

УДК 543.422.3:615.281.9:547.564

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ В ТАБЛЕТКАХ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СУЛЬФАНІЛОВОЇ КИСЛОТИ

О. Костів*, О. Коркуна

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна
e-mail: oksanakostiv73@gmail.com*

Розроблено методику спектрофотометричного визначення амоксициліну у таблетках “Амоксил” та “Амоксиклав Квіктаб” з використанням сульфанилової кислоти, яка ґрунтується на порередньому діазотуванні реагенту в хлориднокислому середовищі та наступному азосполученні з амоксициліном при рН 10,5 з утворенням ефективної аналітичної форми визначення амоксициліну, для якої характерний максимум світлопоглинання при 440 нм. Обчислено спектрофотометричні характеристики аналітичної форми для амоксициліну ($\varepsilon_{440} = 1,95 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та метрологічні характеристики розробленої методики (межі лінійності – від 0,7 до 32,9 мкг/мл, $C_n = 0,35$ мкг/мл).

Ключові слова: амоксицилін, сульфанилова кислота, діазотування, азосполучення, спектрофотометрія, таблетки.

DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.5901.182>

Амоксицилін (АМ) – лікарський засіб, напівсинтетичний бета-лактамний антибіотик широкого спектру дії групи пеніцилінів (табл. 1). Амоксицилін, як і багато інших антибіотиків, піддається деградації бета-лактамазами, що продукуються деякими бактеріями, тому його часто застосовують у комбінаціях з клавулановою кислотою, яка є інгібітором таких ферментів [1–2]. Спектр активності амоксициліну тригідрату щодо грампозитивних мікроорганізмів включає: *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp. (крім штамів, що продукують бета-лактамази), *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*. Препарат активний також стосовно грамнегативних мікроорганізмів (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, деяких штамів *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. та ін.), а також до деяких спірохет (*Leptospira* spp., *Borrelia* spp.). Кислотостійкий.

Для отримання ліків належної якості потрібно застосовувати чутливі та селективні методики визначення вмісту діючих компонентів у готових лікарських формах.

Для кількісного визначення амоксициліну рекомендовано методи високоєфективної рідинної хроматографії, потенціометричного титрування, йодометрії, різні варіанти вольтамперометрії. Відомі також спектрофотометричні методики, однак вони є малочисельними, хоча відрізняються своєю простотою в

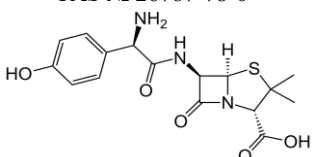
аналізі та економності. В літературі запропоновано спектрофотометричні методики визначення амоксициліну, які ґрунтуються на реакціях азосполучення з діазотованими *n*-амінобензойною кислотою та прокаїном, *o*-нітроаніліном, бензокаїном [3–6]. Також відомі аналітичні форми для визначення амоксициліну, засновані на реакціях окиснення амоксициліну, нуклеофільного заміщення, утворення комплексних сполук з іонами металів.

Таблиця 1

Структурна формула та деякі характеристики амоксициліну

Table 1

Molecular structure and characteristic of amoxicillin

Формула	Назва	Характеристики
CAS № 26787-78-0 	Амоксицилін (АМ) [2S-[2альфа,5альфа,6бета(S*)]]- 6-[[Аміно-(4- гідроксифеніл)ацетил] аміно]- 3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1- азабіцикло[3.2.0]гептан-2- карбонова кислота	Білий, або майже білий кристалічний порошок, $M = 365,4 \text{ г/моль}$

Як реагент з первинною ароматичною аміногрупою, для розроблення методики визначення амоксициліну у таблетках ми вибрали сульфанілову кислоту, про взаємодію якої з амоксициліном у літературі є короткі відомості, однак немає детальної інформації [6].

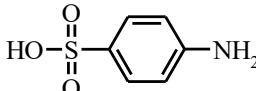
Сульфанілова кислота (СК) (*n*-амінобензолсульфокислота, 4-амінофенол-сульфонова кислота, анілін-4-сульфонова кислота), формула якої $C_6H_7NO_3S$. Сульфанілова кислота має вигляд внутрішньої солі, в якій аміногрупа нейтралізована залишком сульфокислоти і є слабкою NH-кислотою (табл. 2). Сульфанілова кислота не утворює солей з мінеральними кислотами, проте її сульфогрупа може бути нейтралізована лугами.

Таблиця 2

Структурна формула та деякі характеристики сульфанілової кислоти

Table 2

Molecular structure and characteristic of sulphanilic acid

Формула	Характеристики
Сульфанілова кислота CAS № 121-57-3 	Блідо-сірі кристали, що розкладаються при 280–300 °С, обмежено розчинні у воді (1 г/100 мл при 20 °С). $M = 173,2 \text{ г/моль}$; $pK_a = 4,2$

Сульфанілову кислоту використовують як аналітичний реагент. Застосовують у синтезі барвників. У лабораторії сульфанілову кислоту використовують для визначення нітритів і виявлення деяких металів, зокрема, осмію та рутенію, церію та ін. [7].

Усі водні розчини, які використовували в роботі, готували на дистильованій воді.

Розчин амоксициліну готували розчиненням точної наважки реактиву фармакопейної чистоти (більше 99 %) фірми Sigma-Aldrich в 0,1 М розчині HCl. Розчин зберігали за кімнатної температури у захищеному від світла місці. Робочі розчини зберігали за кімнатної температури у захищеному від світла місці не більше двох днів.

Вихідний стандартний розчин сульфанилової кислоти з концентрацією $\sim 10^{-3}$ М готували розчиненням точної наважки кваліфікації “ч.д.а.” в 0,1 М розчині натрій гідроксиду.

