

Львівський національний університет ім. Івана Франка
Міністерство освіти і науки України

Львівський національний університет ім. Івана Франка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОСТІВ ОКСАНА ІГОРІВНА

УДК [543.422.3+543.552]:543.632.6:547.556.3:615.33

ДИСЕРТАЦІЯ

**РЕАКЦІЯ АЗОСПОЛУЧЕННЯ В АНАЛІЗІ β -ЛАКТАМНИХ ТА
ТЕТРАЦИКЛІНОВИХ АНТИБІОТИКІВ**

102 Хімія

10 Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ О. І. Костів

Науковий керівник: Коркуна Ольга Яремівна, кандидат хімічних наук,
доцент

Львів – 2021

АНОТАЦІЯ

Костів О.І. Реакція азосполучення в аналізі β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі 10 – Природничі науки за спеціальністю 102 – Хімія. Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню спектрофотометричних (СФ) та вольтамперометричних (ВА) властивостей азосполук β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків, отриманих на основі реакції азосполучення: амоксициліну (АМ) та окситетрацикліну (ОТЦ) з діазотованими реагентами, які містять в своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу; діазотованих цефалоспоринів з фенольними реагентами з метою розробки методик їхнього визначення. У роботі вивчено можливості використання отриманих азосполук для кількісного визначення АМ, цефтазидиму (ЦЕФТ), цефтріаксону (ЦЕФТР) та ОТЦ.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті дослідження хіміко-аналітичних властивостей антибіотиків (АН) вперше запропоновано використання реакції азосполучення АМ з діазотованим сульфатіазолом (СТЗ) та сульфаніламідом (САМ), ОТЦ з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою (ДНСК) та діазотованим фуксином (Фукс), діазотованого ЦЕФТ з резорцином (Рез), 8-оксихіноліном (8-Окс), 2-метилфенолом (2-Мет) та діазотованого ЦЕФТР з 8-Окс і 2-Мет для розробки методик СФ визначення АН в одно- та багатокомпонентних лікарських засобах. Вперше вивчено оптимальні умови діазотування реагентів (САМ, СТЗ та Фукс) для подальшого азосполучення з АМ та ОЦТ відповідно та цефалоспоринових антибіотиків (ЦЕФТ та ЦЕФТР) для подальшої взаємодії з 8-Окс, 2-Мет і Рез, зокрема: природу та концентрацію кислоти як середовища діазотування, надлишок діазотуючого реагенту натрій нітриту та тривалість діазотування. Вперше вивчено оптимальні умови азосполучення ДНСК, діазосолей Фукс, САМ та СТЗ з АН, та діазосолей цефалоспоринових антибіотиків (ЦА) із фенольними реагентами, зокрема, кислотність середовища взаємодії, надлишок реагенту, вплив сторонніх електролітів для отримання максимального аналітичного сигналу, що в свою чергу,

дало змогу одержати ефективні кольорові аналітичні форми антибіотиків з реагентами, розрахувати для них $\bar{\epsilon}_\lambda$ та розробити методики кількісного визначення цих АН. Встановлено достатньо високу селективність аналітичних реакцій АН з реагентами за наявності біологічно активних (клавуланової кислоти) та допоміжних речовин, що дало змогу розробити СФ методики визначення АН у одно- та багатокомпонентних готових лікарських формах. Вперше досліджено електрохімічну поведінку АМ та продукту його азосполучення з діазотованим САМ і запропоновано схему електродного процесу відновлення утвореної азосполуки та розроблено і валідовано ВА методику визначення АМ у лікарських засобах. Вперше вивчено електрохімічну поведінку продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону та показано можливість його використання для ВА визначення ЦЕФТР.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених експериментальних досліджень розроблено прості, селективні спектрофотометричні методики визначення АМ з діазотованими сульфаніламидами (СА), ОТЦ з діазотованим Фукс та ДНСК, а також ЦЕФТР за допомогою 8-Окс та 2-Мет і ЦЕФТ з використанням Рез, 8-Окс та 2-Мет, що переважають відомі аналоги за еспресністю (10–40 хв) та співмірні за чутливістю з найчутливішими методиками СФ визначення цих біологічно активних речовин. Також розроблені чутливі ВА методики визначення АМ за реакцією азосполучення із діазотованим САМ та ЦЕФТР за продуктом власного азосполучення.

Розроблені методики успішно апробовано під час аналізу одно- та багатокомпонентних лікарських форм (таблеток, пероральних та ін'єкційних порошків та суспензій). Результати аналізу порівнювали з результатами наведеними у сертифікатах якості відповідних препаратів. Окремі методики було валідовано згідно вимог Державної фармакопеї України (ДФУ), зокрема СФ методики визначення амоксициліну з САМ і СТЗ, цефтріаксону з 8-Окс та ВА методику визначення амоксициліну із САМ. Новизна та оригінальність розробленої ВА методики визначення АМ з сульфаніламідом підтверджена патентом України на винахід "Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у

фармацевтичних препаратах”. Окремі матеріали дисертаційної роботи впроваджено у практику аналітичних лабораторій. Розроблену методику СФ визначення АМ у таблетках “Амоксиклав квіктаб” за реакцією азосполучення із діазотованим САМ впроваджено у лабораторний практикум дисципліни “Аналіз лікарських засобів” для студентів освітнього рівня “магістр” хімічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Методики спектрофотометричного визначення ОТЦ за реакцією азосполучення із діазотованим Фукс та ДНСК впроваджено у практику лабораторії високоефективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів.

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертації, визначено мету і задачі роботи, сформульовано об’єкт та предмет дослідження, зазначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

У першому розділі проведено огляд літературних даних стосовно фізичних, хімічних та лікувальних властивостей АН, розглянуто основні методи кількісного визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТР, ЦЕФТ та детально проаналізовано відомі СФ та ВА методики. Також проаналізовано фізичні та хіміко-аналітичні характеристики реагентів: САМ, СТЗ, ДНСК, Фукс, Рез, 2-Мет та 8-Окс. Обґрунтовано переваги використання спектрофотометрії та вольтамперометрії для визначення АН.

У другому розділі описано методики виконання експериментальних досліджень, приготування та стандартизації вихідних та робочих розчинів, охарактеризовано обладнання, яке використовували в роботі.

У третьому розділі дисертаційної роботи обґрунтовано та експериментально доведено можливість застосування реакції азосполучення в аналізі β -лактамних (АМ, ЦЕФТ та ЦЕФТР) та тетрациклінових (ОТЦ) антибіотиків з метою отримання аналітичних форм для їх спектрофотометричного визначення.

Встановлено оптимальні умови проведення реакцій діазотування реагентів САМ, СТЗ та Фукс: природу та концентрацію кислоти – 0,6–1,0 М хлоридна кислота, концентрацію діазотуючого реагенту – 15-кратний надлишок натрій нітриту відносно концентрації САМ та СТЗ; 10-кратний надлишок відносно концентрації Фукс; тривалість реакції діазотування – 10–20 хв. Досліджено умови максимального

виходу забарвлених азосполук діазосолей реагентів з досліджуваними антибіотиками АМ та ОТЦ: кислотність середовища для азосполук САМ–АМ, СТЗ–АМ, Фукс–ОТЦ – рН 10,5, ДНСК–ОТЦ – середовище 10,0 М NaOH; надлишок реагенту для отримання азосполук САМ–АМ та СТЗ–АМ – 5-кратний, ДНСК–ОТЦ – 2,5-кратний, для азосполуки Фукс–ОТЦ – 1,33-кратний надлишок ОТЦ стосовно Фукс. Вивчено стійкість утворених азосполук сполук АМ–САМ (СТЗ) – 10 хв; ОТЦ–Фукс – 3 год, ОТЦ–ДНСК – 10 хв.

Вивчено оптимальні умови діазотування цефалоспоринових антибіотиків ЦЕФТ та ЦЕФТР: концентрація хлоридної кислоти – 12,0 М; концентрація діазотуючого реагенту – 10-кратний надлишок відносно концентрації АН. Досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей ЦА з реагентами: лужне середовище з кінцевою концентрацією NaOH 0,16 М; надлишок реагенту – 7-кратний для взаємодії ЦА з 8-Окс; 10-кратний у випадку азосполучення ЦА з 2-Мет та ЦЕФТ з Рез. Вивчено стійкість утворених азосполук ЦЕФТ–8-Окс (Рез, 2-Мет) та ЦЕФТР–8-Окс (2-Мет) – 1 год.

Четвертий розділ містить описи нових розроблених методик СФ визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ, ЦЕФТР та їхні метрологічні характеристики. Найменша межа виявлення характерна для методик визначення: АМ з СТЗ, $C_{\min} = 6,0 \cdot 10^{-7}$ М; ОТЦ з фуксином, $C_{\min} = 3,17 \cdot 10^{-6}$ М; ЦЕФТ з 2-Мет, $C_{\min} = 5,7 \cdot 10^{-7}$ М; ЦЕФТР з 2-Мет, $C_{\min} = 4,3 \cdot 10^{-7}$ М. Запропоновані методики чутливі, селективні, доволі експресні, час проведення аналізу (10–30 хв). Усі розроблені СФ методики визначення АН успішно апробовані на модельних розчинах методом “уведено-знайдено”, а методику визначення АМ із САМ під час аналізу водопровідної води.

На підставі одержаних результатів розроблено методики СФ визначення АМ за реакцією азосполучення із діазотованими сульфаніламидами у таблетках “Амоксил” та “Амоксиклав Квіктаб”, порошку для приготування оральної суспензії “Оспамокс”, суспензії для ін’єкцій “Амоксицилін 15% Л.А.”; методики фотометричного визначення ОТЦ за реакцією азосполучення із діазотованим фуксином та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою у порошках для перорального застосування “Окситетрациклін НСІ”, “Бровасептол” та розчині для ін’єкцій “Окси-

100”); методики фотометричного визначення ЦЕФТР за реакцією азосполучення із 8-Окс та 2-Мет в порошках для приготування ін’єкційних розчинів “Цефтриаксон” і “ЕМСЕФ 1000” та ЦЕФТ за реакцією азосполучення із 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом – “Цефтазидим” та “Денізид”. Методики визначення АМ з САМ, СТЗ та ЦЕФТР з 8-Окс валідовано згідно вимог ДФУ.

У п’ятому розділі висвітлено можливість застосування азосполуки АМ з сіллю арендізонію САМ, а також азоіміносполуки на основі ЦЕФТР для розробки методик ВА визначення АМ та ЦЕФТР. Вивчено, що азоіміносполука ЦЕФТР відновлюється за $E_k^{n1} = -0,64$ В, а азосполука АМ–САМ за $E_k^{n2} = -0,55$. На основі проведених досліджень розроблено нові вольтамперометричні методики визначення АМ та ЦЕФТР та розраховано їх метрологічні характеристики, зокрема, для АМ, $C_{\min} = 2,4 \cdot 10^{-7}$ М, а для ЦЕФТР, $C_{\min} = 2,3 \cdot 10^{-6}$ М. Методику ВА визначення АМ за реакцією азосполучення із САМ успішно апробовано та валідовано під час аналізу таблеток “Амоксил” та порошку для приготування оральної суспензії “Оспамокс”. Також розроблено методику ВА визначення ЦЕФТР за реакцією власного азосполучення та успішно апробовано під час аналізу порошку для приготування ін’єкційного розчину “Цефтриаксон”.

Ключові слова: Спектрофотометрія, циклічна вольтамперометрія, полярографія, валідація, антибіотики, цефтриаксон, цефтазидим, амоксицилін, окситетрациклін, діазотування, солі (арен)діазонію, азосполучення, первинні ароматичні аміни, фенольні сполуки, лікарські препарати.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Костів О.** Вольтамперометричне визначення цефтриаксону за реакцією азосполучення / **О. Костів**, П. Ридчук, О. Коркуна // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2019. – Вип. 60., Ч.1 – С. 200–209.

2. **Kostiv O.** Development and validation of the simple and sensitive spectrophotometric method of amoxicillin determination in tablets using sulphanilamides / **O. Kostiv**, O. Korkuna, P. Rydchuk // Acta Chim. Slov. – 2020, Vol. 67, No. 1. – P. 23–35.

3. Патент України на винахід № 120717. МПК G01N 27/00 (2020). Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах / О.Я. Коркуна, П.В. Ридчук, **О.І. Костів**. – №а201801406. – заявл. 13.02.2018; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. Заявник і власник – Львівський національний університет імені Івана Франка.

4. **Костів О.І.** Реакція азосполучення цефалоспоринових антибіотиків з 8-оксихіноліном та її застосування в аналізі лікарських засобів / **О. Костів**, О. Коркуна, М. Орнат // *Methods Objects Chem. Anal.* – 2020. – Vol. 15, No. 3. – P. 144–155.

5. **Костів О.І.** Спектрофотометричне визначення цефтазидиму у ліках із застосуванням резорцину та 2-метилфенолу / **О.І. Костів**, О.Я. Коркуна, М.В. Шерedyкo // *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii.* – 2021. – No. 1, – P. 35–44.

6. **Костів О.** Застосування азосполуки окситетрацикліну з 1-аміно-2-нафтол-4-сульфо кислотою для спектрофотометричного аналізу ветеринарних препаратів / **О. Костів**, О. Коркуна, Л. Янчук, М. Смолінська // *Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім.* – 2021. – Вип. 62. – С. – 156–167.

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

1. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Застосування реакції азосполучення для спектрофотометричного визначення амоксициліну // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2016”, 18–22 жовтня 2016, Київ. – С. 130–131.

2. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Оптимальні умови взаємодії амоксициліну з деякими реагентами, що містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу // *Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2017): зб. тез допов. десятої Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 27–29 березня 2017, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2017. – С.19.*

3. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Нові спектрофотометричні методики визначення амоксициліну з діазотованими реагентами: сульфаніловою кислотою, стрептоцидом, сульфатіазолом та бензидином // *Зб. наук. праць XVI наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2017”, 28 травня – 31 травня 2017, Львів. – С. У10.*

4. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Спектрофотометричне визначення амоксициліну у лікарських препаратах із застосуванням реакції азосполучення // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2017” / Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 18–21 жовтня 2017, Київ. – С. 168–169.

5. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Грийцаровська І.А. Використання сульфаніламідів та сульфатіазолу для визначення вмісту амоксициліну у лікарських формах та валідація розроблених методик // Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези допов. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народж. д. фарм. н., проф. О. М. Гайдукевича, 12–13 квітня 2018, Харків: НФаУ. – С. 333

6. **Костів О.І.**, Шередько М.В., Максимів І.Р., Коркуна О.Я. Встановлення оптимальних умов діазотування цефтазидиму та подальшого його азосполучення з фенольними реагентами // Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2019): зб. тез допов. XII Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 19–21 березня 2019, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2019. – С.12.

7. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Застосування реакції азосполучення для вольтамперометричного визначення амоксициліну // Зб. наук. праць XVII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2019”, 2–5 червня 2019, Львів. – С. У43.

8. **Костів О.І.**, Орнат М.П., Коркуна О.Я., Скробала В.Е. Спектрофотометричне визначення цефтріаксону в лікарських засобах за допомогою 8-оксихіноліну // Зб. тез Всеукр. наук.-практич. конф. з міжнар. участю “Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020”, 5–6 березня 2020, Запоріжжя. – С. 16.

9. **Костів О.І.**, Грийцаровська І.А., Коркуна О.Я., Хавчук М.М. Валідація спектрофотометричної методики визначення амоксициліну на основі реакції азосполучення у суспензії для ін’єкцій “Амоксицилін 15% L.A” // Тези доп. XXI

міжнар. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених “Сучасні проблеми хімії”/ Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 20–22 травня 2020, Київ. – С. 24.

10. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Янчук Л.В., Спектрофотометричне визначення окситетрацикліну за реакцією азосполучення з фуксином та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою // Зб. тез допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2020”, 21–23 жовтня, Наукове видання, Київ: “LAT&K”, 2020. – С. 24.

11. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Валідація вольтамперометричної методики визначення амоксициліну // Сьомий наук. семін. студентів, аспірантів і молодих учених “Прикладні аспекти електрохімічного аналізу”, 15–16 жовтня 2020, Львів: Малий видавн. центр хім. та фізичн. факульт. ЛНУ ім. І. Франка, 2020. – С. 21.

12. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Орнат М.П. Валідація спектрофотометричної методики визначення цефтріаксону за допомогою 8-оксихіноліну у порошку для приготування розчинів для ін’єкцій “цефтріаксон” // XIII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів “Хімічні Каразінські читання – 2021”, 20–21 квітня, Харків, 2021. – С. 38–39.

13. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Орнат М.П., Футрик А.Н. Азосполука цефтріаксону з 2-метилфенолом, як дериват для спектрофотометричного визначення антибіотика у ліках // V Всеукр. наук. конф. “Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи”. Зб. матеріалів конф., 15 квітня 2021, Житомир, 2021. – С. 25.

14. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Реакція азосполучення в аналізі β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків // Зб. наук. праць: XVIII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2021”, 31 травня – 2 червня, Львів: Видавництво від А до Я, 2021. – С. У19.

SUMMARY

Kostiv O.I. Azo coupling reaction in the analysis of β -lactam and tetracycline antibiotics. – Manuscript.

Thesis for obtaining a scientific degree of the Doctor of Philosophy in specialty 102 Chemistry, field of studies 10 Natural Science. – Ivan Franko National University of Lviv. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2021.

The thesis is devoted to the research of spectrophotometric (SPh) and voltammetric (VA) properties of azo compounds obtained from β -lactam and tetracycline antibiotics. To develop the methods of investigated antibiotics determination two different ways of azo coupling reaction were used: between amoxicillin, oxytetracycline and diazotized reagents containing in their structure a primary aromatic amino group, as well as between diazotized cephalosporins and phenolic reagents. The possibilities of using the obtained azo compounds for quantitation of amoxicillin (AM), ceftazidime (CEFT), ceftriaxone (CEFTR) and oxytetracycline (OTC) were studied.

Scientific novelty of the obtained results. Relies on the research of chemical and analytical properties of antibiotics (AN) such azo coupling reactions were used for the first time: amoxicillin with diazotized sulphathiazole (STZ) or with sulphanilamide (SAM); oxytetracycline with 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid (DNSA) or with diazotized fuchsine (Fuchs); diazotized ceftazidime with resorcinol (Res), or with 8-oxyquinoline (8-Ox), or with 2-methylphenol (2-Meth); diazotized ceftriaxone with 8-Ox or with 2-Met. All reactions were used for the development of methods for SPh determination of antibiotics in single- and multicomponent drugs. For the first time, the optimal conditions for diazotization of reagents (SAM, STZ and Fuchs) for further azo coupling with AM and OCT, and for diazotization of cephalosporin antibiotics (CEFT and CEFTR) for further interaction with 8-Ox, 2-Meth, Res were investigated. Among them were acid nature and concentration (as diazotizing medium), excess of the diazotizing reagent (sodium nitrite) and duration of diazotizing. For the first time, the optimal conditions for azo coupling of DNSA, Fuchs, SAM and STZ diazo salts with AN, and cephalosporin antibiotic (CA) diazo salts with phenolic reagents were studied,

in particular, acidity of the interaction medium, reagent excess, influence of foreign electrolytes to obtain the maximum analytical signal. That allowed to obtain effective color analytical forms of antibiotics with reagents, calculate $\bar{\epsilon}_\lambda$ for them and develop methods for quantitation of these AN. A sufficiently high selectivity of analytical reactions of AN with reagents in the presence of biologically active (clavulanic acid) and auxiliary substances was established, which allowed to develop methods for determination of antibiotics in one- and multicomponent finished dosage forms. For the first time, the electrochemical behavior of AM and the product of its azo coupling with diazotized SAM was investigated and the scheme of electrode process of reduction of the formed azo compound was offered, the VA method of determination of AM in drugs was developed and validated. For the first time the electrochemical behavior of the product of diazotized ceftriaxone own azo coupling was investigated and the possibility of its use for VA determination of CEFTR was shown.

The practical significance of the obtained results. Based on the carried out experimental studies, simple, selective spectrophotometric methods for the determination of the AM with diazotized sulphonamides, OTC with diazotized fuchsine and with DNSA, as well as CEFTR using 8-Ox, 2-Met and CEFT using Res, 8-Ox, 2-Met respectively were developed. These methods prevail over the known analogues in rapidity (10–40 min) and are comparable in sensitivity with the most sensitive methods of spectrophotometric determination of these biologically active substances. Sensitive voltammetric methods for the quantitation of AM by the reaction of azo coupling with diazotized SAM and CEFTR by the product of its own azo coupling have also been developed.

The developed methods have been successfully tested during the analysis of single-component and multicomponent dosage forms (tablets, oral and injectable powders and suspensions). The results of the analysis were compared with the results given in the quality certificates of the respective drugs. Some methods were validated according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU), in particular the SPh method of determination of amoxicillin with SAM and STZ and ceftriaxone with 8-Ox and VA method of determination of amoxicillin with SAM. The

novelty and originality of the developed VA method for the determination of AM with sulphanilamide was confirmed by the patent of Ukraine for the invention “Method of voltammetric determination of amoxicillin in pharmaceuticals”. Some materials of the thesis were introduced into the practice of analytical laboratories. The developed method of SPh determination of AM in tablets “Amoksiklav Quicktab” by the reaction of azo coupling with diazotized SAM was introduced into the laboratory workshop of the discipline “Analysis of drugs” for students of educational level “Master” of the Faculty of Chemistry of Ivan Franko National University of Lviv. Methods of spectrophotometric determination of OTC by the reaction of azo coupling with diazotized Fuchs and with DNSA have been introduced into the practice of the laboratory of high-performance liquid chromatography State Research Control Institute of veterinary medicinal products and feed additives (SCIVP), Lviv.

The introduction substantiate the relevance of the thesis topic, defines the purpose and tasks of the work, formulates the object and subject of research, indicates the scientific novelty and practical significance of the obtained results.

The first section reviews the literature on the physical, chemical and therapeutic properties of AN, considers the main methods of quantitation of AM, OTC, CEFT, CEFTR and discusses in detail already known SPh and VA methods. Physical and analytical characteristics of reagents: SAM, STZ, DNSA, Fuchs, Res, 2-Meth and 8-Ox were also analyzed. The advantages of using spectrophotometry and voltammetry to determine AN were substantiated.

The second section describes the methods of experimental research, preparation and standardization of initial and working solutions, describes the equipment used during the work.

The third section substantiates and experimentally proves the possibility of using the azo coupling reaction in the analysis of β -lactam (AM, CEFT and CEFTR) and tetracycline (OTC) antibiotics in order to obtain analytical forms for their spectrophotometric determination.

The optimal conditions for carrying out the diazotization reactions of reagents SAM, STZ, Fuchs were established: 0.6-1.0 M hydrochloric acid; 15-fold excess of

sodium nitrite relative to the concentration of SAM and STZ; 10-fold excess of sodium nitrite relative to the concentration of fuchsine; the duration of the diazotization reaction is 10–20 minutes. The conditions of maximum yield of colored azo compounds of diazo salts of reagents with the antibiotics AM and OTC were studied: pH 10.5 for azo compounds SAM–AM, STZ–AM, Fuchs–OTC; 10.0 M NaOH medium for DNSA–OTC; 5-fold excess of reagent for azo compounds SAM–AM and STZ–AM; 2.5-fold excess for DNSA–OTC; 1.33-fold excess of OTC toward Fuchs for azo compound Fuchs–OTC. Azo compounds AM–SAM, AM–STZ, OTC–DNSA are stable for 10 minutes; OTC–Fuchs – 3 hours.

The optimal conditions for diazotization of cephalosporin antibiotics CEFT and CEFTR were studied: 12.0 M hydrochloric acid; 10-fold excess of sodium nitrite relative to the concentration of AN. The conditions of maximum yield of colored compounds of CA diazo salts with reagents were investigated: reaction medium – 0.16 M NaOH in the final concentration; 7-fold excess of 8-Ox; 10-fold excess of 2-Meth or Res. CEFT azo compounds with 8-Ox, Res, 2-Met and CEFTR with 8-Ox, 2-Met are stable for 1 hour.

The fourth section contains descriptions of new developed methods of SPh determination of AM, OTC, CEFT, CEFTR and their analytical characteristics. The smallest limit of detection is characteristic for methods of determination of AM with STZ, $C_{\min} = 6.0 \cdot 10^{-7}$ M; OTC with fuchsine, $C_{\min} = 3.17 \cdot 10^{-6}$ M; CEFT with 2-Meth, $C_{\min} = 5.7 \cdot 10^{-7}$ M; CEFTR with 2-Meth, $C_{\min} = 4.3 \cdot 10^{-7}$ M. The offered techniques are sensitive, selective, rather rapid, time of carrying out the analysis (10–30 min). All developed SPh methods of AN determination were successfully tested on the model solution by the method “added-found”, and the method of the AM determination with SAM was tested during the AM quantification in tap water.

Based on the obtained results, the following methods of SPh determination were developed: AM in the reaction of azo coupling with diazotized sulphanilamides in tablets “Amoxil” and “Amoksiklav Quicktab”, in powder for oral suspension “Ospamox”, in suspension for injection “Amoxicillin 15% L.A.”; OTC in the reaction of azo coupling with diazotized fuchsine or 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid in powders for oral administration “Oxytetracycline HCl”, “Brovaseptol”, in solution for

injection “Oxy-100”; CEFTR in the reaction of azo coupling with 8-Ox or 2-Meth in powders for the preparation of injectable solvents “Ceftriaxone”, “EMCEPH 1000”; CEFT in the reaction of azo coupling with 8-oxyquinoline, resorcinol, 2-methylphenol in powders for the preparation of injectable solvents “Ceftazidime” and “Denizid”. Methods for AM determination using SAM or STZ and CEFTR with 8-Ox were validated according to the requirements of the DPhU.

The fifth section highlights the possibility of using the AM azo compound with the arenediazonium salt of SAM, as well as CEFTR-based azoimino compounds for the development of methods for VA determination of AM and CEFTR respectively. It was studied that the azoimine compound CEFTR is reduced at $E_c^{p1} = -0,64$ V, and the azo compound of AM-SAM at $E_c^{p2} = -0,55$ V. Based on the conducted research new voltammetric determination methods of AM and CEFTR were developed. Their analytical characteristics were calculated, for instance, $C_{min} = 2.4 \cdot 10^{-7}$ M for AM, and $C_{min} = 2.3 \cdot 10^{-6}$ M for CEFTR. VA method of AM determination by the reaction of azo coupling with SAM were successfully tested and validated during the analysis of tablets “Amoxil” and the analysis of powder for preparation of oral suspension “Ospamox”. The VA determination of CEFTR by the reaction of its own azo coupling was also developed and successfully tested at the analysis of the powder for preparation of injectable solution “Ceftriaxone”.

Key words: Spectrophotometry, cyclic voltammetry, polarography, validation, antibiotics, ceftriaxone, ceftazidime, amoxicillin, oxytetracycline, diazotization, arenediazonium salts, azo coupling, primary aromatic amines, phenolic compounds, drugs.

Publications in which the main scientific results of the thesis are published:

1. **Kostiv O.** Voltammetric determination of ceftriaxon in pharmaceuticals Voltammetric determination of ceftriaxone by azo coupling reaction / **O. Kostiv**, P. Rydchuk, O. Korkuna // Visnyk Lviv Univ. Ser. Chem. – 2019. – Iss. 60 (1). – P.200–209 (in Ukrainian).

2. **Kostiv O.** Development and validation of the simple and sensitive spectrophotometric method of amoxicillin determination in tablets using

sulphanilamides / **O. Kostiv**, O. Korkuna, P. Rydchuk // *Acta Chim. Slov.* – 2020, Vol. 67, No. 1. – P. 23–35.

3. Ukrainian patent for invention № 120717. MPK G01N 27/00 (2020). A method for voltammetric determination of amoxicillin in pharmaceuticals / O.Ya. Korkuna, P.V. Rydchuk, **O.I. Kostiv**. – No a201801406. – stated. 13.02.2018; publ. 27.01.2020, Bull. No 2. Applicant and owner – Ivan Franko National University of Lviv.

4. **Kostiv O.** Azocoupling reaction of cephalosporin antibiotics with 8-hydroxyquinoline and its application in the analysis of medicinal products / O. Kostiv, O. Korkuna, M. Ornat // *Methods Objects Chem. Anal.* – 2020. – Vol. 15, No. 3. – P. 144–155 (in Ukrainian).

5. **Kostiv O.** Spectrophotometric determination of ceftazidime in pharmaceutical using resorcinol and 2-methylphenol / **O. Kostiv, O. Korkuna, M Sheredko** // *Voprosy Khimii i Khimicheskoi tekhnologii.* – 2021. – No. 1. – P. 35–44 (in Ukrainian).

6. **Kostiv O.** Application of azo compounds of oxytetracycline with 1-amino-2-naftol-4-sulphonic acid for spectrophotometric analysis of veterinary medicines / **O. Kostiv**, O. Korkuna, L. Yanchuk, M. Smolinska // *Visnyk Lviv Univ. Ser. Chem.* – 2021. – Iss. 62. – P.156–167 (in Ukrainian).

Scientific publications that certify approbation of the thesis:

1. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya. Application of azo coupling reaction for spectrophotometric determination of amoxicillin // *Book of abstracts of Kyiv conf. on analytical chemistry “Modern Trends 2016”*, October 18–22, 2016, Kyiv. – P. 130–131 (in Ukrainian).

2. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya. Optimal conditions for the amoxicillin interaction with some reagents containing in its structure a primary aromatic amino group // *Book of abstracts of X Ukrainian scien. conf. for students, and young scientists with the international participation “Current chemical problems”*, March 27–29, 2017, Vinnytsia. – P. 19. (in Ukrainian).

3. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya. New spectrophotometric methods for the amoxicillin determination with diazotized reagents: sulfanilic acid, streptocide, sulphathiazole and benzidine // Coll. scient. works of the XVI scient. conf. “Lviv chemical readings – 2017”, May 28–31, 2017, Lviv. – P. U10. (in Ukrainian).

4. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya. Spectrophotometric determination of amoxicillin in drugs using azo coupling reaction // Book of abstracts of Kyiv conf. on analytical chemistry “Modern Trends 2017”, October 18–21, 2017, Kyiv. – P. 168–169. (in Ukrainian).

5. **Kostiv O.I.**, Korkuna O. Ya., Grytsarovska I.A. The use of sulphanilamide and sulphathiazole to determine the content of amoxicillin in dosage forms and validation of the developed methods // Synthesis and analysis of biologically active substances and medicinal substances: abstracts of Ukrainian scient.-pract. conf. with international participation dedicated to the 80th anniversary of birth. doct. pharm. scien., prof. O.M. Gaidukevich, April 12–13, 2018, Kharkiv. – P. 333

6. **Kostiv O.I.**, Sheredko M.V., Maksymiv I.R., Korkuna O. Ya. Establishment of optimal conditions for ceftazidime diazotization and its subsequent azo coupling with phenolic reagents // Book of abstracts of XII Ukrainian scient. conf. for students, and young scientists with the international participation “Current chemical problems”, March 19–21, 2019, Vinnytsia. – P. 12. (in Ukrainian).

7. **Kostiv O.I.**, Korkuna O. Ya., Rydchuk P.V., Khavchuk M.M. Application of azo coupling reaction for voltammetric determination of amoxicillin // Coll. scient. works of the XVII scient. conf. “Lviv Chemical Readings – 2019”, June 2–5, 2019, Lviv. – P. U43.

8. **Kostiv O.I.**, Ornat M.P., Korkuna O.Ya., Skrobala V.E. Spectrophotometric determination of ceftriaxone in drugs using 8-oxyquinoline // Coll. thesis Ukrainian scientific-practical conf. with international participation “Modern issues of molecular biochemical research and laboratory screening in clinical and experimental medicine – 2020”, March 5–6, 2020, Zaporizhzhia. – P. 16.

9. **Kostiv O.I.**, Grytsarovska I.A., Korkuna O.Ya., Khavchuk M.M. Validation of spectrophotometric method for determination of amoxicillin based on azo coupling

reaction in suspension for injection “Amoxicillin 15% L.A” // Book of abstracts of 21th international. conf. students, PhD students and young scientists “Modern chemistry problems”, May 20–22, 2020, Kyiv. – P. 24.

10. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya., Yanchuk L.V. Spectrophotometric determination of oxytetracycline by the reaction of azo copling with fuchsine and 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid // Book of abstracts of Kyiv conf. on analytical chemistry “Modern Trends 2020”, October 21–23, 2020, Kyiv. – P. 24 (in Ukrainian).

11. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya., Rydchuk P.V., Khavchuk M.M. Validation of voltammetric method for determination of amoxicillin // Book of abstracts of VII scient. and pract. seminar for students, postgraduates and young scientists “Applied aspects of electrochemical analysis”, October 15–16, 2020, Lviv. – P. 21. (in Ukrainian).

12. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya., Ornat M.P. Validation of spectrophotometric method for ceftriaxone determination using 8-oxyquinoline in powder for preparation of solution for injection “Ceftriaxone” // XIII Ukr. scient. conf. of students and postgraduate students “Chemical Karazin readings – 2021”, April 20–21, 2021, Kharkiv. – P. 38–39.

13. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya., Ornat M.P., Futryk A.N. Azo compound of ceftriaxone with 2-methylphenol as a derivate for spectrophotometric determination of antibiotic in drugs // Coll. materials of the V Ukrainian science. conf. “Current problems of chemistry: research and prospects”, April 15, 2021, Zhytomyr. – P. 25.

14. **Kostiv O.I.**, Korkuna O.Ya. Azo copling reaction in the analysis of β -lactam and tetracycline antibiotics // Coll. scient. works of the XVIII sciences. conf. “Lviv chemical readings – 2021”, May 31 – June 25, 2021, Lviv. – P. U43.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	15
1.1. Хіміко-фармакологічна характеристика деяких антибіотиків пеніцилінового, цефалоспоринового та тетрациклінового рядів	15
1.1.1. Амоксицилін.....	16
1.1.2. Цефалоспорини: цефтріаксон та цефтазидим.....	19
1.1.3. Окситетрацилін.....	20
1.2. Методи визначення антибіотиків.....	21
1.2.1. Титриметричні методи.....	22
1.2.2. Хроматографічні методи	23
1.2.3. Люмінесцентні методи	24
1.2.4. Електрохімічні методи	25
1.2.5. Спектрофотометричні методи	28
1.3. Аналітична характеристика реагентів.....	33
1.4. Умови перебігу та особливості механізму реакцій діазотування та азосполучення	37
ВИСНОВКИ З ОГЛЯДУ ЛІТЕРАТУРИ.....	42
РОЗДІЛ 2. ВИГОТОВЛЕННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ РОЗЧИНІВ. ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ТА ВОЛЬТ- АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ.....	45
2.1. Виготовлення робочих розчинів.....	45
2.1.1. Виготовлення та стандартизація розчинів антибіотиків.....	45
2.1.2. Виготовлення і стандартизація розчинів реагентів.....	46
2.1.3. Референтні методики визначення антибіотиків у лікарських формах.....	53
2.2. Апаратура.....	59
2.3. Вибір оптимальних умов спектрофотометричного визначення.....	59

2.4. Вибір оптимальних інструментальних параметрів для вольтамперометричного дослідження	61
2.5. Метрологічні та валідаційні характеристики результатів досліджень.....	63
РОЗДІЛ 3 СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ АЗОСПОЛУК ОТРИМАНИХ ВНАСЛІДОК ВЗАЄМОДІЇ АНТИБІОТИКІВ З РЕАГЕНТАМИ.....	64
3.1 Спектрофотометрія азосполук отриманих на основі антибіотиків які містять фенольну групу із солями арендіазонію реагентів.....	64
3.1.1 Спектрофотометрія амоксициліну із сульфаніламидами.....	65
3.1.2 Спектрофотометрія окситетрацикліну із 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо-кислотою та фуксином.....	79
3.1.3 Дослідження складу утворених азосполук амоксициліну та окситетрацикліну із досліджуваними реагентами, що містять первинну ароматичну аміногрупу	92
3.2 Спектрофотометрія азосполук отриманих на основі діазотованих цефалоспоринових антибіотиків із фенольними реагентами.....	98
3.2.1 Спектрофотометричне дослідження взаємодії цефтазидиму з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом.....	98
3.2.2 Дослідження складу азосполук діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом.....	116
3.3 Спектрофотометричне вивчення продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону.....	121
3.3.1 Уточнення умов азосполучення молекул діазотованого ЦЕФТР	122
РОЗДІЛ 4 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ, ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ АЗОСПОЛУЧЕННЯ З ПЕРВИННИМИ АРОМАТИЧНИМИ АМІНАМИ ТА ЦЕФТАЗИДИМУ, ЦЕФТРИАКСОНУ – З ФЕНОЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ.....	129
4.1 Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення антибіотиків з реагентами.....	129

4.2 Специфічність спектрофотометричного визначення амоксициліну та окситетрацикліну з первинними ароматичними амінами, цефтазидиму та цефтріаксону з фенольними сполуками за наявності допоміжних та діючих речовин.....	135
4.3 Спектрофотометричне визначення антибіотиків у модельних розчинах...	139
4.4 Спектрофотометричне визначення амоксициліну у водопровідній воді...	140
4.5 Спектрофотометричне визначення амоксициліну, окситетрацикліну, цефтазидиму та цефтріаксону у лікарських препаратах.....	141
4.6 Валідація методики спектрофотометричного визначення амоксициліну у таблетках “Амоксил” 250 мг.....	147
РОЗДІЛ 5 ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ ТА ЦЕФТРИАКСОНУ НА ОСНОВІ ОТРИМАНИХ АЗОСПОЛУК.....	159
5.1. Дослідження електрохімічної поведінки продукту азосполучення солі діазонію цефтріаксону між собою у водних розчинах.....	159
5.2. Вольтамперометричне дослідження азосполуки амоксициліну із діазосіллю сульфаніламідю.....	164
5.2.1 Дослідження електрохімічної поведінки та оборотності електродного процесу відновлення у водних розчинах АМ, САМ та продукту їхньої взаємодії.....	164
5.2.2 Дослідження впливу кислотності середовища при утворенні азосполуки АМ із САМ та швидкості накладання напруги поляризації на її електрохімічне відновлення.....	167
5.2.3 Дослідження впливу сечовини, яку використовують для усунення непрореагованого натрій нітриту на вигляд вольтамперограм азосполуки АМ із САМ.....	169
5.2.4 Дослідження природи струму та механізму електрохімічного відновлення продукту азосполучення діазотованого сульфаніламідю з амоксициліном.....	171
5.3 Метрологічні характеристики вольтамперометричних методик визначення	

цефтріаксону та амоксициліну.....	177
5.4 Вибірковість взаємодії амоксициліну з діазосіллю сульфаніламідру за наявності допоміжних та біологічно-активних речовин.....	181
5.5 Апробація методики вольтамперометричного визначення амоксициліну та цефтріаксону у лікарських препаратах.....	183
ВИСНОВКИ.....	187
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	189
ДОДАТКИ.....	216
ДОДАТОК А КЛАСИ АНТИБІОТИКІВ.....	217
ДОДАТОК Б МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКІВ.....	220
ДОДАТОК В КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ПРИРОДИ СТРУМУ ТА ХАРАКТЕРУ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	235
ДОДАТОК Г ВАЛІДАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ВИМОГИ ДО НИХ...	237
ДОДАТОК Д ВОЛЬТАМПЕРОГРАМИ РОЗЧИНІВ АЗОСПОЛУК ОТЦ З ФУКСИНОМ ТА ЦА З 8-ОКСИХІНОЛІНОМ.....	242
ДОДАТОК Е ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ ТА ЦЕФТРИАКСОНУ.....	244
ДОДАТОК Є МЕХАНІЗМИ ВІДНОВЛЕННЯ ДЕЯКИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП.....	276
ДОДАТОК Ж СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ. ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ.....	277
ДОДАТОК З ВПРОВАДЖЕННЯ.....	282

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

A	– оптична густина розчину
$C_{\text{мін}}$	– межа виявлення
$C_{\text{н}}$	– межа визначення
CAS №	– реєстраційний номер хімічних сполук Хімічної реферативної служби Американського хімічного товариства
$E_{\text{п}}^{\text{к}}$	– потенціал катодного піку, В
$E_{\text{п}/2}^{\text{к}}$	– потенціал катодного півпіку, В
$I_{\text{п}}^{\text{к}}$	– значення сили струму катодного піку, мкА
$I_{\text{п}}^{\text{а}}$	– значення сили струму анодного піку, мкА
V	– швидкість накладання напруги поляризації, В/с.
λ_{max}	– довжина хвилі максимуму світлопоглинання, нм
R	– коефіцієнт кореляції
$\bar{\epsilon}_{\lambda}$	– ефективний молярний коефіцієнт світлопоглинання при довжині хвилі λ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹
АН	– антибіотик
АМ	– амоксицилін
ВЕРХ	– вискоефективна рідинна хроматографія
ВА	– вольтамперометрія
ДНСК	– 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислота
ЕСП	– електронний спектр світлопоглинання
ЛЗ	– лікарський засіб
ОТЦ	– окситетрациклін
Рез	– резорцин
р.к.е.	– ртутний краплинний електрод
РСЗ	– робочий стандартний зразок
РДЗ	– робочий досліджуваний зразок
РМЗДП	– робочий модельний зразок досліджуваного препарату

РМЗ	– робочий модельний зразок
СА	– сульфаніламід
САМ	– сульфаніламід (стрептоцид)
СТЗ	– сульфатіазол
СФ	– спектрофотометрія
ТШХ	– тонкошарова хроматоргафія
УФ	– ультрафіолетова ділянка спектру
УБС	– універсальна буферна суміш
Фукс	– фуксин
х.ч.	– хімічно чистий
ч.д.а.	– чистий для аналізу
ЦА	– цефалоспоринові антибіотики
ЦЕФТР	– цефтріаксон
ЦЕФТ	– цефтазидим
8-Окс	– 8-оксихінолін
2-Мет	– 2-метилфенол

ВСТУП

Актуальність теми. Одним з найбільш пріоритетних напрямків розвитку аналітичної хімії є розробка методик визначення біологічно активних сполук – речовин, які внаслідок своїх фізико-хімічних властивостей мають певну специфічну активність і впливають на деякі функції організму та можуть використовуватись, зокрема, як лікарські засоби. До таких сполук належать антибіотики – речовини природного, напівсинтетичного та синтетичного походження, які вибірково пригнічують ріст та розмноження живих клітин мікроорганізмів, пухлин тощо. Понад 100 років відомо про антибактеріальні властивості АН. За цей час було створено багато різних класів АН. Це було зумовлено тим, що бактерії все більше набували стійкості до їхньої дії через надмірне використання АН як для лікування людей особливо у субтерапевтичних дозах, так у тваринництві для покращення росту і задля профілактики інфекцій, чи через додавання до готової продукції для її консервації. Проблема резистентності патогенних мікроорганізмів до дії АН на сьогодні набуває ще більшого резонансу, у тому числі, зокрема, у зв'язку із лікуванням наслідків коронавірусної інфекції. Досить часто пацієнтам доводиться виписувати кілька АН із різних груп, які часто є ліками “останньої надії”, що також сприяє розвитку резистентності мікроорганізмів до їхньої дії. З іншого боку це велика спокуса для “чорних фармацевтів” щоб створювати неякісні чи фальсифіковані антибіотики. Тому кількість об'єктів у яких потрібно контролювати вміст АН увесь час зростає. Це ліки на усіх етапах їхнього виготовлення для забезпечення належної якості, продукти харчування тваринного походження, стоки тваринницьких ферм та підприємств із їхньої переробки.

За статистикою до найпоширеніших за застосуванням у медичній практиці є група β -лактамних АН, які порушують синтез клітинної стінки бактерій, до цієї групи належать, зокрема, пеніциліни та цефалоспорини. У ветеринарії доволі часто вживаними залишаються тетрациклінові АН, що порушують синтез білка у бактеріальній клітині, зокрема окситетрациклін. Складність інфекцій різного характеру та резистентність до дії окремих антибіотиків зумовлює використання комбінованих лікарських засобів на їхній основі, особливо це стосується

ветеринарних препаратів. Контроль якості ліків вимагає застосування чутливих і селективних методів визначення вмісту діючих компонентів як в готових лікарських формах, так і їх залишкових кількостей у фізіологічних рідинах та тканинах. У зв'язку з цим, зростає потреба в швидких і надійних методиках ідентифікації АН та визначення їх кількісного вмісту.

Для визначення β -лактамних та тетрациклінових АН найширше застосовують ВЕРХ, яка потребує дуже дорогого обладнання, реактивів і стандартів високої чистоти. Спектрофотометричні та вольтамперометричні методики, які є відносно простими, експресними, достатньо чутливими та недорогими у виконанні для визначення цих АН використовуються досить обмежено. А ті, що пропонують застосовувати, мають ряд недоліків, зокрема, вимагають використання специфічних та дорогих реагентів, тривале нагрівання; використання токсичних органічних розчинників; у деяких роботах не вивчена селективність запропонованих реакцій. Більшість розроблених методик не є валідованими, хоча дана процедура є обов'язковою до виконання та прописана у фармакопях різних країн світу.

Для отримання ефективних аналітичних форм органічних речовин, які містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу або фенольний гідроксил, і можуть виступати як діазоскладова чи азоскладова відповідно, широко використовують реакцію азосполучення, зокрема, її застосовують для визначення АМ, ОТЦ та ЦА. Ондак умови проведення даної реакції є доволі складними, а сама процедура тривалою. Серед вище згаданих АН найбільш суперечливі є умови діазотування цефалоспоринів, однак і умови реакції азосполучення для решти досліджених нами АН також потребують конкретизації. Тому вивчення умов обох реакцій діазотування та азосполучення АН з відповідними реагентами з метою розроблення нових, надійних, чутливих, селективних, експресних та простих методик визначення цих біологічно активних субстанцій залишається актуальним.

