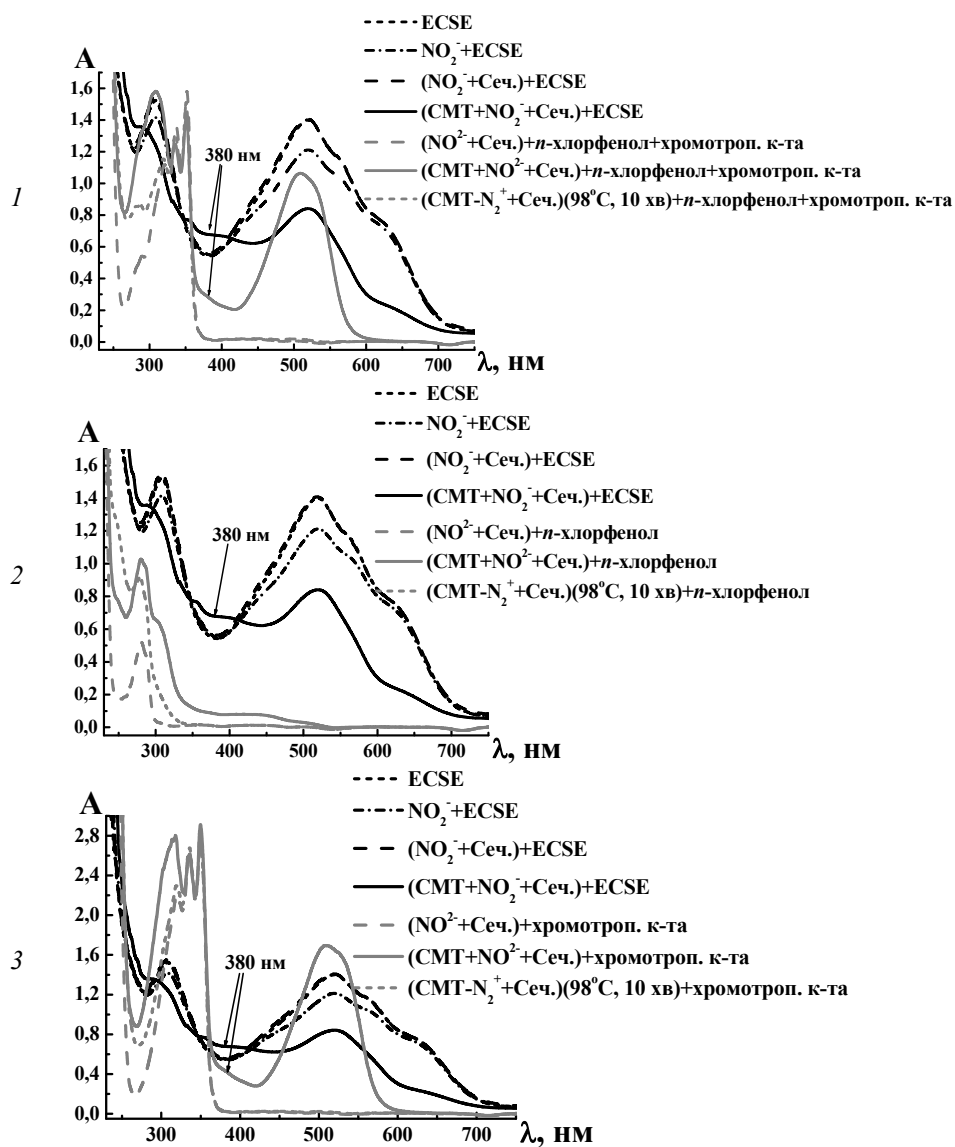


Рис. 8. Електронні спектри поглинання розчинів ECSE, *p*-хлорфенолу, хромотропової кислоти і продуктів їхньої взаємодії з діазосіллю CMT.
 $C_{\text{HCl}}=1,0 \text{ M}$, $C_{\text{CA}}=6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}}=4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ЕЧТ}}=C_{\text{ЕСЧР}}=C_{\text{ЕССЕ}}=3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$,
 $C_{\text{п-хлорфенол}}=C_{\text{хромотроп. к-та}}=1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}}=4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, pH 8,0

Спектрофотометричні та метрологічні характеристики сполук СА з ECSE підсумовано в табл. 5. Виявлено, що аналітичний сигнал у разі визначення десяти СА з ECSE лінійно залежить від концентрації аналіту в розчині в межах концентрацій від 14–23 до 80 мкг/мл для різних СА.