Робочі розчини хлоридної, сульфатної, фосфатної кислот готували розведенням відповідних концентрованих кислот кваліфікації “х.ч.”, ацетатної – з ацетатної кислоти (льод.) кваліфікації “ч.д.а.”. У роботі використовували розчини натрій гідроксиду, який готували розчиненням реактиву кваліфікації “х.ч.”.

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючому спектро-фотометрі SPECORD M-40 (CarlZeissJena, Німеччина) в кюветах $l=1$ см.

Величину рН вимірювали рН-150 М (РУП “Гомельський завод измерительных приборов”, Білорусь) з аргентум хлоридним електродом порівняння. Необхідне значення рН середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду.

Результати досліджень засвідчили, що у взаємодії діазосолі СК з амоксициліном утворюється забарвлена сполука жовтого кольору, яка характеризується появою нового максимуму світлопоглинання при $\lambda_{\max} = 440$ нм (рис. 1). Цей максимум не є характерним ні для спектра світлопоглинання самого амоксициліну в середовищі хлоридної кислоти ($\lambda_{\max} = 250$ нм), ні для діазотованого реагенту в лужному середовищі ($\lambda_{\max} = 270$ нм). Крім основного максимуму, який є характерним для продукту взаємодії АМ з сіллю діазонію СК, на спектрах можна простежувати ще один широкий результуючий максимум світлопоглинання в оптичному діапазоні 250–270 нм, який є наслідком адитивного поглинання фрагментів обох реагентів у новоутвореному продукті.

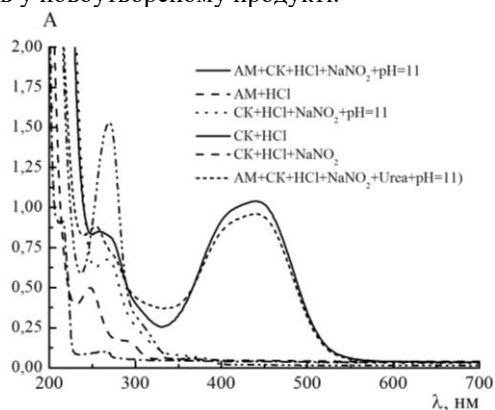


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії амоксициліну з сіллю діазонію СК: $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{СК} = 1 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{urea} = 0,05$ М; $C_{HCl} = 1$ М

Fig. 1. Absorption spectra of aqueous solutions of amoxicillin interaction products with sulphanilic acid diazonium salt: $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{СК} = 1 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{urea} = 0.05$ М; $C_{HCl} = 1$ М

У випадку, коли непрореагований під час діазотування надлишок натрій нітриту усувати сечовиною, продукти взаємодії також утворюються, проте величина світлопоглинання на максимумах є дещо нижчою. Тому у проведенні подальших досліджень недоцільно використовувати сечовину для усунення непрореагованого натрій нітриту.

У структуру досліджуваних реагентів входить первинна ароматична аміногрупа. З літературних даних відомо [8], що її діазотування відбувається в сильнокислому середовищі і природа кислоти впливає на вихід продукту реакції. Однак літературні дані досить суперечливі щодо умов діазотування. Тому для оптимізації експерименту потрібно дослідити вплив різних чинників, від яких залежить ефективність діазотування: концентрації та природи мінеральної кислоти, тривалості процесу діазотування, а також концентрації натрій нітриту як діазотуючого реагенту.

Для визначення оптимальних умов взаємодії компонентів досліджуваної системи вивчено вплив концентрації хлоридної, сульфатної, фосфатної та ацетатної кислот на вихід діазосолей та утворення продуктів азосполучення. Одержані результати наведено на рис. 2.

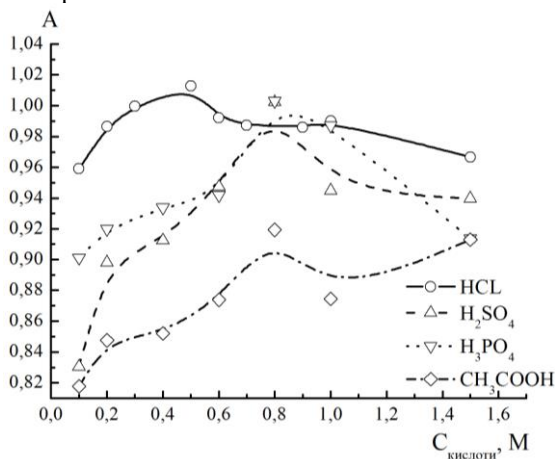


Рис. 2. Вплив природи та концентрації кислоти (хлоридної, сульфатної, фосфатної, ацетатної) на вихід діазосолі СК та продукту її взаємодії з АМ.

$$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ М}; C_{\text{NaNO}_2} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ М}; C_{\text{AM}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$$

Fig. 2. Effect of nature and concentration acids (hydrochloric, sulfuric, phosphoric, acetic) on the SK diazonium salt formation and the product of its interaction with the AM.

$$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ М}; C_{\text{NaNO}_2} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ М}; C_{\text{AM}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$$

Як показали результати досліджень (рис. 2), усі досліджувані кислоти, за винятком ацетатної, можна використовувати для діазотування сульфанілової кислоти, однак максимальний вихід кінцевого продукту азосполучення АМ з СК простежується, якщо діазотування проводити в середовищі 0,5 М хлоридної кислоти, яку ми вибрали для подальших досліджень.

Різний вплив досліджуваних кислот на діазотування реагентів, а також подальше утворення продуктів азосполучення можна, очевидно, пояснити різною силою кислот, тобто різною кількістю іонів гідрогену, так і можливим утворенням різних проміжних сполук у процесі діазотування [9].