Як реагенти (діазоскладові у реакції азосполучення) для визначення АМ та ОТЦ ми обрали деякі сульфаніламіді, фуксин та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоту. СА широко використовують у медицині як антимікробні лікарські засоби. СА часто визначають за реакцією азосполучення із різними фенольними реагентами, однак

даних про їхнє використання як аналітичних реагентів в літературі немає. Трифенілметановий барвник Фукс (містить три ароматичні аміногрупи) не має дуже широкого застосування в аналітичній хімії. ДНСК широко використовують як діазоскладову для синтезу багатьох метал-азобарвників, які застосовуються у текстильній промисловості, але відомостей про застосування її в аналізі в літературі немає.

Як реагенти для визначення цефалоспоринів ми обрали фенольні сполуки 8-оксихінолін, 2-метилфенол та резорцин, які застосовують як азоскладову в реакції азосполучення. 2-метилфенол та резорцин широко використовують у синтезі азобарвників та для одержання смол. Рез як аналітичний реагент має обмежене застосування, а 2-Мет – взагалі не застосовують. 8-Окс набув широкого використання в аналітичній хімії для визначення і розділення іонів металів, однак в аналізі органічних речовин використовується рідко.

Актуальність дослідження взаємодії β -лактамних антибіотиків АМ, ЦЕФТ, ЦЕФТР та тетрациклінового антибіотика ОТЦ з реагентами, які містять в своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу та фенольними реагентами за реакцією азосполучення зумовлена необхідністю розробки нових експресних, селективних і доступних методик СФ визначення антибіотиків в одно- та багатокомпонентних лікарських препаратах за наявності інших біологічно активних і допоміжних речовин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами. Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі аналітичної хімії Львівського національного університету ім. Івана Франка відповідно до науково-тематичних планів і державних бюджетних тем: ХА-32 Ф “Закарпатські цеоліти в аналітичній хімії розсіяних елементів, бактерицидних, протипухлинних засобів та інших біологічно активних речовин” (2016-2018 рр., державний реєстраційний номер 0116U001541) та ХА-87 Ф “Багатофункціональні матеріали клиноптилоліт – перехідні метали у хімічному аналізі та біології” (2019-2021 рр., державний реєстраційний номер (0119U002207).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – розробка простих, експресних, селективних і чутливих методик визначення деяких β -лактамних та тетрациклінових АН у вигляді азосполук із реагентами, які містять первинну ароматичну аміногрупу,

або фенольну групу у комбінованих лікарських формах фармацевтичних та ветеринарних препаратів.

Для реалізації цієї мети необхідно було вирішити наступні **завдання**:

- провести експериментальний пошук серед великого різноманіття сполук, що містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу, діазосолі яких взаємодіють з АМ та ОТЦ, або фенольних сполук, які будуть азосполучатися з діазотованими антибіотиками ЦЕФТ та ЦЕФТР, вибрати для наступних досліджень ті, що утворюють кольорові та електрохімічно активні аналітичні форми;
- оптимізувати умови діазотування реагентів та антибіотиків, дослідити умови максимального виходу забарвлених азосполук АН з реагентами (вплив кислотності середовища, вплив природи та концентрації буферного розчину, вплив концентрації реагенту) та вивчити стабільність забарвлених аналітичних форм у часі, вибрати критерії СФ та ВА визначення;
- вивчити вплив діючих і допоміжних речовин, які використовують для отримання лікарських форм антибіотиків, на процес взаємодії АМ, ОТЦ, ЦЕФТР та ЦЕФТ з обраними реагентами;
- провести апробацію розроблених методик СФ та ВА визначення антибіотиків при аналізі лікарських препаратів.

Об'єкт дослідження: азосполучення амоксициліну та окситетрацикліну з діазотованими реагентами, що містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу, та діазотованих цефалоспоринів із фенольними реагентами.

Предмет дослідження: забарвлені аналітичні форми амоксициліну з сульфаніламідом та сульфатіазолом, окситетрацикліну з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою та фуксином, цефтазидиму з резорцином, 8-оксихіноліном та 2-метилфенолом, цефтріаксону з 8-Окс та 2-Мет.

Методи дослідження: спектрофотометрія в УФ та видимій ділянці спектру, вольтамперометрія, вискоефективна рідинна хроматографія.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті дослідження хіміко-аналітичних властивостей антибіотиків вперше запропоновано використання реакції азосполучення АМ з діазотованим сульфатіазолом та сульфаніламідом, ОТЦ з 1-

діазо-2-нафтол-4-сульфокислотою та діазотованим фуксином, діазотованого ЦЕФТ з резорцином, 8-оксихіноліном, 2-метилфенолом та діазотованого ЦЕФТР з 8-Окс і 2-Мет для розробки методик СФ визначення АН у одно- та багатокомпонентних лікарських засобах. Вперше вивчено оптимальні умови діазотування реагентів (САМ, СТЗ та Фукс) для подальшого азосполучення з АМ та ОЦТ відповідно та цефалоспоринових антибіотиків (ЦЕФТ та ЦЕФТР) для подальшої взаємодії з 8-Окс, 2-Мет і Рез, зокрема: природу та концентрацію кислоти як середовища діазотування, надлишок діазотуючого реагенту натрій нітриту та тривалість діазотування. Вперше вивчено оптимальні умови азосполучення ДНСК, діазосолей Фукс, САМ та СТЗ з АН, та діазосолей цефалоспоринових антибіотиків із фенольними реагентами, зокрема, кислотність середовища взаємодії, надлишок реагенту, вплив сторонніх електролітів для отримання максимального аналітичного сигналу, що в свою чергу, дало змогу одержати ефективні кольорові аналітичні форми антибіотиків з реагентами, розрахувати для них $\bar{\epsilon}_\lambda$ та розробити методики кількісного визначення цих АН. Встановлено достатньо високу селективність аналітичних реакцій АН з реагентами за наявності біологічно активних (клавуланової кислоти) та допоміжних речовин, що дало змогу розробити СФ методики визначення АН у одно- та багатокомпонентних готових лікарських формах. Вперше досліджено електрохімічну поведінку АМ та продукту його азосполучення з діазотованим САМ і запропоновано схему електродного процесу відновлення утвореної азосполуки та розроблено і валідовано ВА методику визначення АМ у лікарських засобах. Вперше вивчено електрохімічну поведінку продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону та показано можливість його використання для ВА визначення ЦЕФТР.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених експериментальних досліджень розроблено прості, селективні спектрофотометричні методики визначення АМ з діазотованими сульфаніламидами, ОЦТ з діазотованим Фукс та ДНСК, а також ЦЕФТР за допомогою 8-Окс та 2-Мет і ЦЕФТ з використанням Рез, 8-Окс та 2-Мет, що переважають відомі аналоги за еспресністю (10–40 хв) та співмірні за чутливістю з найчутливішими методиками СФ визначення цих біологічно активних речовин. Також розроблені чутливі ВА методики

визначення АМ за реакцією азосполучення із діазотованим САМ та ЦЕФТР за продуктом власного азосполучення.

Розроблені методики успішно апробовано під час аналізу одно- та багатокомпонентних лікарських форм (таблеток, пероральних та ін'єкційних порошків та суспензій). Результати аналізу порівнювали з результатами наведеними у сертифікатах якості відповідних препаратів. Окремі методики було валідовано згідно вимог Державної фармакопеї України, зокрема СФ методики визначення амоксициліну з САМ і СТЗ, цефтріаксону з 8-Окс та ВА методику визначення амоксициліну із САМ. Новизна та оригінальність розробленої ВА методики визначення АМ з сульфаніламідом підтверджена патентом України на винахід "Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах". Окремі матеріали дисертаційної роботи впроваджено у практику аналітичних лабораторій. Розроблену методику СФ визначення АМ у таблетках "Амоксиклав квіктаб" за реакцією азосполучення із діазотованим САМ впроваджено у лабораторний практикум дисципліни "Аналіз лікарських засобів" для студентів освітнього рівня "магістр" хімічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Методики спектрофотометричного визначення ОТЦ за реакцією азосполучення із діазотованим Фукс та ДНСК впроваджено у практику лабораторії високоефективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів.

Особистий внесок здобувача. Пошук, систематизація та аналіз літературних даних за темою дисертації, експериментальна робота, опрацювання, аналіз та інтерпретація одержаних результатів, оформлення та написання дисертаційної роботи виконані дисертанткою самостійно. Вибір тематики, постановка мети та визначення завдань дослідження, планування експериментів та узагальнення одержаних результатів, їх виклад у формі наукових публікацій, проведено спільно з науковим керівником к.х.н., доц. Коркуною О.Я. Співавторами спільних із дисертанткою наукових публікацій є доцент кафедри аналітичної хімії, к.х.н. Ридчук П.В., який брав участь у плануванні та підготовці частини вольтамперометричних досліджень, а також студенти, які виконували частину досліджень під час магістерських та курсових робіт.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних та вітчизняних конференціях: Київській конференції з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2016” (Київ, 2016); X Українській науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Хімічні проблеми сьогодення” (Вінниця, 2017); XVI Науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2017” (Львів, 2017); Київській конференції з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2017” (Київ, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій” (Харків, 2018); II Міжнародній (XII Українській) науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Хімічні проблеми сьогодення” (Вінниця, 2019); XVII Науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2019” (Львів, 2019); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020” (Запоріжжя, 2020); XXI Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Сучасні проблеми хімії” (Київ, 2020); Київській конференції з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2020” (Київ, 2020); VII науковому семінарі студентів, аспірантів і молодих учених “Прикладні аспекти електрохімічного аналізу 2020” (Львів, 2020); Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів “Хімічні каразінські читання – 2021” (Харків, 2021); V Всеукраїнській науковій конференції “Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи” (Житомир, 2021); XVIII Науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2021” (Львів, 2021); звітних наукових конференціях викладачів та співробітників Львівського національного університету імені Івана Франка (Львів, 2017–2021).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах, 14 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій та отримано один патент України на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що налічує 242 найменування і 8 додатків. Дисертація містить 75 таблиць і 80 рисунків. Загальний обсяг роботи 300 сторінок.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Хіміко-фармакологічна характеристика деяких антибіотиків пеніцилінового, цефалоспоринового та тетрациклінового рядів

Антибіотики – речовини природного, напівсинтетичного та синтетичного походження, які вибірково пригнічують ріст та розмноження живих клітин мікроорганізмів. Відомі різні класифікації АН, зокрема: за типом дії, за спектром антимікробної активності та за хімічною будовою. Найбільш ширшою та досконалою вважають хімічну класифікацію, згідно з якої АН поділяють на: β – лактами, які містять бета-лактамне кільце і до яких належать пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми та монобактами; макроліди, які містять макроциклічне лактонне кільце; тетрацикліни, які містять чотири конденсованих шестичленних цикли; амфеніколи у молекулі містять структуру фенілу; аміноглікозиди містять у структурі аміносахариди, що з'єднані глікозидним зв'язком із агліконовим фрагментом; лінкозаміди, що в свою чергу складаються з амінокислоти та моносахариду, з'єднаних амідним зв'язком; полієни – група антибіотиків, для яких характерна наявність у молекулярній структурі 4 і більше спряжених подвійних зв'язків; поліміксини, які складаються із циклічного пептиду і гідрофобного хвоста, хінолони – група синтетичних АН, що є похідними 4-хінолону і мають в своєму складі піперазиновий цикл [1]. Детальніше класифікацію антибіотиків за хімічною будовою наведено у додатку А, табл. А1. Згідно цієї класифікації можна виокремити велику групу β -лактамних антибіотиків, що найчастіше використовуються в лікарській практиці, та тетрациклінові антибіотики, які широко застосовуються у ветеринарній практиці.

Відкриття антибіотиків кардинальним чином змінило терапію розповсюджених у наш час інфекційних захворювань. Складність інфекцій різного характеру та резистентність до дії окремих антибіотиків зумовлює використання комбінованих лікарських засобів на їхній основі.

На фармацевтичному ринку України до найпоширеніших антибіотиків належать представники класу β -лактамів: амоксицилін, цефтріаксон, цефтазидим. До

складу комбінованих ветеринарних препаратів найчастіше включають окситетрациклін, який належить до тетрациклінових антибіотиків. Структуру та детальнішу інформацію про ці антибіотики наведено у табл. 1.1.

1.1.1. Амоксицилін

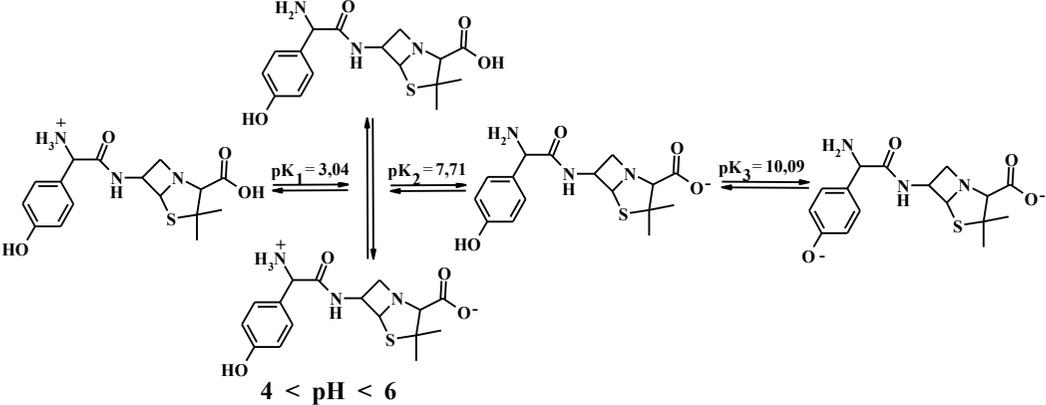
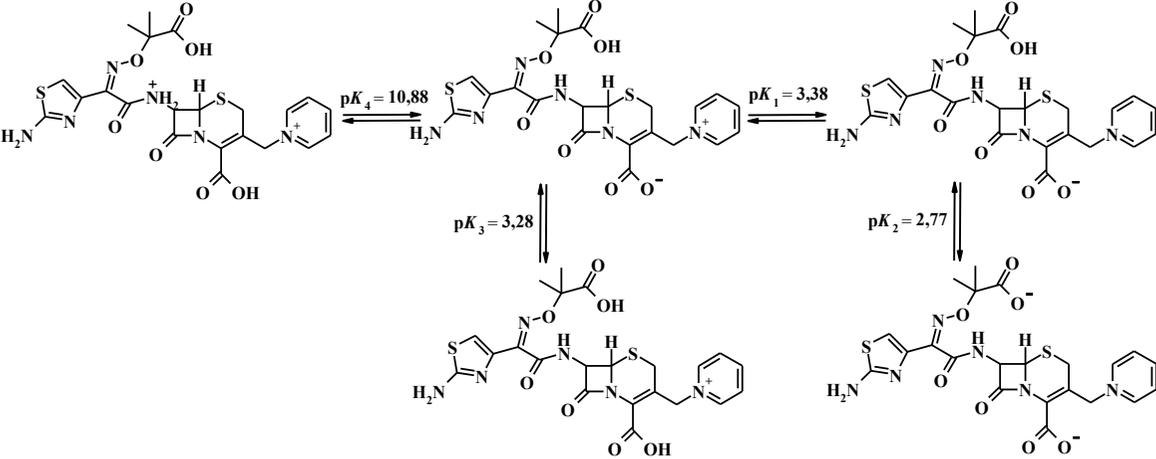
Напівсинтетичний β -лактамний антибіотик амоксицилін належить до групи пеніцилінів є одним з найпоширеніших у лікарській практиці представником цього класу. У молекулі амоксициліну є три функціональні групи, які здатні іонізуватися: $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$. Завдяки цьому АМ може існувати у катіонній, аніонній та формі цвіттеріону (табл. 1.1). Через наявність фенольного гідроксилу АМ може виступати як азоскладова у реакції азосполучення.

Фармакологія

Амоксицилін – пеніциліновий антибіотик, дія якого пов'язана із порушенням синтезу клітинної стінки бактерій в фазі активного росту, що викликає загибель мікроорганізмів. АМ має бактерицидний вплив на ряд грампозитивних (*Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp. (крім штамів, що продукують бета-лактамази), *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*.) та грамнегативних (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, деяких штамів *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. і ін.) бактерій, а також до деяких спірохет (*Leptospira* spp., *Borrelia* spp.) [10]. АМ руйнується бета-лактамазами. Він є кислотостійким.

АМ – це один з найбільш значущих антибіотиків через його ефективність та безпеку при лікуванні бактеріальних інфекцій. АМ добре всмоктується при прийомі внутрішньо, максимальний вміст антибіотика у крові досягається через 1–2 години після прийому. Препарат виділяється в основному через нирки, виводиться з сечею в незмінному стані. Препарати на основі АМ застосовують для лікування інфекційно-запальних захворювань, таких як інфекції нижніх та верхніх дихальних шляхів, ЛОР-органів, сечостатевої системи, шлунково-кишкового тракту, жовчних шляхів, шкіри та м'яких тканин, гінекологічних інфекцій [14].

Таблиця 1.1 – Фізико-хімічні характеристики досліджуваних антибіотиків.

Антибіотик	Хімічна назва за УРАС, характеристики
<p style="text-align: center;">Амоксицилін</p> <p><i>Брутто-формула: C₂₂H₂₂N₆O₇S₂. Молекулярна маса – 365,4 г/моль.</i></p>  <p style="text-align: center;">$4 < \text{pH} < 6$</p>	<p>Хімічна назва за УРАС, характеристики [2S-[2альфа, 5альфа, 6бета(S*)]]-6-[[Аміно-(4-гідрокси-феніл)ацетил]аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0] гептан-2-карбонова кислота.</p> <p><i>CAS індекс:</i> Амоксицилін 26787-78-0, Амоксицилін тригідрат 61336-70-7.</p> <p>Білий або майже білий кристалічний порошок, без запаху.</p> <p>Розчинність: погано розчинний у воді та у етанолі, добре розчинний у розчинах слабких лугів і кислот. $\log K_{ow} = 0,87$. [2, 3].</p>
<p style="text-align: center;">Цефтазидим</p> <p><i>Брутто-формула: C₂₂H₂₂N₆O₇S₂. Молекулярна маса – 546,6 г/моль.</i></p> 	<p>(піридин 1-[[7-[[2-аміно-4-тіазоліл] [(1-карбоксі-1-метилетокси) іміно] ацетил] аміно]-2-карбоксі-8-оксо-5-тіа-1 азабіцикло [4.2.0] окт-2-ен-3-ил] метил)-, гідроксид внутрішня сіль пентагідрат [6R-[6альфа, 7бета (Z)]].</p> <p><i>CAS індекс:</i> Цефтазидим 72558-82-8.</p> <p>Порошок білого кольору із специфічним запахом.</p> <p>Розчинність: у воді 5 мг/мл, у етанолі 1 мг/мл, малорозчинний в ацетонітрилі. $\log K_{ow} = 1,60$ [4, 5].</p>

1.1.2. Цефалоспорини: цефтріаксон та цефтазидим

Цефалоспорини – ряд природних та напівсинтетичних β -лактамних антибіотиків, які є біциклічними сполуками, що складаються з β -лактамного і дигідротіазинового кілець, які утворюють спільну для молекул усіх цефалоспоринів 7-аміноцефалоспоринову кислоту. На сьогоднішній день ЦА займають одне з провідних місць у клінічній практиці. ЦА застосовують при найтяжчих формах інфекційних процесів. Існує понад 60 оригінальних представників АН цефалоспоринового ряду, проте лише 16 препаратів зареєстровано в Україні, зокрема до таких належать представники третього покоління цефалоспоринів ЦЕФТ та ЦЕФТР. Вартує зауважити, що цефтріаксон є одним з найбільш часто застосовуваних у лікарській практиці антибіотиків у світі [15].

Молекула цефтазидиму містить карбоксильну, аміно, карбокси, іміно та тiazолільну групи [4]. Цефтріаксон містить у своїй структурі карбоксильну, аміно, гідроксильну та тiazолільну групи. У водних розчинах ЦЕФТР існує в двох таутомерних формах, хоча основна його кількість перебуває в кето-формі і лише незначна – в енольній таутомерній формі [6–8]. Через наявність первинної ароматичної аміногрупи ЦЕФТ та ЦЕФТР можуть виступати як діазоскладові у реакціях азосполучення.

Фармакологія

Механізм дії ЦЕФТР та ЦЕФТ пов'язаний з пригніченням активності ферменту траспептидази, порушенням біосинтезу пептидоглікану клітинної стінки мікроорганізмів. Цефалоспорини третього покоління володіють бактерицидним ефектом проти великої кількості грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *b*-гемолітичних стрептококів групи А, (*S.pyogenes*), стрептококів групи В (*S.agalactiae*), *Streptococcus viridans*, *Streptococcusbovis*, неентерококових стрептококів групи D), грамнегативних (*Haemophilus influenzae*, *Escherichiacoli*, *H. parainfluenzae*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteusvulgaris*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), аеробних (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseriameningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) та облігатних анаеробних (*Peptococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*) бактерій [16].

Цефтазидим та цефтріаксон застосовують при інфекціях, викликаних чутливими до нього збудниками, а саме: інфекції ЛОР-органів; важкі інфекції (менінгіт, септицемія); інфекції дихальної системи, кісток і суглобів, травного тракту, сечових шляхів, шкіри і м'яких тканин, черевної порожнини і жовчних шляхів. Цефтріаксон застосовують для профілактики інфекцій, що можуть виникнути після хірургічних операцій. Антибіотик ЦЕФТР призначають при резистентності мікрофлори до інших препаратів β -лактамної групи. ЦЕФТ та ЦЕФТР не застосовують внутрішньо, тому що вони швидко руйнуються під впливом шлункового соку. Антибіотик цефтазидим не метаболізує в організмі, період напіввиведення становить приблизно 2 години. Цефтріаксон після внутрішньом'язового введення всмоктується швидко і повно, біодоступність становить близько 100%. Препарат має високий ступінь стабільності в організмі і тривалий період напіввиведення, стабільна концентрація препарату досягається через 4 години. Мінімальні антимікробні концентрації виявляються в крові більше 24 годин. Період напіввиведення при введенні препарату становить 5,8–8,7 години. ЦЕФТР володіє найдовшим часом напіввиведення серед усіх цефалоспоринів [16].

1.1.3. Окситетрациклін

Окситетрациклін належить до класу природних антибіотиків аліциклічної будови тетрациклінів. Вперше його виділили з культуральної рідини іншого актиноміцета *Streptomyces* ще у 1949 р. Зараз цей антибіотик є одним з незамінних у ветеринарній практиці. За хімічною структурою ОТЦ належить до ряду частково гідрованих похідних тетрацену. Окситетрациклін виявляє амфотерні властивості: основні властивості зумовлені наявністю диметиламіногрупи в положенні 4, а кислотні – фенольного гідроксилу в положенні 10 і енольних груп у положенні 3 і 12. ОТЦ іонізується у всьому діапазоні рН, існує в катіонній формі за рН нижче 3,3, як цвіттер-іон в межах рН 3,3–7,7 і як аніон за рН вище 7,7 (табл. 1.1) [11, 12].

Фармакологія

Окситетрациклін виявляє переважно бактеріостатичну активність і антимікробну дію шляхом гальмування синтезу протеїнів у бактеріальній клітині.

ОТЦ володіє широким спектром антибактеріальної дії, зокрема, на грампозитивні і грамнегативні бактерії *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Haemophilus spp.*, *E. coli*, *Pasteurella spp.*, *Bordetella spp.*, рикетсії, спірохети, багатьох штамів мікоплазм та хламідій [17]. ОТЦ швидко всмоктується в кров і проникає в більшість органів і тканин організму. Максимальна концентрація антибіотика в крові досягається через 30–60 хвилин і утримується на терапевтичному рівні протягом 3–4 діб після одноразового введення препарату. ОТЦ широко застосовується в медицині та ветеринарії для боротьби з багатьма інфекційними хворобами [18]. Лікарські засоби тетрациклінового ряду використовують при пневмонії, дизентерії, гонорей, тифі та інших інфекційних захворювань, хоча в теперішній час ОТЦ вкрай рідко використовують в медичній практиці. ОТЦ більш широко застосовують у ветеринарії для лікування та профілактики інфекційних захворювань тварин і як стимулятори росту сільськогосподарських тварин; у рослинництві для профілактики бактеріальних і грибкових захворювань рослин; в ряді галузей бродильної промисловості як засіб боротьби із чужорідними мікроорганізмами; у наукових дослідженнях для інгібування певних етапів біохімічних перетворень; у харчовій промисловості для консервування різних харчових продуктів [19, 20]. Близько половини препаратів, у яких наявний ОТЦ використовують у тваринництві.

1.2. Методи визначення антибіотиків

Антибіотики амоксицилін, окситетрациклін, цефтазидим та цефтріаксон мають у своїй структурі кілька функціональних груп, що дозволяє використовувати різні підходи та методи для розроблення методик їх кількісного і якісного визначення. Для проведення ідентифікації субстанцій досліджуваних β -лактамних антибіотиків АМ, ЦЕФТР, ЦЕФТ Державна Фармакопея України пропонує використовувати абсорбційну спектрофотометрію в інфрачервоній ділянці (ІЧ) та метод тонкошарової хроматографії (ТХШ). Натрієві солі антибіотиків дають якісну реакцію на іон натрію. Для ідентифікації окситетрацикліну в ДФУ рекомендовано метод ТХШ з детекцією в ультрафіолетовій (УФ) ділянці спектру

за $\lambda_{\max} = 254$ нм, а також за появою жовтого забарвлення при взаємодії антибіотика з концентрованою сульфатною кислотою [21].

Для кількісного визначення β -лактамних та тетрациклінових АН найчастіше використовують хроматографію та спектрофотометрію. У літературі також представлені електрохімічні методи для визначення антибіотиків, зокрема, вольтамперомерія. Для визначення АМ пропонують використовувати титриметричні методи аналізу. Для контролю вмістів АМ і ОТЦ також використовують люмінесцентний метод. Найважливішим при виборі методу аналізу є природа зразків аналітів. Так для аналізу субстанцій та простих препаратів використовують спектрофотометрію. При проведенні контролю вмістів АН в складних об'єктах таких як біологічні рідини, харчові продукти, комбіновані лікарські та ветеринарні препарати чи об'єкти довкілля (стічні води) доцільно застосовувати хроматографію. Для встановлення кількісного вмісту ліків на основі АМ, ОТЦ, ЦЕФТР та ЦЕФТ згідно ДФУ використовують рідинну хроматографію з УФ детекцією [21].

1.2.1 Титриметричні методи

Відомо використання титриметричних методів для кількісного визначення пеніцилінових антибіотиків у ліках, зокрема метод в якому амоксицилін піддають взаємодії з калій йодидом при рН 5 і виділений йод титрують натрій тіосульфатом. Також відома методика визначення амоксициліну в середовищі 10% HCl при взаємодії з йодбенzenом, додають калій йодид і виділений йод титрують натрій тіосульфатом, методи характеризуються точною стехіометрією [2]. Також відомий метод визначення деяких β -лактамних АН, що мають α -аміногрупу на бічному ланцюзі і які розкладаються у лужному середовищі до похідних піразину, продукт розкладу титрують іонами меркурію (I) за наявності дифенілкарбазону. Метод дозволяє визначати мікрограмові кількості АМ, проте є доволі тривалий в часі і вимагає використання токсичних реагентів [22].

Для цефалоспоринових АН та ОТЦ титриметрію не використовують.

Титриметричні методи є малоселективними дозволяють визначати лише суму пеніцилінів, визначенню заважають органічні реагенти, тому їх доцільно застосовувати для аналізу субстанцій або однокомпонентних препаратів.

1.2.2. Хроматографічні методи

Хроматографічні методи найчастіше використовують для аналізу антибактеріальних речовин, адже дозволяють селективно визначати АН в об'єктах зі складною матрицею: у багатокомпонентних та комбінованих препаратах, біологічних рідинах (сироватці крові, сечі) продуктах харчування (м'ясі, меді, молочних продуктах, овочах), в об'єктах довкілля (стічній воді). Хроматографія використовується як для кількісного визначення β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків, так і для визначення їх чистоти.

У кількісному аналізі АМ, ЦЕФТР, ЦЕФТ та ОТЦ застосовують рідинну хроматографію [23–26], яка є офіційним фармакопейним методом [21, 27–29], високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з УФ та мас-спектрометричним детектуванням [7, 28–50], при аналізі ОТЦ ще і з флуоресцентною детекцією [51–55], ультра високоефективну рідинну хроматографію (УЕРХ) у поєднанні з мас-спектрометрією [56–59]. Через погану розчинність антибіотиків АМ, ЦЕФТР, ЦЕФТ, ОТЦ у органічних розчинниках для їх визначення здебільшого використовують обернено-фазову або іонно-парну рідинну хроматографію [7, 25–36, 38–55]. Найбільш поширеними колонками, які використовують для аналізу АМ, ЦЕФТ, ЦЕФТР та ОТЦ, є силікагелеві з привитими C_8 -, C_{18} - групами, відомо також використання колонок з NH_2 -групою для визначення цефтріаксону [37] та сталевих колонок для аналізу амоксициліну [28]. УФ-детектування АМ здійснюють при 220–260 нм [30–35]; ЦЕФТР – при 230–260 нм [7, 36–39]; ЦЕФТ – при 245–265 нм [7, 40–43] та ОТЦ – при 250–350 нм [44–50], флуориметричну детекцію ОТЦ проводять при $\lambda_{збудж.}$ 380–390 нм, а $\lambda_{емісії}$ 512–520 нм [51–55]. Більшість хроматографічних методів, що використовуються для контролю вмістів АМ, ЦЕФТР, ЦЕФТ та ОТЦ у фармацевтичних продуктах та біологічних рідинах, використовують стаціонарні фази на основі силікагелю та органічних модифікаторів (метанол, ацетонітрил або

пропанол) [7, 23–59], який додають до водної рухомої фази, найчастіше як рухому фазу використовують саме ацетонітрил. Варто зауважити, що біологічні зразки не можуть бути проаналізовані безпосередньо, без попередньої пробопідготовки: очищення та ефективного вилучення антибіотика з об'єкту. До прикладу, ОТЦ визначають в біологічних рідинах лише після осадження білків трихлорацетатною кислотою, ацетонітрилом або буферними розчинами [50].

ВЕРХ дає можливість визначати нанограмові кількості антибіотиків, але потребує використання значної кількості органічних розчинників. Доволі часто при підготовці зразків антибіотиків, зокрема ОТЦ, для аналізу таких складних об'єктів як кров, плазма, сеча, продукти харчування пропонують використовувати метод екстракції, що ускладнює процес проведення аналізу та вимагає використання додаткових органічних реагентів. Саме тому незважаючи на високу селективність і низьку межу визначення, хроматографічний метод має низку обмежень, такі як висока вартість обладнання і витратних матеріалів, довготривалість аналізу, використання порівняно великих кількостей токсичних органічних розчинників.

Детальнішу інформацію про деякі фармакопейні хроматографічні методики визначення АН у субстанціях та лікарських формах наведено в табл. Б.1 додатку Б.

1.2.3. Люмінесцентні методи

Люмінесценція використовується в аналізі антибіотиків значно рідше у порівнянні з іншими методами. Відомо використання різновидів люмінесценції для аналізу АМ та ОТЦ. Для аналізу вмісту АМ пропонують використовувати флюорометричний метод, який ґрунтується на гасінні флуоресценції мербоніну в слабо лужному середовищі (рН=10), максимум емісії розчину спостерігається при 544 нм, а збудження при 470 нм [2]. Запропоновано люмінесцентне визначення залишків АМ у стічній воді, яке базується на використанні гібридного сенсору на основі органічно-неорганічних наночастинок нафталіміду [60]. Відомо використання посилення хемілюмінесценції комплексу АМ з Ag-люмінолом в лужному середовищі для визначення АМ [61], та інший метод, який полягає у взаємодії KMnO_4 з люмінолом та АМ [62].

Для люмінесцентного визначення ОТЦ як аналітичні форми часто використовують різнолігандні комплекси, в яких як другий ліганд вводять органічні основи або донорно-активні речовини, такі як 1,10-фенантролін, триоктилфосфіноксид, β -дикетони, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), β -циклодекстрин, оксикарбонові кислоти та інші ліганди [63–65]. Найбільшу інтенсивність люмінесценції та найбільший час її життя має комплекс Eu–ОТЦ–цитратна кислота, який використовують для визначення слідових кількостей ОТЦ у біологічних об'єктах, та для визначення у фармацевтичних препаратах [63].

Для визначення цефалоспоринових антибіотиків люмінесцентні методи не застосовують.

1.2.4. Електрохімічні методи

В літературі відомо використання сучасних різновидів електрохімічних методів для визначення антибіотиків. Більшість наявних в літературі ВА методик визначення АМ, ЦЕФТР та ЦЕФТ пов'язані з використанням ртутного крапельного, вуглецево-пастового, скловуглецевого електродів модифікованих різними плівками. Для електрохімічного визначення ОТЦ застосовують амперометричні, потенціометричні, вольтамперометричні, кондуктометричні методи аналізу.

Вольтамперометричні методики найчастіше використовують для аналізу пеніцилінових та цефалоспоринових антибіотиків, дещо рідше для визначення тетрациклінів. Для контролю вмістів АМ використовують анодні хвилі окиснення ароматичної –ОН групи амоксициліну при потенціалах від +0,48 В – +0,57 В з використанням вуглецево-пастового електроду модифікованого плівками поліаніліну [66], нанокомпозитом на основі ZnO/CNT та 8,9-дигідрокси-7-метил-12Н-бензотіазол[2,3-*b*]хіназоліну [67], комплексом Ni(II)-куркуміну [68], електро-синтезованою плівкою на основі полі(*o*-толуїдину) та натрій додецилсульфату з включенням CuO [69], золам TiO₂ та наночастинками золота [70], а також отриманого на основі термічного спікання суміші графіту та іонної рідини N-октилпіридинійгексафторфосфату (1:1) [71]. Відомі методи визначення АМ із застосуванням квадратно хвильової вольтамперометрії, в яких як електрохімічний

сенсор використовують скловуглецевий електрод модифікований вуглецевою сажею, яку іммобілізують в середовищі дигексадецилфосфату [72], або глутаровим альдегідом та поліглутаміною кислотою [73], а також модифікованого тривимірним графеном та поліглутаміною кислотою [74]. Пропонується також метод квадратно-хвильової вольтамперометрії з використанням скловуглецевого електроду модифікованого плівкою полі-(3,4-етилендіокситіофен) полістирол сульфонату з квантовими включеннями (точками) кадмій телуриду та високодисперсного карбону [75].

Для визначення АМ застосовують метод диференційної імпульсної вольтамперометрії на стаціонарній ртутній краплі, модифікованій полі(N-хлораніл N, N, N', N'-тетраметилендіамоній дихлоридом) [76]. Також відомі полярографічні методи, за якими амоксицилін дериватизують і визначають за піком відновлення комплексної сполуки Ni(II)–амоксициліну [77], або утвореного похідного сульфанілової кислоти після окиснення АМ бромат/бромідною сумішшю [78].

Цефалоспоринові антибіотики є електрохімічно активними, вони містять β -лактамне кільце, яке з'язане із шестичленним дигідротіазиновим циклом, що містить замісники, приєднані до С-3 (R_1), С-4 ($COOR_2$) і С-7 ($NHC(=O)R_3$), які здатні відновлюватись чи окиснюватись [7]. В процесі досліджень електрохімічної поведінки ЦЕФТР та ЦЕФТ виникало багато проблем пов'язаних із великою схильністю ЦА, найбільше цефтріаксону до адсорбції на поверхні ртутного електроду, що приводило до нестабільності сигналу в кислому середовищі [79]. Підсумовуючи літературні джерела про електроактивність цефалоспоринових антибіотиків та їхнє аналітичне застосування, отримані аналітичні методики можна розділити на дві основні групи: полярографічні методики визначення цефалоспоринів на ртутному крапельному або стаціонарному електродах [79–85] та вольтамперометричні методики визначення продуктів розкладання цефалоспоринів після кислотного, нейтрального або лужного гідролізу або УФ-фотолізу [7, 86–88]. Більшість наведених методик пов'язані із відновленням функціональних груп цефалоспоринів на ртутному крапельному електроді. Зокрема, для визначення обох ЦА використовують двоелектронне відновлення азометинового зв'язку ($>C=N-$) метоксиіміно-групи: у ЦЕФТР залежно від фонового електроліту за $E = -0,88$ В [79,

81], $E = -0,504$ В [80], $E = -0,47$ В [83], а у ЦЕФТ – за $E = -0,36$ В (рН=3,5) [79, 81], $E = -0,45$ В [87]. Також відомі методики визначення ЦЕФТР за відновленням триазинового циклу за $E = -0,788$ В [80, 83, 85] та ЦЕФТ за піком відновлення піридинового циклу з відщепленням від молекули антибіотика за $E = -1,00$ В [87]. Тільки в кількох роботах ЦА визначають за анодним піком амініотіазольної групи [85], так на скловуглецевому електроді ЦЕФТ окиснюється за $E = 1,80$ В [86]. Також цефтазидим можна визначити за допомогою тензаметричного піку піридину, що відщеплюється при лужному гідролізі ЦЕФТ (рН 9,5–10) за $E = -0,60$ В [87, 88].

Для визначення ОТЦ пропонуєть метод диференційної імпульсної вольтамперометрії з використанням графітово-поліуретанового композитного електроду модифікованого молекулярно-імпринтним полімером, що містить фолієву кислоту [89], ацетамінофен [90] та тетрациклін [91]. Також ОТЦ визначають методом диференціальної імпульсної вольтамперометрії на стаціонарному ртутному електроді за $E = -0,101$ В [92].

Відомий метод кількісного визначення окситетрацикліну гідрохлориду в ліках методом **амперометричного титрування**, який базується на реакції взаємодії ОТЦ з гетерополіаніоном 12-молібдофосфатної кислоти з утворенням малорозчинного асоціату [93]. Також визначення вмісту окситетрацикліну проводять **іонометричним методом** за допомогою іонселективного електрода який складється з пластифікованої мембрани та асоціату органічного катіона й аніона вольфрамогалієвої гетерополікислоти $H_5GaW_{12}O_{40}$ і гетероаніона фосфоромолібдату, чутливого до органічного катіона окситетрацикліну [94].

Загалом, для визначення ОТЦ [95] запропоновано також інші **електрохімічні методи у титриметричному варіанті**: кондуктометрію, потенціометрію та циклічну вольтамперометрію. Титриметричне визначення окситетрацикліну (в субстанції і лікарських формах) методом циклічної вольтамперометрії з використанням $FeCl_3$ проводять у фосфатному буфері за рН = 6,54. $FeCl_3$ та $NH_4Mo_7O_{24}$ використовують як титранти для потенціометричного титрування ОТЦ. Кондуктометричне титрування ОТЦ проводять за допомогою реагентів $NH_4Mo_7O_{24}$, $NaVO_3$, $NaOH$ і $AgNO_3$, з якими окситетрациклін утворює осад. Кількісне визначення ОТЦ методом

амперометричного титрування характеризується високою чутливістю та доброю відтворюваністю результатів. Методика має низку переваг: експресність і простоту, достатню чутливість і селективність, відсутність довготривалих, багатостадійних і складних етапів експерименту з використанням коштовної апаратури, летких і токсичних реагентів. Визначення можна пароводити за наявності різноманітних супутніх та допоміжних речовин, у каламутних і забарвлених розчинах.

Варто зауважити, що в літературі наведено велике різноманіття методів електрохімічного аналізу АМ, ОТЦ, ЦЕФТР та ЦЕФТ. Проте, більшість з них мають ряд недоліків, вимагають використання малодоступних реагентів, є недостатньо селективними, потребують рутинної, довготривалої і трудомісткої модифікації електродів, внаслідок чого погіршується відтворюваність результатів.

Детальнішу інформацію про деякі вольтамперометричні методики визначення ЦА антибіотиків та АМ наведено в табл. Б.2–Б3 додатку Б.

1.2.5 Спектрофотометричні методи

Спектрофотометричні методи, незважаючи на свою не надто високу селективність у порівнянні з іншими методами аналізу, як і раніше широко застосовують. Активне використання спектрофотометрії в аналізі лікарських препаратів можна пояснити доступністю, дешевизною, простотою виконання в поєднанні з доброю точністю даного методу. Відомо, що більшість лікарських речовин можна визначати за власним світлопоглинанням в УФ ділянці спектру, не винятком є і антибіотики. Окрім того, деякі з них вступають в хімічні реакції, що призводять до утворення забарвлених сполук. Загалом, всі спектрофотометричні методики визначення АМ, ЦЕФТР, ЦЕФТ та ОТЦ, можна поділити на декілька груп:

- спектрофотометрія в УФ ділянці – як аналітичний сигнал використовують оптичну густину власного світлопоглинання антибіотиків. Описані методики є достатньо чутливими, однак не є селективними, оскільки в цій ділянці спектру поглинає багато інших органічних речовин різних класів.

- утворення хелатних комплексів та іонних асоціатів, комплексів з перенесенням заряду;

- утворення кольорових продуктів внаслідок, редокс реакцій;
- гідроліз з наступною реакцією з кольоровими реагентами;
- утворення кольорових похідних у реакціях діазотування-азосполучення, де АМ та ОТЦ виступають як азоскладова, а ЦЕФТР та ЦЕФТ – як діазоскладова.

Реакція, що лежить в основі цього методу є двостадійною, відносно тривалою в часі, однак вона не вимагає використання складних реагентів.

Методики, які ґрунтуються на вимірюванні власного світлопоглинання антибіотиків використовують для аналізу лікарських засобів, при умові, що інші компоненти чи допоміжні речовини не заважають його кількісному визначенню. Найчастіше даний спосіб використовують для аналізу однокомпонентних ліків або субстанцій.

УФ-спектрофотометрія.

Розроблено методики визначення амоксициліну у простих лікарських формах з використанням похідної УФ-спектрофотометрії першого, другого та третього порядків з використанням як розчинника розчинів розведених лугів (NaOH, KOH) або мінеральних кислот, максимумами світлопоглинання фіксували за $\lambda_{\max} = 234 - 302,3$ нм [96–102]. Розроблено і валідовано методику одночасного визначення амоксициліну та калій клавуланату у сиропі при застосуванні похідної спектрофотометрії другого порядку, як середовище використовували суміш фосфатного буферу рН=4,4 та метанолу (91:9), $\lambda_{\max} = 239$ нм [102].

Для ідентифікації та кількісного визначення окситетрацикліну також застосовують УФ-спектрофотометрію, проте, обмежено. У лікарських та ветеринарних препаратах контроль вмісту ОТЦ проводять за допомогою диференційних спектрофотометричних методів, які ґрунтуються на похідних техніках, величину оптичної густини фіксують за довжини хвилі 298–393 нм [50, 103–105].

Відомо використання УФ-спектрофотометрії й для аналізу цефалоспоринових антибіотиків, зокрема цефтазидим визначають за власним поглинанням в діапазоні 255–266 нм [106–108], а для цефтріаксону за наявності продуктів його лужного гідролізу отримуючи спектр світлопоглинання в діапазоні 230–265 нм [7] чи за

наявності фосфатного буферного розчину при рН 7,4 і вимірюють світлопоглинання за $\lambda_{\max} = 340$ та 360 нм [109].

Реакції комплексоутворення: хелатні комплекси, іонні асоціати, комплекси з перенесенням заряду.

Відомі спектрофотометричні методики визначення АМ, ОТЦ ЦЕФТР та ЦЕФТ, які ґрунтуються на утворенні забарвлених комплексних сполук з іонами металів, зокрема з Fe(III), Cu(II), Pd(II), у випадку останнього метод включає попередній гідроліз ЦЕФТР за допомогою HCl [105–115]. Також є методики визначення АМ, які ґрунтуються на використанні реакції нітрування антибіотика з подальшим комплексоутворенням з нуклеофільним реагентом ацетоном, інша – на реакції нітрування АМ та комплексоутворенні з Cu(II), а третя – на екстракції хлороформом отриманого хелату АМ – Cu(II) [112].

Також відомий метод спектрофотометричного визначення амоксициліну, який базується на реакції утворення іонних пар між АМ та комплексом Mo(V)–тіоцінат з наступною екстракцією метиленхлоридом [116], утворення йонної пари АМ з пірокатехіовим фіолетовим червоно-коричневого кольору з $\lambda_{\max} = 641$ нм [117] та взаємодії з бромкрезоловим зеленим в середовищі диметилсульфоксиду внаслідок чого спостерігається утворення забарвленого у блакитний колір іонного асоціату [118].

У роботі [119] запропоновано метод визначення ОТЦ, який ґрунтується на молекулярній взаємодії між тетрациклінами і хлораніловою кислотою з утворенням комплексу з перенесенням заряду, в якому ОТЦ виступає як *n*-донор, а хлоранілова кислота як π -акцептор в ацетонітрилі. Відомі методики визначення ОТЦ ґрунтуються на отриманні забарвлених комплексів з натрій молібдатом, утворюється водорозчинний комплекс з $\lambda_{\max} = 404$ нм [120]. Ураніл ацетат в середовищі N,N-диметилформаміду утворює із ОТЦ оранжево-червоний комплекс [121]. Окситетрациклін взаємодіє з 4-аміноантипірином за наявності $K_3Fe(CN)_6$ з утворенням сполуки червоного кольору, $\lambda_{\max} = 440$ нм [122].

Відомо три методики визначення ЦЕФТ, що ґрунтуються на реакціях утворення комплексів з перенесенням заряду з йодом, 2,3-дихлор-5,6-диціано-*n*-бензохіноном та 7,7,8,8-тетраціанохінодиметаном [123]. Для визначення

цефалоспоринів пропонують використання комплексів з 4-хлоро-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом [124], натрій нітропрусидом [125], 3-метилбензотіазолін-2-ону гідразоном у присутності ферум (III) хлориду в кислому середовищі [126]. Також описано визначення цефалоспоринових антибіотиків, що ґрунтується на реакції утворення комплексу з сіллю Рейнеке ($\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NCS})_4(\text{NH}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$) в кислому середовищі [127]. Часто утворені комплексні сполуки доводиться екстрагувати органічними розчинниками [116, 125, 127], що є суттєвим недоліком.

Утворення кольорових продуктів внаслідок редокс реакцій.

Для отримання аналітичних форм антибіотиків з метою їхнього СФ визначення часто застосовують окисно-відновні реакції самих АН та реагентів, які специфічно реагують з препаратом з утворенням кольорових сполук.