Таблиця 5

Спектрофотометричні та метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення СА з використанням ECSE, $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 4,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}} = 0,24 \text{ M}$, $C_{\text{ECSE}} = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,5$, $\lambda = 380 \text{ нм}$; $n = 5$, $P = 0,95$

СА	$\varepsilon \cdot 10^{-2}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Лінійність $C_{\text{СА}}$, мкг/мл	Рівняння графіка, $C_{\text{СА}}$, мкг/мл	$C_{\text{мін}}$, мкг/мл	$C_{\text{н}}$, мкг/мл	R
САМ	5,6	21 – 80	$\Delta A = 0,019 + 0,008 \cdot C$	7,05	21,2	0,9992
СМО	7,1	14 – 80	$\Delta A = 0,016 + 0,005 \cdot C$	5,14	15,4	0,9991
СМТ	10,0	14 – 80	$\Delta A = 0,009 + 0,006 \cdot C$	4,96	14,9	0,9995
СДМ	10,8	15 – 80	$\Delta A = 0,047 + 0,005 \cdot C$	5,05	15,2	0,9997
СМР	9,3	22 – 80	$\Delta A = 0,016 + 0,006 \cdot C$	7,54	22,6	0,9994
СТЗ	8,3	15 – 80	$\Delta A = 0,008 + 0,006 \cdot C$	5,02	15,1	0,9991
СГН	5,6	23 – 80	$\Delta A = 0,019 + 0,005 \cdot C$	7,67	23,0	0,9997
СМП	5,8	22 – 80	$\Delta A = 0,002 + 0,005 \cdot C$	7,52	22,6	0,9993
СММ	7,1	14 – 80	$\Delta A = 0,017 + 0,005 \cdot C$	4,93	14,8	0,9994
СДА	7,9	15 – 80	$\Delta A = 0,005 + 0,006 \cdot C$	5,09	15,3	0,9998

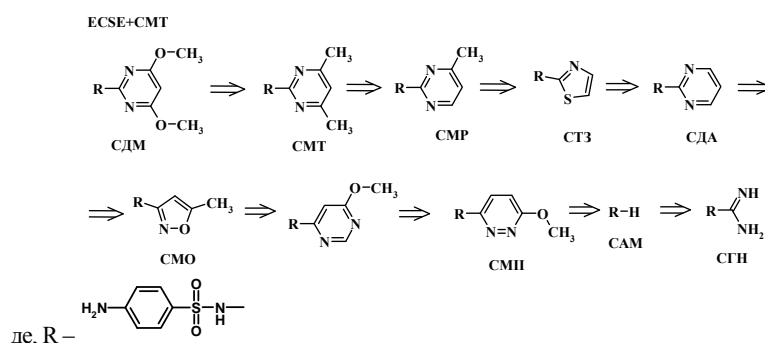


Рис. 9. Ряди чутливості визначення десяти СА з ECSE

Як бачимо з табл. 5 та рис. 9, за допомогою ECSE найчутливішим є визначення СДМ, СМТ, які містять шестичленні гетероцикли з двома атомати нітрогену та двома замісниками метокси- або метил-радикалами, які мають +M-ефект. Менш чутливе визначення тих СА, які 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 киснем у другому. Ще менш чутливим є визначення тих СА, які містять у структурі шестичленні гетероцикли з двома атомами нітрогену, однак мають один замісник метоксил-радикал. З найменшою чутливістю можна визначати САМ та СГН, у молекулах яких немає гетероциклічних замісників [34–36].