Досліджено вплив концентрації натрій нітриту як діазотуючого реагента на вихід діазосоли сульфанілової кислоти та подальшого її азосполучення з амоксациліном. Отримані результати, наведені на рис. 3, свідчать, що оптимальним є використання натрій нітриту у концентрації вище п'ятнадцятикратного надлишку стосовно концентрації сульфанілової кислоти ($C_{СК} : C_{NaNO_2} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M} : 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ M} = 1 : 15$), де аналітичний сигнал не змінюється за збільшення концентрації нітрит-іонів. Надлишок нітриту стосовно реагентів можна пояснити самим механізмом діазотування, згідно з яким з однією аміногрупою взаємодіють дві молекули нітритної кислоти [8, 10, 11], крім того, як відомо, надлишок реагенту зміщує рівновагу реакції в бік утворення продуктів реакції.

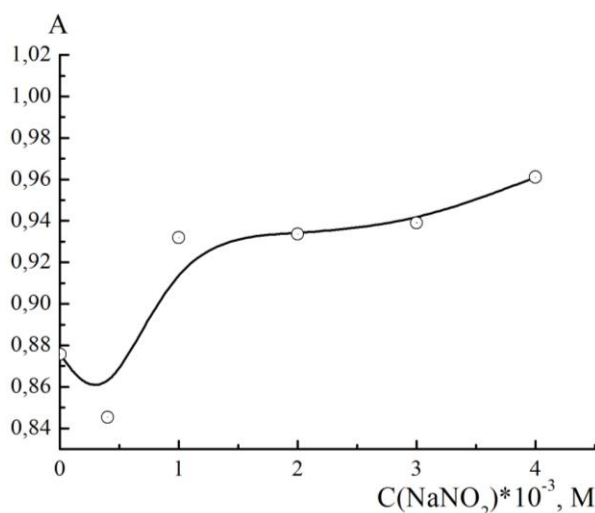


Рис. 3. Вплив концентрації натрій нітриту на вихід діазосоли СК та продукту її взаємодії з АМ. $C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}$; $C_{\text{AM}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

Fig. 3. Effect of sodium nitrite concentration during SK diazotization on the SK interaction with AM. $C_{\text{SK}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}} = 0.5 \text{ M}$; $C_{\text{AM}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

Для досягнення максимальних виходів діазосоли сульфанілової кислоти досліджено тривалість діазотування (рис. 4). Як бачимо з рис. 4, максимальний вихід діазосоли досягають під час діазотування реагенту протягом 20 хв за кімнатної температури, за тривалішого часу діазотування вихід продуктів азосполучення діазотованої СК з АМ залишається майже незмінний.

Солі діазонію як електрофільні реагенти здатні взаємодіяти з основними ароматичними сполуками. Реакцію азосполучення з фенольними сполуками проводять при $\text{pH} = 9-10$, тому що діазоній-катион порівняно слабкий електрофіль, який може існувати лише у кислому середовищі і здатний взаємодіяти з фенолят-іоном у лужному середовищі, а не з слабодисоційованою молекулярною формулою фенолу. Проте в сильнолужному середовищі концентрація діазосоли значно знижується у зв'язку з утворенням нездатного до азосполучення діазотату [8, 11]. Тому з метою отримання максимального виходу продукту азосполучення потрібно визначити оптимальне значення pH середовища.

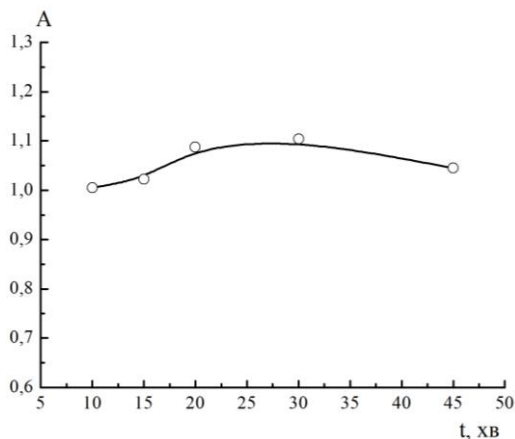


Рис. 4. Вплив тривалості реакції діазотування СК на вихід продукту взаємодії з АМ.

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{УБС} = 0,04$ М; $\lambda_{max} = 440$ нм

Fig. 4. Effect of time of the SK diazotization on the yield of the product of its interaction with AM.

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{УБМ} = 0,04$ М; $\lambda_{max} = 440$ нм

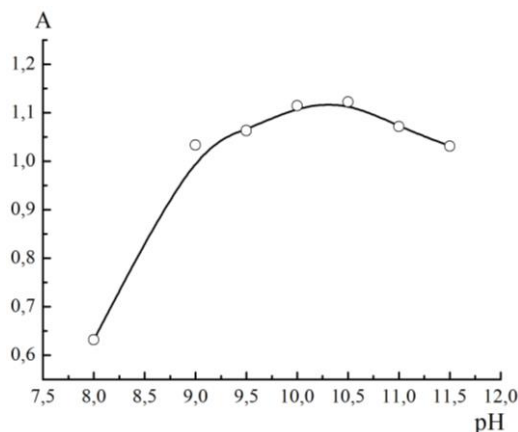


Рис. 5. Вплив кислотності середовища на азосполучення діазотованої СК з АМ.

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{УБС} = 0,04$ М; $\lambda_{max} = 440$ нм

Fig. 5. Effect of medium acidity on SK diazonium salt azocoupling with AM.

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{УБМ} = 0,04$ М; $\lambda_{max} = 440$ нм

З рис. 5 бачимо, що максимальний вихід продуктів реакції простежується в лужному середовищі в межах рН від 9,0 до 11,5. Подальші дослідження проводили при рН = 10,5.