Для визначення АМ пропонуються використовувати методи, які ґрунтуються на реакції окиснення антибіотика іонами $\text{Ce}(\text{IV})$, $\text{Fe}(\text{III})$ в кислому середовищі [128], калій перманганатом, у випадку останнього фіксують зменшення інтенсивності фіолетового забарвлення [129], N-бромсукцинімідом або N-хлорсукцинімідом у лужному середовищі [130]. Також відомі методики, які ґрунтуються на окисненні реагентів, зокрема 2,4-динітрофенілгідразину, і зв'язуванні окисненого продукту з амоксициліном [131]. Для спектрофотометричного аналізу АМ запропоновано використовувати реагент Фоліна-Чікалтеу [132] (суміш молібденової, вольфрамової кислот та літій сульфату), метод ґрунтується на утворенні блакитного забарвлення за рахунок відновлення вольфрамату і/або молібдату в реагенті Фоліна-Чікалтеу амоксициліном в лужному середовищі.

В кількісному аналізі також запропоновано методики, які ґрунтуються на окисненні цефтазидиму нітратною кислотою, з утворенням нітрозопохідного, окисненні ЦЕФТ свіжоприготованим гіпобромідом, а також отриманні трис (III)-*o*-фенантроліна феруму (II) в ацетатному буферному розчині ($\text{pH} = 3,6$) при окисненні цефтазидиму ферум (III)-*o*-фенантроліном [133]. В літературі відомо спектрофотометричний метод визначення цефтазидиму, що ґрунтується на реакції окиснення калій перманганатом в лужному середовищі, який має максимум поглинання при 610 нм [134].

Для отримання аналітичних форм ОТЦ цей тип реакцій не застосовують.

Гідроліз АН з наступною реакцією з реагентами

Дещо рідше для отримання забарвлених аналітичних форм АМ, ЦЕФТ та ЦЕФТР застосовуєть гідроліз антибіотиків з наступною взаємодією з реагентами. Відомо кінетично-спектрофотометричний метод визначення АМ з попереднім гідролізом АН за допомогою 1,0 М НСІ та наступною реакцією з Pd(II) [110]. Відома методика визначення цефалоспоринів, яка ґрунтується на відновленні комплексу желатин – Ag⁺ продуктами лужного гідролізу ЦА з утворенням золю жовтого кольору ($\lambda_{\max} = 350 \text{ нм}$) [135]. В аналізі ОТЦ такий тип реакцій не застосовують.

Утворення кольорових похідних у реакціях діазотування – азосполучення,

В літературі доволі широко представлено методики визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ та ЦЕФТР, в яких для отримання забарвлених аналітичних форм антибіотиків використовують реакції діазотування та азосполучення. АМ та ОТЦ виступають як азоскладова, тому в літературі пропонують велику кількість реагентів, які здатні вступати в реакцію діазотування з утворенням солі арендіазонію з наступним азосполученням з цими АН [136–142].

В літературі відома спектрофотометрична методика визначення амоксициліну, яка базується на його реакції з діазотованими *n*-амінобензеновою кислотою та прокаїном [136], *o*-нітроаніліном [137], метаклопрамідом [138], бензокаїном в середовищі триетиламіну [139], сульфаніловою кислотою [140]. Для визначення ОТЦ пропонують використовувати його азосполуки з діазотованими *n*-нітроаніліном [141], 4-аміноантипірином [142]. Деякі з цих методик мають ряд недоліків, зокрема потребують охолодження [137, 141–142] або екстракції отриманої азосполуки хлороформом [137].

Цефалоспоринові антибіотики після діазотування вступають в реакцію азосполучення. В літературі наведено ряд методик визначення цефалоспоринів, однак умови діазотування АН є дуже суперечливі. Головна проблема полягає в тому, що молекули діазотованих ЦА азосполучаються між собою вже в кислому середовищі, що науковці не завжди враховують у своїх дослідженнях. Зокрема відома методика СФ визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР, яка ґрунтується на отриманні

діазосолі антибіотика та подальшому азосполученні його молекул між собою в середовищі цитратної кислоти [143]. В літературі представлено ряд методик для визначення ЦЕФТ, які ґрунтуються на реакціях діазотування АН та подальшого азосполучення з 3-аміно фенолом [144], з *n*-диметил-бензальдегідом в метанольному середовищі [145], реактивом Браттона-Маршалла (N-(1-нафтил)-етилендіамін-дигідрохлоридом) [146, 147], 1-нафтолом [148].

Запропоновано методики визначення ЦЕФТР, які ґрунтуються на його діазотуванні та подальшому азосполученні з *n*-диметиламінобензальдегідом [149], N-(1-нафтил)-етилендіамін дигідрохлоридом, резорцином та хлороглуцином [150], 2-нафтолом у водному розчині [151] та метанольному розчині [152], 2,5-диметилфенолом (2,5-DMP) та 4-третбутилфенолом (4-TBP) [153].

Детальніше СФ методики визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ, ЦЕФТР розглянуто в табл. Б4-Б7 (додаток Б).

1.3. Аналітична характеристика реагентів

Для отримання нових аналітичних форм для визначення β-лактамних та тетрациклінових антибіотиків перспективною є реакція азосполучення. Реагенти, які містять первинну ароматичну аміногрупу, після діазотування виступають як діазокомпонента у цій реакції, фенольні сполуки – як азокомпонента. Оскільки АМ та ОТЦ є фенольними сполуками для розробки методик їх визначення було обрано реагенти, що мають первинну ароматичну аміногрупу: сульфаніламід, сульфатіазол для АМ та фуксин і 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоокислоту для ОТЦ. Цефтазидим та цефтріаксон є сполуками з первинною ароматичною аміногрупою, тому для їх визначення за реакцією азосполучення використано фенольні сполуки 8-оксихінолін, резорцин та 2-метилфенол. Хімічні властивості та форми існування цих реагентів наведені в табл. 2.1 та 2.2.

Аналітична характеристика фенольних реагентів

8-оксихінолін (C₉H₇NO) – належить до класу гетероциклічних органічних сполук, який утворює комплексні сполуки більш ніж з 40 хімічними елементами. На практиці використовується здатність 8-оксихіноліну утворювати малорозчинні у

водних розчинах (аміаку, ацетатній кислоті та ін.) кристалічні внутрішньокмплексні солі (хелати) з багатьма катіонами металів, що активно застосовують для визначення і розділення ряду металів (Al, Cd, Zn, Mg та ін.) (наприклад, $Mg(C_9H_6ON)_2$, $Al(C_9H_6ON)_3$). Також 8-оксихінолін застосовують для визначення алюмінію та літію люмінісцентним методом [154]. Гідроксихінолінати різних металів відрізняються своїм забарвленням та можуть бути визначені СФ методом. Їх хорошу розчинність в хлороформі застосовують для екстракційно-фотометричного визначення ряду хімічних елементів [155]. Як реагент в органічному аналізі 8-Окс не застосовують, натомість широко відоме його використання в органічному синтезі для отримання азобарвників за реакцією азосполучення [156].

2-метилфенол – це органічна сполука, яка є похідним фенолу. 2-метилфенол легко вступає в реакції електрофільного заміщення та конденсації, наприклад з альдегідами, при змішуванні з хлорною водою за наявності NH_3 утворює сполуки забарвлені у жовто-бурий колір. При каталітичному відновленні 2-метилфенол перетворюється в метилциклогексаноли і метилциклогексанони. *О*-крезол піддається також фотокаталітичному окисненню, у роботі [157] описується вплив характеристик композиту Pt/TiO_2 на тимчасову поведінку розкладу *о*-крезолу шляхом фотокаталізу, індукованого видимим світлом. Авторами статті [158] досліджено одночасне нітрування та біодеградацію *о*-крезолу в безперервному газо-вихровому реакторі з використанням аеробної гранульованої біомаси. Цей метод застосовується для очищення забруднених амонійних стічних вод. Про використання *о*-крезолу як аналітичного реагенту даних у літературі немає.

Резорцин є проміжною хімічною речовиною для синтезу фармацевтичних препаратів та інших органічних сполук. Він використовується у виробництві азобарвників та пластифікаторів, клеїв для деревини і гумово-текстильних композитів, служить зшиваючим агентом для неопрену і УФ поглиначем [159]. Існує чотири модифікації резорцину – α , β , γ та δ . Модифікації γ та δ з'являються лише під впливом високого тиску [160].

Резорцин з лугами утворює солі – феноляти. При взаємодії з аміаком утворює 3-амінофенол. Він забарвлює розчин Ферум (III) хлориду у темно-фіолетовий колір,

а при взаємодії з бромною водою утворює осад трибромрезорцину. Ці властивості дозволяють використовувати його як барвник для хроматографії. При нагріванні лужного розчину резорцину на водяній бані з додаванням декількох крапель хлороформу розчин набуває червоного забарвлення, що переходить в жовте при підкисленні розведеною ацетатною кислотою. Також резорцин при нагріванні з фталевим ангідридом утворює флуоресцеїн. Резорцин застосовують як аналітичний реагент для якісного визначення кетоз та для колориметричного визначення фурфуролу, вуглеводів, Zn, Pb і інших елементів, а також нітратів у морській воді [159].

Аналітична характеристика реагентів, які містять в своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу

Сульфаніламідні – синтетичні похідні сульфанілової кислоти, хіміотерапевтичні засоби, що пригнічують розвиток грампозитивних і грамнегативних бактерій, хламідій, деяких найпростіших і патогенних грибів [161].

Наявність ароматичної аміногрупи у молекулі СА зумовлює їхні основні властивості. Рухливий атом гідрогену в складі сульфамідної групи СА зумовлює кислотні властивості сполуки, які виражені сильніше, ніж основні [162]. Завдяки амфотерним властивостям СА можуть розчинятись як у кислотах, так і в лугах з утворенням відповідних солей [163, 164]. Кислотні властивості сульфамідної групи зумовлюють можливість взаємодії з солями важких металів. При цьому утворюються забарвлені в різний колір комплекси, розчинні або нерозчинні у воді [165].

Усі сульфаніламідні можуть галоїдуватись, нітруватись, сульфуватись в ароматичному кільці. За рахунок наявності первинної ароматичної аміногрупи сульфаніламідні вступають у реакції діазотування з наступним азосполученням. Існує безліч методів визначення СА [162] на основі реакції азосполучення, однак як реагенти для визначення інших речовин їх раніше не застосовували. Для подальших досліджень як реагенти (діазоскладові) ми обрали два представники цього класу: сульфаніламід (САМ) та сульфатіазол (СТЗ).

Фуксин (хлориднокислий розанілін) – барвник трифенілметанового ряду, який містить у своєму складі три первинні ароматичні аміногрупи. Виділяють фуксин основний і фуксин кислий. Фуксин основний – це суміш хлоридних і ацетатних

солей розаніліна і парарозаніліна. Кислий фуксин виготовляють з основного методом сульфонації. Фуксин використовують як барвник в сфері фарбування не текстильних матеріалів, у мікробіології для фарбування бактерій під час їхнього спостереження під мікроскопом, також у медицині як протигрибкова речовина для знищення деяких хвороботворних мікроорганізмів, іноді і як засіб для дезинфекції. Як первинний ароматичний амін, барвник діазотують, а отриманий гексазоній парарозанілін використовують як фіксуєчий агент для вивчення ферментної активності в гістохімії [166-169]. Гексазоній парарозанілін вперше був використаний в гістохімії для сполучення з нафтолами виділеними субстратами для холінестерази та фосфатази [166]. При кімнатній температурі в середовищі 1 М хлоридної кислоти гексазоній парарозанілін стабільний впродовж 1 год, тому в промислових масштабах не виготовляється.

Як аналітичний реагент фуксин застосовують для визначення мікрограмових кількостей золота [170], платини [171] і паладію [172], а також осмію (IV) екстракційно-фотометричним методом [171]. В аналітичній хімії також використовують здатність фуксину у водному розчині приєднувати молекули сульфур діоксину, утворюючи безбарвну фуксинсульфітну кислоту (реагент Шиффа), яка використовується для якісного виявлення альдегідів, оскільки при взаємодії з ними утворює пурпурово-фіолетовий барвник [173]. Фукс використовують для визначення оксациліну в лікарських препаратах у вигляді іонного асоціату екстракційно-спектрофотометричним методом [174]. Відомостей про застосування фуксину в реакціях азосполучення як аналітичного реагенту у літературі не виявлено.

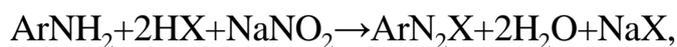
1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоту добувають діазотуванням 1-аміно-2-нафтол-4-сульфоїкислоти (АНСК) в присутності іонів феруму (II) (1–30 ммоль FeSO_4 на 1 моль АНСК) для запобігання його окиснення [175], у літературі є також дані про інші способи синтезу за відсутності мінеральних кислот, але наявності солей купруму (II) [176]. Отримані діазосоли є термостійкими, їх можна сульфувати, нітрувати та кристалізувати з гарячої води без розкладання [177].

ДНСК широко використовують як діазоскладову для синтезу багатьох метал-азобарвників, які застосовують у текстильній промисловості. Зокрема у роботі [176]

описано синтез азосполуки ДНСК з β -нафтолом та комплексів цієї сполуки із купруммом, кобальтом та хромом з метою застосування для фарбування тканин. Електронні спектри розчину азосполуки ДНСК з β -нафтолом у діоксані характеризуються інтенсивним максимумом світлопоглинання при 295 нм та мало інтенсивним максимумом при ~ 500 нм.

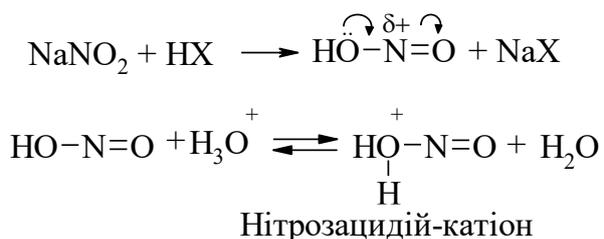
1.4 Умови перебігу та особливості механізму реакцій діазотування та азосполучення

Діазотування – реакція електрофільного заміщення біля атома Нітрогену первинної ароматичної аміногрупи за наявності сильної мінеральної кислоти під дією нітритної кислоти. Реакція діазотування протікає за наступним загальним механізмом [178–181]:

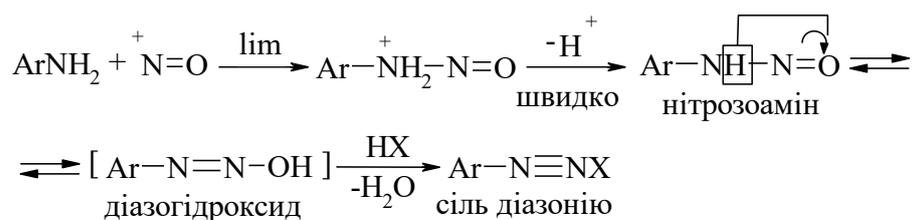


де X – Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻ тощо.

Класично діазотування здійснюють дією на амін натрій нітритом в середовищі сильних кислот, де утворюється нітритна кислота. Природа електрофільного агента має велике значення, адже нітритна кислота, яка в процесі діазотування утворюється з натрій нітриту при взаємодії з мінеральною кислотою, не є самостійним діазотуючим агентом. В молекулі нітритної кислоти є дефіцит електронної густини на атомі Нітрогену (+ M-ефект гідроксильної групи), тому для підвищення її електрофільної реакційної здатності реакцію діазотування треба проводити у середовищі сильної мінеральної кислоти. При цьому відбувається протонування атому Оксигену гідроксильної групи нітритної кислоти, відщеплення води та генерування нітрозацидій катіона (спряжена нітритна кислота) – дуже активного електрофільного агента [181].



Лімітуючою стадією процесу діазотування є утворення N-арилнітрозоаміну, який утворюється під дією діазотуючої частинки на вихідний амін. Здатність амінів реагувати з нітритною кислотою визначається наявністю неподіленої електронної пари в атомі Нітрогену аміногрупи та атома Гідрогену здатного в результаті відщепитися від атома Нітрогену у вигляді протону. Перехідний стан реалізується при взаємодії амінів з нітритною кислотою. Саме ця стадія є лімітуючою в концентрованих розчинах нітритної кислоти. Наступне перетворення первинних амінів пов'язане з наявністю у Нітрогена аміногрупи ще одного атома Гідрогена, який активується електроакцепторною нітрозо-групою, мігрує в вигляді протона до атома Оксигена, утворюючи діазогідрат. Оскільки реакцію проводять в середовищі сильної мінеральної кислоти, то утворені діазогідрати протонуються за атомом Оксигену, утворюючи внаслідок відщеплення води нітрени, а далі діазоній катіон [181,185].



На реакцію діазотування найбільше впливають наступні фактори: природа та концентрація кислоти, температура, концентрація діазотуючого агенту.

Згідно механізму реакції для діазотування теоретично потрібний двократний надлишок кислоти стосовно ароматичного аміну. Фактично сильну мінеральну кислоту беруть в кількості більше як трьохкратний надлишок. Висока кислотність середовища необхідна для того, щоб призупинити дві побічні реакції за участю катіона арендіазонію, що утворюється із вихідного ароматичного аміну. В одній з них з діазоній-катіону та аміну утворюється триазен (діазоіміносполука), а в іншій – аміноазосполука:



У розчині з низьким значенням рН різко знижується концентрація вільного аміну і тим самим пригнічуються обидва небажаних процеси.

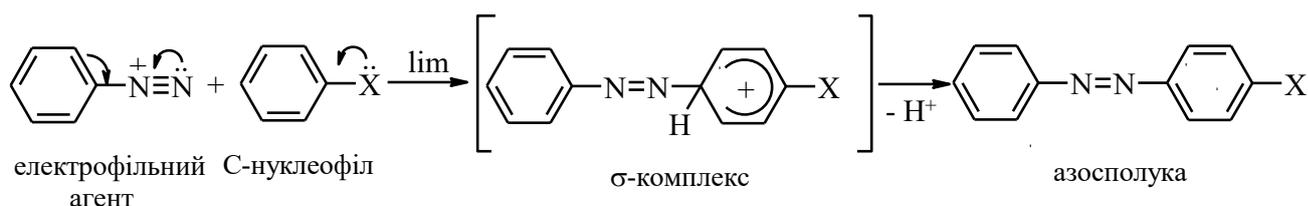
Як правило, діазотування проводять при охолодженні (0–5 °С) або при кімнатній температурі, однак відомі випадки проведення діазотування при

нагріванні. Умови проведення реакції значною мірою залежать від природи аміну який бере участь у діазотуванні [180, 181].

Важливий вплив також має надлишок натрій нітриту як діазотуючого реагенту, його потрібно точно дозувати, щоб уникнути утворення нестабільної форми діазосполуки, процесів окиснення та осмолення [182].

Катіон діазонію має електрофільні властивості (понижену електронну густину) біля атому Нітрогену, саме тому він здатний атакувати ароматичні сполуки за типом електрофільного заміщення (азосполучення).

Реакції азосполучення відбувається за механізмом електрофільного заміщення (S_{EAr}), реакція протікає через стадію утворення аренієвого σ -адукту (лімітуюча стадія) і його розпаду. Електрофільним агентом є катіон арендіазонію, який називають діазокомпонентою.

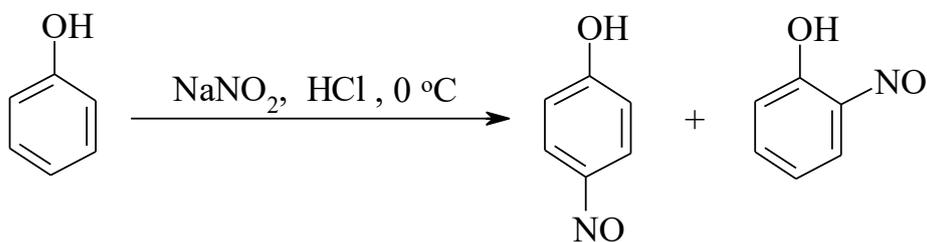


Іони діазонію не належать до числа сильних електрофільних реагентів через значну делокалізацію позитивного заряду, тому вони можуть вступати в реакції лише з реакційноздатними ароматичними сполуками (азокомпонентою). В реакцію азосполучення найчастіше вступають феноли та первинні аміни (сильний +M-ефект аміно групи та атома Оксигену в іоні феноляту, який і вступає в реакцію). Оскільки електрофільність іонів діазонію незначна, тому вони реагують регіоселективно, так що утворюється майже виключно продукт *para*- заміщення і невелика кількість *ortho*-ізомеру. –I– та –M– замісники в іоні діазонію підвищують його реакційну здатність до взаємодії з ароматичними сполуками, а групи з +I– та +M– ефектами навпаки знижують її [184].

Азосполучення відбувається лише при певних значеннях рН розчину в залежності від азоскладової. Реакцію азосполучення з фенольними сполуками проводять за рН=9–10, а для амінів – в слабко кислому середовищі рН=3–7 (в сильно кислому середовищі аміни протонуються і втрачають реакційну здатність до

азосполучення) оскільки діазоній-катіон порівняно слабкий електрофіл, який може існувати лише у кислому середовищі і здатний взаємодіяти з фенолят-іоном у лужному середовищі, а не з слабодисоційованою молекулярною формою фенолу. Проте, у зв'язку з утворенням нездатного до азосполучення діазотату, в сильнолужному середовищі концентрація діазосолі значно знижується [181–184].

В умовах реакції діазотування, коли не усувати непроредагований залишок натрій нітриту, досить часто відбувається нітрузування самого ароматичного аміну або азосполуки на його основі. Реакція нітрузування за атомом карбону проходить в активованих електродонорними замісниками ароматичних системах, таких як феноли та третинні ароматичні аміни під дією натрій нітриту. Вони легко вступають у взаємодію з таким слабким електрофілом як нітрозоній-катіон NO^+ , знижена реакційна здатність якого зумовлена його відносною стійкістю. Нітрузування зазвичай проходить у водному розчині під дією нітритної кислоти, з утворенням переважно *n*-нітрозопродукту з невеликою кількістю *o*-ізомеру [186].



n-нітрузофенол *o*-нітрузофенол

Умови проведення реакцій діазотування та азосполучення значною мірою залежать від поставленого завдання і може значно відрізнятися, якщо кількісно отримувати азопродукт у твердому стані (органічний синтез) чи для отримання забарвлених азосполук у розчині в аналітичних цілях. Тому при отриманні нового типу азосполук умови реакцій діазотування та азосполучення потрібно експериментально досліджувати.

ВИСНОВКИ З ОГЛЯДУ ЛІТЕРАТУРИ

Проаналізувавши літературні джерела, можна узагальнити, що існує велике різноманіття класів антибіотиків, які виявляють широкий спектр антибактеріальної дії, що дає можливість застосовувати їх у боротьбі з різними захворюваннями викликаними різноманітними мікроорганізмами. Амоксицилін, цефтріаксон, цефтазидим є представниками класу β -лактамних антибіотиків і є одними із найбільш затребуваних антибіотиків. Окситетрациклін в теперішній час практично не використовується у лікарській практиці, однак є незамінним у ветеринарії. Слід зазначити, що застосовувати антибіотики потрібно з обережністю, адже довготривале та безконтрольне використання призводить до появи резистентності у штамів бактерій. Це зумовило необхідність створення комбінованих антимікробних препаратів, які в своєму складі містять антибіотики різних класів. Проблема фальсифікації ліків зумовлює контроль якості великої кількості препаратів на ринку за допомогою різних методів аналізу, які повинні бути достатньо чутливими та селективними, а також простими та експресними.

Проаналізувавши методи визначення досліджуваних антибіотиків можна зробити висновок, що найчутливішими, найселективнішими та найпоширенішими є хроматографічні методи визначення АН, однак вони є складними та довготривалими, вимагають дорогого обладнання, малодоступних реактивів та великих кількостей органічних розчинників високої чистоти. Відомі також люмінесцентні методи, які вирізняються високою чутливістю визначення антибіотиків. Для титриметричних та потенціометричних методів не характерна висока селективність і чутливість, їх застосовують для аналізу простих лікарських засобів. Для визначення АН у лікарських формах та біологічних зразках найбільше є розроблено хроматографічних, спектрофотометричних та вольтамперометричних методик. СФ та ВА методи хоча поступаються за чутливістю і селективністю хроматографічним, проте є достатньо простими та експресними, що надає їм перевагу у порівнянні з іншими методами. Незважаючи на велику кількість відомих спектрофотометричних методик визначення антибіотиків АМ, ОЦ, ЦЕФТ та ЦЕФТР багатьом з них властивий ряд недоліків: використання важкодоступних та

рідкісних реагентів, використання органічних розчинників, довготривалість, необхідність відокремлення супутних компонентів. Недоліком більшості відомих ВА методик є необхідна рутинна підготовка електродної системи, що впливає на відтворюваність результатів та експресність аналізу. На противагу їм ртутний крапельний електрод є простим і зручним у використанні, а також характеризується максимальною відтворюваністю результатів. Крім того слід зазначити, що описані методики визначення АН не всі є валідованими, хоч це вимагається більшістю фармакопей світу, зокрема і Державною Фармакопеею України.

Для отримання нових аналітичних форм для визначення β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків перспективною є реакція азосполучення, яку використовують в основному для СФ визначення досліджуваних антибіотиків, ондак умови проведення даної реакції є доволі складними та тривалими. Особливо спірними є умови діазотування цефалоспоринових антибіотиків. Тому актуальним залишається дослідження умов взаємодії під час проведення як реакції діазотування АН так і їх азосполучення з відповідними реагентами з метою розроблення нових СФ та ВА методик визначення досліджуваних біологічно активних речовин, які б забезпечували надійні результати аналізу, були чутливими, селективними, експресними, простими у виконанні та не вимагали складної пробопідготовки. Варто також зауважити, що для вольтамперометричного визначення АН аналітичні форми, отримані на основі реакції азосполучення раніше не застосовували.

У реакцію азосполучення можуть вступати реагенти, які містять первинну ароматичну аміногрупу, які після діазотування виступають як діазокомпонента та фенольні сполуки – як азокомпонента. Оскільки АМ та ОТЦ є фенольними сполуками для розробки методик їх визначення було обрано реагенти, що мають первинну ароматичну аміногрупу: сульфаніламід, сульфатіазол для АМ та фуксин і 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоту для ОТЦ. Сульфаніламід широко використовують у медицині, даних про їхнє застосування в аналізі як органічних реагентів в літературі немає. Трифенілметановий барвник фуксин в аналітичній хімії використовується лише для екстракційно-спектрофотометричного визначення золота і платини, паладію, осмію та оксациліну; у складі реактиву Шиффа – для

якісного виявлення альдегідів. Відомо, що діазотований фуксин використовується в гістохімічних дослідженнях, але відомостей про його застосування як реагенту в реакції азосполучення у літературі немає. ДНСК широко використовують як діазоскладову для синтезу багатьох метал-азобарвників, які застосовують у текстильній промисловості, але даних про застосування її в хімічному аналізі в літературі немає. Тому дані реагенти стали предметом досліджень з метою отримання нових ефективних аналітичних форм АМ та ОТЦ.

Для визначення цефтазидиму та цефтріаксону, які містять первинну ароматичну аміногрупу за реакцією азосполучення було використано фенольні сполуки 8-оксихінолін, резорцин та 2-метилфенол. 8-Окс набув широкого використання в аналітичній хімії іонів металів для їхнього визначення та розділення, він утворює комплексні сполуки більш ніж з 40 елементами періодичної системи. Рез застосовують як аналітичний реагент для якісного визначення кетоз та для колориметричного визначення фурфуролу, вуглеводів, Zn, Pb і інших елементів. Однак в аналізі органічних речовин ці реагенти використовуються рідко. З іншого боку відоме їхнє застосування у виробництві азобарвників, оскільки феноли та нафтоли можуть застосовуватись як азоскладові в реакціях азосполучення. 2-Мет найчастіше використовують як дезінфікуючу речовину та консервант, та широко застосовують для одержання смол та синтезу барвників. Відомостей про його використання як аналітичного реагенту в літературі немає. Саме з цих причин 8-Окс, Рез та 2-Мет стали предметом нашого дослідження в реакції азосполучення із діазотованими ЦА з метою отримання нових ефективних аналітичних форм для СФ визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР.

Механізм реакцій діазотування та азосполучення за довгі роки існування цих реакцій вивчений достанько детально, але застосування різних нових реагентів часто складної будови вимагає додаткового встановлення оптимальних умов отримання солей діазонію і цільових азопродуктів з досліджуваними реагентами.

РОЗДІЛ 2

ВИГОТОВЛЕННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ РОЗЧИНІВ. ВИБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ТА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

2.1 Виготовлення робочих розчинів.

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

Розчини солей натрій тетраборату, натрій нітриту, натрій хлориду, сечовини, сульфамінової кислоти готували з відповідних реагентів кваліфікації “ч.д.а.”. Розчини натрій фосфату, натрій карбонату, натрій тіосульфату, натрій пірофосфату, натрій ацетату – з реактивів марки “х.ч.”. Всі вище перелічені реактиви придбані у ТОВ “Сфера Сім”, м. Львів.

Також у роботі використовували субстанції клавуланової кислоти, триметоприму, фармакопейної чистоти, а також допоміжні речовини: наповнювачі – повідон, натрій крохмальгліколят, кальцій стеарат, алюміній моностеарат, бутиленгідрокситолуен, поліетиленгліколь, магній хлорид; консерванти – бензиловий спирт фармакопейної чистоти фірми “Sigma-Aldrich” із вмістом основної речовини не менше 99 %; розчинник рафінована кокосова олія кваліфікації “х.ч.”.

2.1.1 Виготовлення та стандартизація розчинів антибіотиків

Розчин АМ готували розчиненням точної наважки реактиву фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich в 0,1 М розчині НСІ. Точну концентрацію вихідного розчину АМ визначали СФ [187], вимірювали оптичну густину розчину чистої субстанції в 0,1 М хлоридній кислоті за $\lambda_{\max} = 230$ нм і розраховували концентрацію АМ за основним законом світлопоглинання, використовуючи значення молярного коефіцієнту світлопоглинання $1,085 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹.

Розчин ОТЦ готували розчиненням точної наважки реактиву окситетрацикліну гідрохлориду із вмістом основної речовини не менше 99 %

фірми Sigma-Aldrich (Польща) у 0,01 М розчині хлоридної кислоти. Точну концентрацію вихідного розчину ОТЦ визначали спектрофотометрично, вимірювали оптичну густину розчину чистої субстанції в 0,1 М хлоридній кислоті за $\lambda_{\max} = 267$ нм і розраховували концентрацію ОТЦ за основним законом світлопоглинання, використовуючи значення молярного коефіцієнту світлопоглинання $2,120 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹ [188].

Розчин ЦЕФТР готували розчиненням точної наважки антибіотика (USP Reference Standards, Швейцарія, вміст основної речовини не менше 99%) в дистильованій воді. Точну концентрацію вихідного розчину ЦЕФТР визначали спектрофотометрично [7], вимірювали оптичну густину розчину чистої субстанції в 0,1 М хлоридній кислоті за $\lambda_{\max} = 265$ нм і розраховували концентрацію ЦЕФТР за основним законом світлопоглинання, використовуючи значення молярного коефіцієнту світлопоглинання $5,695 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹.

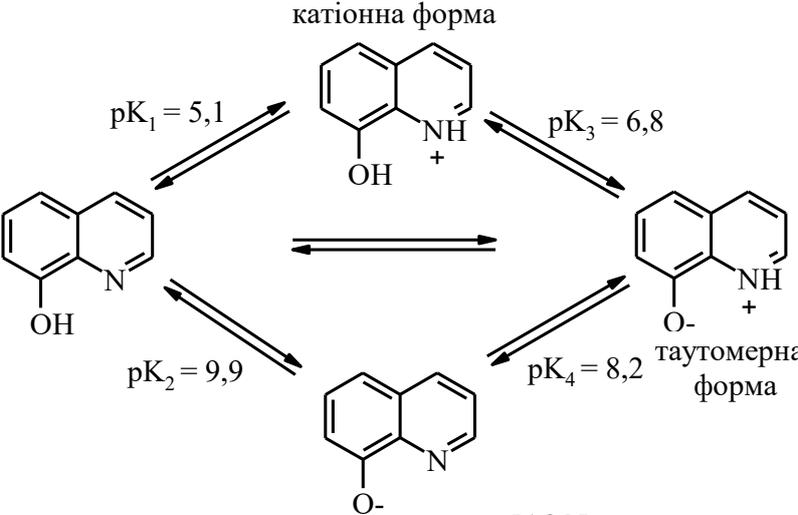
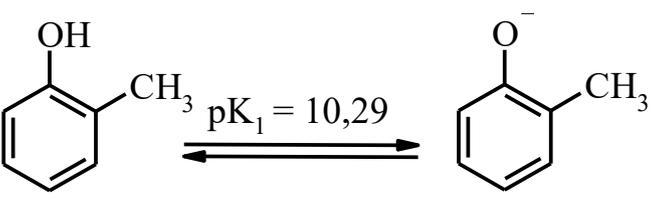
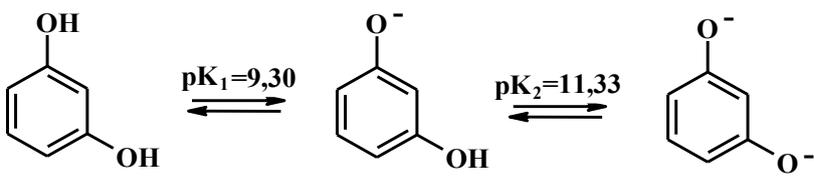
Розчин ЦЕФТ готували розчиненням точної наважки реактиву цефтазидиму пентагідрату фармакопейної чистоти (вміст в перерахунку на безводний 88,2 %) фірми Sigma-Aldrich у воді. Точну концентрацію вихідного розчину ЦЕФТ визначали спектрофотометрично [106], вимірювали оптичну густину розчину чистої субстанції в 0,1 М хлоридній кислоті за $\lambda_{\max} = 261$ нм і розраховували концентрацію ЦЕФТ за основним законом світлопоглинання, використовуючи значення молярного коефіцієнту світлопоглинання $5,210 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹.

Робочі розчини антибіотиків готували розведенням відповідних аліквот їх стандартних розчинів у зазначених розчинниках, зберігали при кімнатній температурі в захищеному від світла місці не більше двох днів.

2.1.2 Виготовлення та стандартизація розчинів реагентів

Для розробки методик визначення цефалоспоринових антибіотиків за реакцією азосполучення було обрано фенольні сполуки 8-оксихінолін резорцин та 2-метилфенол, формули та деякі характеристики яких наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Форми існування та деякі характеристики досліджуваних фенольних реагентів

Реагент	Деякі характеристики
<p>8-оксихінолін, 8-гідроксихінолін, 8-хінолінол, 1-азанафтелен-8-ол, Феннозан Р 30, гідроксибензопіридин, фенопіридин, хінофенол, оксин CAS № 148-24-3, M=145,16 г/моль;</p> <p style="text-align: center;">катіонна форма</p>  <p style="text-align: center;">[189]</p>	<p>Кристали світло-жовтого кольору.</p> <p>Розчинність: погано розчинний у воді (мінімальна розчинність 0,53 г/л), добре розчинний в лугах, кислотах, органічних розчинниках (в хлороформі 382 г/л, в бензені 319 г/л, в ізоамілацетаті 174 г/л, етиловому етері 96 г/л). $T_{пл.}=75-76^{\circ}C$, $T_{кип.}=267^{\circ}C$.</p>
<p>2-метилфенол, <i>o</i>-крезол CAS № 95-48-7, M= 108,1 г/моль;</p>  <p style="text-align: center;">[190]</p>	<p>Безбарвні кристали.</p> <p>Розчинність: у воді 0,23 г/л, розчинний в ацетоні та хлороформі, важкорозчинний в діетиловому ефірі та етанолі.</p> <p>$T_{пл.}=30,9^{\circ}C$, $T_{кип.}=190,9^{\circ}C$.</p>
<p>Резорцин, <i>m</i>-дигідроксибензен, бензен-1,3-діол CAS № 108-46-3, M=110,1 г/моль;</p>  <p style="text-align: center;">[191]</p>	<p>Безколірні кристали.</p> <p>Розчинність: розчинний у воді (1,4 г/мл), етанолі, діетиловому ефірі, ацетоні, важкорозчинний в хлороформі, бензені.</p> <p>$T_{пл.}=110^{\circ}C$, $T_{кип.}=280,8^{\circ}C$.</p>

Стандартні вихідні розчини резорцину, 8-оксихіноліну та 2-метилфенолу готували розчиненням точної наважки реагентів фірми Sigma-Aldrich кваліфікації “ч.д.а.” (не менше 99 %) у 4 М розчині натрій гідроксиду безпосередньо перед виконанням експерименту.

Методика стандартизації розчину резорцину [192]

0,500 г (точна наважка) резорцину розчиняють у воді і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 250,0 мл. 25,0 мл одержаного розчину поміщають у колбу із притертим скляним корком, додають 1,0 г калій броміду, 50,0 мл 0,0167 М розчину калій бромату, 15 мл хлороформу, 15,0 мл 6,8 М хлоридної кислоти. Колбу закривають, перемішують і залишають у захищеному від світла місці впродовж 15 хв, періодично струшуючи.

Потім додають 10 мл розчину 100 г/л калій йодиду, ретельно перемішують, витримують впродовж 5 хв і титрують 0,1 М розчином натрій тіосульфату, використовуючи як індикатор 1 мл 1% розчину крохмалю. 1 мл 0,0167 М розчину калій бромату відповідає 1,835 мг $C_6H_6O_2$.

Методика стандартизації розчину 8-оксихіноліну [193]

Аналізований розчин 8-оксихіноліну повинен містити 2 М хлоридну кислоту. До розчину об'ємом 50 мл додають 1 г калій броміду і потім краплями при перемішуванні доливають розчин калій бромату з $C_E = 0,1$ М. Треба внести близько 1 мл надлишку цього розчину. Для цього визначають приблизно кінець реакції, наносячи дуже маленькі краплі титрованого розчину на йодид-крохмальний папір. Додавання калій бромату припиняють, коли на йодид-крохмальному папері відразу утворюється чисто-синя пляма. Тоді дають постояти 2 хв і визначають надлишок калій бромату йодометричним способом: додають 2 г калій йодиду, кілька мілілітрів 1%-ного розчину крохмалю і дуже повільно титрують 0,1 М розчином натрій тіосульфату до зникнення синього забарвлення. При правильному проведенні першої операції на зворотне титрування витрачається 1–2 мл 0,1 М розчину натрій тіосульфату. При додаванні калій йодиду може утворитися коричневий осад. Це йодопохідне дибромоксихіноліну. При подальшому титруванні розчином натрій тіосульфату ця сполука поступово

руйнується. 1,0 мл 0,1 М розчину калій бромату відповідає 0,04 моль 8-оксихіноліну.

Методика стандартизації розчину 2-метилфенолу [194]

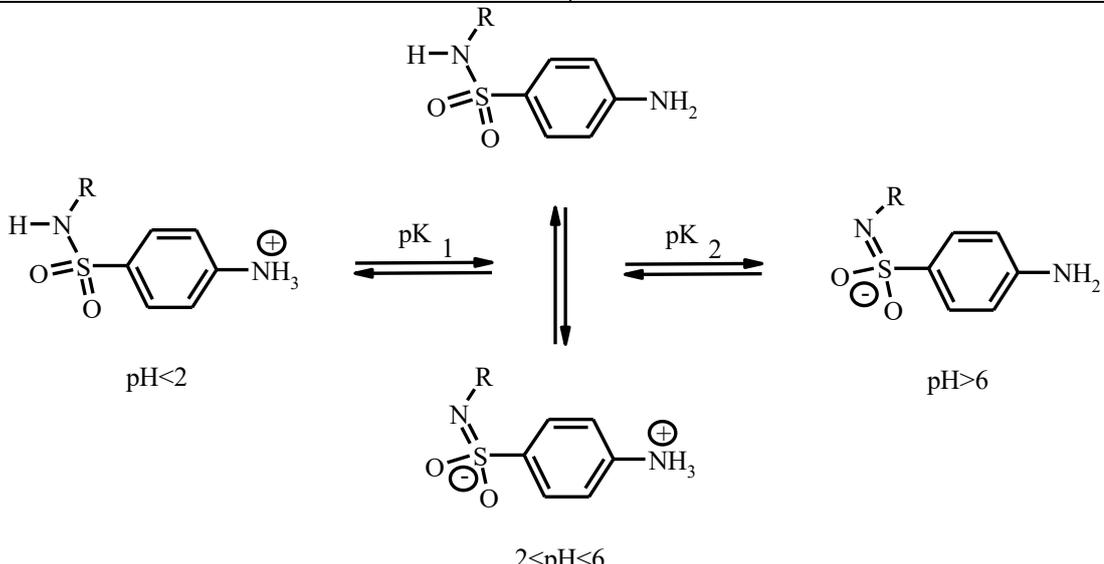
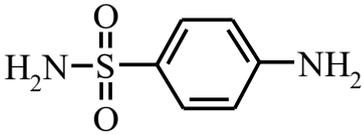
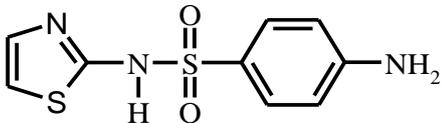
У колбу з притертим корком об'ємом 50 мл вносять 1мл розчину, що містить 1,0 мг 2-метилфенолу, 10 мл води і 4 мл насиченої бромної води. Закривають колбу і струшують впродовж 10 хв, використовуючи електричний шейкер. Руйнують надлишок бромну додаючи краплями 80% форміатну кислоту. Додають 1 мл 5% розчину калій йодиду, закупорюють колбу і струшують впродовж 5 хв. Виділений йод екстрагують двома порціями хлороформу по 10 мл. Екстракт збирають в іншу лійку і збовтують із 100 мл води, що містить 1 мл 1% розчину натрій сульфату. Переносять водний (верхній) шар, що містить йодид, у конічну колбу об'ємом 50 мл, окиснюють йодид 3 мл насиченої бромної води струшуючи впродовж 3 хв, потім видаляють надлишок бромну 2 мл 80% форміатної кислоти під час струшування. Додають 2 мл 5% розчину KI та титрують виділений йод 0,01 М розчином натрій тіосульфату, використовуючи 1% розчин крохмалю як індикатор. Проводять титрування холостого розчину. 1 мл 0,01 М розчину натрій тіосульфату відповідає 90,12 мкг 2-метилфенолу.

Для розроблення методик визначення амоксициліну та окситетрациоліну за реакцією азосполучення обрано реагенти, що містять первинну ароматичну аміногрупу, САМ та СТЗ для АМ, Фукс та ДНСК для ОТЦ. Детальніша інформація про досліджувані реагенти наведена в табл. 2.2.

Розчини сульфаніламідів (САМ, СТЗ) готували розчиненням точної наважки реактиву із вмістом основної речовини не менше 99 % фірми Sigma-Aldrich у 0,1 М розчині натрій гідроксиду.

Для стандартизації розчинів сульфаніламідів використовували фармакопейний метод нітритометричного титрування згідно ДФУ 2.0 [21], що призначений для встановлення вмісту діючої речовини в субстанції.

Таблиця 2.2 – Форми існування та деякі характеристики досліджуваних реагентів, що містять первинну ароматичну аміногрупу

Реагент	Деякі характеристики
 <p style="text-align: center;">Форми існування СА у водних розчинах [162].</p>	
<p>Сульфаніламід, стрептоцид, 4-амінобензенсульфонамід CAS № 63-74-1</p>  <p>$M = 172,2 \text{ г/моль};$ $pK_{a1} = -; pK_{a2} = 10,1$ [162].</p>	<p>Кристалічний порошок білого кольору, без запаху, має злегка гіркий смак з солодким присмаком. Легко розчинний в киплячій воді (1:2), важко – в етанолі (1:37), розчинний в розчинах хлоридної кислоти, їдких лугах, ацетоні (1:5), гліцерині, пропіленгліколі; не розчиняється в ефірі, хлороформі, бензені, петролейному етері.</p> <p>$T_{пл.} = 165,5 \text{ } ^\circ\text{C}$</p>
<p>Сульфатіазол, 4-аміно-<i>N</i>- (1,3-тіазол-2-іл) бензенсульфонамід CAS № 72-14-0</p>  <p>$M = 255,3 \text{ г/моль};$ $pK_{a1} = 2,62; pK_{a2} = 7,37$ [162].</p>	<p>Білий або білий зі злегка жовтуватим відтінком кристалічний порошок без запаху. Дуже мало розчинний у воді, етері, дихлорметані, мало – в етанолі, розчинний в розведених мінеральних кислотах і розчинах лугів.</p> <p>$T_{пл.} = 202 - 202,5 \text{ } ^\circ\text{C}$</p>

Фуксин основний (розанілін хлорид)

4-((4-амінофеніл)(4-іміно-2,5-циклогексادیєн-1-іліден)метил)-2-метил-бензенамін монохлорид

CAS № 632-99-5

M = 337,85 г/моль

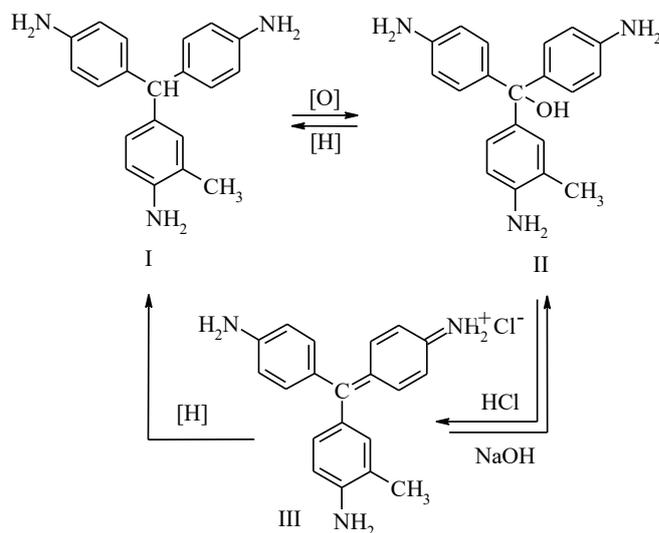


Схема перетворення фуксину у кислому та лужному середовищі.