Методика визначення СА з ECSE. До мірної колби об'ємом 25 мл вносять 5,0 мл 1,0 М хлоридної кислоти, аліквоту досліджуваного розчину в межах 16–80 мкг/мл (кінцева концентрація) СА, додають 0,5 мл $5,0 \cdot 10^{-2}$ М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують упродовж 20 хв за кімнатної температури, додають 0,5 мл 2,5 М розчину сечовини, перемішують і витримують впродовж 10 хв за кімнатної температури для руйнування надлишку нітриту, додають 1,5 мл $6,0 \cdot 10^{-3}$ М водного розчину ECSE, вносять 2,5 мл 0,04 М розчину УБС, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до pH 7,5. Інтенсивність світлопоглинання

досліджуваного розчину щодо “холостого” розчину вимірюють при $\lambda = 380$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію СА знаходять способом порівняння або за допомогою градуувального графіка.

Правильність спектрофотометричних методик визначення СА з ЕС SE перевіряли в ході аналізування модельних розчинів, що містили відповідні СА, способом “уведено-знайдено”. Результати наведено у табл. 6.

Таблиця 6

Результати спектрофотометричного визначення СА з ЕС SE у модельних розчинах
 $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $C_{\text{ЕС SE}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,5$, $\lambda = 380 \text{ нм}$, $n = 5$, $P = 0,95$

СА	Уведено, мкг	Знайдено	
		$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$, мкг	S_r
САМ	100	102 ± 2	0,022
СМО		102 ± 2	0,021
СМТ		101 ± 2	0,014
СДМ		101 ± 2	0,019
СМР		101 ± 3	0,021
СТЗ		101 ± 3	0,023
СГН		102 ± 2	0,021
СМП		98 ± 2	0,022
СММ		101 ± 3	0,024
СДА		99 ± 3	0,025

Як впливає з наведених результатів, одержані дані добре корелюють з уведеною кількістю СА в модельних розчинах у межах похибки фотометричних методів, тому розроблені методики визначення цих антибактеріальних речовин за допомогою досліджуваних реагентів можна ефективно використати для аналізування готових лікарських форм.

Розроблені методики спектрофотометричного визначення СА з ЕС SE ми успішно застосували для визначення вмісту СА в однокомпонентних препаратах різних лікарських форм, а саме: у супозиторіях і таблетках. Результати визначення вмісту СА у лікарських засобах наведено в табл. 7.

Пробопідготовка таблеток для визначення СА. У фарфоровій ступці розтирають 20 таблеток до порошку, відбирають наважку, що містить 100 мг СА згідно з вмістом у препараті, вносять до мірної колби місткістю 100 мл, додають 50 мл 0,1 М розчином натрій гідроксиду для отримання витяжки СА, перемішують упродовж 10 хв та доводять вміст колби до мітки тим же 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 згідно з вмістом у препараті, вносять у хімічну склянку, додають 50 мл розчину 0,1 М натрій гідроксиду. Суміш нагрівають на водяній бані за температури ~ 80 °С не менше 10 хв до повного розплавлення мазі. Отриману суміш фільтрують крізь паперовий складчастий фільтр (біла стрічка) у мірну колбу об'ємом 100 мл (склянку із сумішшю до закінчення фільтрування утримують у гарячій

водяній бані для уникнення застигання препарату). Фільтр промивають декілька разів гарячим розчином 0,1М натрій гідроксиду. Фільтрат охолоджують і доводять вміст колби до мітки тим же розчинником і використовують для аналізу.