З метою визначення стабільних умов для реакції азосполучення, підтримання оптимального значення рН середовища та для підвищення експресності методики визначення амоксициліну з діазосіллю СК потрібно було підібрати буферну суміш. До складу буферних розчинів, зазвичай, входять аніони слабких кислот, тому ми досліджували вплив різних аніонів на світлопоглинання продуктів азосполучення амоксициліну з сіллю діазонію досліджуваного реагенту.

Як показали результати досліджень (рис. 6, *a*), присутність аніонів (ацетату, пірофосфату, карбонату, тетраборату, фосфату) не впливають на характер та положення максимумів світлопоглинання продуктів взаємодії АМ з діазосіллю СК, однак значно впливають на інтенсивність світлопоглинання. Тому важливо було дослідити співвідношення аніонів, які не змінюють аналітичний сигнал, або до якої міри вони його підвищують чи понижують. Показано (рис. 6, *б*), що такі аніони, як ацетат, карбонат, тетраборат негативно впливають на вихід продукту взаємодії АМ з сіллю діазонію СК, тоді як присутність пірофосфату та фосфату незначно підвищують аналітичний сигнал. УБС за низьких концентрацій спроможний стабілізувати систему і дещо підвищити сигнал. У подальших дослідженнях ми використовували 0,04 М розчин УБС.

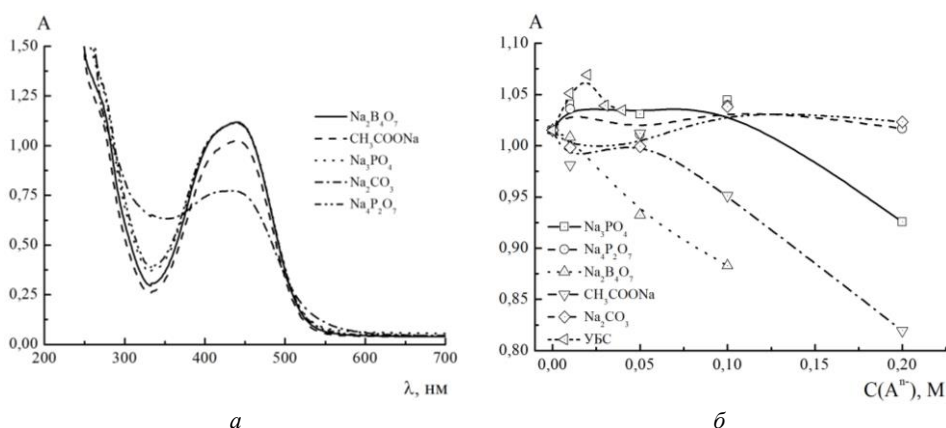


Рис. 6. Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії амоксициліну з діазосіллю СК у присутності аніонів (ацетату, пірофосфату, карбонату, тетраборату, фосфату) (*a*); вплив природи та концентрації аніонів (ацетату, пірофосфату, карбонату, тетраборату, фосфату), буферного розчину (УБС) на світлопоглинання продуктів взаємодії АМ з діазотованою СК (*б*).

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $\lambda_{max} = 440$ нм

Fig. 6. Absorption spectra of aqueous solutions of the products interaction of amoxicillin with SK diazonium salt in the presence of salts anions (acetate, pyrophosphate, carbonate, tetraborate, phosphate) (*a*); influence of nature and concentration of salts anions (acetate, pyrophosphate, carbonate, tetraborate, phosphate) and buffer solution (UBM) on the SK interaction with AM (*b*).

$C_{СК} = 2 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 3 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0.5$ М; $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ М; $\lambda_{max} = 440$ nm

Результати, наведені на рис. 7, засвідчують, що для взаємодії діазосолі СК із АМ максимальний вихід забарвленої аналітичної форми досягають за п'ятикратного надлишку реагенту, і він залишається практично незмінним за подальшого збільшення його кількості.

Оскільки дві послідовні стадії утворення азобарвника проходять у різному середовищі, яке значно впливає на самі реагенти, то важливо було дослідити порядок додавання компонентів у суміш. Результати цих досліджень наведено в табл. 3.

Дані, наведені в табл. 3, свідчать, що максимальний вихід продукту азосполучення простежується, якщо діазотування СК проводити у такій послідовності: у розчин кислоти вводити аліквоту розчину реагенту, а тоді додавати розчин натрій нітриту. Якщо ж спочатку вводити аліквоту нітрит-іона до кислоти, то частина його руйнується з утворенням слабкої нітритної кислоти, яка не взаємодіє з реагентами, і, відповідно, вихід продукту зменшується.

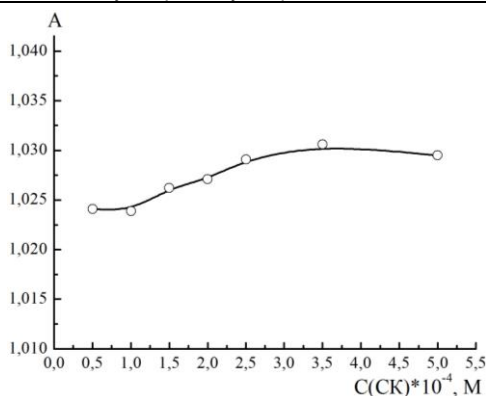


Рис. 7. Залежність величини світлопоглинання продукту азосполучення діазосолі СК з АМ від її концентрації. $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ M; $C_{HCl} = 0,5$ M; $pH = 10,5$; $C_{УБС} = 0,04$; см; $\lambda_{max} = 440$ нм
 Fig. 7. The mole ratio curve for the product of amoxicillin interaction with SK diazonium salt. $C_{AM} = 5 \cdot 10^{-5}$ M; $C_{HCl} = 0.5$ M; $pH = 10.5$; $C_{UBM} = 0,04$ M; $\lambda_{max} = 440$ nm