Зелені кристали з металічним блиском.

Добре розчинний у етиловому або амільовому спирті, хлоридній кислоті, погано розчинний у воді 2,65 г/л при 25°C.

T_{пл.} = 200 °C. Нестійкий до дії світла [195].

pH = 1,2 – 3,0

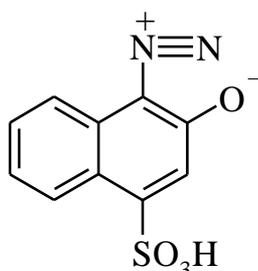
пурпуровий – блідо-пурпуровий

При переході фуксину з кислого в лужне середовище відбуваються внутрішньомолекулярні перетворення. Сполуки типу I є безбарвними і називаються лейко-сполуками. При окисненні лейкосполук утворюються карбонільні основи II, які в недисоційованій формі також безбарвні. В кислому середовищі вони утворюють забарвлені солі III, які є барвниками. При відновленні барвників утворюються їхні лейкосполуки I, а при дії лугів – карбінольні основи II [196].

Концентровані кислоти: HCl, HNO₃, H₂SO₄ обезбарвлюють розчин Фукс з утворенням сполук жовтого кольору. При сильному розведенні кислого розчину його забарвлення повертається до пурпурового. При дованні луку розчин Фукс знебарвлюється і випадає білий пластівчастий осад вільної основи, який при обережному підкисленні розчиняється і повертається вихідне забарвлення Фукс [197].

1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислота

CAS № 887-76-3



M = 250,23 г/моль;

Порошок коричневого кольору. Водні розчини мають жовто-коричневе забарвлення (pH = 4,4). ДНСК обмежено розчинна у воді (15,8 г/л), добре розчинна у 96 % сульфатній кислоті [175]. Розкладається на світлі, при температурі більше 100°C може вибухнути.

T_{пл.} = 160 °C, розкладається.

Методика стандартизації розчинів сульфаніламідів [21]

Приготування і стандартизація 0,1 М розчину натрій нітриту

Розраховують масу наважки натрій нітриту необхідного для приготування 200,0 мл 0,1 М розчину натрій нітриту, зважують і поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 70 мл води, розчиняють при перемішуванні та доводять до мітки водою.

Близько 0,2 г (точна наважка) сульфанілової кислоти, двічі перекристалізованої і висушеної при 120 °С до постійної маси, поміщають в колбу для титрування місткістю 200,0 мл; додають 60 мл води і розчиняють. До отриманого розчину додають 10 мл 2,0 М хлоридної кислоти, 1 г калій броміду, 4 краплі тропеолін 00 і 2 краплі розчину метиленового синього та титрують 0,1 М розчином NaNO_2 до зміни забарвлення розчину з червоно-фіолетового до голубого.

Паралельно виконують контрольний дослід. За результатами титрувань та масою наважки сульфанілової кислоти розраховують молярність розчину натрій нітриту.

Визначення вмісту сульфаніламідів у використуваних субстанціях

Наважку субстанції масою близько 0,2 г (точна наважка) розводять 10 мл 2 М хлоридної кислоти, потім доливають воду до загального об'єму 80 мл, додають 1 г калій броміду, 4 краплі тропеоліну 00 і 2 краплі розчину метиленового синього та титрують 0,1 М розчином NaNO_2 до зміни забарвлення розчину з червоно-фіолетового до голубого. За результатами титрування проводять розрахунок вмісту сульфаніламідів.

Робочі розчини сульфаніламідів готували розведенням аліквоти вихідного стандартного розчину з використанням хлоридної кислоти.

Вихідні стандартні розчини реагентів фуксину основного (вміст основної речовини не менше 95 %) фірми Fluka (Німеччина) та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоту (вміст основної речовини не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich (Польща) з концентрацією $\sim 10^{-3}$ М готували розчиненням точної наважки відповідних реактивів у 0,01 М розчині хлоридної кислоти та в дистильованій воді відповідно.

Точну концентрацію вихідних розчинів фуксину визначали спектрофотометрично [196] при $\lambda_{\text{max}} = 544$ нм і розраховували концентрацію за

основним законом світлопоглинання, використовуючи відоме значення молярного коефіцієнту світлопоглинання у водному розчині $\varepsilon_{544}=1,16 \cdot 10^5 \text{ л/моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

2.1.3 Референтні методики визначення антибіотиків у лікарських формах

Методика хроматографічного визначення ЦЕФТ у порошках для виготовлення ін'єкційних розчинів

Умови хроматографічного визначення цефтазидиму у порошках для розчину для ін'єкцій [28] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка C_{18} (150 мм×4,6 мм, $d=5$ мкм); рухома фаза – фосфатний буферний розчин з рН=7,0 : ацетонітрил : вода= 10:2:88, швидкість потоку рухомої фази 2 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=264$ нм, час утримування – 1,5 хв, $V=20$ мкл.

Приготування стандартного розчину. Точно зважують близько 29 мг цефтазидиму тригідрату і переносять у мірну колбу на 25,0 мл, що містить 2,5 мл фосфатного буферного розчину з рН=7,0, та струшують до повного розчинення. Доводять водою до мітки, перемішують. Розчин зберігають у захищеному від світла місці. Безпосередньо перед хроматографуванням 5,0 мл отриманого вихідного розчину переносять у мірну колбу на 50,0 мл, доводять водою до позначки і перемішують. Концентрація отриманого розчину цефтазидиму – близько 100 мкг/мл.

Приготування випробуваного розчину. Точну наважку препарату, еквівалентну близько 250 мг цефтазидиму, переносять у мірну колбу місткістю 250,0 мл. Доводять водою до мітки і перемішують, отримують вихідний розчин. Розчин зберігають у захищеному від світла місці. Безпосередньо перед хроматографуванням переносять 5,0 мл отриманого розчину в мірну колбу на 50,0 мл доводять водою до позначки і перемішують.

Процедура визначення. Окремо інжектують рівні об'єми (близько 20 мкл) стандартного і випробуваного розчину у хроматограф, реєструють хроматограми і вимірюють відповідні площі основних піків.

Розрахунки. Обчислюють кількість (%) цефтазидиму у перерахуванні на сушу, вільну від натрію карбонату, речовину, за формулою:

$$X=25000 \left[\frac{C}{W \cdot (100-m-g)} \right] \frac{s_u}{s_s},$$

де C – концентрація цефтазидиму в стандартному розчині, мкг/мл; W – маса наважки препарату для приготування випробовуваного розчину, мг; m – втрати маси при висушуванні, %; g – вміст натрій карбонату у цефтазидимі, %; s_u – площа основного піку цефтазидиму на хроматограмі випробовуваного розчину; s_s – площа основного піку цефтазидиму на хроматограмі стандартного розчину.

Методика хроматографічного визначення ЦЕФТР у порошках для виготовлення ін'єкційних розчинів

Умови хроматографічного визначення цефтріаксону у порошках для розчину для ін'єкцій [28] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка C_{18} (150 мм×4,6 мм, $d=5$ мкм); рухома фаза – фосфатний буферний розчин з рН=7,0 : ацетатний буферний розчин з рН=5,0 : ацетонітрил : вода = 0,4 : 4,4 : 40 : 55,2, швидкість потоку рухомої фази 2 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=270$ нм, час утримування – 11,9 хв, $V=20$ мкл.

Приготування стандартного розчину. Точно зважують 40,0 мг стандартного зразка натрій цефтріаксону та переносять у мірну колбу об'ємом 200,0 мл, розчиняють в рухомій фазі, доводять рухомою фазою до мітки та перемішують. Розчин використовують безпосередньо після приготування. Концентрація отриманого розчину цефтазидиму – близько 200 мкг/мл.

Приготування випробовуваного розчину. Точну наважку препарату, еквівалентну близько 1 г цефтріаксону вилучають 10,0 мл стерильної води для ін'єкцій, переносять за допомогою голки та шприца в мірну колбу об'ємом 100,0 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до мітки і перемішують. Розводять 15 мл цього розчину рухомою фазою до 50,0 мл. 15 мл отриманого розчину доводять рухомою фазою до 250,0 мл і перемішують.

Процедура визначення. Хроматографують рухому фазу, як контрольний розчин. По черзі хроматографують випробовуваний розчин та стандартний розчин, реєструють хроматограми та вимірюють площі основних піків.

Розрахунки. Вміст цефтріаксону (X), в мг/флакон обчислюють за формулою:

$$X = \frac{S_t \cdot W_s \cdot 100 \cdot 50 \cdot 250 \cdot P \cdot m}{S_s \cdot 200 \cdot W_u \cdot 15 \cdot 15 \cdot 100} = \frac{S_t \cdot W_s \cdot P \cdot m \cdot 0,28}{S_s \cdot W_u \cdot 15},$$

де S_t – площа піку ЦЕФТР, розрахована з хроматограм робочого розчину, S_s – площа піку ЦЕФТР, розрахована з хроматограм стандартного розчину, W_s – маса наважки робочого стандартного зразка натрій цефтріаксону, мг; W_u – маса наважки препарату, мг; m – середня маса вмісту флакона, мг; P – вміст ЦЕФТР в робочому стандартному зразку натрій цефтріаксону, %.

Методика хроматографічного визначення АМ у таблетках.

Умови хроматографічного визначення амоксициліну у таблетках [21] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка “Kromasil C₁₈” (250 мм×4,6 мм, $d=5$ мкм); рухома фаза А – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 1:99; рухома фаза В – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 20:80. Урівноважують колонку рухомою фазою зі співвідношенням рухомих фаз А : В = 92:8, швидкість потоку рухомої фази 1 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=254$ нм, час утримування – 7,5 хв, V=50 мкл.

Приготування стандартного розчину. Точно зважують 30,0 мг стандартного зразка амоксициліну тригідрату, розчиняють у рухомій фазі А і доводять об’єм розчину до 50,0 мл.

Приготування випробовуваного розчину. 40 мг порошку розтертих таблеток розчиняють у рухомій фазі А і доводять об’єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл. Витримують на ультразвуковій бані 15 хв, періодично струшуючи, і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор не більше 0,45 мкм.

Процедура визначення. Почергово хроматографують по 50 мкл випробовуваного розчину та стандартного розчину, реєструють хроматограми та вимірюють площі основних піків.

Розрахунки. Вміст амоксициліну в одній таблетці (X), в мг розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 50 \cdot P \cdot b}{S_0 \cdot 50 \cdot m_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot b}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100},$$

де S_1 – середнє значення площ піків АМ, розраховане з хроматограм випробувального розчину; S_0 – середнє значення площ піків АМ, розраховане з хроматограм стандартного розчину; m_1 – маса наважки порошку розтертих таблеток, мг; m_0 – маса наважки стандартного зразка АМ, мг; P – вміст амоксициліну тригідрату в робочому стандартному зразку АМ, %; b – середня маса таблетки, мг.

Методика хроматографічного визначення АМ у таблетках, що диспергуються.

Умови хроматографічного визначення амоксициліну та клавуланової кислоти у таблетках, що диспергуються [28] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка “Hypersil ODS” (250 мм×4,6 мм, $d=5$ мкм); рухома фаза: фосфатний буферний розчин з рН=4,4 : метанол = 95:5; швидкість потоку рухомої фази 2 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=220$ нм, час утримування – 10,0 хв, $t_{\text{колонки}}=30$ °С; $V=20$ мкл.

Приготування стандартного розчину. В мірну колбу об’ємом 100,0 мл зважують приблизно 15 мг робочого стандарту літій клавуланату і 60 мг робочого стандарту амоксициліну тригідрату (точна наважка) розчиняють і доводять об’єм розчину водою до мітки. ($C_{\text{АМ}} = 0,5$ мг/мл, $C_{\text{клавуланової кислоти}} = 0,14$ мг/мл).

Приготування випробуваного розчину. Зважують 20 таблеток, визначають середню масу і подрібнюють їх до порошку. Точно зважують приблизно 650 мг порошку таблеток (відповідає приблизно 250 мг АМ) і переносять в мірну колбу об’ємом 500,0 мл. Додають приблизно 400 мл води і струшують на механічному струшувачі протягом 15 хв. Доводять об’єм розчину в колбі до мітки. Обробляють ультразвуком 15 хв, періодично струшуючи.

Процедура визначення. Випробовуваний та стандартний розчини фільтрують через мембранний фільтр Millipore 0,45 мкм, діаметр фільтра 25 мм, відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Почергово хроматографують по 20 мкл випробовуваного розчину та стандартного розчину, реєструють хроматограми та вимірюють площі основних піків.

Розрахунки. Вміст амоксициліну (клавуланової кислоти) в одній таблетці (X), в мг/таблетку розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_s \cdot m_{st} \cdot m \cdot P \cdot D_s}{S_{st} \cdot m_s \cdot 100 \cdot D_{st}}$$

де S_s , S_{st} – середні площі піків амоксициліну (клавуланової кислоти), розраховані з хроматограм випробувального та стандартного розчинів відповідно; m_s – наважка зразка, мг; m_{st} – маса наважки стандартного зразка амоксициліну тригідрату (літій клавуланату), мг; P – чистота робочого стандарту, %; m – середня маса таблетки, мг; D_s – розведення випробовуваного розчину = 500; D_{st} – розведення стандартного розчину = 100, D_s/D_{st} – 500/100=5.

Методика хроматографічного визначення АМ у порошку для приготування суспензії.

Умови хроматографічного визначення амоксициліну у порошку для приготування суспензії [28] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка “Superspher 100 RP-18e” (125 мм×4,0 мм, $d=4,0$ мкм); рухома фаза фосфатний буферний розчин з рН=6,5 : ацетонітрил = 97:3; швидкість потоку рухомої фази 2 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=210$ нм, час утримування – 2,6 хв, $t_{\text{колонок}}=44$ °С; V =10 мкл.

Приготування стандартного розчину. В мірну колбу об’ємом 100 мл зважують 22,5-27,5 мг робочого стандарту амоксициліну тригідрату (з точністю до 0,01 мг) розчиняють і доводять об’єм розчину розчинником до мітки та перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв. Фільтрують отриманий розчин через мембранний фільтр.

Приготування суспензії. До 5,10 г порошку додають 56,0 мл води і струшують вручну, потім впродовж 10 хв струшують на механічній мішалці.

Приготування випробованого розчину. За допомогою піпетки під час перемішування на магнітній мішалці відбирають 10,0 мл готової до застосування суспензії, зважують з точністю до 0,01 г, переносять у мірну колбу на 250,0 мл, доводять до мітки водою і перемішують на магнітній мішалці впродовж 30 хв. Піпеткою відбирають 5,0 мл отриманого розчину в мірну колбу на 20,0 мл і доводять до мітки водою. Фільтрують отриманий розчин через мембранний фільтр.

Процедура визначення. Почергово хроматографують по 10 мкл випробовуваного розчину та стандартного розчину, реєструють хроматограми та вимірюють площі основних піків.

Розрахунки. Вміст амоксициліну (X) в мг на 5 мл готової до використання суспензії розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_p \cdot m_R \cdot W \cdot 50 \cdot 1,018}{S_R \cdot m_p \cdot 100},$$

де S_p – площа піку амоксициліну для визначуваного розчину; S_R – площа піку амоксициліну для стандартного розчину; m_p – наважка зразка, г; m_R – маса наважки стандартного зразка амоксициліну тригідрату, мг; W – вміст амоксициліну в стандартному розчині, %; 1,018 – теоретична густина готової до використання суспензії.

Методика спектрофотометричного визначення ОТЦ за власним поглинанням в УФ-ділянці спектру при $\lambda=355$ нм [28].

Відбирають наважку порошку окситетрацикліну, яка містить 15,5 мг ОТЦ згідно з номінальним вмістом у препараті, вносять до мірної колби об'ємом 25,0 мл, розчиняють вміст в 0,01 М розчині хлоридної кислоти та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником. Отриману суміш перемішують і використовують як робочий розчин. Для визначення відбирають 1,5 мл цього розчину, переносять в колбу на 25,0 мл і доводять розчин дистильованою водою до мітки. Отриманий розчин фотометрують за 355 нм у кюветі з $l=1$ см. Розрахунок концентрації ОТЦ проводять методом порівняння [28].

Умови хроматографічного визначення та ОТЦ (комбінований порошок, розчин для ін'єкцій) у ветеринарних препаратах

Умови хроматографічного визначення окситетрацикліну у порошках та розчині для ін'єкцій [28] методом обернено-фазової ВЕРХ: колонка C_{18} (150 мм×4,6 мм, $d=5$ мкм); рухома фаза – 0,2% ортофосфатна кислота : ацетонітрил = 80:20; швидкість потоку рухомої фази 1 мл/хв; УФ-детектування – $\lambda=350$ нм; час утримування – 2,50 хв; $V=10$ мкл. Стандартний розчин ОТЦ із концентрацією 100 мкг/мл.

2.2. Апаратура

Вимірювання світлопоглинання проводили на скануючому спектрофотометрі SPECORD M-40 (Carl ZeissJena, Німеччина) в кюветах $l = 1$ см.

Хроматографічне визначення здійснювали на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity Autosampler system (Agilent Technologies, Inc, США).

Величину рН вимірювали з допомогою рН-150 М (РУП “Гомельський завод измерительных приборов”, Білорусь) з використанням комбінованого скляного електроду. Необхідне значення рН середовища створювали за допомогою додавання розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду.

Вольтамперметричні дослідження проводили на цифровій установці MTech OVA-410 у поєднанні з персональним комп'ютером. Прилад і програмне забезпечення до нього розроблені на кафедрі аналітичної хімії ЛНУ ім. І. Франка [198]. Точність вимірювання потенціалу становить не менше 1мВ. Невизначеність вимірювання струму – 0,1%. У роботі використовували триелектродну комірку місткістю 10 мл: індикаторний електрод – ртутний крапельний електрод (р.к.е.), електрод порівняння – насичений каломелевий (н.к.е.), допоміжний електрод – платиновий. Характеристики р.к.е.: $m = 1,46 \text{ мг} \cdot \text{с}^{-1}$; $\tau = 6,0$ с у холостому розчині із $\mu = 0,3$ без накладання напруги поляризації.

У роботі користувалася аналітичною вагою 2-го класу точності марки XAS 100/C (RADWAG, Польща), $\text{Max}=100$ г, $\text{Min}=10$ мг; $T=-100$ г; $d=0,1$ мг.

2.3 Вибір оптимальних умов спектрофотометричного визначення

Умови отримання кольорових аналітичних форм та селективність обраного реагенту займають важливе місце для досягнення правильності, специфічності та високої відтворюваності результатів спектрофотометричного визначення.

Під час розробки нових спектрофотометричних методик визначення антибіотиків АМ, ОТЦ, ЦЕФТР, ЦЕФТ з використанням фенольних та реагентів з первинною ароматичною аміногрупою, в першу чергу, необхідно встановити сприятливі умови реакції та спектрофотометричні характеристики отриманих азосполук. Для цього було проведено наступні дослідження:

○ *отримання електронних спектрів світлопоглинання* – встановлення та дослідження спектральної ділянки максимального світлопоглинання розчину досліджуваної сполуки і ділянки, де спостерігається максимальна різниця оптичних густин досліджуваного і “холостого” розчинів;

○ *вплив середовища реакції і концентрації кислоти* – дослідження діазотування реагентів (сульфаніламідів, фуксину) і аналітів (цефтріаксону та цефтазидиму), що містять первинну ароматичну аміногрупу у середовищі різних кислот з подальшим вимірюванням світлопоглинання продуктів їхнього взаємодії із відповідними фенольними сполуками (антибіотиками АМ та ОЦ) та реагентами (8-оксихіноліном та 2-метилфенолом та резорцином). Вплив кислотності середовища на взаємодію діазосолей антибіотиків чи реагентів з відповідними фенольними реагентами чи антибіотиками та отримання спектрів світлопоглинання за умов різної кислотності. Залежно від рН середовища змінюється стійкість діазосолі та форма існування антибіотика та реагентів, тому кислотність середовища значно впливає на утворення, а також на вихід забарвленої сполуки [199–201];

○ *вплив концентрації реагентів* – дослідження надлишку діазотуючого реагенту натрій нітриту; дослідження надлишку реагенту, що є необхідним для повного зв'язування антибіотиків у кінцевий азопродукт. Їх кількість встановлювали за максимальним світлопоглинанням продукту реакції експериментально. Для цього готували серію розчинів із постійним вмістом визначуваної речовини, проте з різним і постійно зростаючим вмістом реагентів, натрій нітриту та відповідної кислоти. Оптимальний надлишок реагентів для повного зв'язування АН у кінцевий продукт знаходили за різким зломом кривої $\Delta A = f(C_R / C_{АН})$;

○ *порядок змішування реагентів* – це вплив послідовності додавання реагентів на світлопоглинання досліджуваних розчинів.

○ *співвідношення компонентів та молярний коефіцієнт світлопоглинання забарвленої сполуки.*

Встановлення мольного співвідношення компонентів у забарвленій сполуці за даними ізомольних кривих проводили за рівнянням [201]:

$$n = X_{\max} / [1 - X_{\max}],$$

де $X = [C_R / (C_M + C_R)]$; X_{\max} – значення X , при якому світлопоглинання сполуки є максимальним; n – число молекул реагенту, яке припадає на одну молекулу діазосолі.

Розрахунок ефективного молярного коефіцієнта світлопоглинання розчину забарвленої сполуки здійснюють за рівнянням основного закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера в оптимальних умовах утворення:

$$\varepsilon_{\lambda_{\max}} = \frac{A_{\lambda_{\max}}}{l \cdot C} \text{ (моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}\text{)},$$

де $A_{\lambda_{\max}}$ – світлопоглинання розчину азосполуки за λ_{\max} ; l – товщина поглинаючого шару, см; C – концентрація розчину азосполуки (антибіотика), моль \cdot л $^{-1}$.

○ *вплив часу зберігання* – дослідження стійкості продуктів реакції у часі за стабільністю світлопоглинання розчинів продуктів азосполучення.

2.4 Вибір оптимальних інструментальних параметрів для вольтамперометричного дослідження

Метод вольтамперометрії із швидкою розгорткою потенціалу отримав широке застосування завдяки можливості дослідження кінетики електродного процесу, встановлення природи струму, характеру процесів окиснення-відновлення, визначення електрохімічних, хімічних та фізичних констант при дослідженні електродних процесів. Починаючи із становлення осцилографічного варіанту полярографічного аналізу метод дозволяє з'ясувати природу та механізми електрохімічних процесів окиснення та відновлення на електродах речовин різного походження та не втратив своєї актуальності [202-211].

Для дослідження можливості вольтамперометричного визначення антибіотиків у вигляді азосполук вивчали електрохімічну поведінку всіх реагентів, які використовують для одержання аналітичних форм.

Аналітичні дослідження проводили в діапазоні потенціалів від -0,2 до -1,1 В, що пов'язано з відсутністю піків досліджуваних речовин в більш катодній ділянці циклічної вольтамперограми. Швидкість розгортки потенціалу становила 0,6-2,5 В/с, затримка накладання напруги становила 3,6 с.

Вольтамперограми реєстрували при кімнатній температурі ($\sim 20^\circ\text{C}$). Розчинений кисень видаляли з досліджуваних розчинів за допомогою очищеного аргону.

Нами вивчався вплив *кислотності середовища* на вольтамперометричні характеристики. Якщо залежність значення потенціалу відновлення від рН розчину носить лінійний характер, то це вказує на участь іонів гідрогену в електрохімічному процесі. Кількість протонів, що беруть участь в електрохімічній реакції для процесів, не обмежених адсорбцією деполаризатора на поверхні електроду розраховують згідно наступного рівняння $dE/dpH=0,059 \cdot n_{H^+}/n_e$ [211] (де n_{H^+} – кількість протонів, а n_e – кількість електронів, які беруть участь в електрохімічній реакції) на основі нахилу лінійної залежності потенціалу піку від рН. Вплив кислотності середовища на струм електроду носить індивідуальний характер для окремо взятої системи. Найчастіше він проявляється через зміну концентрації домінуючої електроактивної форми деполаризатора під дією H_3O^+ чи OH^- [212].

У роботі нами використовувався ряд діагностичних критеріїв та вивчався вплив фізико-хімічних факторів на процес відновлення азосполук на основі амоксициліну із сульфаніламідом та продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону, з метою оцінки природи струму та характеру процесу відновлення з водних розчинів, критерії наведено в додатку В.

Методика ВА дослідження азосполуки амоксициліну із сульфаніламідом

До мірної колби вносять розчин 0,6 М хлоридної кислоти, додають аліквоту розчину сульфаніламідом з кінцевою концентрацією $\sim 10^{-4}$ М, вносять розчин натрій нітриту у 15-кратному надлишку стосовно молярної концентрації САМ. Перемішують суміш та витримують впродовж 20 хв при кімнатній температурі. Додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну ($C(\text{САМ}):C(\text{АМ})=5:1$). Вносять аліквоту розчину 0,25 М натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до відповідного значення рН середовища та доводять розчин до мітки дистильованою водою. Досліджуваний розчин вносять в електролітичну комірку і видаляють розчинений кисень продуванням очищеного аргону упродовж 15 ± 1 хв та отримують вольтамперограми за різних умов полярографування, щоб досягнути максимального значення аналітичного сигналу чи дослідити вплив різних чинників.

2.5 Метрологічні та валідаційні характеристики результатів досліджень

Під час розроблення аналітичних методик обов'язковим етапом є встановлення характеру концентраційної залежності аналітичного сигналу. У разі лінійної залежності відповідно розраховують параметри a і b рівняння прямої градуйованого графіка методом найменших квадратів.

Для встановлення характеристики чутливості аналітичної методики використовують межу виявлення C_{\min} (мінімальна концентрація аналіту, яку можна виявити цим методом з певною достовірністю) та межу визначення C_H (мінімальна концентрація аналіту, яку можна визначити цим методом з певною достовірністю). C_{\min} та C_H розраховують за формулами:

$$C_{\min} = \frac{3 \cdot S_0}{b},$$

$$C_H = kC_{\min},$$

де S_0 – стандартне відхилення при вимірюванні фонового сигналу на вольтамперограмах розчинів, b – тангенс кута нахилу градуйованого графіка, $k=3,3$ [213].

Відповідно до вимог, які ставить Державна Фармакопея України [21, 214–217] усі аналітичні методики, які використовують для контролю якості лікарських засобів мають пройти процедуру валідації. Валідація аналітичних методик – це експериментальний доказ придатності методики для вирішення передбачуваних завдань. Процедура валідації складається з наступного ряду тестів: специфічність, лінійність, правильність, робастність, прецизійність, внутрішньолабораторна прецизійність. Відповідність валідаційних параметрів критеріям, які до них ставляться, визначає можливість використання конкретної аналітичної методики для контролю кількісного вмісту ліків. Якщо хоча б один з валідаційних критеріїв не виконується, згідно ДФУ методику не можна застосовувати для визначення лікарської речовини. Більш вичерпну інформацію про валідаційні параметри та формули для їхнього розрахунку наведено у додатку Г.

РОЗДІЛ 3

СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ АЗОСПОЛУК ОТРИМАНИХ ВНАСЛІДОК ВЗАЄМОДІЇ АНТИБІОТИКІВ З РЕАГЕНТАМИ

Азосполуки є ефективними спектрофотометричними аналітами, на спектрах світлопоглинання яких є інтенсивні максимуми, спричинені електронними переходами в азогрупі. Серед великого різноманіття антибіотиків нашу увагу привернули поширені антибіотики для визначення яких можна використовувати азосполуки, як аналітичні форми. Такі АН мають у своїй будові ароматичну аміногрупу чи є фенольними сполуками і можуть вступати в реакцію азосполучення. З іншого боку широке застосування цих АН у лікарській та ветеринарній практиках, провокує фальсифікування препаратів на їхній основі, тому є потреба в наявності простих та доступних методик визначення АН, зокрема СФ.

Для своїх досліджень серед фенольних сполук ми обрали антибіотик пеніцелінового ряду амоксицилін та тетрацикліновий АН окситетрациклін; серед антибіотиків із первинною гетероароматичною аміногрупою було обрано цефасоспоринові АН цефтріаксон та цефтазидим. Пошук нових аналітичних форм для визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТР та ЦЕФТ за реакцією азосполучення є актуальним, оскільки відомі методики характеризуються рядом наступних недоліків: довготривалістю аналізу, необхідністю використання льодяної бані, а інколи і нагрівання. У випадку цефалоспоринів літературні дані є доволі суперечливі щодо умов діазотування антибіотиків даного класу.

3.1 Спектрофотометрія азосполук отриманих на основі взаємодії антибіотиків, які містять фенольну групу із солями арендіазонію реагентів

Для визначення фенольних АН, які в реакції діазотування відіграють роль азоскладової ми обрали наступні реагенти – діазоскладові: для амоксициліну сульфаніламід та сульфатіазол; для окситетрацикліну – фуксин та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоту. Сульфаніламід як реагенти нами були обрані з міркувань простоти синтезу, доступності, наявності комерційних високочистих субстанцій практично у всіх лабораторіях контролю якості лікарських засобів. Для вивчення

азосполучення окситетрацикліну як діазореагенти ми обрали фуксин та ДНСК через доступність реагентів. Крім того фуксин, як реагент містить три ароматичні аміногрупи, стійкий у формі діазосолі і здатний азосполучатися із трьома молекулами аналіту відповідно, що призведе до утворення великого азопродукту із значним електронним спряженням, що на нашу думку дасть можливість розробити чутливу методику. Використовуючи комерційну діазосіль ДНСК як реагент для реакції азосполучення можна розраховувати на розробку експресної методики визначення ОЦ, оскільки економиться час, який потрібно затратити на діазотування реагентів із первинною ароматичною аміногрупою.

3.1.1 Спектрофотометрія амоксициліну із сульфаніламидами

Електронні спектри світлопоглинання

В структуру амоксициліну входять різні функціональні групи (карбоксільна, гідроксільна та аміногрупа), стан яких може змінюватися за різних рН, що може вплинути на взаємодію із різними реагентами. Оскільки АМ є фенольною сполукою для його визначення обрали реакцію азосполучення із діазосолями ароматичних амінів, яка відбувається в лужному середовищі. Солі арендіазонію отримують в кислому середовищі під дією натрій нітриту. В літературі відомі методики у яких азопродукт отримують за наявності непрореагованого натрій нітриту (можливе утворення нітрованої азосполуки) і такі, в яких його усувають під дією сечовини. Тому нами було досліджено спектри світлопоглинання амоксициліну в умовах реакцій діазотування та азосполучення, які відбуваються за різних рН (рис. 3.1).

Як видно з рис. 3.1 на спектрах АМ як у кислому, так і в лужному середовищі наявні два максимуми світлопоглинання в УФ ділянці спектру: перший більш інтенсивний при 230 нм (середовище 0,2 М НСІ) та 250 нм (рН=11) та менш інтенсивний при 273 нм (середовище 0,2 М НСІ) та 287 нм (рН=11) відповідно. Більш інтенсивний максимум очевидно пов'язаний із $\pi \rightarrow \pi^*$ електронними переходами в ароматичному кільці [218]. Наявність натрій нітриту в розчині АМ в лужному середовищі призводить до появи дуже інтенсивного максимуму за $\lambda = 210$ нм [219] на адитивному спектрі світлопоглинання, який перебиває

максимум АМ за 250 нм. Наявність сечовини не впливає на характер спектрів розчину АМ, що свідчить про те, що вони не взаємодіють.

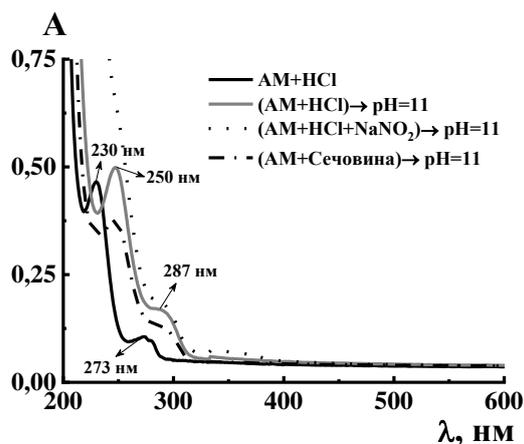


Рисунок 3.1 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів амоксициліну в умовах реакції діазотування (кисле середовище) та азосполучення (лужне середовище): $C_{AM} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{HCl} = 0,2 \text{ M}$; $C_{NaNO_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{Сечовини} = 0,05 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$

Як діазокомпоненту для СФ визначення АМ за реакцією азосполучення ми обрали первинні ароматичні аміни: сульфаніламід та сульфатіазол, що є також антимікробними засобами і до цього не застосовувались як аналітичні реагенти. Для отримання азосполуки на основі АМ, сульфаніламідні реагенти діазотували в хлориднокислому середовищі під дією натрій нітриту і азосполучали з амоксициліном за $pH = 11,0$. При взаємодії діазосолей СА з АМ утворюються забарвлені азосполуки, які характеризуються появою нових максимумів на спектрах світлопоглинання за $\lambda_{max} = 445 \text{ нм}$ для САМ, та $\lambda_{max} = 448 \text{ нм}$ для СТЗ (рис 3.2) [221–227]. Дані максимуми не є характерними ні для спектру світлопоглинання розчину самого АМ в лужному середовищі ($\lambda_{max} = 250 \text{ нм}$), ні для розчинів діазотованих реагентів в лужному середовищі: САМ – $\lambda_{max} = 263 \text{ нм}$, СТЗ – $\lambda_{max} = 265 \text{ нм}$. Поява нових максимумів на адсорбційних спектрах продуктів взаємодії амоксициліну із солями арендіазонію СА, пов'язана із поглинанням новоутворених азогруп, (внаслідок $n \rightarrow \pi^*$ електронного переходу), що характерно для молекул із площинним розміщенням спряженої системи хромофорів. Окрім основного максимуму на спектрах продуктів взаємодії АМ з солями арендіазонію САМ та СТЗ (рис. 3.2) можна спостерігати ще один широкий результуючий максимум світлопоглинання в

оптичному діапазоні 250–270 нм, який є наслідком адитивного світлопоглинання фрагментів обох реагентів в новоутвореному продукті.

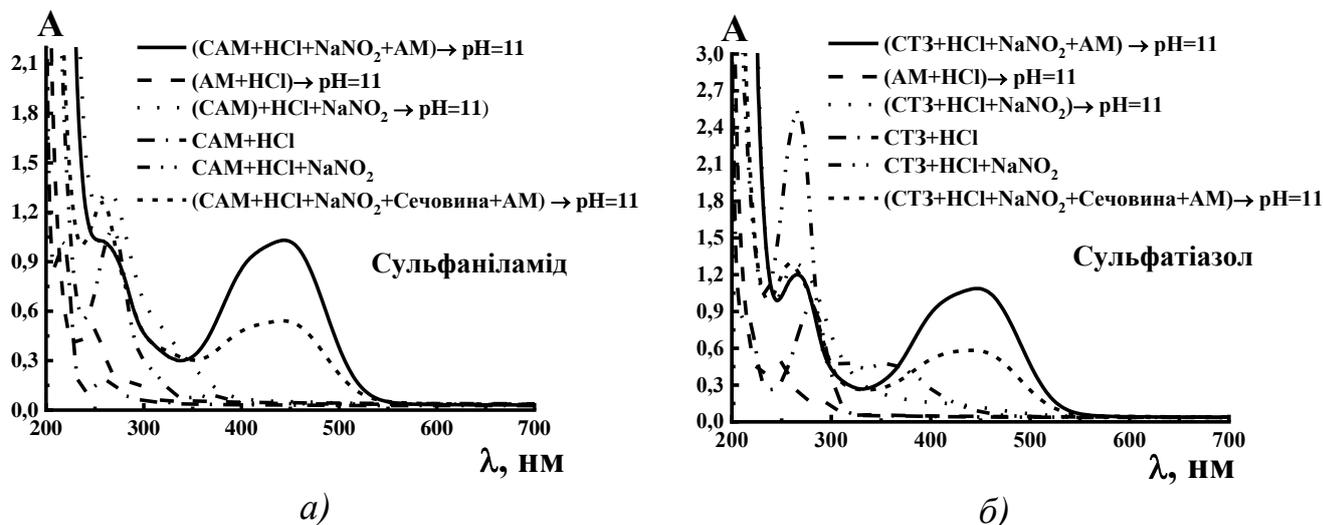


Рисунок 3.2 - Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії амоксициліну з діазосолями *а)* САМ та *б)* СТЗ. Умови діазотування: $C_{\text{CAM}}=1,0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{СТЗ}}=1,0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaNO}_2}=1,0 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{HCl}}=1,0$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}}=5,0 \cdot 10^{-5}$ М; pH=11,0; $l=1$ см.

Зі спектрів, зображених на рис. 3.2 також видно, що у випадку, коли непрореагований при діазотуванні залишок натрій нітриту усувати сечовиною, висота максимумів світлопоглинання продуктів реакції АМ з діазотованими реагентами дещо знижується. Тому при проведенні подальших досліджень непрореагований натрій нітрит не усували з реакційного середовища.

Встановлення оптимальних умов діазотування реагентів

З літературних даних відомо, що реакція діазотування відбувається в кислому середовищі, при чому природа та концентрація кислоти має вплив на вихід продукту реакції. Згідно літературних даних температура впливає на стабільність солей діазонію, особливо коли мова йде про кількісний органічний синтез. Зниження температури стабілізує солі арендіазонію. Однак для розроблення фотометричних методик не обов'язково досягати максимальних виходів продуктів реакцій, достатньо лише щоб умови проведення дозволяли отримувати аналогічний вихід продукту у повторювальних експериментах. Тому у літературі є достатньо багато методик визначення первинних ароматичних амінів, зокрема СА за допомогою

реакції діазотування та азосполучення при кімнатній температурі і навіть при нагріванні [162]. Усі наші дослідження ми проводили за кімнатної температури. Для проведення реакції азосполучення з АМ досліджувані реагенти сульфаніламіді потрібно було попередньо діазотувати за таких умов, які би сприяли максимальному виходу продукту реакції азосполучення. Тому для оптимізації експерименту було досліджено вплив різних чинників, від яких залежить ефективність діазотування СА: концентрації та природи мінеральної кислоти, тривалості процесу діазотування, а також концентрації натрій нітриту як діазотуючого реагенту. Критерієм, за яким оцінювали оптимальні умови діазотування СА була максимальна оптична густина розчинів отриманих продуктів азосполучення з АМ, яку вимірювали на максимумах світлопоглинання.

Вплив природи та концентрації кислоти на діазотування сульфаніламідів

Для встановлення оптимальних умов взаємодії компонентів у досліджуваних системах вивчено вплив концентрації хлоридної, сульфатної, фосфатної та ацетатної кислот на вихід солей діазонію САМ та СТЗ та подальшого утворення продуктів їхнього азосполучення з АМ. Одержані результати наведено на рис. 3.3.

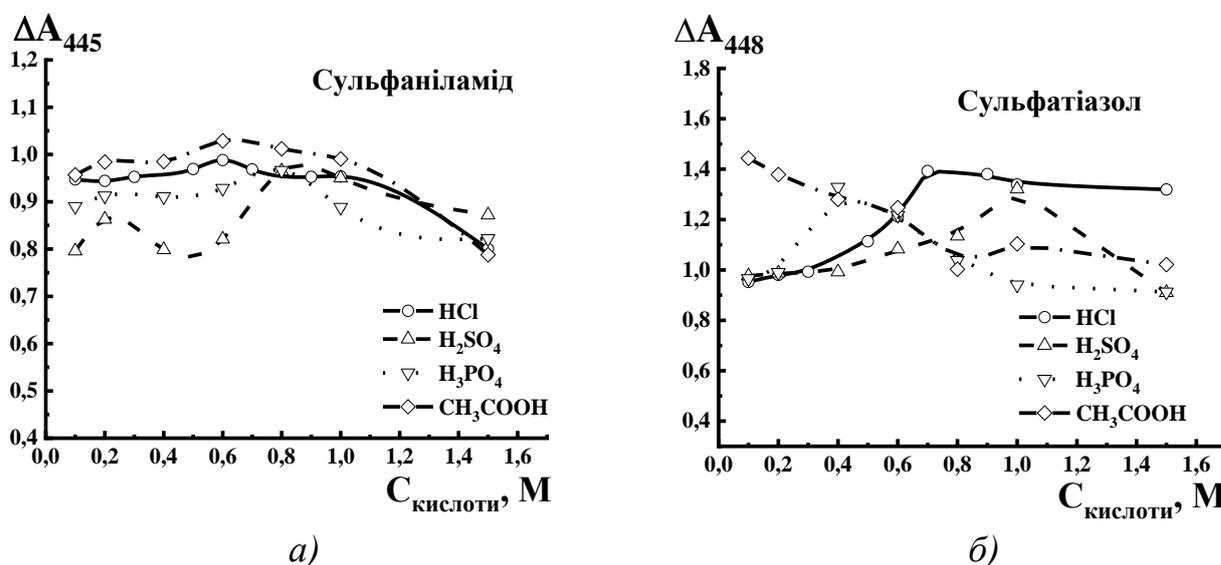


Рисунок 3.3 – Вплив природи та концентрації кислоти (хлоридної, сульфатної, ортофосфатної, ацетатної) на взаємодію діазотованих *а)* САМ та *б)* СТЗ з АМ. Умови діазотування: $C_{САМ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{СТЗ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 2,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{АМ} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М; $pH=10,5$; $l=1$ см.

Як показали результати досліджень (рис. 3.3 а)), максимальна оптична густина розчину продукту взаємодії між АМ та діазосіллю САМ спостерігається, коли проводити діазотування сульфаніламідів в середовищі ацетатної кислоти, однак використання хлоридної та ортофосфатної кислот дають співмірні результати. Для подальших досліджень для діазотування САМ ми обрали 0,6 М хлоридну кислоту. Використання сульфатної кислоти для діазотування САМ призводить до меншого виходу кінцевого продукту азосполучення. Утворення максимальної кількості продукту взаємодії АМ з сіллю арендіазонію СТЗ відбувається коли сульфатіазол діазотувати в середовищі 0,7 М хлоридної кислоти (рис.3.3 б)), про що свідчать найвищі значення світлопоглинання розчину азопродукту [221, 226].

Різний вплив досліджуваних кислот на діазотування реагентів і відповідно подальше утворення продуктів азосполучення з АМ можна пояснити так: відповідно до механізму діазотування, у середовищі різних кислот утворюються нітрозилхлорид, нітрозилсульфат, нітрозилацетат або нітрозилфосфат, які мають різну реакційну здатність та стабільність. Через малу нуклеофільну здатність аніонів сильних кислот утворюються стабільніші солі діазонію [182, 183, 185]. Крім того використання сильно кислого середовища для діазотування пригнічує можливі конкурентні процеси між частинками вихідного аміну та його солями діазонію.

Вплив концентрації діазотуючого агента натрій нітриту

Досліджено вплив концентрації натрій нітриту, як діазотуючого реагента, на вихід діазосолей сульфаніламідів та подальшого їх азосполучення із амоксициліном.

Як показали результати досліджень наведені на рис. 3.4 оптимальним є використання натрій нітриту з концентрацією вище, ніж 15-кратний надлишок відносно концентрації САМ та СТЗ ($C_{\text{реагенту}} : C_{\text{NaNO}_2} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ М} : 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ М} = 1 : 15$), коли досягається максимальне значення аналітичного сигналу. Надлишок нітрит-іонів стосовно реагентів пояснюється самим механізмом діазотування, згідно якого з однією ароматичною аміногрупою взаємодіє дві молекули нітритної кислоти, крім того, як відомо, надлишок реагенту зміщує рівновагу реакції в бік утворення продуктів реакції.

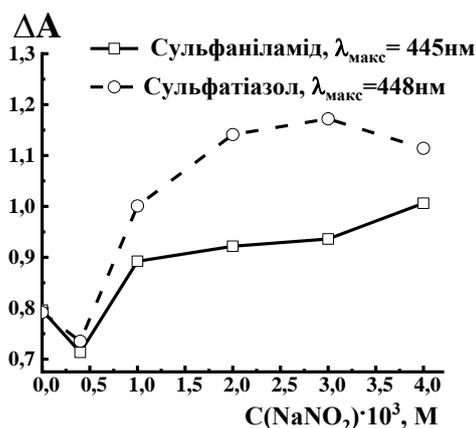


Рисунок 3.4 – Вплив концентрації натрій нітриту на взаємодію САМ і СТЗ, з АМ. Умови діазотування: $C_{\text{САМ}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$; $C_{\text{СТЗ}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 0,7 \text{ M}$; Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Вплив тривалості діазотування

Для досягнення максимальних виходів діазосолей сульфаніламідів та сульфатіазолу було досліджено тривалість діазотування (рис. 3.5).

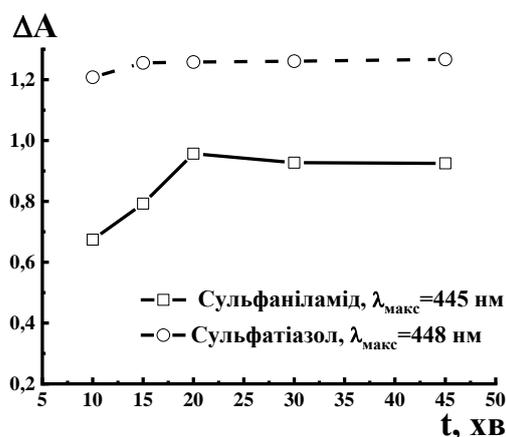


Рисунок 3.5 – Вплив тривалості реакції діазотування САМ та СТЗ на світлопоглинання продуктів азосполучення з амоксициліном. Умови діазотування: $C_{\text{САМ}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$; $C_{\text{СТЗ}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 0,7 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$; $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

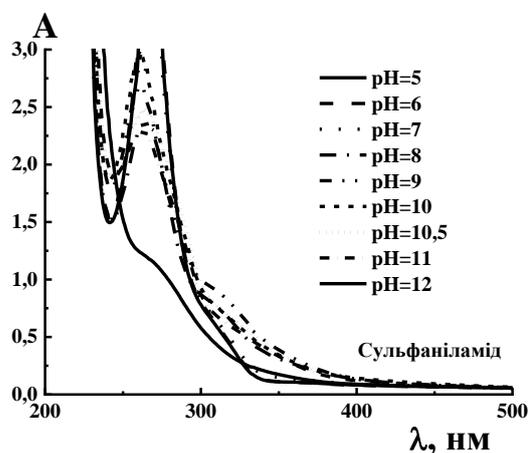
Максимальне світлопоглинання продуктів азосполучення діазосолей САМ та СТЗ із АМ (рис. 3.5) досягається при діазотуванні реагентів впродовж 20 хв. При збільшенні часу діазотування вихід продуктів азосполучення діазотованих сульфаніламідів з АМ залишається майже незмінним, тому в наступних дослідженнях діазотування проводили впродовж 20 хв за кімнатної температури.