Таблиця 7

Результати спектрофотометричного визначення СА з ECSE в однокомпонентних лікарських та ветеринарних препаратах

$$C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}, C_{\text{CA}} = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}, C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}, C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}, C_{\text{ECSE}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}, \\ C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}, \text{pH} = 7,5, \lambda = 340 \text{ нм}, n = 5, P = 0,95$$

Визначуваний сульфаніламід (регламентований вміст у препараті)	Визначений вміст $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ (S_T)	
	згідно з технічною документацією (нітритометричне титрування)	спектрофотометрично з ECSE
“Свічки внутрішньоматкові з сульфадимезином”, супозиторій ТОВ Базальт, м. Київ (допоміжні речовини – поліетилен, пропіленгліколь)		
Сульфадимезин (300±30 мг/г)	298±11 (0,032)	303±12 (0,034)
“Стрептоцид” таблетки ВАТ “Дарниця” м.Київ (допоміжні речовини – крохмаль, желатин, аеросил, кальцій стеарат)		
Сульфаніламід (500±50 мг/табл)	504±16 (0,027)	508±17 (0,029)

Отже, як свідчать результати аналізів, наведені в табл. 7, розроблені методики визначення СА з ECSE дають змогу визначити вміст СА в однокомпонентних препаратах без відділення від допоміжних речовин. Одержані дані вмісту СА у лікарських засобах добре корелюють з вмістом СА, що зазначений виробником, а також з результатами, отриманими згідно з відповідною технічною документацією для зазначених препаратів. Значення S_T не перевищують типових значень похибок у спектрофотометрії.

1. Чекман І. Історія сульфаніламідних препаратів: здобутки, розчарування, перспективи (до 70-річчя відкриття пронтозилу) // Вісник фармакол. та фармацевт. 2005. № 9. С. 42–45.
2. The Merck Index. 11-th Ed. Ranway, N.J., USA: Merck&Co., Inc., 1989.
3. European Pharmacopoeia (Eur. Ph.). 7-th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010.
4. Ятусевич А.И., Толкач Н.Г., Ятусевич И.А., Панковец Е.А. Лекарственные средства в ветеринарной медицине. Справочник. Минск, 2006. 410 с.
5. Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В. и др. Использование УФ-спектров для идентификации сульфаниламидных препаратов // Хим.-фарм. журн. 1981. № 9. С. 106–111.
6. Sadagopa Ramanujam V.M., Netkal Made Gowda M., Trieff N.M., Legator M.S. Ultraviolet spectrophotometric assay of *p*-aminobenzenesulfonamides // Microchem. J. 1980. Vol. 25. N 3. P. 295–300.

7. Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В. и др. Анализ глазных пленок сложного состава // Хим.-фарм. журн. 1983. № 11. С. 1389–1394.
8. Чичиро В.Е., Арзамасцев А.П., Триус Н.В. и др. Разработка методов анализа глазных пленок, содержащих сульфацил натрия // Хим.-фарм. журн. 1982. № 3. С. 109–112.
9. Тураспольская С.Г., Назарова Л.Е., Скибина В.В. Анализ лекарственных форм, содержащих сульфаниламидные препараты и димедрол // Фармация. 1984. Т. 33. № 1. С. 67–69.
10. Shamsa F., Amani L. Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceuticals by visible and UV spectrophotometry // Iranian J. Pharm. Res. 2006. Vol. 1. N 1. P. 31–36.
11. Nagaraja P., Yathirajan H.S., Raju C.R. et al. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives // Il Farmaco. 2003. Vol. 58. N 12. P. 1295–1300.
12. 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. Vol. 53. N 1. P. 187–192.
13. Nagaraja P., Naik S.D., Sherestha A., Shivakumar A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations // Acta Pharm. 2007. Vol. 57. N 3. P. 333–342.
14. Nagaraja P., Sunitha K.R., Vasantha R.A., Yathirajan H.S. Rapid spectrophotometric determination of sulphonomide derivatives with resorcinol // Indian J. Pharm. Sci. 2002. Vol. 644. N 4. P. 391–393.
15. 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. Vol. 24. N 3. P. 1021–1024.
16. 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. Vol. 85. N 4. P. 234–250.
17. Sabry S.M. Enhanced spectrophotometry of sulfonamides with novel 2-acetylbutyrolactone derivatives // Anal. Lett. 2006. Vol. 39. N 13. P. 2591–2615.
18. Vaid F.H.M., Aminuddin M., Mehmood K. *o*-Phthalaldehyde based spectrophotometric determination of sulfonamides // Pakist. J. Pharm. Sci. 2004. Vol. 17. N 2. P. 77–84.
19. 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.
20. 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. Т. 55. № 8. С. 888–895.
21. Ogoda Onah J., Eromi Odeiani J. Simultaneous spectrophotometric determination of sulfadoxine and pyrimethamine in pharmaceutical formulations // J. Pharmaceut. Biomed. 2002. Vol. 30. N 3. P. 851–857.
22. Vijaya Raja G., Bala Sekaran C., Siva Kumari P. et al. Simple and rapid methods for the analysis of sulfonamide bacteriostatic antibiotic in dosage forms // Orient. J. Chem. 2008. Vol. 24. N 3. P. 1021–1024.