Таблиця 3

Вплив порядку додавання реагентів на вихід продукту взаємодії АМ з сіллю діазонію СК

$C_{СК} = 1,9 \cdot 10^{-4}$ M; $C_{AM} = 3,75 \cdot 10^{-5}$ M; $C_{NaNO_2} = 2,9 \cdot 10^{-3}$ M; $C_{HCl} = 0,5$ M; $pH = 10,5$;

$C_{УБС} = 0,04$; $\lambda_{max} = 440$ nm

Table 3

The effect of order of reagents adding on the of product yield of of amoxicillin interaction with SK diazonium salt $C_{SK} = 1.9 \cdot 10^{-3}$ M; $C_{AM} = 3.75 \cdot 10^{-5}$ M; $C_{NaNO_2} = 2.9 \cdot 10^{-3}$ M; $C_{HCl} = 0,5$ M; $pH = 10.5$; $C_{UBM} = 0.04$ M; $\lambda_{max} = 440$ nm

Процес	Порядок додавання реагентів	ΔA_{440}
Діазотування	[HCl + СК + NaNO ₂] _{20 хв}	0,902
	[СК + HCl + NaNO ₂] _{20 хв}	0,872
	[HCl + NaNO ₂ + СК] _{20 хв}	0,895
Азосполучення	[СК діаз. + АМ + УБС + NaOH] → pH	0,901
	[СК діаз. + УБС + АМ + NaOH] → pH	0,897
	[СК діаз. + УБС + NaOH] → pH + АМ	0,851

Співвідношення компонентів у сполуках діазотованої СК з амоксициліном з'ясовано методом ізомолярних серій. Як бачимо з рис. 8, у дослідженні взаємодії діазосолі СК утворює продукт взаємодії з співвідношенням компонентів 1 : 1. Схему реакції азосполучення діазоскладової СК з азоскладовою амоксициліну з утворенням азосполуки наведено на рис. 9. На основі даних ізомолярних кривих обраховано ефективний молярний коефіцієнт світлопоглинання (табл. 4).

Таблиця 4

Спектрофотометричні характеристики сполуки АМ з СК

Table 4

Spectroscopic characteristics of the compound of AM interaction with SK

Реагент	λ_{max} , нм	$\epsilon \cdot 10^{-4}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	АМ: СК	Умови	
				Діазотування	Азосполучення
СК	440	1,95	1:1	$C(HCl) = 0,5$ M $C(NaNO_2) = 3 \cdot 10^{-3}$ M (\geq п'ятнадцятикратний надлишок до СК)	п'ятикратний надлишок СК до АМ $C(УБС) = 0,04$ M $pH = 10,5$

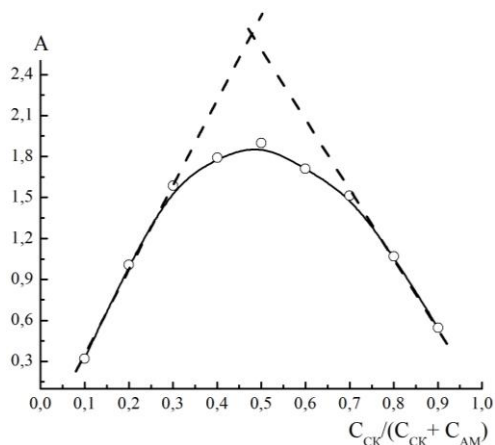


Рис. 8. Крива ізомольярної серії у системі СК–АМ. $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}$;
 $C_{\text{СК}} + C_{\text{АМ}} = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7,20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{АМ}} = 3,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{УБС}} = 0,04 \text{ M}$;
 $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$

Fig. 8. The continuous variations curve in the SK–AM system. $C_{\text{HCl}} = 0.5 \text{ M}$;
 $C_{\text{SK}} + C_{\text{AM}} = 1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{AM}} = 3.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{UBM}} = 0.04 \text{ M}$;
 $\text{pH} = 10.5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

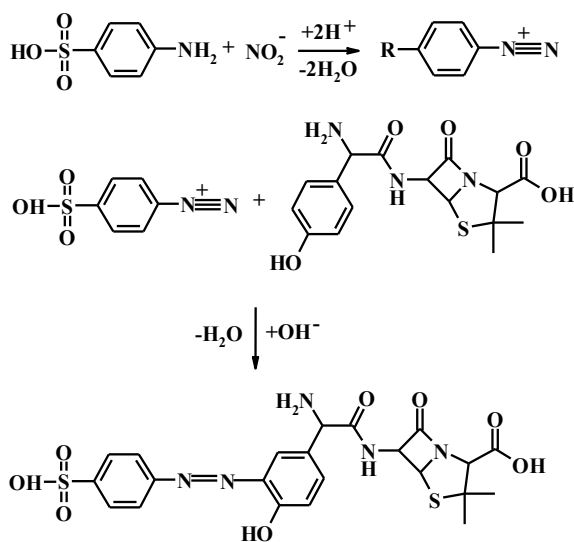


Рис. 9. Схема взаємодії амоксициліну з діазосіллю сульфанілової кислоти
 Fig. 9. Scheme of the interaction of amoxicillin with sulfanilic acid diazonium salt

Для розробки спектрофотометричної методики важливе значення має стійкість у часі аналітичної форми. Як показали результати досліджень (рис. 10), аналітичний сигнал, характерний для продуктів взаємодії діазотованої СК з амоксициліном, залишається стабільним упродовж 10 хв, згодом незначно знижується, а через 20 хв стабілізується і залишається незмінним упродовж 1 год. Цього часу є достатньо для проведення необхідних вимірювань оптичної густини та визначення вмісту аналіту.