Встановлення оптимальних умов азосполучення діазотованих САМ та СТЗ з амоксициліном

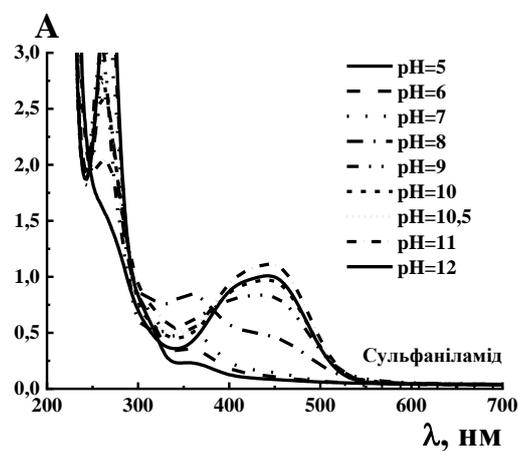
Солі діазонію, як класичні електрофільні реагенти, здатні взаємодіяти з основними ароматичними сполуками. Реакцію азосполучення з фенольними сполуками проводять при рН=9–10, тому що діазоній-катіон порівняно слабкий електрофіль, який може існувати лише у кислому середовищі і здатний взаємодіяти з фенолят-іоном у лужному середовищі, а не з слабодисоційованою молекулярною формулою фенолу. Проте, в сильнолужному середовищі концентрація діазосолі значно знижується, у зв'язку з утворенням нездатного до азосполучення діазотату [178, 182, 183]. Тому з метою отримання максимального виходу продукту азосполучення, необхідно було встановити оптимальне значення рН середовища реакції, а також оптимальний надлишок концентрації солей діазонію досліджуваних реагентів.

Вплив кислотності середовища

Досліджено вплив рН середовища на взаємодію діазотованого сульфаніlamіду та сульфатіазолу з амоксициліном, (рис. 3.6 а–г)). Як свідчать ЕСП продуктів взаємодії діазосолей СА з АМ реакція азосполучення відбувається у широкому інтервалі кислотності середовища рН =7–12. На спектрах продуктів азосполучення (рис. 3.6 б, г)), виокремлюється широкий максимум світлопоглинання в межах довжин хвиль 380–520 нм, при чому максимальна оптична густина світлопоглинання продуктів взаємодії АМ із САМ досягається за довжини хвилі 445 нм, а з СТЗ за $\lambda=448$ нм, у той час як на спектрах світлопоглинання холостих розчинів (розчини солей діазонію СА в лужному середовищі) ніяких максимумів не спостерігається.



а)



б)

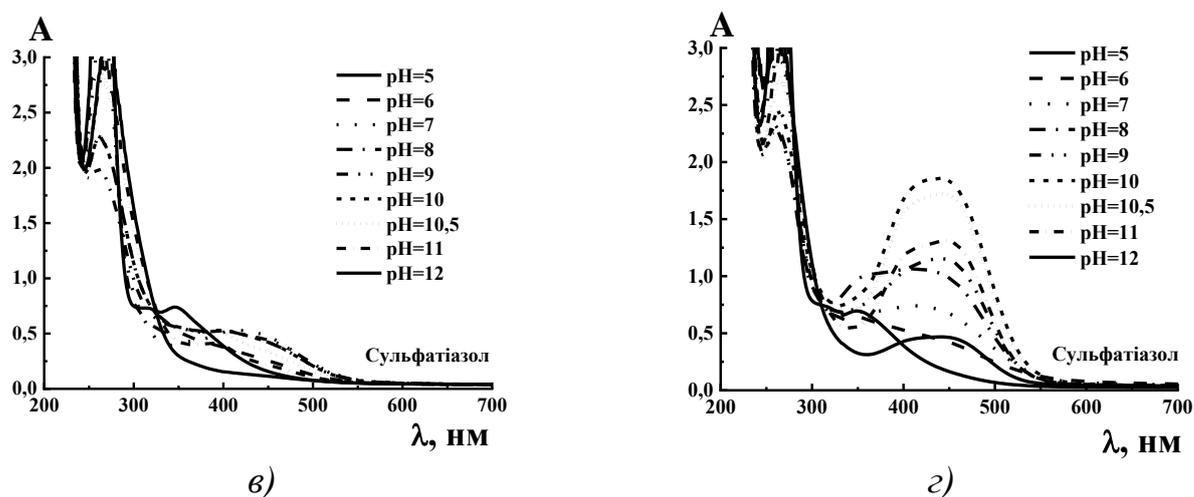


Рисунок 3.6 – Спектри світлопоглинання холостих розчинів діазотованих САМ (а) та СТЗ (б) та продуктів азосполучення АМ із діазосіллю САМ (б) та діазосіллю СТЗ (г). Умови діазотування: $C_{САМ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{HCl} = 0,6$ М; $C_{СТЗ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{HCl} = 0,7$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{АМ} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М; $l = 1$ см.

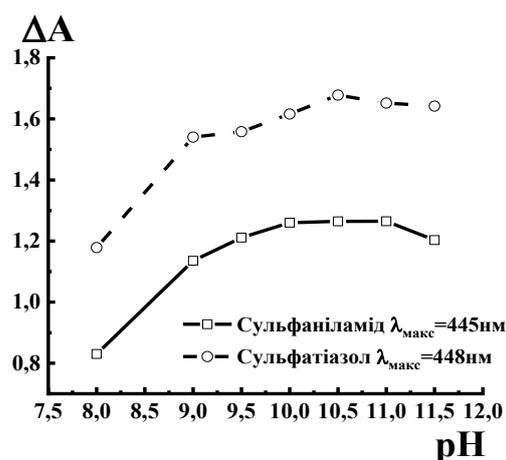


Рисунок 3.7 – Вплив рН середовища на світлопоглинання продуктів азосполучення амоксициліну з діазотованими САМ та СТЗ. Умови діазотування: $C_{HCl} = 0,6$ М, $C_{САМ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{СТЗ} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{HCl} = 0,7$ М; $C_{NaNO_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{АМ} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$ М; $l = 1$ см.

Як видно з рис. 3.7 максимальний вихід продуктів взаємодії діазотованих сульфаніламідів та сульфатіазолу з амоксициліном спостерігається за рН = 10,5.

Вибірковість взаємодії в системах АМ – САМ, АМ – СТЗ, за наявності різних солей натрію.

З метою встановлення стабільних умов для реакції азосполучення, підтримання оптимального рН середовища та для підвищення експресності методики визначення амоксициліну з діазосолями сульфаніламідів потрібно було підібрати буферну суміш. До складу буферних розчинів, як правило, входять аніони слабких кислот, тому ми досліджували вплив різних аніонів солей натрію на світлопоглинання продуктів азосполучення амоксициліну із солями діазонію досліджуваних реагентів.

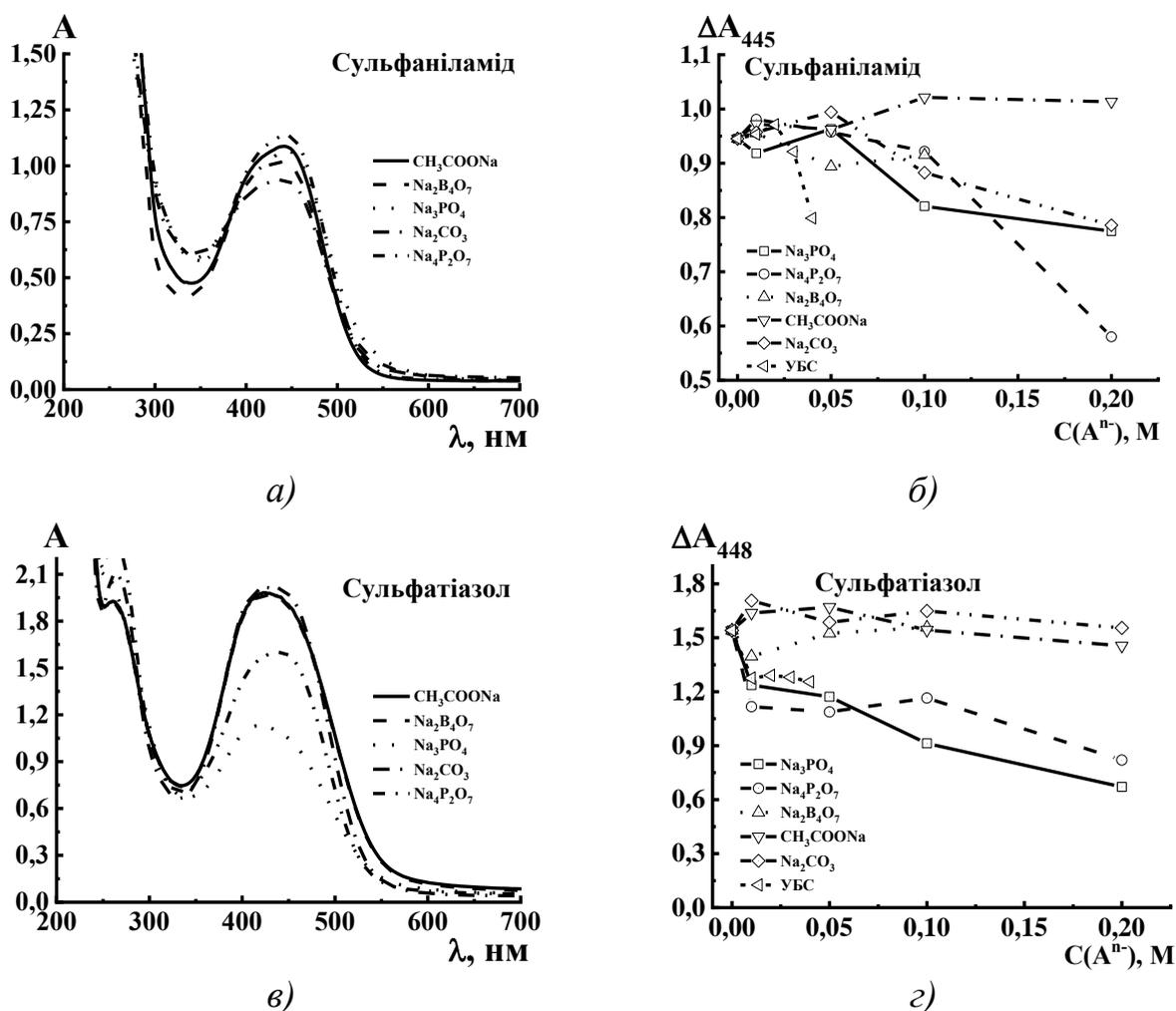


Рисунок 3.8 – (а, в) Спектри світлопоглинання азосполук діазотованих СА із АМ за наявності різних солей натрію; $C_{\text{соли Na}} = 0,01$ М. (б, з) Вплив природи та концентрації аніонів солей натрію та концентрації універсальної буферної суміші (УБС) на світлопоглинання продуктів взаємодії АМ з діазотованими САМ та СТЗ. Умови діазотування: $C_{\text{САМ}} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{HCl}} = 0,6$ М; $C_{\text{СТЗ}} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{HCl}} = 0,7$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 3,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М; рН=10,5; $l=1$ см.

Як показали результати досліджень (рис 3.8 а, в)), наявність аніонів (ацетату, пірофосфату, карбонату, тетраборату, фосфату) солей натрію не впливає на характер та положення максимумів світлопоглинання продуктів взаємодії АМ з солями діазонію СА, однак значно впливає на інтенсивність світлопоглинання. За результатами дослідження впливу концентрації різних солей натрію на взаємодію АМ з діазотованим САМ (рис. 3.8 б)) можна зробити висновок, що такі аніони, як ацетат, пірофосфат та фосфат негативно впливають на вихід продукту взаємодії, тоді як за наявності натрій карбонату аналітичний сигнал незначно зростає. Розчини натрій тетраборату та УБС при низьких концентраціях дозволяють стабілізувати систему. Проте наявність УБС значно знижує аналітичний сигнал, а натрій тетраборат при низьких концентраціях практично не впливає на світлопоглинання. У випадку взаємодії АМ з діазотованим СТЗ (рис. 3.8 г)) наявність у системі таких аніонів, як пірофосфат та фосфат має негативний вплив, тоді як наявність карбонату та ацетату при низьких концентраціях незначно підвищує аналітичний сигнал. За наявності УБС у досліджуваній системі аналітичний сигнал значно знижується. Наявність натрій тетраборату практично не впливає на значення аналітичного сигналу. Для подальших дослідженнях для полегшення підведення рН розчинів потрібно використовувати 0,10 М розчин натрій тетраборату у випадку обох реагентів.

Вплив концентрації діазоскладової на реакцію азосполучення діазотованих САМ та СТЗ з амоксициліном

Для реакцій азосполучення характерна взаємодія компонентів у співвідношенні 1:1, однак як відомо певний надлишок реагенту сприяє зміщенню рівноваги реакції в бік утворення продуктів реакції, що дає можливість отримати максимальний вихід забарвленої аналітичної форми.

Згідно літературних даних, молекула амоксициліну може сполучатися з однією або з двома молекулами солі діазонію [136, 137], тому для встановлення оптимальних умов взаємодії ми проводили пошук оптимального надлишку реагенту для максимального виходу продукту реакції.

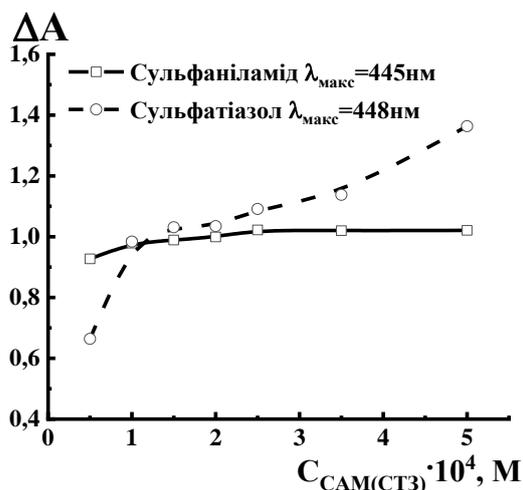


Рисунок 3.9 – Залежність світлопоглинання продуктів азосполучення діазосолей САМ та СТЗ з АМ від їхньої концентрації. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2}=15 \cdot C_{(\text{САМ})\text{СТЗ}}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}}= 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}= 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $l=1 \text{ см}$.

Як видно з рис. 3.9 максимальний вихід забарвлених аналітичних форм досягається за 5-кратних надлишків діазотованих реагентів САМ та СТЗ стосовно АМ, при подальшому збільшенні їх кількості аналітичний сигнал залишається практично незмінним. З результатів досліджень видно, що у випадку азосполучення АМ зі сіллю діазонію СТЗ найоптимальніше використовувати 5-кратний надлишок реагенту, хоча за 10-кратного надлишку спостерігається різке збільшення аналітичного сигналу. Це пов'язано з тим, що за високих концентрацій діазотований СТЗ сполучається між собою (про що свідчить поява жовтого забарвлення розчину), а утворена азосполука поглинає у тій самій ділянці спектру, де поглинає азосполука АМ із СТЗ, що призводить до збільшення значення аналітичного сигналу, тому використовувати великий надлишок реагенту є недоцільно [221, 223, 226].

Вплив послідовності змішування реагентів на вихід продуктів взаємодії діазотованих САМ та СТЗ з АМ

Оскільки дві послідовні стадії утворення забарвлених азосполук проходять у різних середовищах, які мають значний вплив на самі реагенти, то важливо було дослідити порядок додавання компонентів у суміш. Результати цих досліджень наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Порядок додавання реагентів при взаємодії амоксициліну із діазотованими сульфаніламидами. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6 \text{ M}$, $C_{\text{САМ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}}=0,7 \text{ M}$, $C_{\text{СТЗ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2}=2,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}}=3,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $l=1 \text{ см}$.

Реакція	Порядок додавання реагентів	ΔA_{445} САМ	ΔA_{448} СТЗ
Діазотування	[кислота + реагент + NaNO_2] _{20 хв}	0,823	0,809
	[реагент + кислота + NaNO_2] _{20 хв}	0,805	0,776
	[кислота + NaNO_2 + реагент] _{20 хв}	0,811	0,763
Азосполучення	[реагент _{діаз.} + АМ +буфер+ NaOH] \rightarrow pH	0,823	0,807
	[реагент _{діаз.} +буфер+АМ + NaOH] \rightarrow pH	0,820	0,784
	[реагент _{діаз.} +буфер+ NaOH] \rightarrow pH+ АМ	0,815	0,769

Дані в табл. 3.1 ілюструють, що максимальний вихід продукту реакції спостерігається, якщо діазотування усіх реагентів проводити у такій послідовності: у розчин кислоти вносити аліквоту розчину реагенту, тоді додавати розчин натрій нітриту. Якщо ж спочатку вносити аліквоту розчину нітрит-іонів до кислоти, то частина їх руйнується з виділенням газоподібних оксидів Нітрогену, відповідно, вихід продукту зменшується.

Найвище значення аналітичного сигналу досягається, коли проводити азосполучення діазосолей СА з АМ у такій послідовності: до кислого розчину діазотованих реагентів додавати розчин АМ, буферний розчин і лише тоді розчин натрій гідроксиду до відповідного значення рН. Якщо ж розчин АМ додавати у лужне середовище, то вихід азопродукту також буде нижчий, оскільки у лужному середовищі діазосолі реагентів будуть руйнуватися [221, 223].

Стабільність продуктів азосполучення діазотованих САМ та СТЗ з АМ

Для проведення СФ визначення аналіту важливе значення має незмінність світлопоглинання розчину (стійкість у часі аналітичної форми). Тому нами було досліджено стабільність світлопоглинання утворених продуктів азосполучення діазотованих СА з АМ.

Як показали результати досліджень (рис. 3.10) аналітичний сигнал характерний для продуктів взаємодії діазотованих САМ та СТЗ з АМ залишається

стабільним впродовж 10 хвилин. Щоправда треба зауважити, що через 20 хв світлопоглинання розчинів після незначного зменшення стабілізується і залишається незмінним впродовж 1 год.

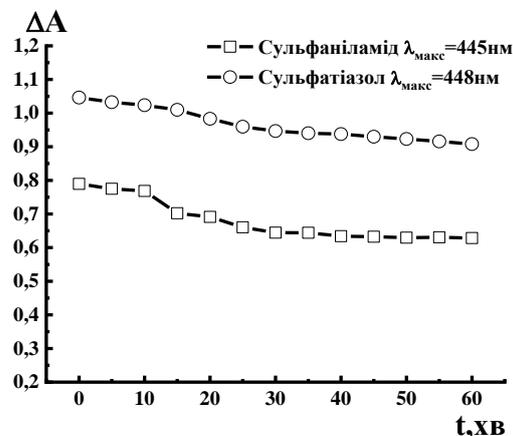


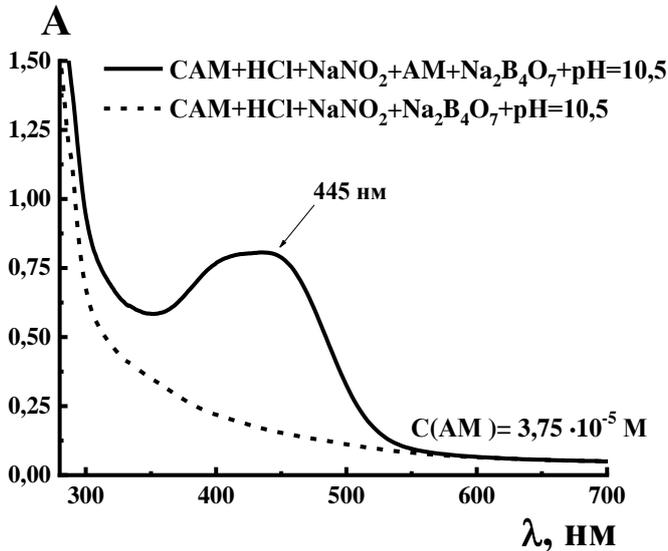
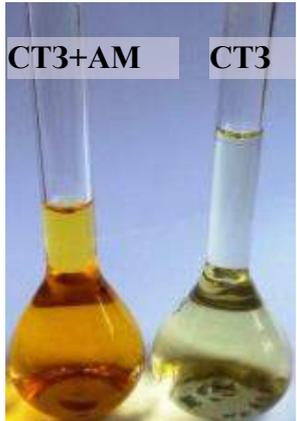
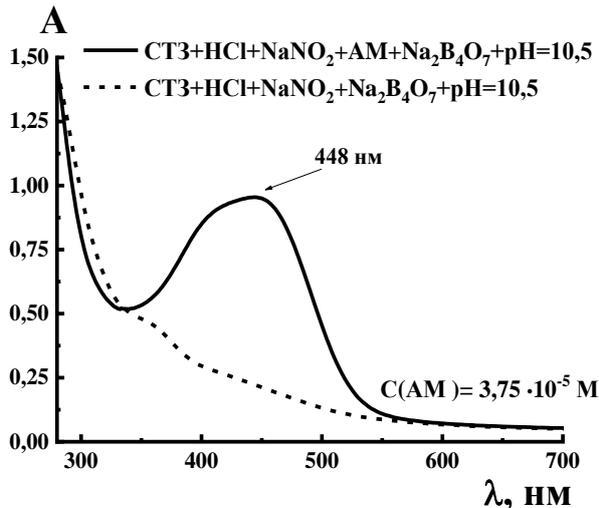
Рисунок 3.10 – Стабільність у часі оптичної густини продуктів азосполучення діазотованих САМ та СТЗ з амоксициліном. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6 \text{ M}$, $C_{\text{САМ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}}=0,7 \text{ M}$, $C_{\text{СТЗ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2}=2,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}}=3,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$; $l=1 \text{ см}$.

Обчислення спектрофотометричних характеристик продуктів азосполучення АМ із діазосолями САМ та СТЗ.

Спектрофотометричні характеристики та оптимальні умови отримання сполук амоксициліну із солями діазонію САМ та СТЗ підсумовано в табл. 3.2 [221–223]. На основі спектрів отриманих в оптимальних умовах азосполучення АМ із діазотованими сульфаніламідів обраховано ефективні молярні коефіцієнти світло поглинання.

Як видно з даних табл. 3.2 значення молярного коефіцієнту для розчинів азосполуки АМ із СТЗ є незначно вищим, що пов'язано із наявністю тіазольного гетероциклу як замісника у молекулі СА, який є електронодонорною групою, що збільшує реакційну здатність солі діазонію СТЗ в реакції азосполучення.

Таблиця 3.2 – Оптимальні умови отримання та спектрофотометричні характеристики азосполук амоксициліну з діазотованими сульфаніламидами

Сульфаніламід	
Діазотування	$C(\text{HCl})=0,6 \text{ M}$, ≥ 15 -кратний надлишок NaNO_2 до САМ, впродовж 20 хв
Азосполучення	5-кратний надлишок САМ до АМ, $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)=0,1 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 10 хв</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли САМ з амоксициліном</p> <p>$\epsilon_{445}(\text{САМ}+\text{АМ}) = (1,74 \pm 0,04) \cdot 10^4, \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>
Сульфатіазол	
Діазотування	$C(\text{HCl})=0,7 \text{ M}$, ≥ 15 -кратний надлишок NaNO_2 до СТЗ впродовж 20 хв
Азосполучення	5-кратний надл. СТЗ до АМ, $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)=0,1 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 10 хв</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли СТЗ з амоксициліном.</p> <p>$\epsilon_{448}(\text{СТЗ}+\text{АМ}) = (1,97 \pm 0,08) \cdot 10^4, \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>

3.1.2 Спектрофотомерія окситетрацикліну із 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою та фуксином

Окситетрациклін в своїй структурі містить тетрациклічний вуглеводневий скелет із різними функціональними групами: гідрокси-, окси-, тритинну аміно- та амідну, які можуть взаємодіяти у незмінному та перетвореному вигляді з різними реагентами за різних рН. Оскільки в структуру ОТЦ входить фенольна ОН- група, для отримання ефективної аналітичної форми для СФ визначення окситетрацикліну було обрано реакцію азосполучення, у яку він може вступати як азоскладава. Реагенти фуксин та ДНСК було обрано як можливі діазоскладові для азосполучення із ОТЦ. Для проведення реакції азосполучення фуксину з ОТЦ його потрібно попередньо діазотувати під дією натрій нітриту в середовищі мінеральної кислоти. СФ дослідження було розпочато із отримання спектрів світлопоглинання ОТЦ у кислій та лужній ділянках рН за наявності натрій нітриту та сечовини, які беруть участь в реакції діазотування фуксину. Електронні спектри світлопоглинання розчинів ОТЦ за різних рН наведені на рис.3.11.

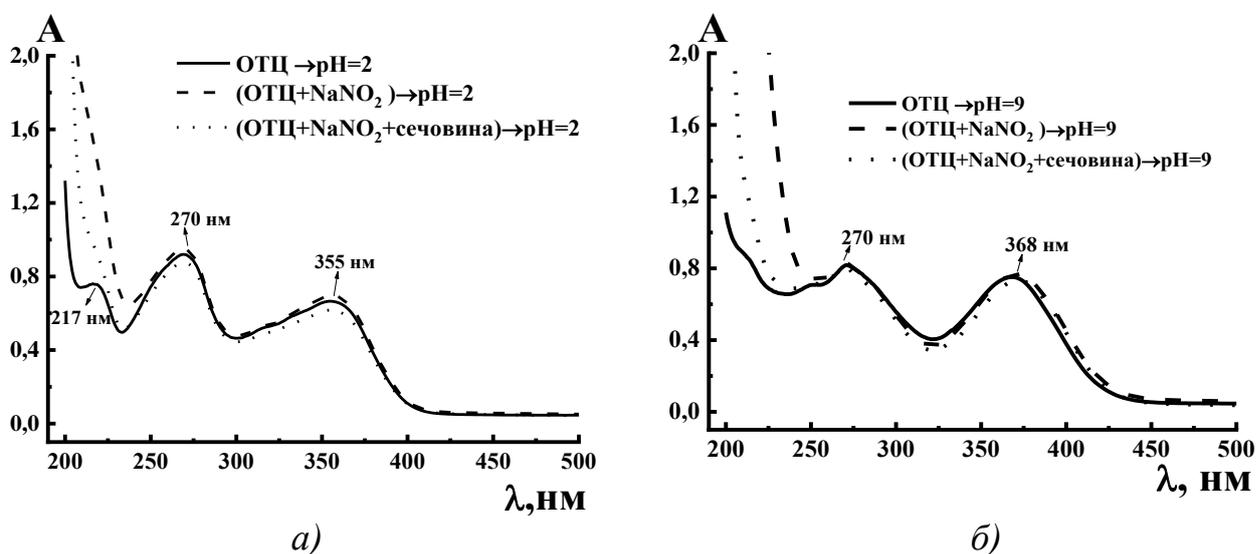


Рисунок 3.11 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів окситетрацикліну. $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{сечовини}} = 2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

Як видно з рис 3.11 а), на спектрах ОТЦ при рН=2 наявні три широкі смуги світлопоглинання, які частково накладаються одна на одну, є достатньо інтенсивні і

відповідають збудженню хромофорних груп ОТЦ. Перша із максимумом за $\lambda_{\max} = 217$ нм, яка належить до $\pi \rightarrow \pi^*$ електронного переходу; друга найінтенсивніша з максимумом за $\lambda_{\max} = 270$ нм, яку можна віднести до $n \rightarrow \sigma^*$ електронних переходів та третя менш інтенсивна за $\lambda_{\max} = 355$ нм, що відповідає $n \rightarrow \pi^*$ електронному переходу [188, 220]. У лужному середовищі (рис. 3.11 б)) за рН=9 перший максимум практично зникає, два інші наявні, проте третій максимум зсунутий батохромно і проявляється за $\lambda_{\max} = 370$ нм, що може бути пов'язано із кето-енольною таутомерією у молекулі ОТЦ. Наявність у розчинах ОТЦ натрій нітриту та сечовини на характер спектру та значення світлопоглинання не впливає.

Електронні спектри світлопоглинання продуктів взаємодії діазотованого фуксину та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислоти з ОТЦ

Електронні спектри світлопоглинання розчинів реагентів та продуктів їх взаємодії з ОТЦ представлено на рис. 3.12.

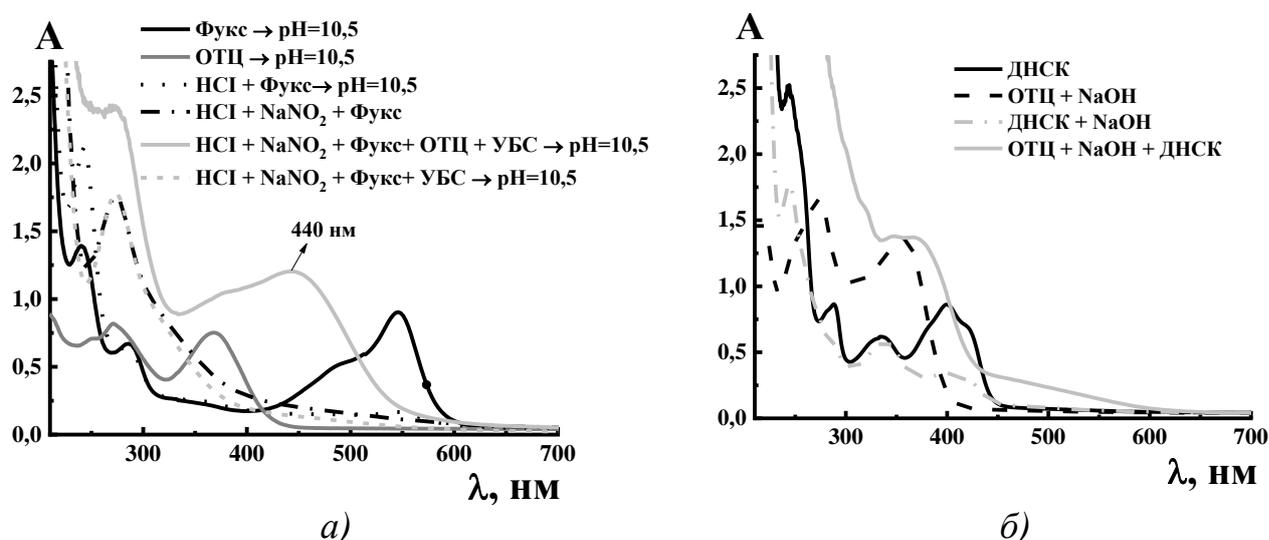


Рисунок 3.12 – Електронні спектри поглинання розчинів а) фуксину та б) 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислоти та продуктів їхньої взаємодії з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{НСІ}} = 1,0$ М, $C_{\text{Фукс}} = 6,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 8,5 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{УБС}} = 0,01$ М, рН=10,5; $C_{\text{ДНСК}} = 2,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 10,0$ М; $l=1$ см.

Як видно з рис. 3.12, продукти взаємодії діазотованого Фукс з ОТЦ характеризуються появою нової широкої смуги світлопоглинання із максимумом за

$\lambda_{\max}=440$ нм. Із цією смугою зливається смуга, яка характерна для самого ОТЦ у лужному середовищі із максимумом світлопоглинання за 370 нм. На спектрі продукту взаємодії ДНСК з ОТЦ з'являється широке плече світлопоглинання з максимальною різницею ΔA при $\lambda=470$ нм [227, 228]. Поява додаткового максимуму при 440 нм та плеча на спектрах світлопоглинання продуктів взаємодії, пов'язана із поглинанням новоутворених азогруп (електронний перехід $n \rightarrow \pi^*$) [182, 183].

Встановлення оптимальних умов діазотування фуксину

В структуру фуксину входять три первинні ароматичні аміногрупи (табл. 2.2), які вступають в реакцію діазотування з утворенням досить стійких потрійних солей діазонію або гексazonієвих солей [168]. Для кожного аміну існує оптимальне значення рН, за якого діазотування протікає найкраще. У загальному можна вказати, що чим менша основність аміну, тим кислішим повинне бути середовище для діазотування. На вибір оптимального рН діазотування впливають, в основному, два чинники: константа іонізації аміну і здатність вступати в реакцію азосполучення молекули непрореагованого аміну з утвореною діазосіллю. Природа кислоти, яку використовують для діазотування має вплив на стабільність продукту реакції. Для отримання максимального виходу азосполуки ОТЦ із діазотованим фуксином, ми досліджували передусім вплив різних чинників, від яких залежить ефективність діазотування фуксину: концентрація та природа кислоти, тривалість процесу діазотування, а також оптимальний надлишок натрій нітриту як діазотуючого реагенту.

Залежність виходу діазотованого фуксину від природи і концентрації кислот

Вивчали вплив концентрації хлоридної, сульфатної, фосфатної та ацетатної кислот на вихід діазосолі фуксину та подальше утворення азосполуки із ОТЦ відповідно. На рис.3.13. наведено залежність світлопоглинання азосполуки солі діазонію фуксину із ОТЦ від концентрації досліджуваних кислот.

Результати досліджень показали (рис. 3.13), що максимальний вихід кінцевих продуктів азосполучення для досліджуваної системи ОТЦ – фуксин спостерігається, якщо діазотування виконувати у середовищі хлоридної кислоти в концентраційних межах від 0,8 М до 1,1 М. Такий результат є закономірним, оскільки галогенід-іони каталізують реакцію діазотування. За наявності нуклеофільного аніону Cl^-

утворюється нітрозуючий агент нітрозилхлорид, ефективність якого залежить як від електрофільності так і від константи рівноваги його утворення, а сама константа залежить від концентрації H^+ -іонів [180]. Використання сульфатної, фосфатної та ацетатної кислот не дозволяє отримати максимальну кількість діазосолі фуксину.

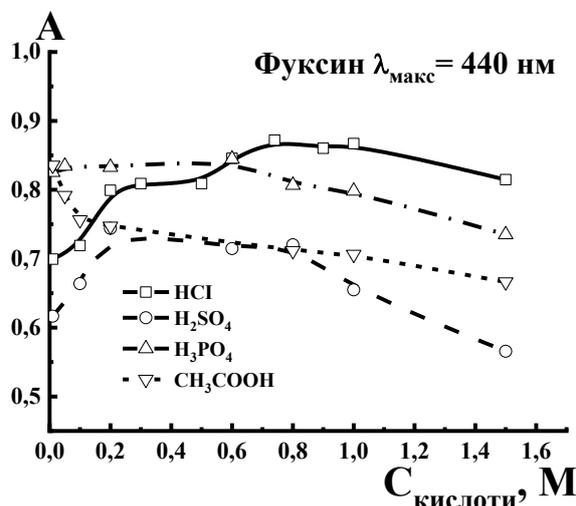


Рисунок 3.13 – Вплив концентрації хлоридної, сульфатної, ацетатної, фосфатної кислот на ефективність діазотування фуксину та його взаємодію з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{Фукс}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Вплив концентрації діазотуючого агента натрій нітриту

Для дослідження ефективності діазотування фуксину використовували натрій нітрит за різних концентрацій. Найвищі значення світлопоглинання азосполуки отриманої на основі діазосолі фуксину та ОТЦ досягаються, коли використовувати для діазотування натрій нітрит у концентрації вище ніж десятикратний надлишок відносно концентрації фуксину (рис. 3.14), $C_{\text{фукс}} : C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М} : 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М} = 1 : 11$.

З літературних даних відомо, що у реакціях діазотування використовують певний надлишок нітрит-іонів, який у більшості випадків усувають дією сечовини, оскільки залишок натрій нітриту може реагувати із азо-складовою чи азопродуктом і впливати на значення аналітичного сигналу. Нами було отримано електронні спектри світлопоглинання продуктів реакції діазотованого фуксину з ОТЦ, де залишок натрій нітриту з реакційного середовища усували сечовиною (рис. 3.15).

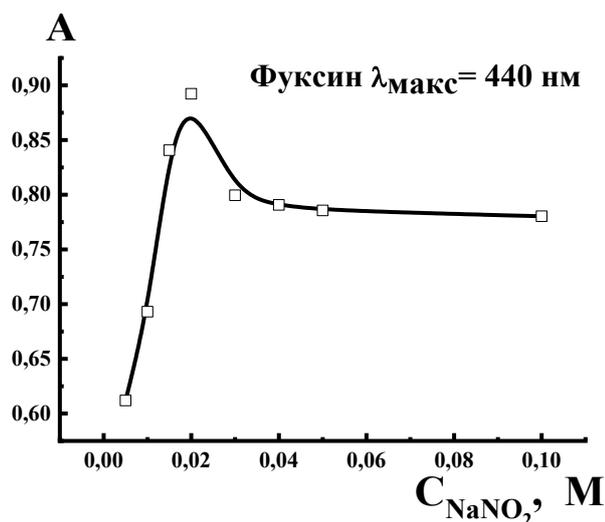


Рисунок 3.14 – Вплив концентрації натрій нітриту на взаємодію фуксину з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ М}$, $C_{\text{Фукс}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

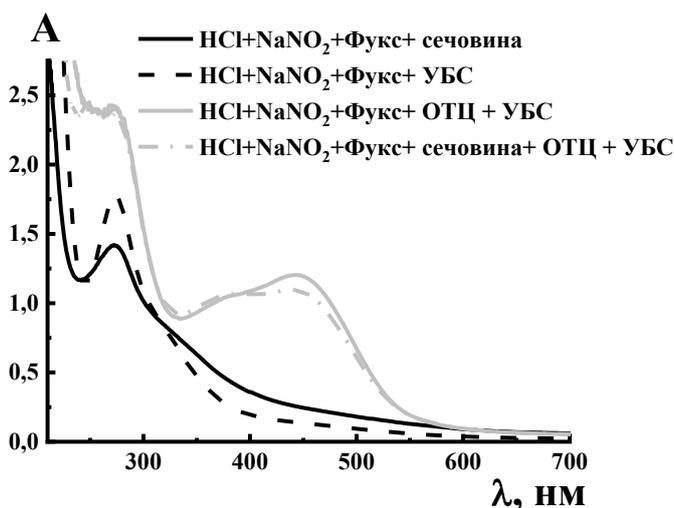


Рисунок 3.15 – Вплив сечовини на продукт взаємодії діазотованого фуксину з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ М}$, $C_{\text{Фукс}} = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{сечовини}} = 3,0 \cdot 10^{-2} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 8,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{УБС}} = 0,01 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Як видно зі спектрів, (рис. 3.15) внесена у реакційне середовище сечовина незначно зменшує світлопоглинання утворених забарвлених продуктів, тому в подальших наших дослідженнях ми не руйнували непрореагований залишок натрій нітриту.

Вплив тривалості діазотування фуксину на його подальше азосполучення із ОТЦ

Для досягнення максимального виходу діазосолі фуксину було досліджено тривалість діазотування (рис. 3.16).

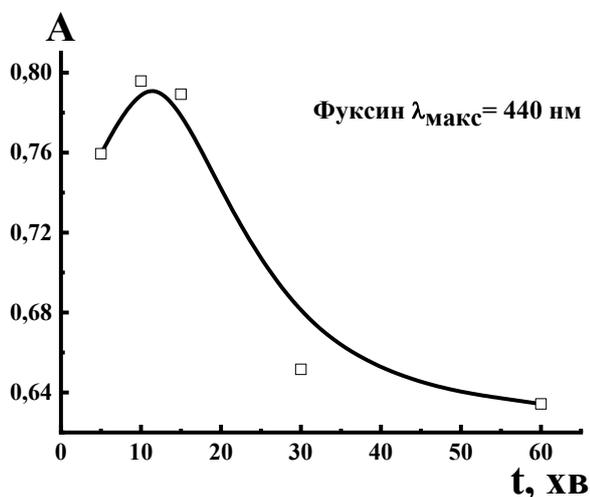


Рисунок 3.16 – Вплив тривалості реакції діазотування фуксину на світлопоглинання азопродукту фуксин-ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Як видно з рис. 3.16 максимальне світлопоглинання азопродукту фуксину з ОТЦ відповідає часу діазотування фуксину впродовж 10 хв. При збільшенні часу діазотування вихід продуктів азосполучення діазотованого фуксину з ОТЦ істотно зменшується, що можливо пов'язане із меншою стабільністю солей діазонію за кімнатної температури.

Встановлення оптимальних умов азосполучення діазотованого фуксину та ДНСК з ОТЦ.

На ефективність азосполучення впливає електрофільність діазоній катіону, яка залежить від природи замісників в ароматичному кільці, природи субстрату та pH середовища [180]. Електроноакцепторні замісники (-NO; -NO₂; -COO⁻) підвищують електрофільність діазоній катіону, особливо якщо знаходяться в *o*- та *n*- положенні і збільшують швидкість реакції електрофільного заміщення, електронодонорні замісники (-O⁻, NR₂, -OH, -OR) знижують електрофільність діазоній катіону і його активність в реакції азосполучення. І навпаки, в реакцію азосполучення вступають

сильно активовані субстрати, які містять електродонорні замісники із сильним +M ефектом. В кислому середовищі реакція азосполучення сповільнюється. З фенольними сполуками реакцію азосполучення проводять в слабо лужному середовищі за $\text{pH}=9-10$, де вони існують у формі фенолят-іонів. При збільшенні pH розчину $\text{pH}>10$ швидкість реакції азосполучення також сповільнюється, тому що іон діазонію переходить у неактивний діазотат-іон [184]. Досліджувані нами азосполуки ОТЦ з Фукс та ДНСК мають складну будову, тому для отримання максимального виходу продуктів азосполучення, необхідно було встановити оптимальне значення pH середовища, а також концентраційні співвідношення між ОТЦ та солями діазонію досліджуваних реагентів.

Вплив кислотності середовища

Досліджено вплив pH середовища на взаємодію діазотованого фуксину з ОТЦ, (рис. 3.17 а)).

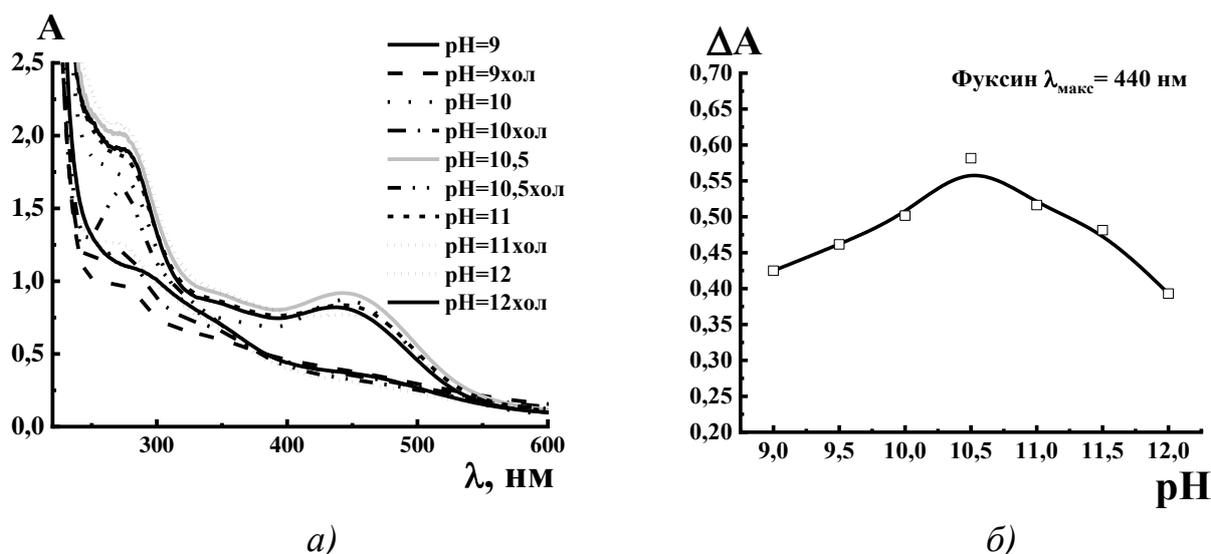


Рисунок 3.17 – а) Електронні спектри світлопоглинання продуктів взаємодії діазотованого фуксину з ОТЦ залежно від кислотності середовища. б) Вплив кислотності середовища на світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії солі діазонію Фукс із ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ М}$, $C_{\text{Фукс}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $l=1 \text{ см}$.

Як свідчать ЕСП продукту взаємодії діазосоли Фукс з ОТЦ та значення оптичної густини на максимумі світлопоглинання за $\lambda=440 \text{ нм}$, реакція відбувається у широкому інтервалі кислотності середовища, і забарвлені продукти починають

утворюватись за рН від 7 до 11–12. Максимальне світлопоглинання продуктів взаємодії діазотованого Фукс з ОТЦ спостерігається за рН=10,5 (рис. 3.17 б)).

Також було досліджено вплив рН середовища на взаємодію ДНСК з ОТЦ. Як показали результати досліджень (рис. 3.18 а)), в інтервалі рН 9–12 реагенти між собою не взаємодіють, однак у більш лужному середовищі утворюється забарвлена в оранжевий колір азосполука. Тому ми досліджували вплив концентрації натрій гідроксиду на утворення продуктів азосполучення ОТЦ із ДНСК (рис. 3.18 б)) і з'ясували, що для максимального виходу азопродукту потрібно використовувати луг із концентрацією не менше ніж 9–10 М. В подальших дослідженнях для азосполучення ОТЦ з ДНСК ми використовували 10,0 М NaOH.