23. *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. Vol. 79A. N 2. P. 325–331.
24. *Бойко М., Врублевська Т., Коркуна О.,* и др. Спектрофотометричне визначення сульфаниламідів у лікарських формах з використанням тропеоліну О // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. хім.* 2011. Вип. 52. С.174–183.
25. *Бойко М., Врублевская Т., Коркуна О.* и др. Спектрофотометрическое определение производных сульфаниламида с использованием 4-(2-пиридилазо) резорцина // *Вопросы химии и химтехнологии.* 2012. № 2. С. 116–126.
26. *Бойко М., Врублевская Т., Коркуна О.* и др. Определение сульфаниламидов в комбинированных лекарственных препаратах с использованием 4-(2-пиридилазо) резорцина // *Заводская лаборатория.* 2012. Т. 28. № 11. С. 19–24.
27. *Стоколоса Л.Я., Костюк І.М., Бойко М.Я.* 4-(2-тіазолілазо) резорцин – новий реагент для визначення сульфаниламідів в різних лікарських формах // “Сучасні проблеми хімії”: Тринадцята Всеукр. конф. студентів та аспірантів, 25–27 квітня 2012. К., 2012. С. 171.
28. *Kocjan R., Swieboda R.* Silica gel modified with eriochrome blue SE as a sorbent in trace analysis for metal ions // *Mikrochim. Acta.* 1996. Vol. 122. N 3–4. P. 175–182.
29. *Pilz D., Koehler H., Rotzsch W.* Simultaneous determination of free and total calcium in serum using an automated colorimetric method // *Z. Med. Laboratoriums diagnostik.* 1979. Vol. 20. N 6. P. 348–353.
30. *Vytras K., Vytrasova J., Kotrly S.* Colour changes of chemical indicators-VI. Metallochromic indicators for direct chelometric titrations of zinc // *Talanta.* 1975. Vol. 22. N 6. P. 529–534.
31. *Бойко М., Врублевська Т., Коркуна О., Тесляр Г.* Взаємодія сульфаниламідів з барвниками різних класів // *Праці НТШ. Сер. хемія, біохемія.* 2011. Т. 28. С. 7–18.
32. *Abdel-Maboud Mohamed I., Hassan Askal F., Gaal Saleh A.* Use of *p*-benzo-quinone for the spectrophotometric determination of certain sulphonamides // *J. Pharmaceut. Biomed.* 1991. Vol. 9. N 7. P. 538–543.
33. *Алыков Н.М., Жукова О.С., Бубнова В.В.* и др. Разработка методики определения сульфаниламидных препаратов в различных материалах // *Научный потенциал регионов на службу модернизации.* Астрахань: АИСИ, 2012. Т. 3. № 2. С. 11–14.
34. *Агрономов А.Е.* Избранные главы органической химии: Учеб. пособие для вузов. М.: Химия, 1990.
35. *Доллингер Г.* Химия азокрасителей / Пер. с нем. Б.А. Порай-Кошиц Л.: Госхимиздат, 1960.
36. *Степанов Б.И.* Введение в химию и технологию органических красителей. М.: Химия, 1977.