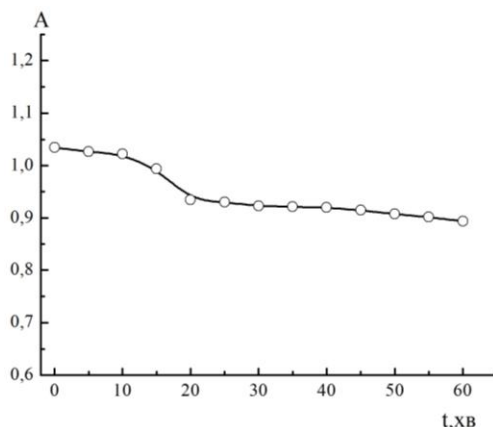


Рис. 10. Стабільність у часі продуктів азосполучення діазотованої СК з АМ. $C_{СК} = 1,9 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{АМ} = 3,75 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{NaNO_2} = 2,9 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $pH = 10,5$; $C_{УБС} = 0,04$; $\lambda_{max} = 440$ нм

Fig. 10. Effect of the keeping time on the absorbance of azocoupling products of diazotized SK with AM. $C_{СК} = 1,9 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{АМ} = 3,75 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{NaNO_2} = 2,9 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{HCl} = 0,5$ М; $pH = 10,5$; $C_{УБМ} = 0,04$; $\lambda_{max} = 440$ nm

З’ясовано, що величина аналітичного сигналу забарвленого продукту у системі СК–АМ лінійно залежить від концентрації амоксициліну в розчині.

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення АМ наведено в табл. 5.

Як бачимо з табл. 5, під час визначення амоксициліну з сульфаніловою кислотою лінійність сигналу світлопоглинання продуктів зберігається в межах двох порядків концентратцій амоксициліну. Чутливість реакції взаємодії АМ з реагентами є досить високою і близькою для більшості спектрофотометричних методик визначення амоксициліну.

Таблиця 5

Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення АМ з використанням СК; $l = 1$ см; $n = 5$; $P = 0,95$; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{СК} = 4,5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 7,2 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{УБС} = 0,04$ М; $pH = 10,5$; $\lambda_{max} = 440$ нм

Table 5

Metrological characteristics of spectrophotometric determination of AM using SK; $l=1$ cm; $P=0.95$; $n=5$; $C_{HCl} = 0,5$ М; $C_{СК} = 4,5 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 7,2 \cdot 10^{-3}$ М; $pH = 10,5$; $C_{УБМ} = 0,04$; $\lambda_{max} = 440$ nm

Реагент	Лінійність $C_{АМ}$, мкг/мл	Рівняння графіка, $C_{АМ}$ мкг/мл	C_{min} , мкг/мл	C_H , мкг/мл	R
СК	0,7–32,9	$\Delta A = 0,00098 + 2,14 \cdot 10^{-4} \cdot C$	0,11	0,35	0,9996

Правильність спектрофотометричних методик визначення амоксициліну з сульфаніловою кислотою перевіряли методом “уведено–знайдено” на модельних розчинах різного складу методом градуйованого графіка (табл. 6).

Отримані результати свідчать про те, що похибка визначення АМ за розробленими методиками не перевищує похибки спектрофотометричного методу, отже, розроблені методики можуть бути застосовані для аналізу реальних об’єктів.

Таблиця 6

Результати спектрофотометричного визначення АМ з СК у модельних розчинах.

$$l = 1 \text{ см}; n = 5, P = 0,95; C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ М}; C_{\text{СК}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}; \\ C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}; C_{\text{УБС}} = 0,04 \text{ М}; \text{pH} = 10,5; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$$

Table 6

Results of spectrophotometric determination of AM with SK in model solutions. $l=1 \text{ cm}$;

$$P=0.95; n=5; C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}; C_{\text{SK}} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}; \text{pH} = 10.5; \\ C_{\text{NaNO}_2} = 7.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}; C_{\text{UBM}} = 0.04; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$$

Реагент	Внесено АМ, мкг/мл	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ Знайдено АМ, мкг/мл	S_r
СК	16,44	16,36 ± 0,415	0,017

Лікарські препарати амоксициліну випускають у формі таблеток та розчинів для ін'єкцій. Для отримання зазначених лікарських форм використовують допоміжні речовини, тому під час розроблення нової методики визначення діючих речовин важливим етапом є дослідження впливу усіх компонентів лікарських форм на вибірковість взаємодії діючої речовини з реагентом. Керуючись аналітично-нормативною документацією на препарати, критерієм селективності визначення ми обрали незмінність величини світлопоглинання розчинів отриманих продуктів реакції у межах 5 %.

Таблиця 7

Результати визначення АМ з СК за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей

допоміжних речовин. $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ М}; C_{\text{СК}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ М};$

$$C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}; C_{\text{AM}} = 3,75 \cdot 10^{-5} \text{ М}; C_{\text{УБС}} = 0,04 \text{ М}; \text{pH} = 10,5; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$$

Table 7

Results of determination of AM with SK in the presence of different quantities of auxiliary substances in the test sample. $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ М}; C_{\text{СК}} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ М}; \text{pH} = 10.5; C_{\text{NaNO}_2} = 7.2 \cdot 10^{-3} \text{ М};$

$$C_{\text{AM}} = 3.75 \cdot 10^{-5} \text{ М}; C_{\text{UBM}} = 0.04; \lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$$

Допоміжні речовини	$v(\text{AM}) : v(\text{P})^1$	$v(\text{AM}) : v(\text{P})^2$	АМ + СК Знайдений вміст АМ, %,
Натрій бензоат	1:0,03	1:100	99,6
Крохмаль	1:0,5*	–	100,2
Магній стеарат	1:0,3	–	100,2

¹ Мольні співвідношення АМ та допоміжних речовин у ліках.