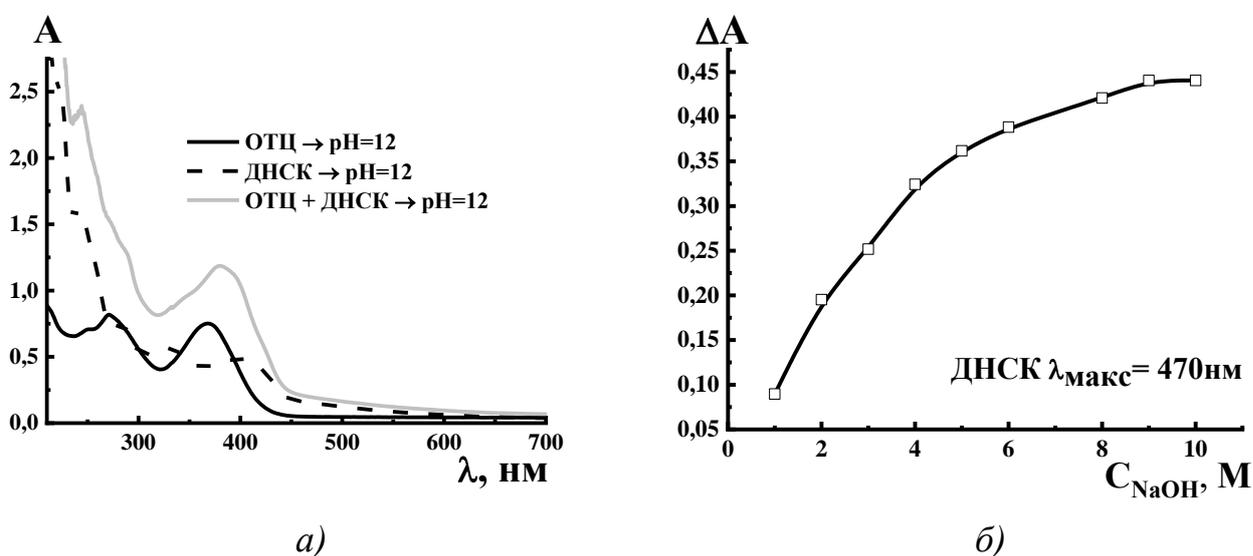


Рисунок 3.18 – а) Вплив кислотності середовища на азосполучення ДНСК з ОТЦ. б) Вплив концентрації NaOH на азосполучення ДНСК з ОТЦ.

$C_{\text{ДНСК}} = 2,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М; $l = 1$ см,

Вибірковість взаємодії в системі фуксин-ОТЦ за наявності натрій тетраборату та УБС

З метою створення стабільних умов проведення реакції азосполучення, підтримання оптимального значення рН середовища, підвищення експресності методики визначення ОТЦ з фуксином було потрібно підібрати буферну суміш. Для встановлення оптимальних умов взаємодії досліджено вплив природи і концентрації натрій тетраборату та універсальної буферної суміші (УБС) на максимальний вихід продукту азосполучення.

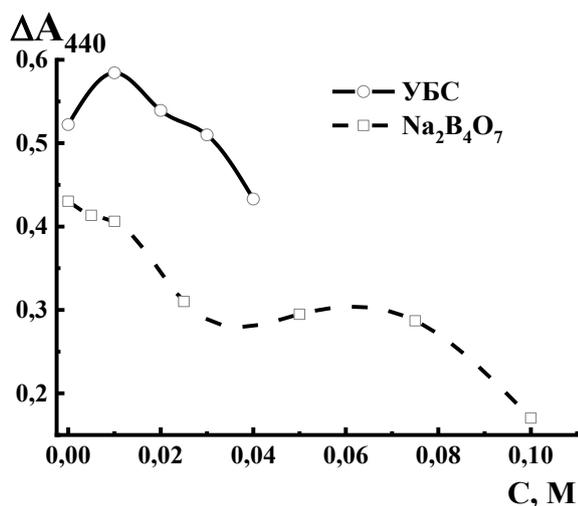


Рисунок 3.19 – Вплив природи та концентрації натрій тетраборату та УБС на світлопоглинання розчинів азосполуки діазотованого фуксину з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

Як показали результати досліджень (рис. 3.19), природа буферу, як і його концентрація має важливе значення при взаємодії діазотованого фуксину з ОТЦ. Встановлено, що натрій тетраборат зменшує вихід продукту взаємодії, на що вказує зниження аналітичного сигналу, тоді як УБС стабілізує систему і незначно підвищує аналітичний сигнал. У наступних дослідженнях ми використовували 0,01 М розчин УБС як буферний розчин.

Вплив концентрації діазоскладової на реакцію азосполучення діазотованого фуксину та ДНСК з ОТЦ

Надлишок реагенту сприяє зміщенню рівноваги реакції в бік утворення продуктів реакції, що дає можливість отримати максимальний вихід забарвленої форми аналіту, особливо це важливо, для реагентів, у яких є кілька реакційних центрів, як зокрема і в фуксині. Досліджено залежність світлопоглинання утворених продуктів від кількості діазотованого фуксину та ДНСК.

Як видно з рис. 3.20, максимальне світлопоглинання розчинів досягається за 1,33 надлишку ОТЦ до діазотованого фуксину, оскільки він містить три реакційно здатні діазогрупи (згідно цього кількість діазогруп діазотованого фуксину є в 2,5

більше від окситетрацикліну) та за 2,5-кратного надлишку ДНСК і залишається постійним при подальшому збільшенні його кількості [227].

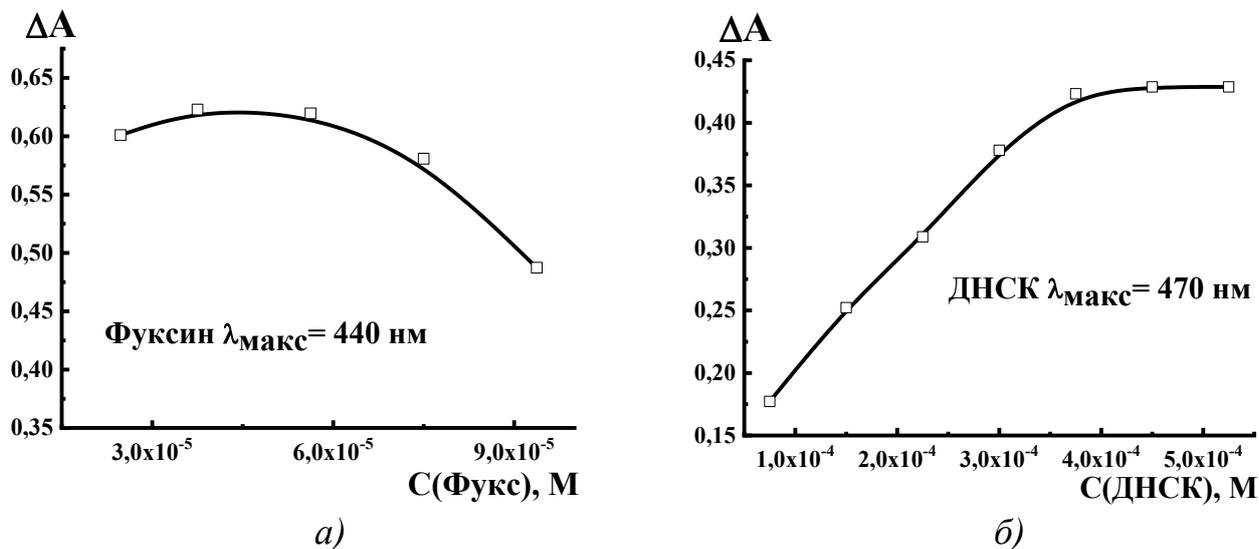


Рисунок 3.20 – Залежність світлопоглинання продуктів азосполучення діазосолей а) фуксину та б) ДНСК з ОТЦ від концентрації реагентів. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Умови азосполучення: а) $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; б) $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ М}$; $l = 1 \text{ см}$.

Вплив послідовності змішування реагентів на вихід продуктів взаємодії ОТЦ з фуксином та ДНСК

Оскільки дві послідовні стадії утворення азобарвника проходять у різному середовищі, яке має значний вплив на самі реагенти, то важливо було дослідити порядок додавання компонентів у суміш. Результати цих досліджень наведені в табл.3.3–3.4

Дані наведені в табл.3.3 свідчать, що максимальний вихід продукту азосполучення спостерігається, якщо діазотування фуксину проводити у такій послідовності: у розчин кислоти вносити аліквоту розчину фуксину, а тоді додавати розчин натрій нітриту. Якщо ж спочатку вносити аліквоту нітрит-іону до кислоти, то частина його руйнується з утворенням слабкої нітритної кислоти, яка не взаємодіє з фуксином і, відповідно, вихід діазосолей зменшується.

Азосполучення діазосолей фуксину з ОТЦ найефективніше проводити у такій послідовності: до кислого розчину діазотованого фуксину додавати розчин ОТЦ, буферний розчин і лише тоді розчин натрій гідроксиду до значення $\text{pH} = 10,5$. Якщо

ж розчин ОТЦ додавати у лужне середовище, то вихід продукту також буде нижчий, оскільки у лужному середовищі діазосіль фуксину буде руйнуватися, не провзаємодіявши з ОТЦ.

Таблиця 3.3 – Порядок додавання реагентів при взаємодії фуксину з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 0,01 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Тип реакції	Порядок додавання реагентів	ΔA_{440}
Діазотування	[HCl + Фукс + NaNO ₂] _{10 хв}	0,590
	[Фукс + HCl + NaNO ₂] _{10 хв}	0,526
	[HCl + NaNO ₂ + Фукс] _{10 хв}	0,550
Азосполучення	[Фукс діаз. + ОТЦ + УБС + NaOH] → pH	0,590
	[Фукс діаз. + УБС + ОТЦ + NaOH] → pH	0,557
	[Фукс діаз. + УБС + NaOH] → pH + ОТЦ	0,551

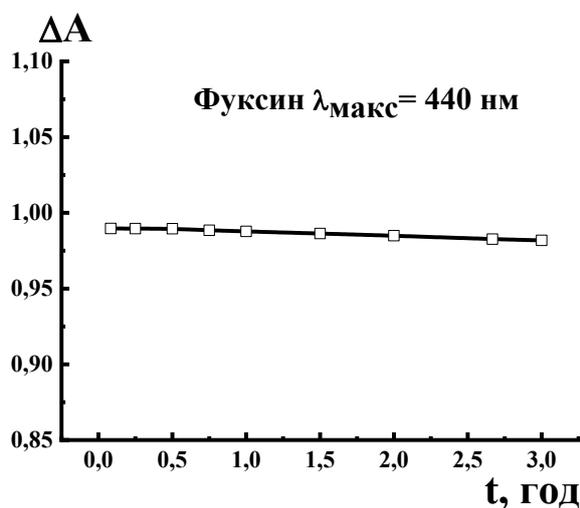
Азосполучення ДНСК з ОТЦ (табл. 3.4) найефективніше проводити у такій послідовності: до розчину ОТЦ додавати 10,0 М розчин натрій гідроксиду і тоді розчин ДНСК, що сприяє переведенню ОТЦ в іонізовану форму, яка легше вступає в реакцію азосполучення [227].

Таблиця 3.4 – Порядок додавання реагентів при взаємодії ДНСК з ОТЦ. $C_{\text{ДНСК}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

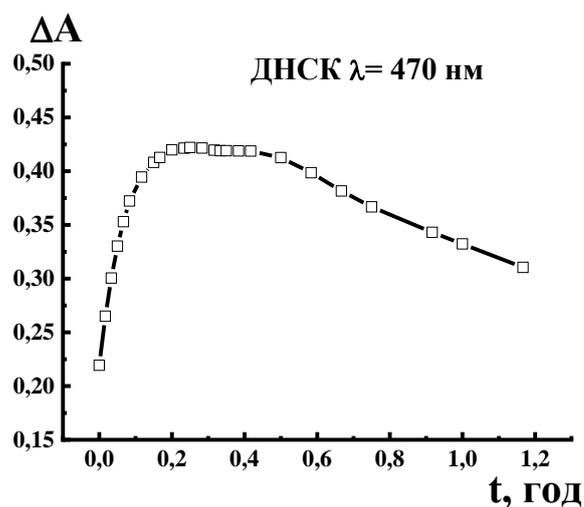
Тип реакції	Порядок додавання реагентів	ΔA_{470}
Азосполучення	[ДНСК + ОТЦ + NaOH]	0,369
	[ДНСК + NaOH + ОТЦ]	0,293
	[ОТЦ + NaOH + ДНСК]	0,463

Стабільність продуктів азосполучення діазотованого фуксину та ДНСК з окситетрацикліном.

Для розробки спектрофотометричної методики важливе значення має стійкість у часі аналітичної форми. Тому було досліджено стабільність утворених продуктів азосполучення діазотованого фуксину та ДНСК з ОТЦ (рис.3.21).



а)



б)

Рисунок 3.21 – Стабільність у часі продукту азосполучення діазосоли а) фуксину та б) ДНСК з ОТЦ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=1,0$ М, $C_{\text{Фукс}}=6,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: а) $C_{\text{ОТЦ}}=8,5 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{УБС}}=0,01$ М, $\text{pH}=10,5$; б) $C_{\text{ДНСК}}=3,8 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ОТЦ}}=1,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}}=10,0$ М; $l=1$ см.

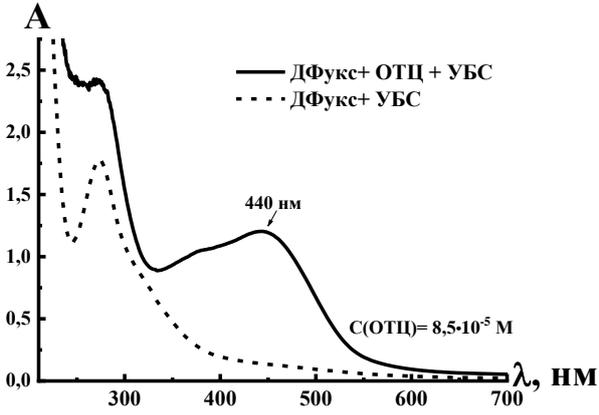
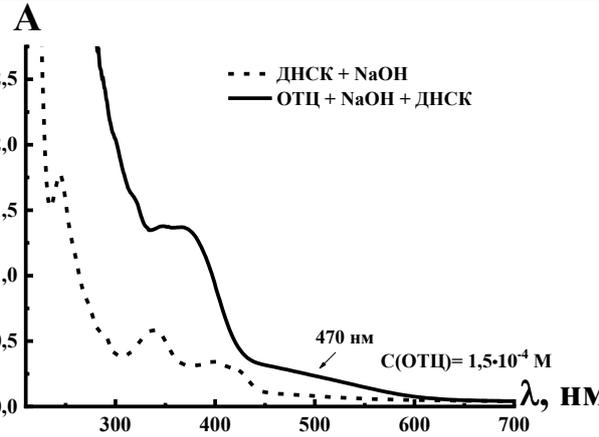
Як показали результати досліджень (рис.3.21 а)), продукт взаємодії Фукс з ОТЦ залишається стійким впродовж 3 год. Цього часу є достатньо для проведення необхідних вимірювань оптичної густини та визначення вмісту аналіту.

Щодо продукту взаємодії ДНСК з ОТЦ (рис.3.21 б)), то варто сказати, що максимальне світлопоглинання розчину азосполуки досягається через 15 хв, і залишається незмінним впродовж 10 хв, далі починає зменшуватися, імовірно через зміну форми існування отриманої азосполуки, внаслідок окиснення азопродукту.

Обчислення спектрофотометричних характеристик продуктів азосполучення ОТЦ із ДНСК та діазосіллю Фуксину

На основі спектрів отриманих в оптимальних умовах азосполучення ОТЦ із діазотованими фуксином та ДНСК (табл. 3.5) обраховано ефективні молярні коефіцієнти світлопоглинання, згідно з якими чутливість визначення ОТЦ із фуксином є вищою через наявність трьох хромофорних центрів у молекулі азопродукту ОТЦ з фуксином.

Таблиця 3.5 – Оптимальні умови отримання та спектрофотометричні характеристики азосполук окситетрацикліну з ДНСК та діазотованим фуксином

Фуксин	
Діазотування	$C(\text{HCl})=1,0 \text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлишок NaNO_2 до фуксину впродовж 10 хв
Азосполучення	1,33-кратний надл. ОТЦ до фуксину, $C(\text{УБС})=0,01 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$
 <p style="text-align: center;">$\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 3 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли Фуксину з ОТЦ.</p> <p>$\epsilon_{440}(\text{Фукс}+\text{ОТЦ}) = (3,14 \pm 0,05) \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>
1-нітрузо-2-нафтол-4-сульфоокислота	
Діазотування	—
Азосполучення	2,5-кратний надлишок ДНСК до ОТЦ, $C(\text{NaOH})=10,0 \text{ M}$
 <p style="text-align: center;">$\lambda = 470 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 5 хв</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії ДНСК з окситетрацикліном.</p> <p>$\epsilon_{470}(\text{ДНСК}+\text{ОТЦ}) = (3,0 \pm 0,15) \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>

3.1.3 Дослідження складу утворених азосполук амоксициліну та окситетрацикліну із досліджуваними реагентами, що містять первинну ароматичну аміногрупу

Співвідношення компонентів у сполуках діазотованих САМ та СТЗ з АМ, а також ДНСК і діазосолі Фукс з ОТЦ, було встановлено методом ізомолярних серій (рис. 3.22)

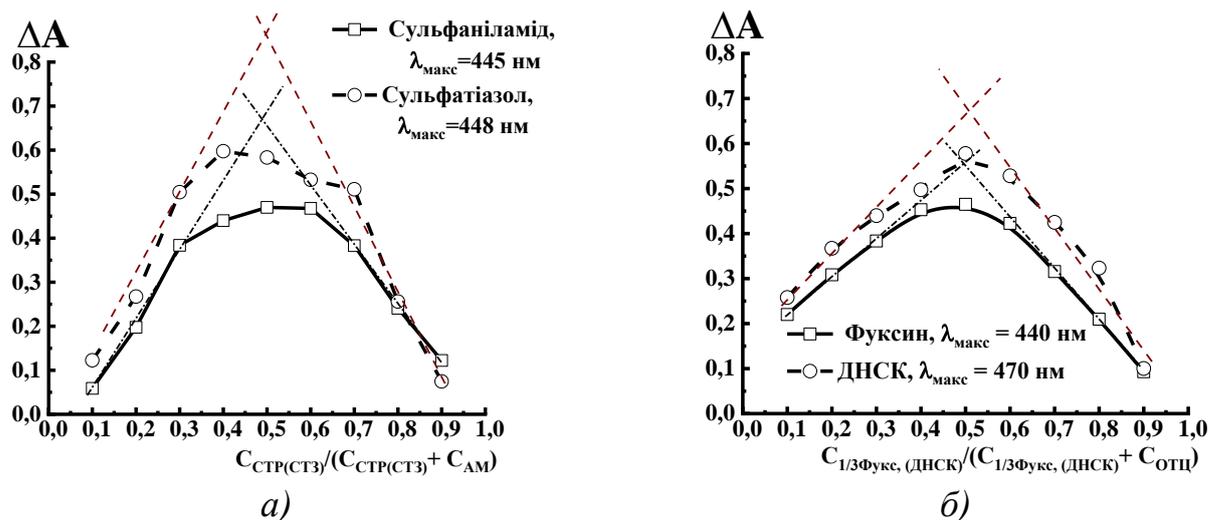


Рисунок 3.22 – Встановлення співвідношення компонентів у досліджуваних системах а) АМ–САМ і АМ–СТЗ; та системах б) ОТЦ–Фукс і ОТЦ–ДНСК методом ізомолярних серій. $l=1$ см а) $C_{HCl}=0,6$ (0,7)М, $C_{САМ(СТЗ)}+C_{АМ}=3,1 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2}=5,6 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{Na_2B_4O_7}=0,1$ М, рН=10,5; б) $C_{HCl}=1,0$ М, $1/3C_{Фукс.}+C_{ОТЦ}=9,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{NaNO_2}=8,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{УБС}=0,01$ М, рН=10,5; $C_{ДНСК}+C_{ОТЦ} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaOH} = 10,0$ М.

Як видно рис. 3.22 при азосполученні у всіх досліджуваних системах утворюється продукти із співвідношенням компонентів 1:1 [227]. Однак варто зауважити, що при дослідженні взаємодії діазотованого фуксину з ОЦТ ми брали в три рази меншу концентрацію Фукс, оскільки враховували кількість діазотованих груп (при побудові залежностей використовували концентрацію діазогруп в фуксині, а не самого фуксину) і як показали результати досліджень всі три діазогрупи вступають в реакцію азосполучення з ОТЦ.

Вивчення складу отриманих азосполук на основі діазотованих САМ, СТЗ з амоксициліном

Згідно з попередніми дослідженнями показано недоцільність усування непрореагованого надлишку натрій нітриту за допомогою сечовини (пункт 3.1.1, рис. 3.4), оскільки це призводило до зменшення оптичної густини. Вищий аналітичний сигнал азопродукту за наявності непрореагованого натрій нітриту під час діазотування СА є наслідком впровадження в молекулу реагентів *NO*-групи, яка підсилює світлопоглинання отриманих азосполук. Для підтвердження цієї гіпотези було проведено вольтамперометричні дослідження азопродукту в системі АМ–САМ в умовах наявності непрореагованого натрій нітриту в реакційному середовищі і коли його усували дією сечовини (рис.3.23).

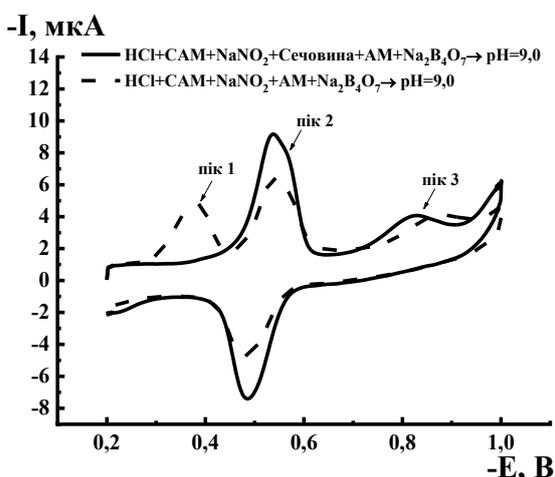


Рисунок 3.23 – Циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення амоксициліну із діазотованим сульфаніламідом. $V = 2,5 \text{ В/с}$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,05 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$.

Як видно з рис. 3.23 на вольтамперограмах розчину продукту азосполучення діазотованого САМ із амоксициліном за наявності непрореагованого залишку натрій нітриту простежується три піки: роздвоєний за $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,55 \text{ В}$, який відповідає відновленню азогрупи сполуки, утвореної внаслідок азосполучення амоксициліну із діазотованим сульфаніламідом та два піки за $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,41 \text{ В}$ та $E_{\text{к}}^{\text{п}3} = -0,86 \text{ В}$. При усуненні непрореагованого залишку натрій нітриту за допомогою сечовини на

вольтамперограмі продукту взаємодії АМ із діазосіллю САМ пік за $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,41 \text{ В}$ зникає. Це свідчить про те, що пік за $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,41 \text{ В}$ відповідає за відновлення нітросо групи, яка впроваджується в молекулу азосполуки під дією непрореагованого залишку натрій нітриту [221, 222].

На основі проведених СФ та ВА досліджень ми пропонуємо наступну схему утворення азосполук (рис. 3.24). За цією схемою на першому етапі в кислому середовищі нітрит-іони діазотують первинну ароматичну аміногрупу СА (1) з утворенням діазосолю (2). Отримана сіль діазонію відповідного сульфаніламіду взаємодіє з амоксициліном (3) у лужному середовищі утворюючи забарвлений нітрозований азопродукт (4) за умови наявності непрореагованого надлишку натрій нітриту, водний розчин якого має жовтий колір.

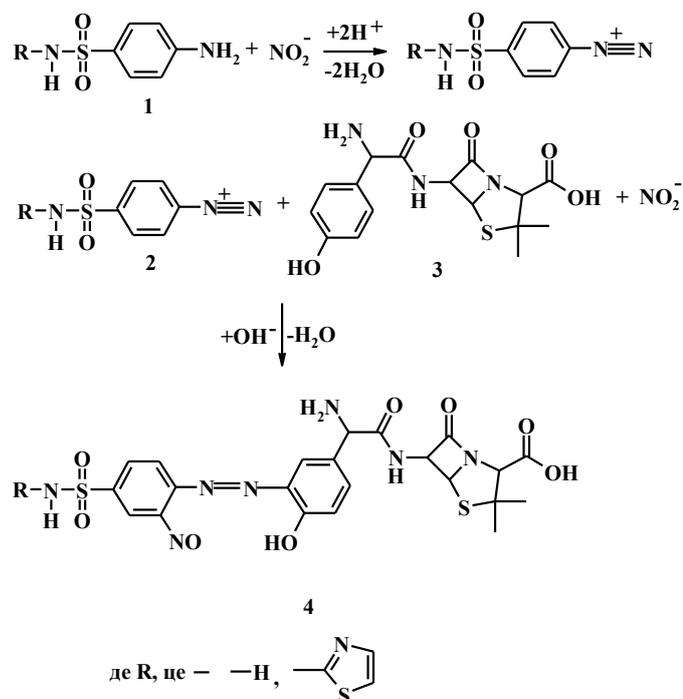


Рисунок 3.24 – Схема взаємодії діазосолей САМ та СТЗ з АМ

Вивчення складу отриманих азосполук на основі окситетрацикліну з діазотованим фуксином та з ДНСК

Фуксин у своїй структурі містить три аміногрупи, які здатні діазотуватися з утворенням потрійної діазосолю Фукс, про існування якої є відомості у літературі [166–169], однак детальних умов її отримання ми не знайшли. Як показали наші дослідження найефективнішою для діазотування фуксину є 1,0 М НСІ. Тому ми вирішили провести дослідження, які б підтвердили, що за умов діазотування в

кислому середовищі ($C(\text{HCl})=1,0 \text{ M}$) молекула трифенілметанового барвника не рветься на фрагменти, оскільки нами було зауважено що під дією кислоти розчин фуксину жовтіє, а при додаванні натрій нітриту зовсім знебарвлюється. При цьому стехіометрія новоутворених азосполук могла б зберігатися, бо у кожному із можливих трьох фрагментів діазосолі буде наявна власна діазогрупа, яка може сполучатися з ОТЦ. З літератури відомо про оборотню зміну забарвлення розчину фуксину при переході із слабокислого в сильноокисле середовище за рахунок внутрішньомолекулярних перетворень [196, 197]. В літературі немає відомостей, як на ці перетворення буде впливати наявність натрій нітриту, який приводитиме до діазотування трьох первинних аміногруп фуксину в сильноокислому середовищі. З цих самих літературних джерел також відомо, що при переході з кислого в лужне середовище відбувається оборотне знебарвлення розчину фуксину. А як відомо, в лужному середовищі сіль діазонію руйнується. Тому був шанс, що при підлужненні розчину солі гексазонію фуксину, яку отримали в кислому середовищі, діазосіль зруйнується і при поверненні до слабокислого середовища ($\text{pH}=3,70$) відновиться вихідне малино-рожеве забарвлення фуксину. Це було б доказом того, що трифенілметанова структура субстрату збережеться. Для підтвердження цих гіпотез ми досліджували електронні спектри світлопоглинання розчинів фуксину та діазотованого фуксину за різного pH в кислій та лужній області (рис. 3.25).

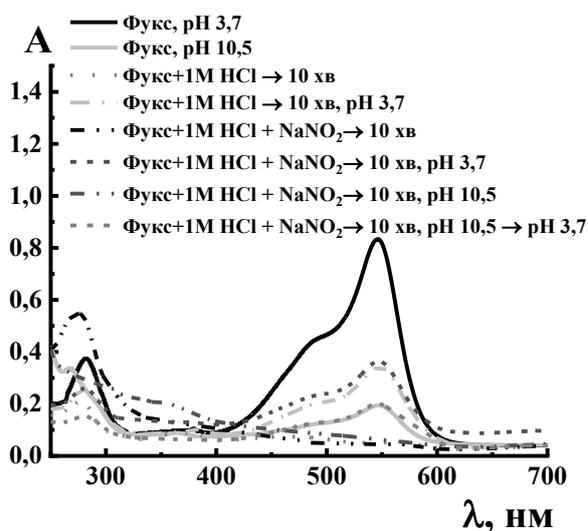


Рисунок 3.25 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів фуксину та діазотованого фуксину за різної кислотності середовища. $C_{\text{Фукс}} = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Як видно з рис. 3.25 в лужному середовищі інтенсивності максимумів світлопоглинання за 544 нм та 288 нм значно знижуються, що візуально проявляється у повільному знебарвленні розчину фуксину при його підлученні. Як видно зі спектрів (рис. 3.25) при додаванні 1,0М HCl до вихідного розчину фуксину відбувається зникнення інтенсивного максимуму світлопоглинання за 544 нм, а також істотне зниження максимуму за 288 нм, однак при додаванні натрій нітриту останній максимум виростає, проте зсувається в область менших довжин хвиль (273 нм). Максимум за 273 нм можна пов'язувати із діазотованою аміногрупою. Однак як показав експеримент забарвлення розчинів чистого фуксину та діазотованого фуксину, які знаходились в умовах отримання діазосоли ($C(HCl)=1,0\text{ M}$) при підлученні до вихідного середовища із $pH=3,70$ поверталось назад до рожевого кольору. Подібна картина спостерігалася коли повертати розчин діазосоли фуксину з лужного середовища із $pH=10,5$ в кислу ділянку $pH=3,7$. Однак світлопоглинання за 544 нм для усіх розчинів Фукс набувало набагато нижчих значень, що можливо пов'язане з тим, що для зміни форми існування барвника за зміни pH було недостатньо часу. Отримані результати досліджень показали, що у наших експериментальних умовах (діазотування у середовищі 1,0 М хлоридної кислоти) вихідна трифенілметанова структура Фукс зберігається і оскільки в реакцію азосполучення з ОТЦ вступають усі три діазотовані аміногрупи, то утворюється масивна потрійна азосполука.

З іншого боку, аналізуючи спектри світлопоглинання, наведені на рис. 3.15 де вивчено вплив наявності непрореагованого натрій нітриту на світлопоглинання потрійної азосполуки діазотованого фуксину з ОТЦ встановили недоцільність усунення надлишку натрій нітриту під дією сечовини через зниження аналітичного сигналу. Такий результат аналогічно до взаємодії АМ із діазосолями СА можна пояснити тим, що за умов експерименту відбувається нітрузування азопродукту, що також підтверджене додатковими полярографічними дослідженнями (Додаток Д, рис. Д.1).

Тому, на основі проведених спектрофотометричних досліджень ми пропонуємо наступну імовірну схему утворення азосполуки солі аренгексазонію

фуксину з окситетрацикліном (рис. 3.26). При побудові схеми враховували дані молекулярної просторової моделі катіону гексазонію парарозаніліну, зробленої в програмі ChemOffice (версія 4.0) з регулюванням 3D-структури, щоб показати стан з найнижчою енергією. За цією моделлю три бензенові (С6) кільця лежать в різних площинах, а діазонієві групи – відхилені від площин кілець [167].

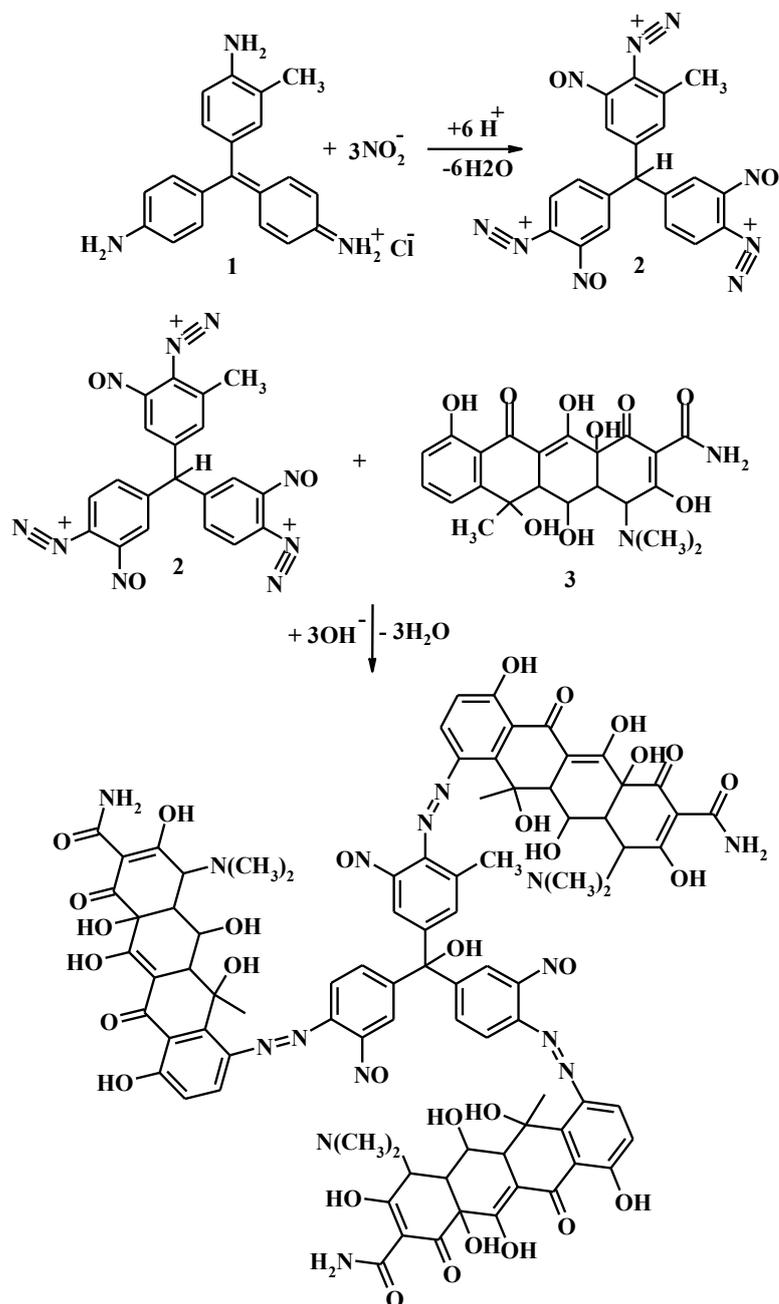


Рисунок 3.26 – Схема взаємодії фуксину з ОТЦ

Імовірну схему утворення азосполуки ОТЦ з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою зображено на рис 3.27. В середовищі 10,0 М лугу відбувається

азосполучення ДНСК, яка перебуває в формі діазосолі з ОТЦ, водний розчин отриманої азосполуки має оранжево-червоний колір [227].

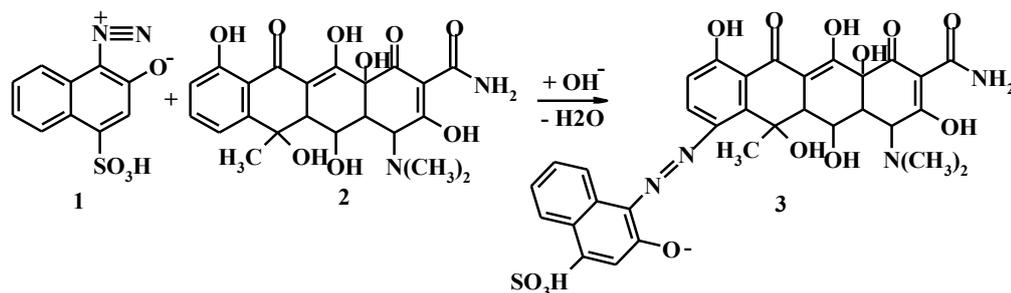


Рисунок 3.27 – Схема взаємодії 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з ОТЦ

3.2 Спектрофотометрія азосполук отриманих на основі діазотованих цефалоспоринових антибіотиків із фенольними реагентами

Цефалоспоринові антибіотики цефтріаксон та цефтазидим мають у своїй структурі гетероциклічну аміно-групу у тiazольному кільці, яку можна діазотувати і проводити подальше азосполучення з фенольними субстратами. Як азоскладові для визначення великих за розміром молекул цефалоспоринових антибіотиків за реакцією азосполучення ми обрали наступні реагенти: для цефтазидиму резорцин, 2-метилфенол та 8-оксихінолін; для цефтріаксону – 2-метилфенол та 8-оксихінолін, молекули яких є невеликого розміру, що полегшує взаємодію.

Серед обраних нами реагентів лише 8-Окс має широке аналітичне застосування, однак в неорганічному аналізі, він є доступним комерційним реагентом. Рез має незначне аналітичне застосування в органічному аналізі, натомість 2-Мет як аналітичний реагент не застосовують. Усі ці сполуки є простими і доступними та можуть бути реагентами в реакції азосполучення з солями арендіазонію.

3.2.1 Спектрофотометричне дослідження взаємодії цефтазидиму з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом

З літературних даних відомо, що в аналізі ЦА застосовують реакцію діазотування цефалоспоринів з подальшим азосполученням з фенольними реагентами [148, 149–150]. Також на підставі літературного огляду з'ясовано, що

цефалоспорини навіть у слабо кислому середовищі після діазотування утворюють сполуки власного азосполучення [143]. Для подолання цієї проблеми при отриманні кольорових азосполук цефтазидиму було запропоновано використовувати концентровану (12,0 М) хлоридну кислоту для діазотування [148].

Перш за все було досліджено спектрофотометричну поведінку цефалоспоринів. На спектрах водних розчинів цефтазидиму та цефтріаксону (рис.3.28 а),б)) не простежується максимумів світлопоглинання у видимій ділянці спектру, а характер спектрів є подібним як в кислому так лужному середовищах. Спектри світлопоглинання (рис. 3.28 а)) цефтазидиму у кислому середовищі характеризуються наявністю інтенсивного максимуму за $\lambda=260$ нм та перегіну за 282 нм, а в лужному середовищі характер спектру зберігається, однак інтенсивність максимумів значно зменшується. Як можемо побачити на спектрі світлопоглинання цефтріаксону (рис. 3.28 б)) спостерігається інтенсивний максимум за $\lambda = 265$ нм у кислому середовищі та нечіткий максимум у вигляді перегіну за 240 нм, які відповідають $\pi \rightarrow \pi^*$ та $n \rightarrow n^*$ електронним переходам [229], а в лужному середовищі максимум світлопоглинання проявляється при $\lambda = 251$ нм, проте інтенсивність його дещо збільшується.

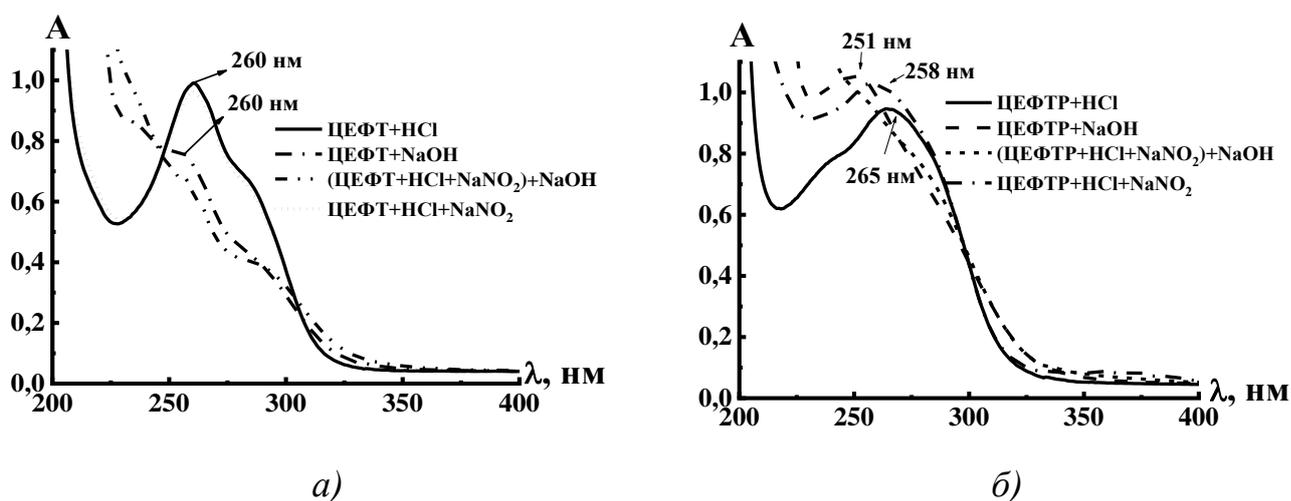


Рисунок 3.28 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів а) цефтазидиму та б) цефтріаксону в умовах реакції діазотування (кисле середовище) та азосполучення (лужне середовище). $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,26 \text{ М}$.

Оскільки із літератури відомо, що діазосоли ЦА здатні азосполучатися між собою [143], то важливим було дослідити, як виглядують спектри світлопоглинання розчинів досліджуваних цефалоспоринів та їх діазосолей у кислому та лужному середовищі в умовах експерименту (рис. 3.29).

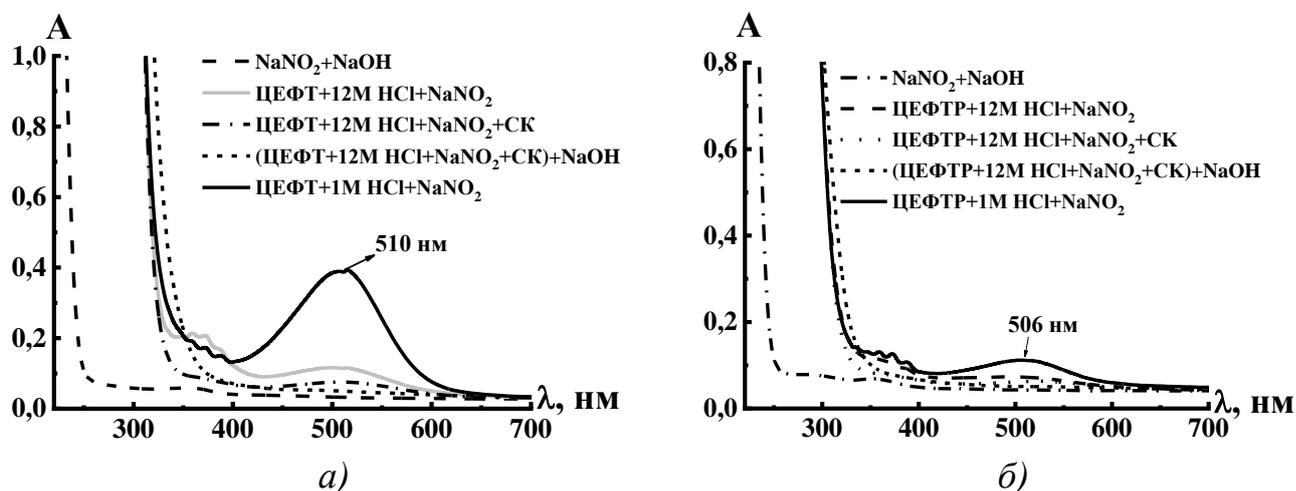


Рисунок 3.29 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів цефтазидиму *a)*, цефтріаксону *б)* та їх діазосолей. $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = C_{\text{ЦЕФТР}} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{СК}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,26 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Як видно зі спектрів (рис 3.29) при діазотуванні цефалоспоринів в середовищі 1,0 М НСІ утворюється азосполука із $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ нм}$ (ЦЕФТ) та $\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ нм}$ (ЦЕФТР), про існування яких у цитратному середовищі описано в роботі [143]. Проте використання концентрованої хлоридної кислоти для діазотування обох ЦА перешкоджає утворенню цих продуктів [146, 148].

На рис. 3.30 зображено спектри світлопоглинання продуктів власного азосполучення ЦА за різної концентрації хлоридної кислоти, яку використовували для діазотування.

Як видно з рис. 3.30 *a)* лише при використанні 1,0 М хлоридної кислоти для діазотування ЦЕФТ спостерігається максимум з невеликою інтенсивністю, який очевидно відповідає азосполученню утвореній внаслідок взаємодії діазосоли ЦЕФТ із молекулою непродіазотованого ЦЕФТ, однак використання більш концентрованої кислоти запобігає утворенню даної азосполуки [230, 231]. Наявність великого надлишку протонів призводить до того, що первинна ароматична аміногрупа

цефтазидиму є протонувана і має позитивний заряд, що перешкоджає її азосполученню із позитивно зарядженою діазогрупою з утворенням триазину (азоіміносполуки), а також аміноазосполуки [180]. У випадку діазотування ЦЕФТР при використанні для діазотування 12,0 М НСІ (рис 3.30 б)) вдається уникнути утворення небажаного продукту власного азосполучення [230].

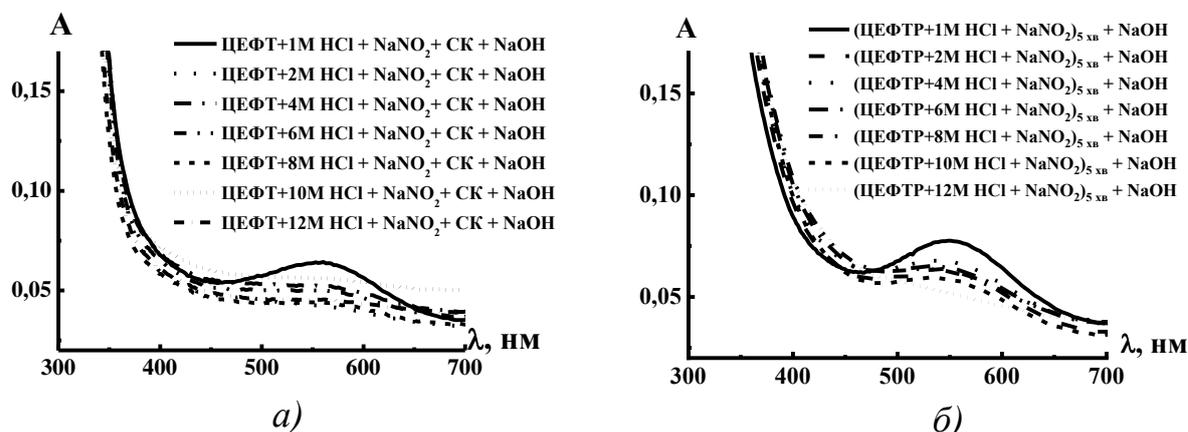


Рисунок 3.30 – Вплив концентрації хлоридної кислоти на взаємодію діазотованого а) ЦЕФТ із молекулою самого ЦЕФТ; б) ЦЕФТР із молекулою самого ЦЕФТР. $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3,7 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{СК}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см.