THE USE OF ERIOCHROME BLUE SE AS AN ANALYTICAL REAGENT FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF SULPHANILAMIDES

M. Boiko^{1,2}, T. Vrublevska¹, O. Korkuna¹, G. Teslyar²

¹*Ivan Franko National University of Lviv,
Kyryla & Mefodiya Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine*

²*State Scientific Research Control Institute of Veterinary
Preparations and Fodder Additives,
Donetska Str., 11, 79019 Lviv, Ukraine,
e-mail: boiko_maria@ukr.net*

The interaction of ten sulphanilamides (SA) with *o,o'*-dihydroxosubstituted azo dye Eriochrome blue SE has been investigated. The optimum conditions of colored compounds formation have been determined. A new method of spectrophotometric determination of sulphanilamides in dosage forms, based on the sulphanilamide diazonium salt azocoupling reaction with product of Eriochrome blue SE redox destruction – Chromotropic acid with the formation of a new azo compound have been elaborated. The absorption spectra of interaction products have the higher absorbance shoulder at 360–400 nm as well as lower absorbance maximum at 520 nm, which is characteristic for Eriochrome blue SE.

The maximum analytical signal is observed at sulphanilamides diazotization in the medium of 1 M hydrochloric acid using above the 3-fold excess of sodium nitrite towards SA. Experimentally it was determined that the unreacted excess of nitrite ions should be eliminated using the urea in 50-fold excess to the concentration of sodium nitrite. The azocoupling reaction was carried out at pH 7.5 in a medium of universal buffer mixture in the presence of 2-fold excess Eriochrome blue SE.

Calculated effective molar absorptivities at 380 nm for colored analytical forms of the interaction products of ten sulphanilamides with Eriochrome blue SE are ranges from $0.6 \cdot 10^3$ to $1.1 \cdot 10^3$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ depending on the sulphanilamide. The elaborated technique allows to determine sulphanilamides in the range of 14–23 mg/ml to 80 mg/ml.

The dependence between the sulphanilamides structure and sensitivity of their determination – the highest one is observed for SA, which contains six-membered heterocycles with two substituents. Less sensitive are the SA determination with six-membered heterocycle with one substituent. The reactions of sulfonamides, whose molecules contain five-membered heterocycles with two different heteroatoms with *o,o'*-dihydroxosubstituted azo dye Eriochrome blue SE have still more lower sensitivity. Non substituted sulphanilamides are determined with the lowest sensitivity.

The elaborated technique has been used to determine the sulphadimezine and sulphanilamide in two dosage forms – suppositories and tablets, respectively. The obtained content of sulphanilamides in medicines is agreed with the indicated content by manufacturer as well as with the results obtained by the official methods of nitritometry.

Key words: sulphanilamides, Eriochrome blue SE, spectrophotometry, dosage form.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭРИОХРОМ СИНЕГО SE КАК АНАЛИТИЧЕСКОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ

М. Бойко^{1,2}, Т. Врублевская¹, О. Коркуна¹, Г. Тесляр²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Кирилла и Мефодия, 6, 79005 Львов, Украина

²Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок,
ул. Донецкая, 11, 79019 Львов, Украина,
e-mail: boiko_maria@ukr.net

Разработано новую методику спектрофотометрического определения сульфаниламидов в готовых лекарственных формах с использованием *o,o'*-дигидрокси-замещенного азокрасителя эриохром синего SE, которая базируется на реакции азосочетания диазосоли сульфаниламида с продуктом окислительно-восстановительного разрушения красителя – хромотроповой кислотой с образованием нового азосоединения. Определено спектрофотометрические характеристики аналитических форм для десяти сульфаниламидов ($\bar{\epsilon}_{380}=(0,6-1,1)\cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹) и метрологические характеристики разработанных методик (границы линейности – от 14 до 80 мкг/мл).

Ключевые слова: сульфаниламид, эриохром синий SE, спектрофотометрия, лекарственная форма.

Стаття надійшла до редколегії 29.10.2013
Прийнята до друку 19.12.2013