² Максимальні мольні співвідношення АМ та досліджуваних допоміжних речовин.

* Масові співвідношення АМ та допоміжних речовин у ліках.

– Дослідження не проводили.

Як бачимо з даних табл. 7, взаємодії АМ з СК не заважає натрій бензоат у кількостях набагато більших, ніж ті, що містяться у лікарських препаратах. Також досліджено вплив крохмалю та магній стеарату на визначення АМ і не виявлено їхньої заважаючої дії, оскільки ці речовини нерозчинні за умов проведення аналізу, тому легко вилучаються з системи фільтруванням.

Оскільки серед усіх лікарських препаратів амоксициліну частину займають комбіновані лікарські засоби, які у своєму складі містять, крім АМ, ще одну діючу речовину, то важливим є дослідити вплив цих біологічно-активних речовин на визначення АМ з СК. У комбінованих препаратах разом з амоксициліном найчастіше

використовують клавуланову кислоту. Наявність клавуланової кислоти в кількостях, що відповідає її вмісту у таблетках, не впливає на характер спектру розчинів продуктів взаємодії АМ з СК, що підтверджено відповідними дослідженнями. Як бачимо з даних табл. 8, присутність у системі клавуланової кислоти в кількостях, які використовують у лікарських засобах, не заважає визначенню АМ за допомогою розробленої методики. Однак якщо концентрація КК перевищує вміст її у ліках вдвічі, то вона негативно впливає на визначення АМ.

Таблиця 8

Результати визначення АМ з СК за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей діючої речовини клавуланової кислоти. $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}$; $C_{\text{СК}} = 4,50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7,20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{AM}} = 3,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{УБС}} = 0,04 \text{ M}$; $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

Table 8

Results of determination of AM with SK in the presence of different quantities of the active substance clavulanic acid in the test sample. $C_{\text{HCl}} = 0.5 \text{ M}$; $C_{\text{SK}} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{AM}} = 3.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{UBM}} = 0.04$; $\text{pH} = 10.5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

	AM + SK
$v(\text{AM}) : v(\text{KK})^1$	1: 0,25
Знайдений вміст АМ, %	97,6
$v(\text{AM}) : v(\text{KK})^2$	1: 0,5
Знайдений вміст АМ, %	81,6

¹Мольні співвідношення АМ та КК у ліках.

²Максимальні мольні співвідношення АМ та КК.

На основі розробленої методики визначення АМ з сульфаниловою кислотою визначено вміст амоксициліну в одно- та багатокомпонентних лікарських препаратах, які випускають у формі таблеток (табл. 9).

Пробопідготовка таблеток “Амоксил” (250 мг АМ) та таблеток “Амоксиклав Квіктаб” (500 мг АМ) для визначення амоксициліну.

У фарфоровій ступці розтирають 20 таблеток до порошку, відбирають наважку порошку, яка містить згідно з номінальним вмістом у препараті $\sim 250 \text{ mg}$ АМ, вводять у мірну колбу ємністю 50,0 мл, розчиняють вміст у 0,1 М розчині хлоридної кислоти та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником для отримання витяжки амоксициліну. Струшують впродовж години на механічному струшувачі. Отриману суміш фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості у конічну колбу, відкидаючи першу порцію розчину 5 мл (вихідний розчин). Робочий розчин амоксициліну готують розведенням вихідного розчину в 10 разів, для чого 5 мл отриманого розчину вводять у мірну колбу ємністю 50,0 мл, доводять об'єм розчину 0,1 М хлоридною кислотою до мітки і перемішують. Робочий розчин містить номінально 250 мкг/мл амоксициліну.

Методика визначення АМ з сульфаниловою кислотою.

До мірної колби ємністю 25 мл вводять 5,0 мл 0,5 М хлоридної кислоти, додають 2 мл $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ розчину сульфанилової кислоти та 2,0 мл 0,1 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують упродовж 20 хв за кімнатної температури, додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 0,7–32,9 мкг/мл (кінцева концентрація), вводять 2,5 мл 0,4 М розчину УБС, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину стосовно холостого розчину проводять при $\lambda = 440 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$. Концентрацію амоксициліну знаходять способом порівняння або за допомогою градувального графіка.

Таблиця 9

Результати спектрофотометричного визначення АМ з СК у лікарських препаратах. $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}$;
 $C_{\text{СК}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{УБС}} = 0,04 \text{ M}$; $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$; $n=5$; $P=0,95$

Table 9

Results of spectrophotometric determination of AM in pharmaceuticals; $C_{\text{HCl}} = 0.5 \text{ M}$;
 $C_{\text{СК}} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{УБМ}} = 0.04$; $\text{pH} = 10.5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$; $P=0.95$; $n=5$

Амоксицилін (регламентований вміст у препараті)	Визначений вміст	
	Спектрофотометрично з СК	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_{Γ}
“Амоксил” – таблетки. ПАТ “Київмедпрепарат”, м. Київ (допоміжні речовини – натрій крохмаль гліколят, повідон, кальцій стеарат)		
Амоксицилін тригідрат (250,0±12,5 г/таблетку)	241,5±4,3	0,015
“Амоксиклав Квіктаб” – таблетки. Лек, фармацевтична компанія д. д. Словенія (квалуанова кислота (185 мг/таблетку), допоміжні речовини – аспартам (Е 951, оксид заліза жовтий (Е 172), тальк, целюлоза мікрокристалічна силікатизована, кремній діоксид.		
Амоксицилін тригідрат (500,0±25,0 г/таблетку)	510,24 ± 13,8	0,024

Як бачимо з даних табл. 9, результати, одержані за розробленою методикою визначення АМ з СК у таблетках “Амоксил” та “Амоксиклав Квіктаб”, є в межах, дозволених згідно з аналітично нормативною документацією фірм виробників, допустимих відхилень у 5 %. Для визначення амоксициліну в цих препаратах рекомендують використовувати хроматографічний метод. Однак розроблена методика є значно простішою та економнішою, характеризується високою відтворюваністю та експресністю. За чутливістю ця реакція не відрізняється від інших спектрофотометричних методик визначення АМ.