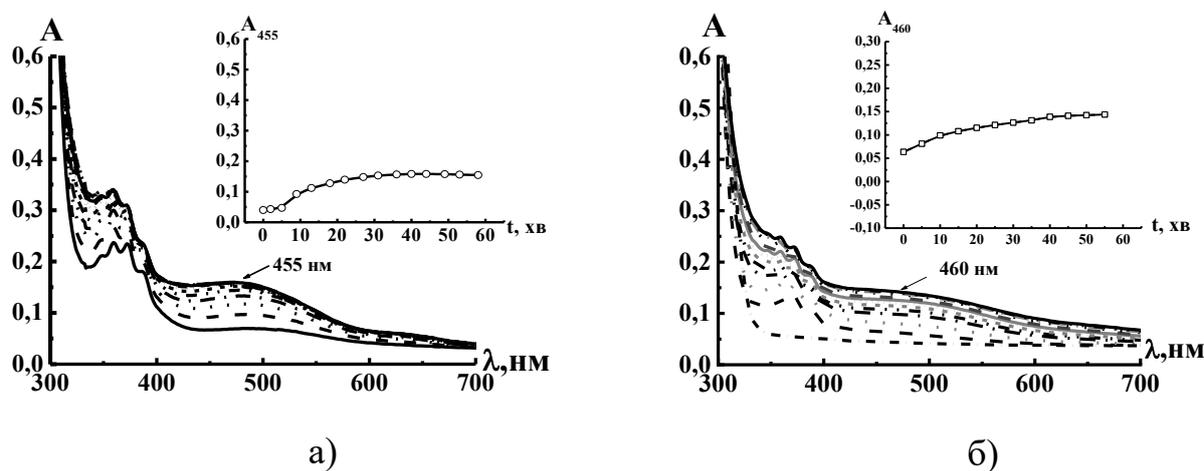


Рисунок 3.31 – Спектри світлопоглинання розчинів солі діазонію а) цефтазидиму та б) цефтріаксону залежно від часу зберігання в кислому середовищі. $C_{\text{НСІ}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,5 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ М; $C_{\text{NaNO}_2} = 7,4 \cdot 10^{-4}$ М; $l = 1$ см.

Однак, як свідчать спектри світлопоглинання зображені на рис. 3.31 з часом (>5хв) продукт власного азосполучення обох антибіотиків із їхніми діазосолями таки утворюється навіть коли проводити діазотування в середовищі концентрованої хлоридної кислоти, оскільки розчин діазосоли жовтіє. На спектрах це проявляється утворенням максимуму при 455 нм (ЦЕФТ) та 460 нм (ЦЕФТР) і зростанням світлопоглинання розчинів діазосоли в подальшому. Такі результати досліджень свідчать про те, що швидкість утворення солей діазонію ЦА в концентрованій хлоридній кислоті є великою, особливо для ЦЕФТ і нема необхідності чекати, а реагент можна додавати відразу після внесення натрій нітриту. Відповідно, цього часу достатньо, щоб додати лужний розчин реагенту і отримати очікуваний продукт практично миттєво. У випадку ЦЕФТР реакція діазотування відбувається повільніше, тому потрібно визначити оптимальний час на його діазотування.

Додатково вивчено, час зберігання розчинів діазотованого ЦЕФТР в середовищі 12,0 М НСІ коли діазотування проводили впродовж 5 хв і після цього швидко підлужнювали розчин (рис. 3.32).

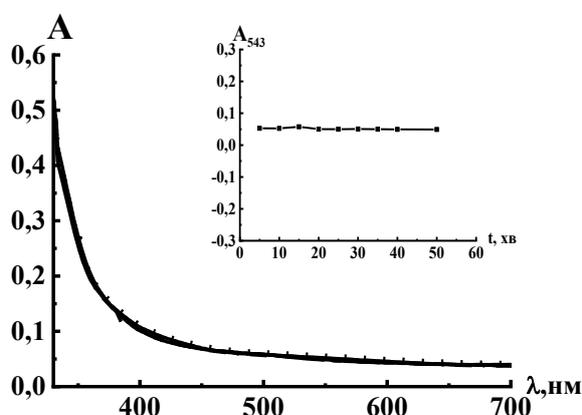


Рисунок 3.32 – Спектри світлопоглинання розчинів солі діазонію ЦЕФТР залежно від часу зберігання в лужному середовищі. $C_{\text{НСІ}} = 12,0 \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,26 \text{ М}$; $l = 1 \text{ см}$.

Як показали результати досліджень навіть при зберіганні такого розчину впродовж 1 години побічний продукт власного азосполучення не утворюється. Імовірно, це пов'язано з тим, що реакція азосполучення з первинними амінами

відбувається в слабокислому чи нейтральному середовищі, однак для взаємодії з фенолами потрібна наявність великого надлишку іонів OH^- [184].

Як реагенти для вивчення взаємодії з діазотованим ЦЕФТ ми вибрали фенольні сполуки – 8-оксихінолін, 2-метилфенол та резорцин. В процесі досліджень було встановлено, що при взаємодії діазосолі цефтазидиму з лужними розчинами 8-Окс, 2-Мет та Рез утворюються забарвлені сполуки, які характеризуються появою нових максимумів світлопоглинання за $\lambda_{\text{max}} = 553$ нм, $\lambda_{\text{max}} = 516$ нм та $\lambda_{\text{max}} = 519$ нм відповідно (рис 3.33 а–в).

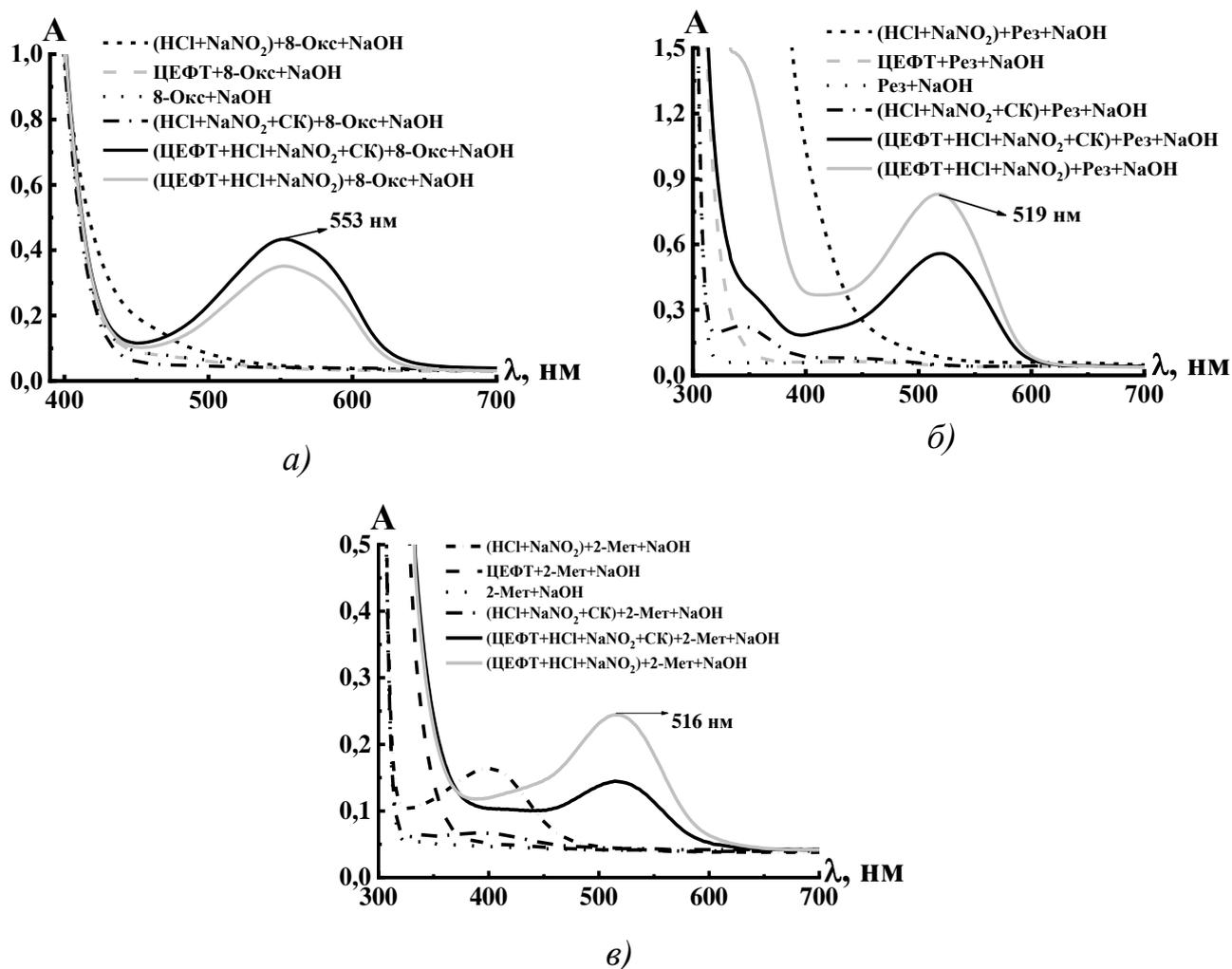


Рисунок 3.33 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів цефтазидиму, діазосолі ЦЕФТ, 8-оксихіноліну, резорцину, 2-метилфенолу та продуктів їхньої взаємодії. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 3,7 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{СК}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{Рез}} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{2\text{-Мет}} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,26$ М; $l = 1$ см.

Використання сульфамінової кислоти для усунення непрореагованого надлишку натрій нітриту у випадку вивчення взаємодії з 8-Окс призводить до збільшення інтенсивності максимуму продукту у порівнянні, коли не усували непрореагований залишок натрій нітриту. Для реакції азосполучення діазотованого ЦЕФТ з Рез та 2-Мет навпаки непрореагований при діазотуванні надлишок натрій нітриту усувати недоцільно, оскільки за його наявності максимум світлопоглинання отриманих продуктів взаємодії є вищим. Такий ефект від наявності залишку непрореагованого натрій нітриту у випадку взаємодії із резорцином та 2-метилфенолом можна пояснити нітрузуванням ароматичного ядра реагенту під дією нітрит-іонів, що сприяє спряженню електронної густини в утвореному продукті азосполучення і, відповідно, зростанню світлопоглинання його розчинів, що узгоджується з літературними даними [162]. Зниження аналітичного сигналу в присутності залишку натрій нітриту у випадку взаємодії з 8-Окс можна пояснити, процесами окиснення самого азопродукту під дією великого надлишку діазотуючого агента, який не витрачається на реакцію нітрузування як у випадку з резорцином та 2-метилфенолом.

Для вивчення взаємодії з діазотованим цефтріаксоном як реагенти були обрані такі фенольні сполуки – 8-оксихінолін та 2-метилфенол. Використання резорцину в аналізі цефтріаксону описано в літературі [150], однак у цій роботі автори пропонують проводити діазотування резорцину у середовищі 0,5 М кислоти, хоча за цих умов проходить власне азосполучення ЦЕФТР. У процесі досліджень було встановлено, що під час взаємодії діазосолі цефтріаксону з лужними розчинами 8-Окс та 2-Мет утворюються забарвлені сполуки, які характеризуються появою нових максимумів світлопоглинання за $\lambda_{\max} = 550$ нм та $\lambda_{\max} = 516$ нм відповідно (рис 3.34 *a-b*) [230–233]. Застосування сульфамінової кислоти для усунення непрореагованого надлишку натрій нітриту призводить до незначного зменшення аналітичного сигналу у випадках з 8-Окс та 2-Мет, саме тому у подальших дослідженнях усувати непрореагований натрій нітрит недоцільно. Такий ефект можна пояснити аналогічно як і у випадку взаємодії ЦЕФТ із резорцином та 2-Мет, тобто нітрузуванням реагенту, що сприяє спряженню електронної густини в

утворених продуктах азосполучення і відповідно веде до збільшення світлопоглинання їхніх розчинів.

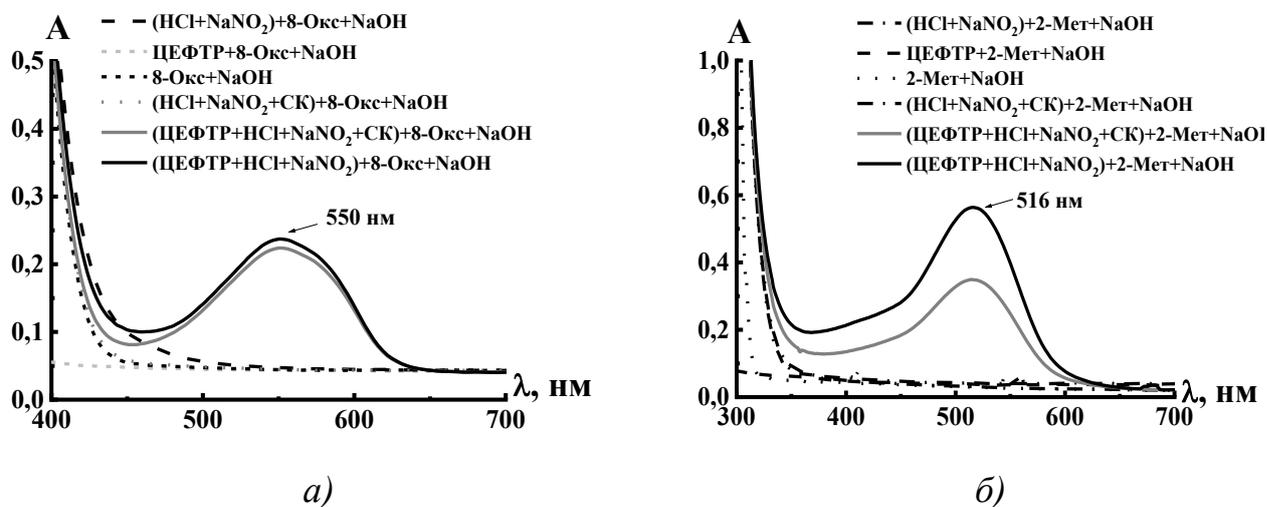


Рисунок 3.34 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів цефтріаксону, діазосолі ЦЕФТР, 8-оксихіноліну, 2-метилфенолу та продуктів їхньої взаємодії. а) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 2,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$, $C_{\text{СК}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,26 \text{ M}$; б) Умови діазотування: $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 7,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$, $C_{\text{СК}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{2\text{-Мет}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,26 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Встановлення оптимальних умов діазотування цефалоспоринових антибіотиків та подальшого азосполучення з реагентами

В структуру досліджуваних антибіотиків входить первинна ароматична аміногрупа, з літературних даних відомо, що її діазотування відбувається в сильноокислому середовищі, природа і концентрація кислоти має вплив на вихід продукту реакції. Однак, літературні дані щодо умов діазотування ЦЕФТ досить суперечливі. Пропонують використовувати хлоридну кислоту різної концентрації, зокрема 1,0M [144], або концентровану [146, 148] для подолання процесу власного азосполучення. 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.

Залежність виходу діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону від концентрації хлоридної кислоти

Оскільки було показано, що кислотність середовища в якому проводять діазотування цефалоспоринових антибіотиків істотно впливає на те чи утвориться продукт власного азосполучення ЦЕФТ та ЦЕФТР, то важливо було визначити найменшу концентрацію хлоридної кислоти, за якої такий продукт не утворюється, а вихід самого продукту азосполучення із досліджуваними реагентами є максимальним.

Результати досліджень впливу концентрація хлоридної кислоти як середовища для діазотування цефалоспоринів та подальше азосполучення отриманих солей діазонію із досліджуваними реагентами (рис. 3.35) показали, що утворення максимальної кількості продукту азосполучення діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з реагентами відбувається, коли діазотування антибіотиків проводити в середовищі 10,0 – 12,0 М хлоридної кислоти.

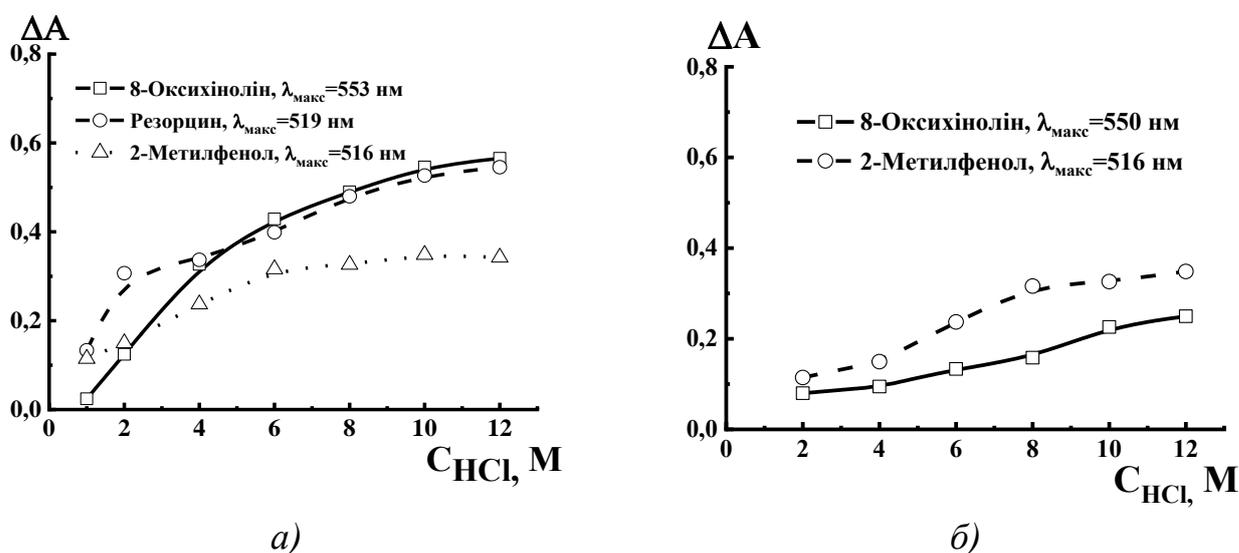


Рисунок 3.35 – Вплив концентрації хлоридної кислоти на діазотування а) цефтазидиму, б) цефтріаксону та подальше азосполучення з фенольними реагентами.

а) Умови діазотування: $C_{CEFT} = 1,0 \cdot 10^{-4} M$, $C_{NaNO_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} M$. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 1,0 \cdot 10^{-3} M$, $C_{Рез} = 1,0 \cdot 10^{-3} M$, $C_{2-Мет} = 1,0 \cdot 10^{-3} M$, $C_{NaOH} = 0,16 M$. б) Умови діазотування: $C_{CEFTR} = 7,4 \cdot 10^{-5} M$, $C_{NaNO_2} = 7,4 \cdot 10^{-4} M$, $t_{дiazot.} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 7,0 \cdot 10^{-4} M$, $C_{2-Мет} = 7,0 \cdot 10^{-4} M$, $C_{NaOH} = 0,26 M$; $l = 1$ см.

Вплив тривалості діазотування

Наступним етапом було дослідження тривалості діазотування у випадку цефтріаксону на подальше утворення азосполуки ЦЕФТР із досліджуваними фенольними реагентами. Як показали результати попередніх досліджень утворення продукту власного азосполучення цефтазидиму відбувається дуже швидко ~ 5 хв, тому для уникнення цього процесу реагенти в реакційну суміш потрібно додавати швидко, і відразу підлучнювати розчин.

Результати досліджень зображені на рис. 3.36 свідчать про те, що оптимальним часом для проходження реакції діазотування є 4–6 хвилин, за який досягається найвище значення аналітичного сигналу. При подальшому збільшенні часу діазотування вихід цільових продуктів очевидно зменшується, про що свідчить зниження світлопоглинання розчинів, що імовірно пов'язано з одночасним утворенням продукту власного азосполучення ЦЕФТР і як наслідок зменшення доступної діазосоли для азосполучення із досліджуваними реагентами. Однак 5 хв є достатньо для діазотування і 1 хв, щоб додати лужний розчин реагенту і отримати очікуваний продукт, який утворюється практично миттєво. Тому при проведенні наступних досліджень діазотування ЦЕФТР проводили впродовж 5 хв [230, 233].

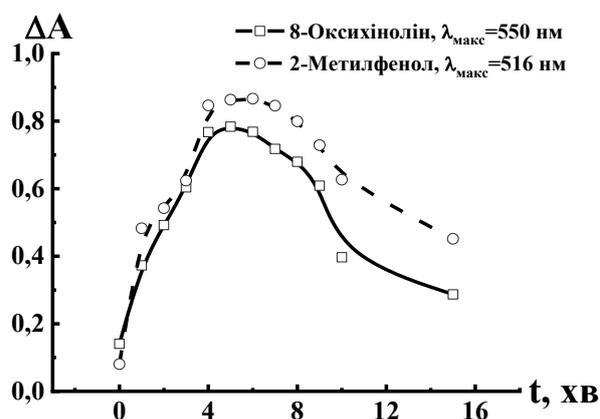


Рисунок 3.36 – Вплив тривалості реакції діазотування цефтріаксону на світлопоглинання кінцевого продукту азосполучення солі діазонію ЦЕФТР із 8-оксихіноліном та 2-метилфенолом. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2\text{-Мет}} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,26$ М; $l = 1$ см.

Вплив концентрації діазотуючого агента натрій нітриту на утворення солі діазонію цефтріаксону

Досліджено вплив концентрації натрій нітриту, як діазотуючого реагента, на утворення солей арендіазонію АН та подальшого їх азосполучення з 8-Окс, Рез та 2-Мет. Згідно механізму реакції діазотування для отримання нітрозоній катіону потрібно 2 молекули нітратної кислоти, і крім того надлишок одного з реагентів сприяє зсуву рівноваги в бік утворення продуктів реакції. Однак при великих надлишках натрій нітриту є небезпека утворення нестабільних форм діазосполук, процесів окиснення і осмолення [181].

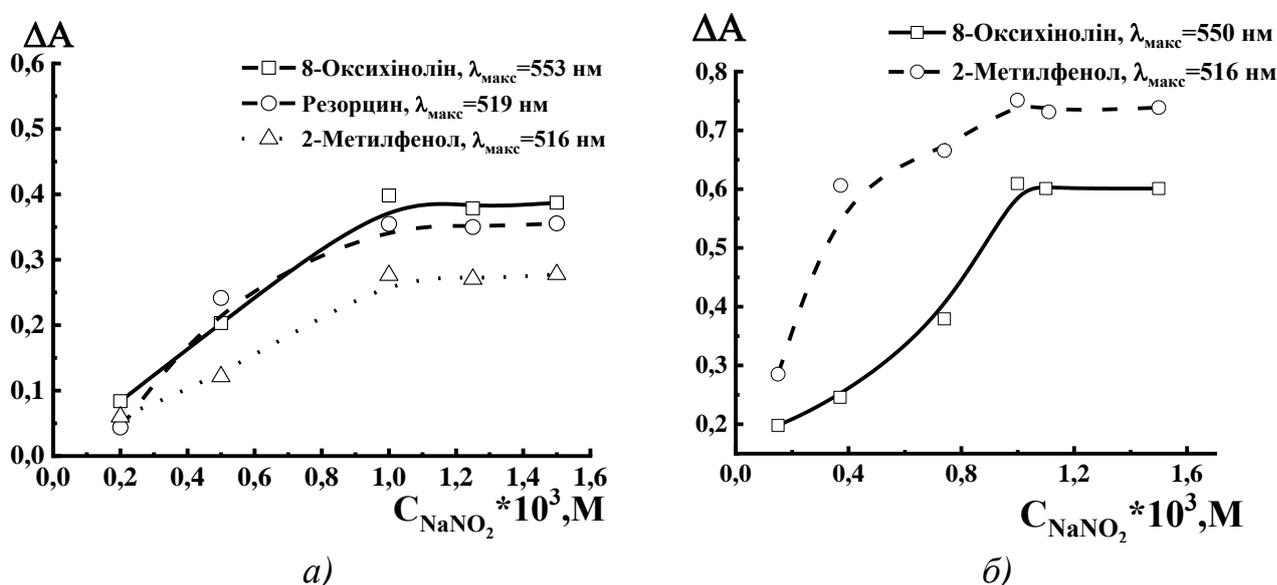


Рисунок 3.37 – Вплив концентрації натрій нітриту під час діазотування ЦА на світлопоглинання продукту азосполучення солі діазонію ЦЕФТ та ЦЕФТР із реагентами. *а)* Умови діазотування: $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{CEFT} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{Рез} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2-Мет} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaOH} = 0,16$ М; *б)* Умови діазотування: $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{CEPTR} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2-Мет} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaOH} = 0,16$ М; $l = 1$ см.

Як показали результати досліджень, наведені на рис. 3.37, оптимальним є використання натрій нітриту з концентрацією $1,0 \cdot 10^{-3}$ М, тобто його 10-кратний надлишок відносно концентрації цефтазидиму та цефтріаксону у випадку азосполучення з усіма реагентами [230–234].

Вплив концентрації сульфамінової кислоти на взаємодію діазотованого цефтазидиму з 8-оксихіноліном

Попередньо встановлено, що сульфамінову кислоту для усунення надлишку натрій нітриту доцільно використовувати лише у випадку взаємодії діазосолі ЦЕФТ із 8-оксихіноліном. На рисунку 3.38 зображено результати дослідження впливу різної концентрації сульфамінової кислоти стосовно до кількості доданого натрій нітриту у випадку взаємодії діазотованого ЦЕФТ з 8-Окс. З отриманих результатів видно, що оптимальним є використання сульфамінової кислоти з концентрацією $1,5 \cdot 10^{-4}$ М, тобто її 1,5-кратний надлишок відносно концентрації діазотуючого реагенту. При подальшому збільшенні концентрації сульфамінової кислоти простежується значне зниження аналітичного сигналу через те, що сульфамінова кислота здатна реагувати як з фенолами так і з ароматичними амінами [235].

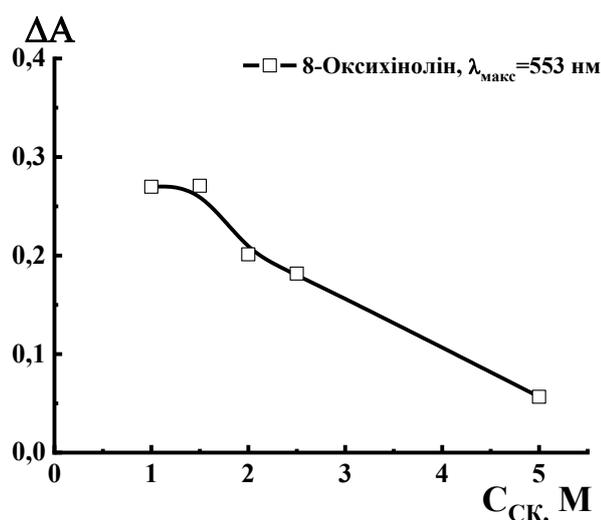


Рисунок 3.38 – Вплив концентрації сульфамінової кислоти на світлопоглинання азосполуки ЦЕФТ з 8-Окс. Умови діазотування: $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{CEFT} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaOH} = 0,16$ М, $l = 1$ см.

Вплив концентрації натрій гідроксиду на вихід продукту азосполучення солі діазонію цефтазидиму та цефтріаксону із 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом.

Азосполучення із фенольними сполуками відбувається в лужному середовищі, тому потрібно було дослідити вплив рН середовища на азосполучення діазотованих

ЦА з фенольними реагентами. Оскільки для діазотування ми використовували концентровану хлоридну кислоту то для нейтралізації значної кількості іонів гідроксонію потрібно використовували концентрований розчин лугу. Тому ми досліджували вплив концентрації NaOH на взаємодію діазотованого ЦЕФТ із 8-Окс, Рез та 2-Мет (рис. 3.39 а)) і діазосолі ЦЕФТР з 8-Окс, 2-Мет (рис. 3.39 б)).

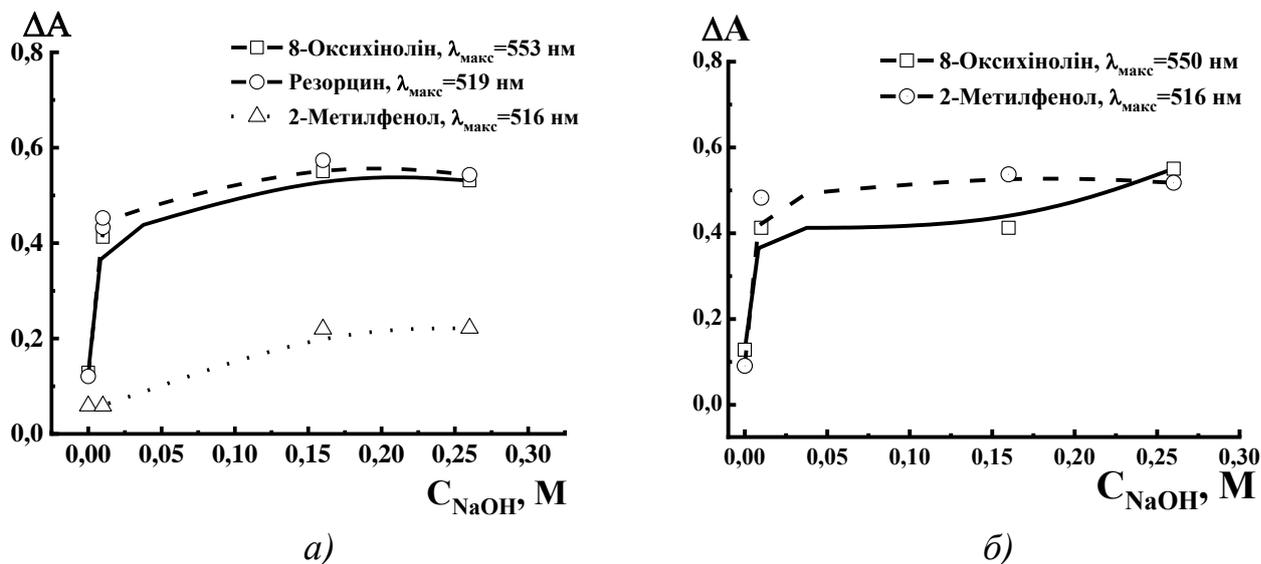


Рисунок 3.39 – Вплив концентрації натрій гідроксиду на світлопоглинання продуктів азосполучення солей діазонію ЦЕФТ та ЦЕФТР із реагентами.

Умови діазотування: а) $C_{HCl}=12,0$ М, $C_{CEFT} = 3,7 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{СК} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{2-Мет} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{Рез} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ М. б) $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{CEFTR} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,4 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{дiazot.} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2-Мет} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $l = 1$ см.

Як показали результати досліджень, наведені на рис. 3.39 максимальний вихід продуктів взаємодії діазотованих ЦА із усіма досліджуваними реагентами спостерігається при концентрації лугу в реакційному середовищі 0,16 М.

Вплив концентрації азоскладової на реакцію азосполучення діазотованих цефалоспоринів з фенольними реагентами

Для встановлення оптимальних умов взаємодії ми проводили пошук оптимального надлишку реагенту для максимального виходу продукту реакції. Нами було використані різні надлишки реагентів 8-Окс, Рез та 2-Мет стосовно кількості діазотованих цефалоспоринів у реакційній суміші.

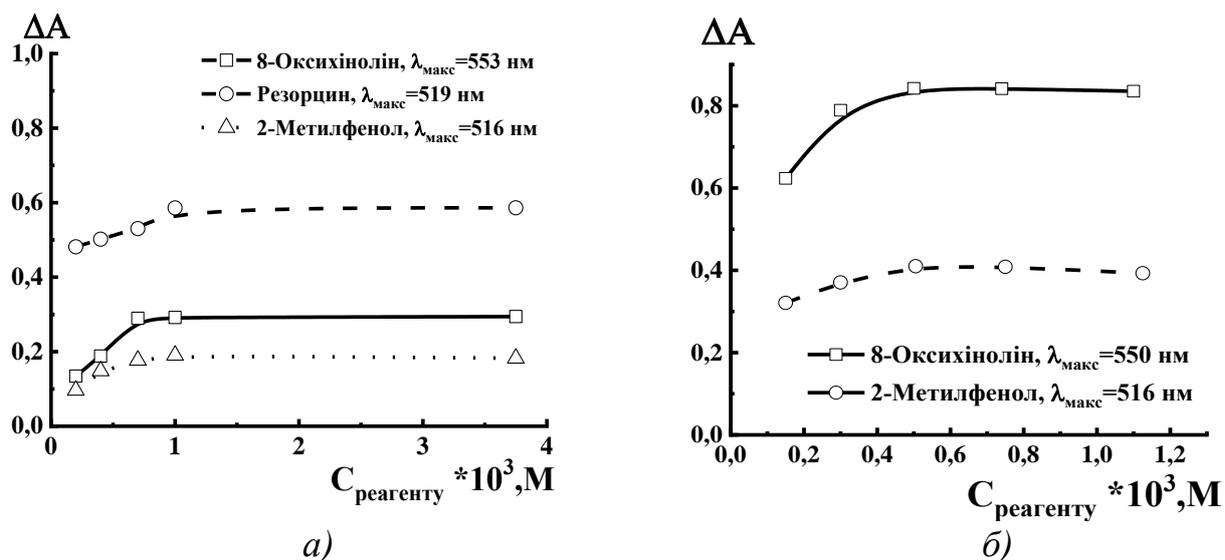


Рисунок 3.40 – Залежність світлопоглинання продуктів азосполучення діазосолей а) ЦЕФТ та б) ЦЕФТР з 8-Окс, Рез та 2-Мет від концентрації реагентів.

а) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{СК}} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$. б) Умови діазотування: 8-Окс – $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. 2-Мет – $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Як можна побачити на рис. 3.40 максимальний вихід забарвлених аналітичних форм діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс спостерігається за 7-кратного надлишку реагента. У системах ЦЕФТ–Рез, ЦЕФТ–2-Мет та ЦЕФТР–2-Мет оптимальним є використання 10-кратного надлишку реагентів [230–233]. Аналітичний сигнал залишається практично незмінним при подальшому збільшенні концентрації реагентів.

Вплив послідовності змішування реагентів на вихід продуктів взаємодії діазотованих цефалоспоринів з фенольними реагентами

Оскільки дві послідовні стадії утворення азосполуки проходять у різному середовищі, яке має значний вплив на самі реагенти, то важливо було дослідити порядок додавання компонентів у суміш. Результати цих досліджень наведені в табл.3.6. Максимальний вихід продукту реакції спостерігається, якщо діазотування та подальше азосполучення усіх реагентів проводити у такій послідовності: у

аліквоту розчину ЦА вносити розчин кислоти, тоді додавати розчин натрій нітриту та за потреби сульфамінову кислоту (ЦЕФТ–8-Окс), а після цього проводити азосполучення з відповідним лужним розчином реагенту.

Таблиця 3.6 – Порядок додавання реагентів при взаємодії діазотованих цефалоспоринів із фенольними реагентами. а) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{СК}} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Рез}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-Мет}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$. б) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 5,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{2\text{-Мет}} = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$, $l = 1 \text{ см}$.

Цефтазидим			
Порядок додавання реагентів	8-Окс	Рез	2-Мет
	ΔA_{553}	ΔA_{519}	ΔA_{516}
$[\text{ЦЕФТ} + \text{HCl} + \text{NaNO}_2] + \text{СК}_{8\text{-Окс}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,540	0,761	0,420
$[\text{HCl} + \text{NaNO}_2 + \text{ЦЕФТ}] + \text{СК}_{8\text{-Окс}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,421	0,614	0,388
$[\text{NaNO}_2 + \text{ЦЕФТ} + \text{HCl}] + \text{СК}_{8\text{-Окс}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,518	0,742	0,406
Цефтріаксон			
Порядок додавання реагентів	8-Окс	2-Мет	
	ΔA_{550}	ΔA_{516}	
$[\text{ЦЕФТР} + \text{HCl} + \text{NaNO}_2]_{5\text{хв}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,911	0,649	
$[\text{HCl} + \text{NaNO}_2 + \text{ЦЕФТР}]_{5\text{хв}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,898	0,547	
$[\text{NaNO}_2 + \text{ЦЕФТР} + \text{HCl}]_{5\text{хв}} + \text{реагент}_{\text{р-н на } 4,0 \text{ M NaOH}}$	0,899	0,475	

Стабільність продуктів азосполучення діазотованих цефалоспоринів з реагентами

Досліджено стабільність світлопоглинання утворених азопродуктів діазотованого ЦЕФТ та ЦЕФТР з фенольними реагентами, оскільки стійкість у часі аналітичної форми є важливим фактором для спектрофотометричної методики. Результати досліджень наведено на рис. 3.41.

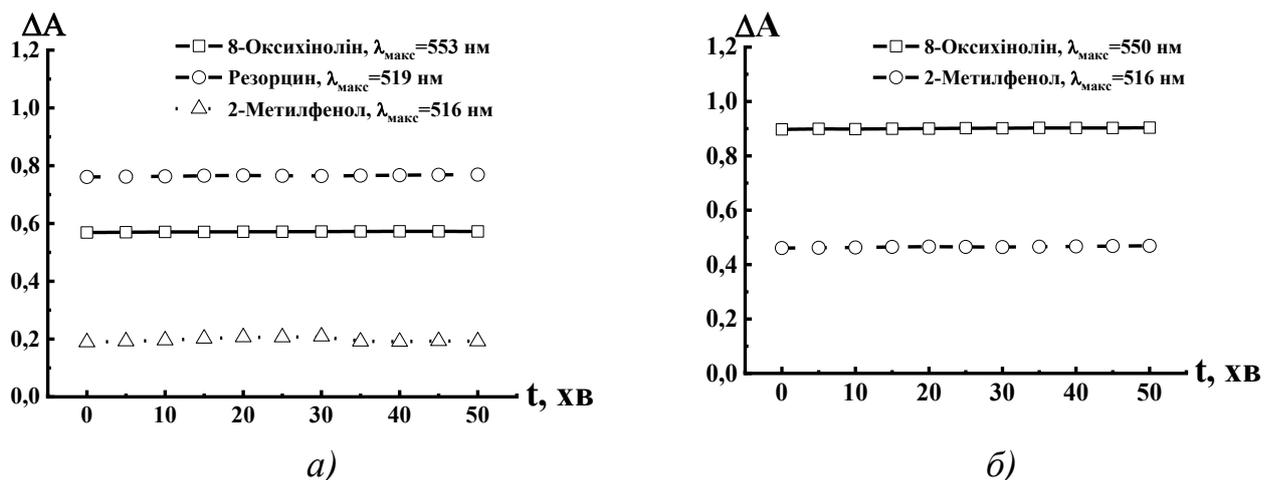


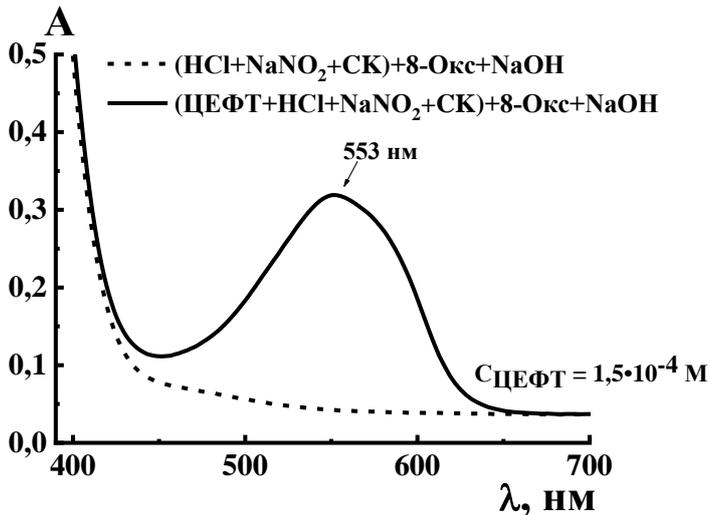
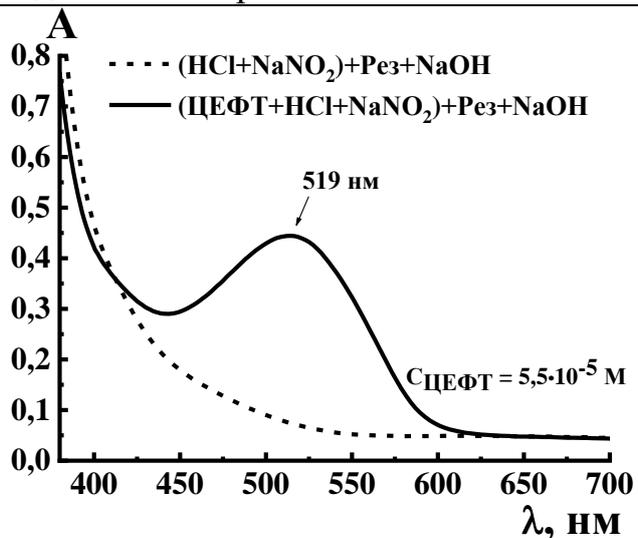
Рисунок 3.41 – Стабільність у часі світлопоглинання розчинів продуктів азосполучення діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з фенольними реагентами. а) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{СК}} = 1,5 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{Рез}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{2\text{-Мет}} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М. б) Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0$ М, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 9,3 \cdot 10^{-3}$ М, $t_{\text{діазот.}} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 5,2 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{2\text{-Мет}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{NaOH}} = 0,16$ М; $l = 1$ см.

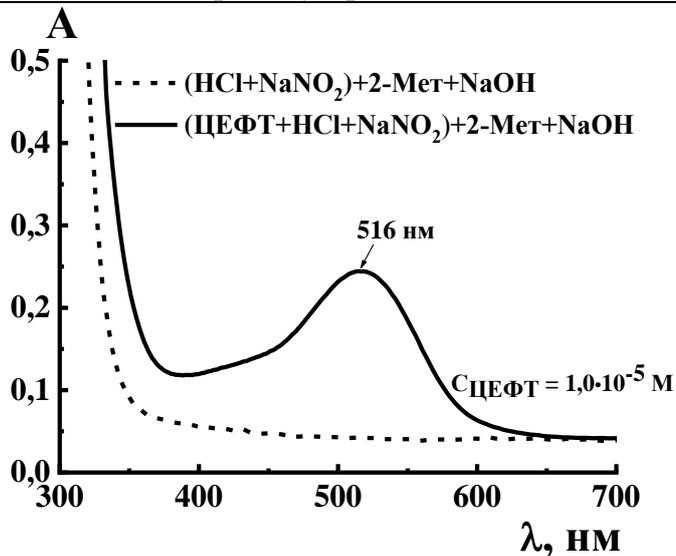
Як показали результати досліджень (рис. 3.41) аналітичний сигнал характерний для продуктів взаємодії діазотованих цефалоспоринових антибіотиків з фенольними реагентами 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом залишаються стабільним впродовж тривалого часу (більше 50 хвилин), про що свідчить незмінність у часі величини світлопоглинання утворених азосполук.

Обчислення спектрофотометричних характеристик продуктів азосполучення діазотованих ЦА із 8-Окс, 2-Мет та Рез.

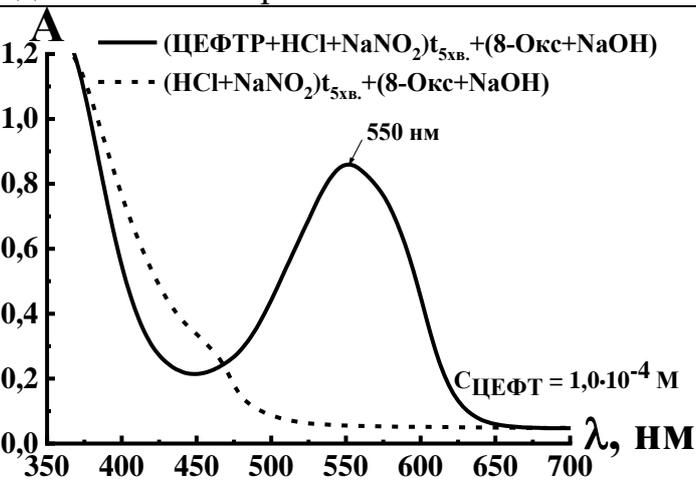
Загалом усі оптимальні умови отримання азосполук солей діазонію цефалоспоринових антибіотиків з фенольними реагентами 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом наведено в таблицях 3.7 – 3.8. Розраховано ефективні молярні коефіцієнти світлопоглинання характерні для азосполук ЦЕФТ–8-Окс, ЦЕФТ–Рез, ЦЕФТ–2-Мет та ЦЕФТР–8-Окс, ЦЕФТР–2-Мет [230, 231].