1. Prakash K. Raju P. N., Kumari K. Sh. et al. Spectrophotometric estimation of amoxicillin trihydrate in bulk and pharmaceutical dosage form // E-J. Chem. 2008. Vol. 5. No. S2. P. 1114–1116. DOI: [10.1155/2008/350646](https://doi.org/10.1155/2008/350646)
2. Strachunsky L. S. Antibiotic therapy: practical guidance / ed. L. S. Strachunsky, Yu. B. Belousova, S. N. Kozlova. Moscow: RC “Farmedinfo”, 2000 (in Russian).
3. Al-Uzri W. A. Spectrophotometric determination of amoxicillin in pharmaceutical preparations through diazotiation and coupling // Iraqi J. Sci. 2012. Vol. 53. No. 4. P. 713–722.
4. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations // Anal. Chim. Acta. 2004. Vol. 515. No. 2. P. 333–341. DOI: [10.1016/j.aca.2004.03.056](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.056)
5. El-Ashry S. M., Belal F., El-Kerdawy M. M. et al. Spectrophotometric determination of some phenolic antibiotics in dosage forms // Mikrochim. Acta. 2000. Vol. 135. No. 3. P. 191–196. DOI: [10.1007/s006040070010](https://doi.org/10.1007/s006040070010)
6. Qader H. A., Fakhri N. A. Spectrophotometric determination of amoxicillin trihydrate in pure and pharmaceutical dosage forms // Ibn Al-Haitham Jour. for Pure & Appl. Sci. 2015. Vol. 28. No. 3. P. 142–153.
7. Neiland O. Ya. Organic chemistry, High School, Moscow, 1990 (in Russian).
8. Zollinger H. Chemistry of Azo Dyes, Goskhimizdat, Leningrad, 1960 (in Russian).

9. *Boiko M. Ya.* Monoazo dyes and heterocyclic azocompounds as analytical reagents for spectrophotometric determination of sulphanilamidums : thesis for obtaining a scientific degree of a candidate of chemical sciences : 02.00.02 / Boiko Maria Yaroslavivna. Lviv, 2013. 267 p.
10. *Agronomov A. E.* Selected chapters of organic chemistry: Proc. a manual for Universities. Chemistry. Moskva, 1990 (in Russian).
11. *Stepanov B.I.*, Introduction to the Chemistry and Technology of Organic Dyes, Chemistry. Moscow, 1977 (in Russian).

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF AMOXICILLIN IN TABLETS USING SULPHANILIC ACID

O. Kostiv*, O. Korkuna

*Ivan Franko National University of Lviv,
Kyryla i Mefodiya Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine
e-mail: oksanakostiv73@gmail.com*

Methods of spectrophotometric determination of amoxicillin (AM) in Amoxil tablets (producer – Public Joint Stock Company Kyivmedpreparat, Ukraine) and Amoksiclav Quicktab (producer – Lek Pharmaceuticals, d.d., Slovenia) using sulphanilic acid (SA) have been developed.

The methods of AM determination are based on previous diazotization of the primary aromatic amino group of SA in the hydrochloric acid medium with the following SA diazonium salt azocoupling with amoxicillin in the alkaline medium at pH 10.5 at the presence of universal buffer mixture with the following indicator of the absorbance of obtained coloured products at $\lambda_{\max} = 440$ nm. The maximum signal of analytical form is observed at sulphanilic acid diazotization in the medium of 0.5 M hydrochloric acid using more than 15-fold excess of sodium nitrite towards SA at room temperature for 20 min. It has been determined experimentally that the unreacted excess of nitrite ions does not need to be deleted using urea. The azocoupling reaction of AM with diazotized SA was carried out at pH 10.5 in a medium of 0.04 M of the universal buffer mixture in the presence of 5-fold excess sulphanilic acid to amoxicillin. Based on the optimum reaction conditions we developed a method that allows to quantificate amoxicillin with sulphanilic acid in a concentration range of 0.7–32.9 $\mu\text{g/ml}$. The technique allows to determine the microgram amount of AM ($C_{LQ} = 0.35 \cdot \mu\text{g/ml}$). Effective molar absorptivities at an absorbance maximum of 440 nm for azo compound were $1.95 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The selectivity of amoxicillin spectrophotometric determination in the presence of auxiliary substances (sodium benzoate, magnesium stearate, starch) and bioactive substances (clavulanic acid) has been investigated. The elaborated method has been approved during the analyses of model solutions and single-component and combined commercial pharmaceuticals. The results obtained according to the developed method for determining AM in Amoxil tablets and Amoksiclav Quicktab are within the limits of 5 % of the admissible error, which is permissible according to the analytical normative documentation of the producer. Therefore, the recommended procedure is well suited for the amoxicillin assay in drugs to assure high standards of quality control.

Keywords: amoxicillin, sulphanilic acid, diazotization, azocoupling, spectrophotometry, tablets.

Стаття надійшла до редколегії 31.10.2017

Прийнята до друку 11.04.2018