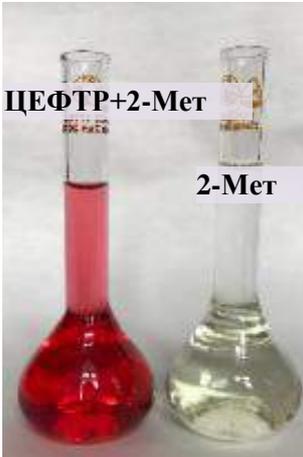
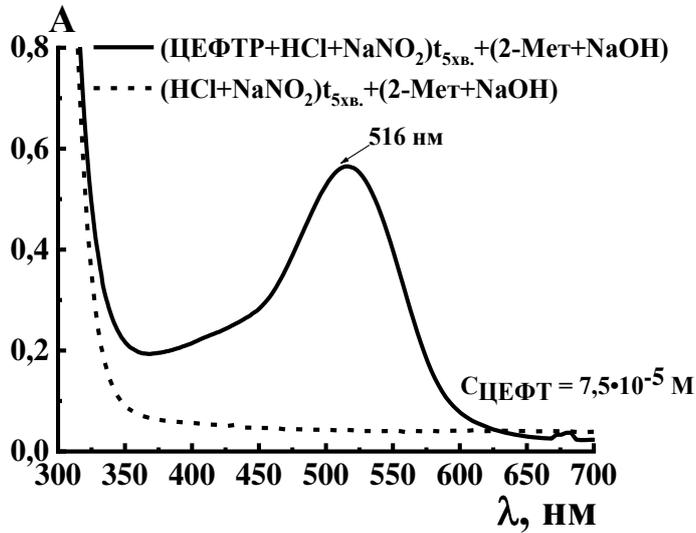
Таблиця 3.7 – Оптимальні умови отримання та спектрофотометричні характеристики азосполук діазосолей цефтазидиму з фенольними реагентами

8-оксихінолін	
Діазотування	$C(\text{HCl})=12 \text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлишок NaNO_2 до ЦЕФТ, $\geq 1,5$ -кратний надл. СК до NaNO_2
Азосполучення	7-кратний надлишок 8-Окс приготованого на 4 М NaOH
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 553 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 1 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли ЦЕФТ з 8-Окс.</p> $\varepsilon_{553}(\text{ЦЕФТ}+8\text{-Окс}) = (6,30 \pm 0,12) \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Резорцин	
Діазотування	$C(\text{HCl})=12 \text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлшок NaNO_2 до ЦЕФТ
Азосполучення	10-кратний надлишок Рез приготованого на 4 М NaOH
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 519 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 1 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли ЦЕФТ з резорцином.</p> $\varepsilon_{519}(\text{ЦЕФТ}+8\text{-Окс}) = (6,70 \pm 0,13) \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$

2-Метилфенол	
Діазотування	$C(\text{HCl})=12 \text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлишок NaNO_2 до ЦЕФТ
Азосполучення	10-кратний надлишок 2-Метилфенолу приготованого на 4 М NaOH
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 1 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли ЦЕФТ з 2-Мет.</p> <p>$\epsilon_{516}(\text{ЦЕФТ}+8\text{-Окс}) = (6,40 \pm 0,11) \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>

Таблиця 3.8 – Оптимальні умови отримання та спектрофотометричні характеристики азосполук діазосолей цефтріаксону з фенольними реагентами

8-оксихінолін	
Діазотування	$C(\text{HCl})=12 \text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлишок NaNO_2 до ЦЕФТР
Азосполучення	7-кратний надлишок 8-Окс приготованого на 4 М NaOH
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 1 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли ЦЕФТ з 8-Окс.</p> <p>$\epsilon_{550}(\text{ЦЕФТ}+8\text{-Окс}) = (6,80 \pm 0,19) \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>

2-Метилфенол	
Діазотування	$C(HCl)=12\text{ M}$, ≥ 10 -кратний надлишок $NaNO_2$ до ЦЕФТР
Азосполучення	10-кратний надлишок 2-Мет приготованого на 4 М NaOH
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 516\text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 1 год</p>	 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів взаємодії діазосоли ЦЕФТ з 2-Мет.</p> <p>$\varepsilon_{516}(\text{ЦЕФТ}+8\text{-Окс}) = (6,90 \pm 0,16) \cdot 10^3\text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$</p>

Як видно зі значень ефективних молярних коефіцієнтів (табл. 3.7–3.8) чутливість визначення ЦА за допомогою усіх досліджуваних фенольних реагентів є співмірною, оскільки досліджувані реагенти не мають відмінних заміників, які були б здатні впливати на електронне спряження молекул отриманих азосполук.

3.2.2 Дослідження складу азосполук діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом

Співвідношення компонентів у сполуках діазотованих ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-Окс, 2-Мет, Рез було встановлено методом ізомолярних серій (рис. 3.42).

Як видно з рис. 3.42 при взаємодії діазотованих ЦА з усіма досліджуваними реагентами утворюються продукти азосполучення із співвідношенням компонентів 1 : 1.

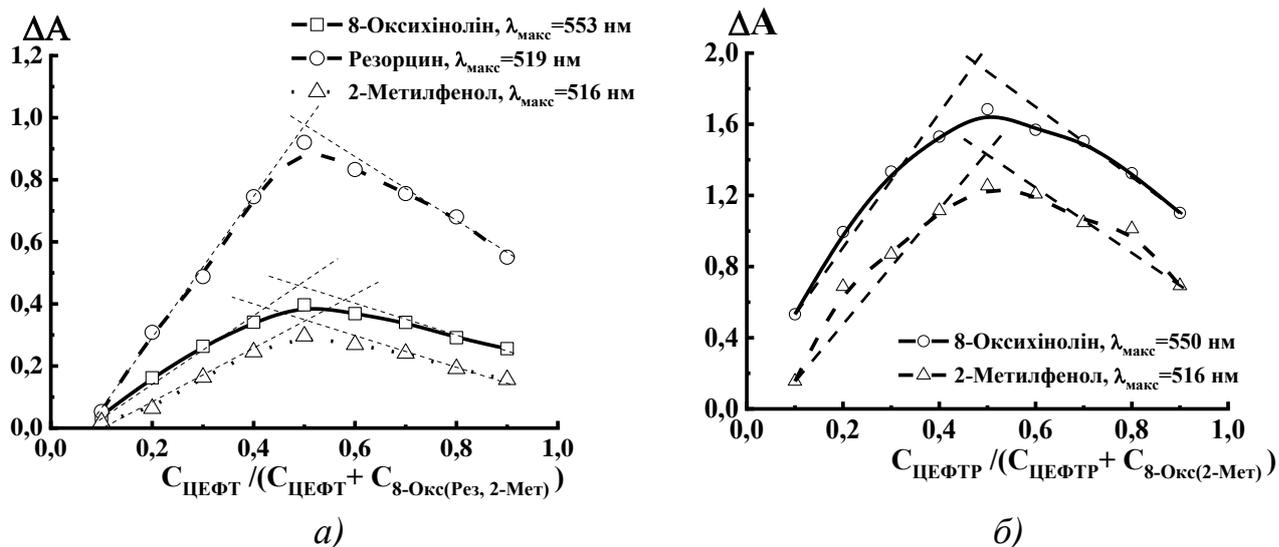


Рисунок 3.42 – Встановлення співвідношення компонентів у системах ЦЕФТ-8-Окс, Рез, 2-Мет та ЦЕФТР-8-Окс, 2-Мет методом ізомолярних серій.

в) $C_{\text{ЦЕФТ}} + C_{2\text{-Мет}} = C_{\text{ЦЕФТ}} + C_{8\text{-Окс}} = C_{\text{ЦЕФТ}} + C_{\text{Рез}} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$.

г) $C_{\text{ЦЕФТР}} + C_{8\text{-Окс}} = C_{\text{ЦЕФТР}} + C_{2\text{-Мет}} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$; $l = 1 \text{ см}$.

Попередні дослідження показали недоцільність усунування непрореагованого надлишку натрій нітриту у випадку взаємодії ЦЕФТР та ЦЕФТ із фенольними реагентами за виключенням системи ЦЕФТ-8-Окс (пункт 3.2.1 рис. 3.33–3.34), оскільки це призводило до зменшення оптичної густини. Вищий аналітичний сигнал азопродуктів за наявності непрореагованого натрій нітриту є наслідком впровадження в молекули фенольних реагентів *NO*-групи, яка підсилює світлопоглинання отриманих азосполук. Щоб запропонувати імовірну схему утворення азопродуктів на основі ЦА ми провели додаткові ВА дослідження отриманих азосполук. На рис. 3.43 зображено циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення ЦЕФТ та ЦЕФТР із 2-Мет в умовах наявності непрореагованого натрій нітриту в реакційному середовищі і коли його усували за допомогою сульфамінової кислоти.

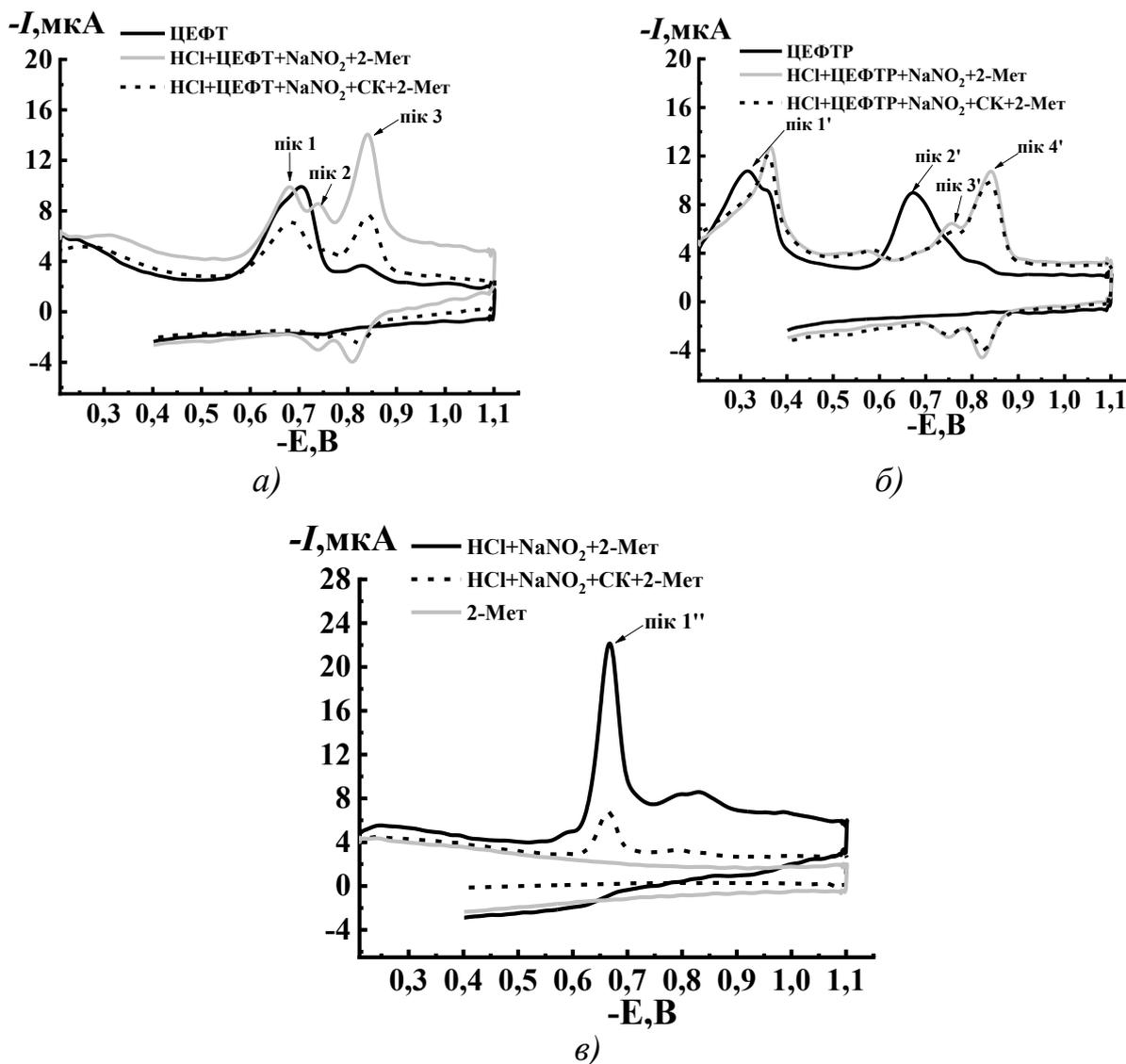


Рисунок 3.43 – Циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення ЦЕФТ та ЦЕФТР із 2-Мет. $V = 2,5 \text{ В/с}$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТ}}=C_{\text{ЦЕФТР}}=7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2}=7,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{СК}}=11,3 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{2\text{-Мет}} = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$.

Як видно з рис. 3.43 а), б) на вольтамперограмах розчинів продуктів азосполучення діазотованих ЦА з 2-Мет простежуються два нові оборотні піки за потенціалів: для ЦЕФТ – $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,74 \text{ В}$, $E_{\text{к}}^{\text{п}3} = -0,84 \text{ В}$; для ЦЕФТР – $E_{\text{к}}^{\text{п}3'} = -0,76 \text{ В}$, $E_{\text{к}}^{\text{п}4'} = -0,84 \text{ В}$, які відповідають за двостадійне відновлення новоутвореної азогрупи. Крім них на полярограмах розчинів азопродуктів наявні піки характерні для самих ЦА: для ЦЕФТ пік за $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,68$; для ЦЕФТР піки за $E_{\text{к}}^{\text{п}1'} = -0,32 \text{ В}$, $E_{\text{к}}^{\text{п}2'} = -0,68 \text{ В}$, які пов'язані із відновленням метоксиіміногрупи [79–81]. Усунення

непрореагованого натрій нітриту із розчинів отриманих азосполук ЦА з 2-Мет не вплинуло на вигляд полярограм. Натомість як видно з рис. 3.43 в) натрій нітрит значно впливає на вигляд полярограми 2-Мет у лужному середовищі; він спричинює появу піку за $E_k^{n1''} = -0,67$ (2-Мет полярографічно неактивний), який імовірно відповідає за відновлення нітросо групи, впровадженій в ароматичне ядро в умовах експерименту. Використання сульфамінової кислоти для усунення натрій нітриту із реакційного середовища призводить до значного зменшення піку 1'' (для зникнення цього піку потрібно використати вищу концентрацію СК або збільшити час реакції), що є підтвердженням нітросування 2-метилфенолу в процесі азосполучення із діазотованими ЦА за наявності непрореагованого натрій нітриту. На полярограмах розчинів азопродуктів важко зафіксувати вплив непрореагованого натрій нітриту, оскільки пік 1'' відновлення нітросо-групи накладається на власні піки ЦА (1 та 2').

Циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення ЦЕФТ та ЦЕФТР із 8-Окс в умовах наявності непрореагованого натрій нітриту в реакційному середовищі і коли його усували за допомогою сульфамінової кислоти зображено на рис. Д.2 (Додаток Д)

Проведені СФ та ВА дослідження дозволили запропонувати імовірні схеми утворення азосполук діазотованих цефалоспоринів з фенольними реагентами. Імовірна схема взаємодії діазотованих цефтазидиму та цефтріаксону з 2-метилфенолом та резорцином наведена на рис. 3.44, а з 8-Окс на рис. 3.45.

Як видно зі схем наведених на рис. 3.44–3.45 в кислому середовищі нітрит-іони діазотують первинну ароматичну аміногрупу цефалоспоринів з утворенням діазосолі відповідного антибіотика, яка у лужному середовищі взаємодіє з відповідним реагентом, утворюючи забарвлений продукт. Утворені азосполуки ЦЕФТ–Рез, ЦЕФТ–2-Мет, ЦЕФТР–8-Окс та ЦЕФТР–2-Мет зазнають нітросування у фрагменті реагенту, свідченням чого є вищі значення світлопоглинання для розчинів цих систем, які містять непрореагований залишок натрій нітриту [230, 231].

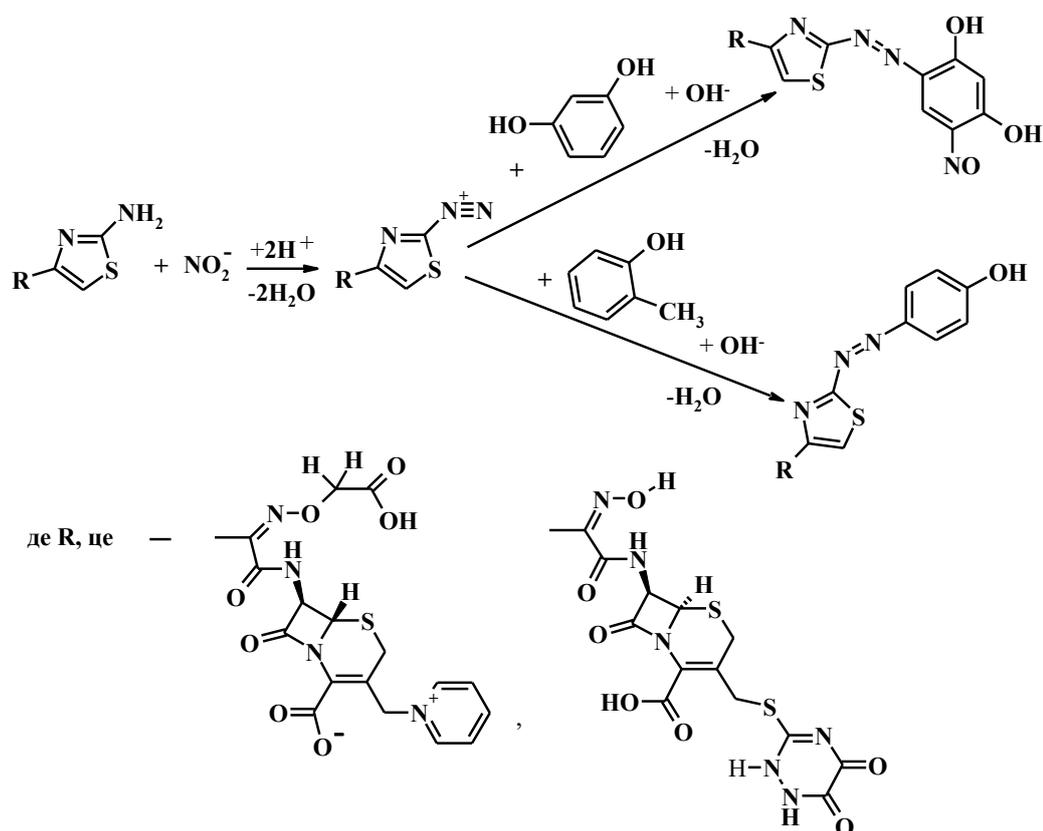


Рисунок 3.44 – Схема взаємодії діазосолі ЦЕФТ та ЦЕФТР з 2-метилфенолом та резорцином.

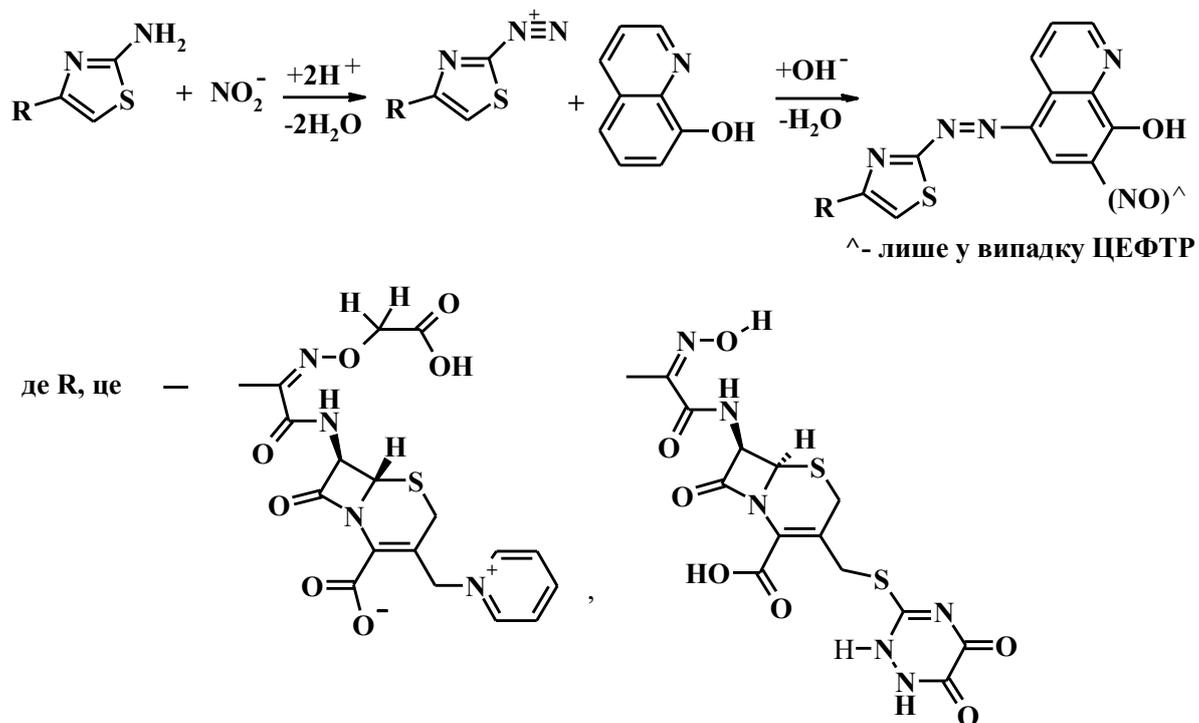


Рисунок 3.45 – Імовірна схема взаємодії діазосолей ЦЕФТ та ЦЕФТР з 8-оксихіноліном

3.3 Спектрофотометричне вивчення продукту власного азосполучення діазотованого цефтріаксону

В літературі є відомості про можливість СФ визначення цефтріаксону за продуктом власного азосполучення діазотованого ЦЕФТР як в кислому середовищі [138] так і в лужному середовищах [147] (табл. 3.9), однак в цих роботах наявні лише методики визначення ЦЕФТР у ліках, але результатів досліджень, на підставі яких було обрано оптимальні умови реакції у цих роботах не наведено. Однак, отримана сполука на основі власного азосполучення діазотованого ЦЕФТР може стати перспективною аналітичною формою для вольтамперометричного визначення ЦЕФТР (розділ 5.1), адже більшість ВА методик його визначення мають ряд недоліків через схильність ЦА до адсорбції на електродах [79–81]. В літературі немає відомостей про застосування азосполук ЦА для ВА визначення. У зв'язку з цим ми провели СФ дослідження для того щоб уточнити умови діазотування ЦА та подальшого його власного азосполучення.

Таблиця 3.9 – Умови СФ визначення ЦЕФТР за реакцією власного азосполучення.

Реагент	Середовище	λ , нм	Межі визначуваних концентрацій; C_{\min}
NaNO ₂ [138]	Водний розчин цефтріаксон + 0,2 мл 1% цитратної кислоти + 0,2 мл 0,5% розчину натрій нітриту при кімнатній температурі	500	12,5-200 мкг/мл; 10 мкг/мл
NaNO ₂ [147]	0,5–1,5 мл 1 мг/мл розчину цефтріаксону, 1 мл 0,1% розчину NaNO ₂ , 1 мл 0,5 М розчину HCl → витримують протягом 10 хв при кімнатній температурі, 1 мл 2% розчину NaOH	559	7,5 мкг/мл

3.3.1 Уточнення умов азосполучення молекул діазотованого ЦЕФТР

Спектри світлопоглинання діазотованого цефтріаксону в залежності від кислотності середовища.

Дослідження взаємодії діазотованого цефтріаксону залежно від рН середовища наведено на рис. 3.46.

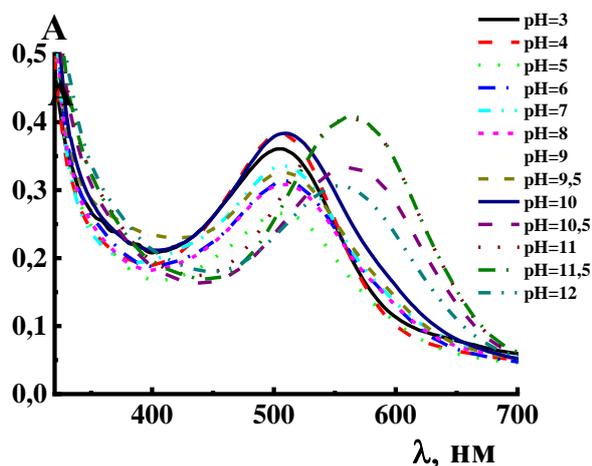


Рисунок 3.46 – Електронні спектри світлопоглинання розчинів діазотованого цефтріаксону залежно від кислотності середовища. $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $l = 1 \text{ см}$

Як видно з рис. 3.46, на спектрах діазотованого цефтріаксону в ділянці рН від 3 до 10 спостерігається інтенсивний максимум за $\lambda = 505 \text{ нм}$. В лужній ділянці за $\text{pH} > 10,5$ цей максимум батохромно зсувається до $\lambda = 560 \text{ нм}$ і стає більш інтенсивним. Можна припустити, що це пов'язано із переходом протонованої форми утвореної азосполуки в депротоновану (кетто-енольна таутомерія в молекулі ЦЕФТР). При цьому вишневе забарвлення змінюється на фіолетове, що пов'язано із зміною хромофорної системи молекули продукту азосполучення цефтріаксону. Крім того величина аналітичного сигналу при цьому зростає, тому за таких умов в лужному середовищі (рН 11,0) можливе чутливіше визначення цефтріаксону.

Залежність виходу діазосоли цефтріаксону від природи та концентрації кислот

Для встановлення оптимальних умов взаємодії компонентів системи було досліджено вплив концентрації хлоридної, сульфатної, фосфатної та ацетатної кислот на вихід діазосоли та утворення продукту азосполучення. Одержані результати представлені на рис. 3.47.

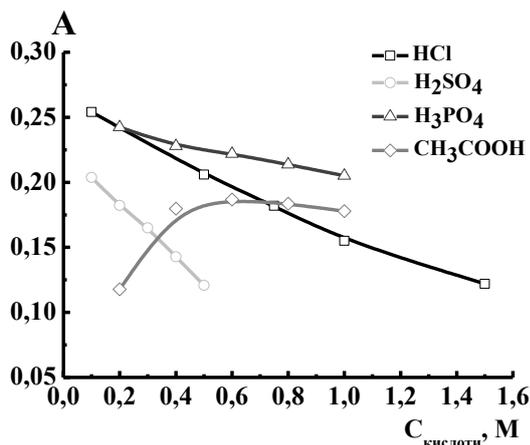


Рисунок 3.47 – Залежність оптичної густини розчину діазотованого цефтріаксону від природи та концентрації кислот (хлоридної, сульфатної, ацетатної, фосфатної), які використовували для діазотування. Умови діазотування: $C_{\text{ЦЕФТ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$; $\lambda = 560 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Як показали результати досліджень максимальний вихід кінцевого продукту азосполучення молекул цефтріаксону між собою спостерігається, якщо діазотування проводити в середовищі хлоридної та фосфатної кислот з концентрацією 0,1 М. Використання сульфатної та ацетатної кислот не дозволяє отримати максимальну кількість діазосолі цефтріаксону. Спираючись на отримані експериментальні результати ми обрали для наступних досліджень діазотування в середовищі 0,1 М хлоридної кислоти.

Вплив концентрації діазотуючого реагенту натрій нітриту на вихід солі діазонію цефтріаксону.

Також було досліджено вплив концентрації натрій нітриту, як діазотуючого реагента, на вихід діазосолі цефтріаксону (рис. 3.48).

Як показали результати досліджень, наведені на рис. 3.48 оптимальним є використання натрій нітриту з концентрацією $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, тобто п'ятикратний його надлишок відносно концентрації цефтріаксону.

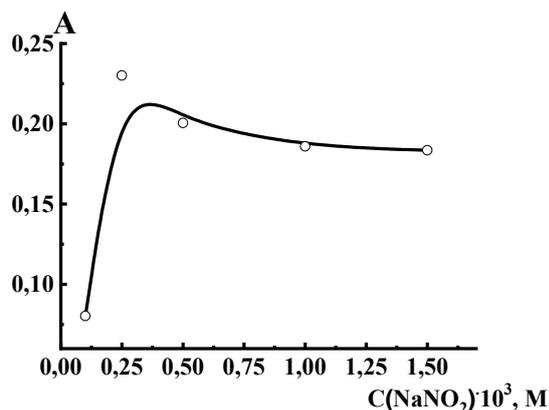


Рисунок 3.48 – Залежність оптичної густини розчину діазотованого ЦЕФТР від концентрації натрій нітриту, який використовували для діазотування. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$; $\lambda = 560 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$.

Вплив тривалості діазотування цефтріаксону на вихід його азосполуки в лужному середовищі.

Для досягнення максимальних виходів ЦЕФТ було досліджено тривалість діазотування (рис. 3.49).

Встановлено, що діазотування ЦЕФТР доцільно проводити впродовж 25 хв, адже в такому випадку спостерігається максимальне світлопоглинання розчину продукту власного азосполучення (рис. 3.49).

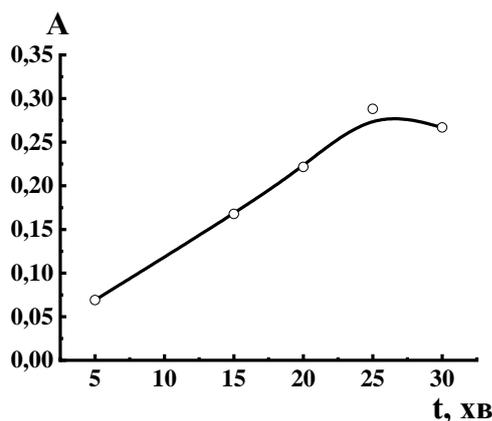


Рисунок 3.49 – Вплив тривалості реакції діазотування на світлопоглинання кінцевого продукту власного азосполучення ЦЕФТР. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$; $\lambda = 560 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$.

Стабільність світлопоглинання продукту азосполучення діазосоли цефтріаксону між собою

Для розробки методики визначення важливе значення має стійкість у часі аналітичної форми. Тому було досліджено стабільність світлопоглинання утворених продуктів власного азосполучення діазотованого ЦЕФТР.

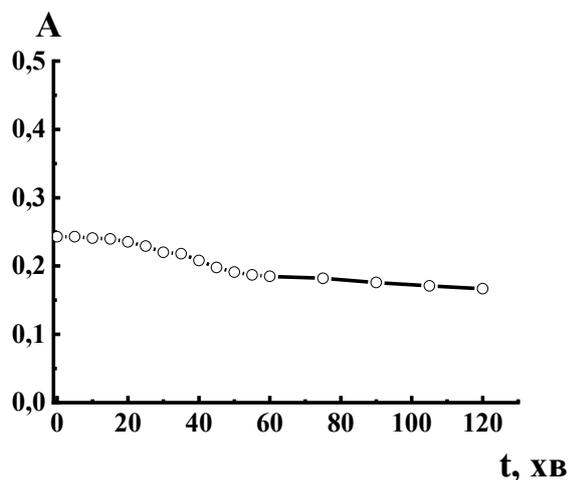


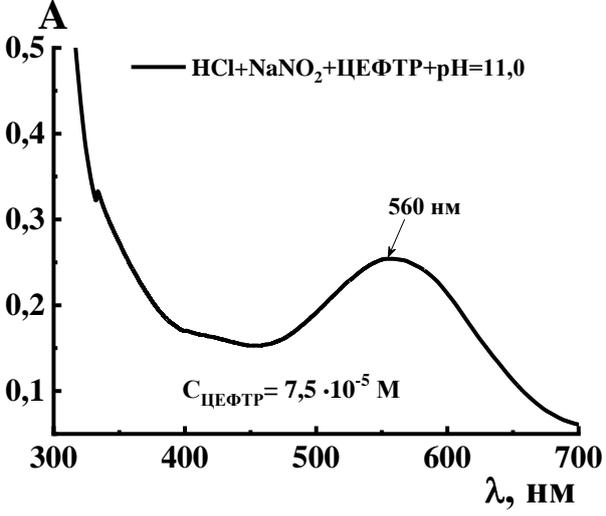
Рисунок 3.50 – Дослідження стабільності світлопоглинання продукту власного азосполучення ЦЕФТР. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$; $\lambda = 560 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Як показали результати досліджень (рис. 3.50) аналітичний сигнал характерний для продуктів взаємодії діазотованого ЦЕФТР у лужному середовищі при $\text{pH} 11,0$ залишається стабільним впродовж 20 хвилин. Цього часу є достатньо для проведення необхідних вимірювань аналітичного сигналу та визначення вмісту аналіту. Далі оптична густина розчину незначно знижується через повільний гідроліз цефтріаксону в лужному середовищі. Тому при використанні цієї реакції для визначення ЦЕФТР потрібно чітко дотримуватись однакового часового інтервалу при вимірюванні аналітичного сигналу.

Обчислення спектрофотометричних характеристик продукту власного азосполучення діазотованого ЦЕФТР.

Загалом усі оптимальні умови діазотування та власного азосполучення цефтріаксону, а також ефективний молярний коефіцієнт світлопоглинання обрахований на основі даних спектрів світлопоглинання азосполуки ЦЕФТР отриманої в оптимальних умовах наведено в табл. 3.10.

Таблиця 3.10 – Оптимальні умови отримання та спектрофотометричні характеристики сполуки власного азосполучення цефтріаксону

Діазотування	C(HCl)=0,1 М, ≥ 5 -кратний надлишок NaNO ₂ до ЦЕФТР впродовж 25 хв	
Азосполучення	Лужне середовище, рН=10,5	
 <p>$\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ нм}$</p> <p>Стабільність аналітичного сигналу – 5 хв</p>		 <p>Електронні спектри світлопоглинання розчинів продуктів власного азосполучення ЦЕФТР</p> <p>$\epsilon_{560}(\text{ЦЕФТР}+\text{NaNO}_2) = (3,36 \pm 0,15) \cdot 10^3, \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$</p>

Як видно зі значень ефективних молярних коефіцієнтів (табл. 3.8, 3.11) молярний коефіцієнт азопродукту власного азосполучення ЦЕФТР вдвічі менший за молярні коефіцієнти азосполук ЦЕФТР із фенольними реагентами 8-Окс та 2-Мет. Це вказує на вищу чутливість розроблених нами методик.

З результатів описаних у цьому розділі можна зробити висновки:

- Показано, що β -лактамний антибіотик амоксицилін та тетрацикліновий антибіотик окситетрациклін, які містять фенольний гідроксил у своїх структурах азосполучаються із діазотованими сульфаніламідом, сульфатіазолом та фуксином відповідно (реагенти із первинною ароматичною аміногрупою) з утворенням кольорових продуктів. ОТЦ утворює забарвлену азосполуку із 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою. Одержано ЕСП кольорових азосполук, на яких простежуються максимуми світлопоглинання: для сполуки АМ–САМ – 445 нм, АМ–СТЗ – 448 нм, ОТЦ–Фукс – 440 нм, ОТЦ–ДНСК – 470 нм.

- Експериментально з'ясовано оптимальні умови отримання діазосолей реагентів САМ та СТЗ для подальшого азосполучення із АМ; Фукс – для азосполучення із ОТЦ: природу та концентрацію кислоти (0,6–1,0 М хлоридна кислота), концентрацію діазотуючого реагенту (10–15-кратний надлишок відносно концентрації реагента), тривалість реакції діазотування (10–20 хв). Досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей реагентів з антибіотиками – кислотність середовища (для САМ, СТЗ, Фукс – рН 10,5, ДНСК (визначення ОТЦ) в середовищі 10,0 М NaOH), надлишок реагенту (для САМ та СТЗ – 5-кратний стосовно АМ, для Фукс – 1,33-кратний надл. ОТЦ, для ДНСК – 2,5-кратний стосовно ОТЦ), вплив природи та концентрації буферного розчину (для сполук АМ–САМ (СТЗ) – 0,1 М розчин натрій тетрабарату, для ОТЦ–Фукс – 0,01 М розчин УБС), стійкість утворених азосполук: АМ–САМ (СТЗ) – 10 хв; ОТЦ–Фукс – 3 год, ОТЦ–ДНСК – 10 хв. Встановлено, що для досліджуваних систем АМ та ОТЦ непрореагований натрій нітрит недоцільно усувати з реакційного середовища.
- обчислено значення ефективних молярних коефіцієнтів світлопоглинання азосполук: для системи АМ–САМ – $\epsilon_{445} = (1,74 \pm 0,04) \cdot 10^4$, АМ–СТЗ – $\epsilon_{448} = (1,97 \pm 0,08) \cdot 10^4$, ОТЦ–Фукс – $\epsilon_{440} = (3,14 \pm 0,05) \cdot 10^4$, ОТЦ–ДНСК – $\epsilon_{470} = (3,0 \pm 0,15) \cdot 10^3$. Встановлено, що на чутливість визначення впливає як будова АН, так і реагентів.
- Показано, що цефалоспоринові антибіотики (ЦЕФТ і ЦЕФТР), що містять первинну гетероароматичну аміногрупу у своїй структурі після їх діазотування азосполучаються із фенольними реагентами (8-оксихіноліном, 2-метилфенолом, резорцином) з утворення забарвлених азопродуктів. Отримано ЕСП кольорових азосполук, на яких наявні максимуми світлопоглинання: для сполуки ЦЕФТ–8-Окс – 553 нм, ЦЕФТ–2-Мет – 516 нм, ЦЕФТ–Рез – 519 нм, ЦЕФТР–8-Окс – 550 нм, ЦЕФТР–2-Мет – 516 нм.
- Оптимізовано умови отримання діазосолей ЦЕФТ та ЦЕФТР – концентрація хлоридної кислоти (12,0 М), концентрація діазотуючого реагенту (10-кратний надлишок відносно концентрації антибіотика). Досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей ЦА з фенольними

реагентами – кислотність середовища (кінцева концентрація $\text{NaOH}=0,16 \text{ M}$), надлишок реагенту (для систем 8-Окс–ЦЕФТ та 8-Окс–ЦЕФТР 7-кратний; для Рез–ЦЕФТ, 2-Мет–ЦЕФТ, 2-Мет–ЦЕФТР – 10-кратний). Показано, що утворені азосполуки ЦЕФТ–8-Окс (Рез, 2-Мет) та ЦЕФТР–8-Окс (2-Мет) стійкі у розчині впродовж 1 год. Встановлено, що лише у випадку азосполуки ЦЕФТ–8-Окс необхідно усувати надлишок нітрит-іонів сульфаміновою кислотою, у всіх інших випадках наявність натрій нітриту підвищує аналітичний сигнал.

- обчислено значення ефективних молярних коефіцієнтів світлопоглинання азосполук: для системи ЦЕФТ–8-Окс – $\varepsilon_{553}=(6,30\pm 0,12)\cdot 10^3$, ЦЕФТ–2-Мет – $\varepsilon_{516}=(6,40\pm 0,11)\cdot 10^3$, ЦЕФТ–Рез – $\varepsilon_{519}=(6,70\pm 0,13)\cdot 10^3$, ЦЕФТР–8-Окс – $\varepsilon_{550}=(6,80\pm 0,19)\cdot 10^3$. ЦЕФТР–2-Мет – $\varepsilon_{516}=(6,90\pm 0,16)\cdot 10^3$. Встановлено, що чутливість визначення ЦА за допомогою 8-Окс, 2-Мет та Рез є однаковою.
- уточнено оптимальні умови утворення продукту власного азосполучення діазотованого ЦЕФТР (азоіміносполуки). Діазотування ЦЕФТР відбувається в середовищі 0,1М хлоридної кислоти під дією 5-кратного надлишку натрій нітриту впродовж 25 хв; продукт власного азосполучення утворюється за $\text{pH}=10,5$. Максимум світлопоглинання на спектрі азоіміносполуки спостерігається за $\lambda_{\text{max}}=560 \text{ нм}$, $\varepsilon_{560}=(3,36\pm 0,15)\cdot 10^3 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.
- методами спектрофотометрії та вольтамперометрії із швидкою розгорткою потенціалу досліджено, що в структуру отриманих азосполук АН за умов наявності непрореагованого натрій нітриту впроваджується нітрузо-група, яка відіграє роль ауксохрома, що підсилює інтенсивність світлопоглинання хромофорної системи утворених продуктів та спричинює появу нового піку на вольтамперограмах розчинів азосполук.
- запропоновано імовірні схеми та структури утворених продуктів азосполучення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ та ЦЕФТР з відповідними реагентами.

РОЗДІЛ 4

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ,
ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ АЗОСПОЛУЧЕННЯ З
ПЕРВИННИМИ АРОМАТИЧНИМИ АМІНАМИ ТА ЦЕФТАЗИДИМУ,
ЦЕФТРІАКСОНУ – З ФЕНОЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ**

Згідно даних щодо одержання забарвлених азосполук амоксициліну з сульфаніламидами; окситетрацикліну з фуксином та ДНСК; цефтазидиму з 8-оксихіноліном, 2-метилфенолом та резорцином, цефтріаксону з 8-оксихіноліном та 2-метилфенолом, наведених у розділі 3, нами запропоновано методики визначення антибіотиків з досліджуваними реагентами [221, 222, 227, 230, 231].

4.1 Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення антибіотиків з реагентами

Встановлено, що аналітичний сигнал в розчинах азосполук на основі систем АМ–САМ, АМ–СТЗ, ОТЦ–Фукс, ОТЦ–ДНСК, ЦЕФТ–8-Окс, ЦЕФТ–Рез, ЦЕФТ–2-Мет, ЦЕФТР–8-Окс, ЦЕФТР–2-Мет при визначенні АН амоксициліну, окситетрацикліну, цефтазидиму та цефтріаксону, лінійно залежить від концентрації аналіту у розчині [336, 337]. Метрологічні характеристики розроблених методик СФ визначення АМ з сульфаніламидами, ОТЦ з фуксином та ДНСК, ЦА з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом та власного азосполучення ЦЕФТР наведено у табл. 4.1-4.5.

Таблиця 4.1 – Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення АМ з використанням САМ та СТЗ, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{HCl}}=0,7 \text{ М}$, $C_{\text{СТЗ}}=1,9 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaNO}_2}=2,9 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $l=1 \text{ см}$.

Реагент	Лінійність $C_{\text{АМ}}$, мкг/мл	Рівняння графіка C , мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
САМ	1,3 – 32,9	$\Delta A_{445} = -0,071 + 0,059 \cdot C$	$1,1 \cdot 10^{-6}$ (0,40)	$3,60 \cdot 10^{-6}$ (1,32)	0,9987
СТЗ	0,7 – 27,4	$\Delta A_{448} = 0,043 + 0,056 \cdot C$	$6,0 \cdot 10^{-7}$ (0,23)	$2,10 \cdot 10^{-6}$ (0,76)	0,9990

Таблиця 4.2 – Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ОТЦ з використанням Фукс та ДНСК, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування Фукс: $C_{\text{HCl}}=1,0 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}}=8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}}=10 \text{ хв.}$ Умови азосполучення з Фукс: $C_{\text{УБС}}=0,01 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$. Умови азосполучення з ДНСК: $C_{\text{ДНСК}}=7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=10,0 \text{ M}$; $l=1 \text{ см}$

Реагент	Лінійність $C_{\text{ОТЦ}}$, мкг/мл	Рівняння графіка C , мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
Фукс	5,0 – 42,2	$\Delta A_{440}=0,003+0,023 \cdot C$	$3,17 \cdot 10^{-6}$ (1,46)	$1,51 \cdot 10^{-6}$ (4,38)	0,9989
ДНСК	12,4 – 198,6	$\Delta A_{470}=0,011+0,006 \cdot C$	$1,11 \cdot 10^{-5}$ (5,12)	$3,34 \cdot 10^{-5}$ (15,37)	0,9994

Таблиця 4.3 – Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТ з використанням 8-Окс, Рез та 2-Мет, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=2,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}}=5 \text{ хв.}$ Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{Рез}}=1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-мет}}=1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$; $l=1 \text{ см.}$

Реагент	Лінійність $C_{\text{ЦЕФТ}}$, мкг/мл	Рівняння графіка C , мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
8-Окс	3,8 – 191,3	$\Delta A_{553}=0,052+0,009 \cdot C$	$1,81 \cdot 10^{-6}$ (0,99)	$5,43 \cdot 10^{-6}$ (2,97)	0,9983
Рез	2,75 – 185,5	$\Delta A_{519}=0,027+0,007 \cdot C$	$1,54 \cdot 10^{-6}$ (0,84)	$4,65 \cdot 10^{-6}$ (2,54)	0,9993
2-Мет	0,32 – 191,3	$\Delta A_{516}=0,062+0,005 \cdot C$	$5,70 \cdot 10^{-7}$ (0,31)	$1,70 \cdot 10^{-6}$ (0,93)	0,9987

Таблиця 4.4 – Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТР за продуктом власного азосполучення. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,1 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $\text{pH}=11,0$; $l=1 \text{ см.}$

Лінійність $C_{\text{ЦЕФТ}}$, мкг/мл	Рівняння графіка C , мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
5,5 – 55,5	$\Delta A_{560}=0,048+0,006 \cdot C$	$2,40 \cdot 10^{-6}$ (1,33)	$7,92 \cdot 10^{-6}$ (4,39)	0,9988

Таблиця 4.5 – Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ЦЕФТР з використанням 8-Окс та 2-Мет, $n = 5$, $P = 0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}= 2,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}= 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-мет}}=9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$.

Реагент	Лінійність $C_{\text{ЦЕФТР}}$ мкг/мл	Рівняння графіка C мкг/мл	C_{min} , М (мкг/мл)	C_{H} , М (мкг/мл)	R
8-Окс	0,35 – 31,05	$\Delta A_{550}=0,083+0,028 \cdot C$	$5,92 \cdot 10^{-7}$ (0,33)	$1,79 \cdot 10^{-6}$ (0,99)	0,9993
	31,05 – 94,28	$\Delta A_{550}=0,846+0,012 \cdot C$			0,9993
2-Мет	0,21 – 51,30	$\Delta A_{516}=0,009+0,019 \cdot C$	$4,30 \cdot 10^{-7}$ (0,22)	$1,42 \cdot 10^{-6}$ (0,79)	0,9995

Розроблені нами методики спектрофотометричного визначення АН амоксициліну, окситетрацикліну, цефтазидиму та цефтріаксону характеризуються широкими інтервалами визначуваних концентрацій (в межах 1–1,5 концентраційних порядки аналіту), високою відтворюваністю та експресністю. Загалом процедури визначення АН триває від 10 до 30 хвили в залежності від антибіотика та реагента. За чутливістю розроблені методики є співмірними з відомими методиками спектрофотометричного визначення досліджуваних антибіотиків (Додаток Б, табл. Б4–Б7).

Методика визначення амоксициліну з сульфаніламідом

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,6 М хлоридної кислоти, додають 2,0 мл $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ розчину сульфаніламідом, додають 1,75 мл 0,1 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв за кімнатної температури, додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 1,3 – 32,9 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 10,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda = 445 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$. Концентрацію АМ знаходять методом градуувального графіка або способом порівняння.

Методика визначення амоксициліну з сульфатіазолом

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,7 М хлоридної кислоти, додають 2,0 мл $4,5 \cdot 10^{-3}$ М розчину сульфатіазолу, додають 1,75 мл 0,1 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв за кімнатної температури, додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 0,7–27,4 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 10,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda = 448$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію АМ знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення окситетрацикліну з фуксином

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 1,0 М хлоридної кислоти, додають 0,85 мл $1,9 \cdot 10^{-3}$ М розчину фуксину, додають 1,0 мл $2,0 \cdot 10^{-2}$ М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 10 хв за кімнатної температури, додають аліквоту досліджуваного розчину окситетрацикліну в межах 5,0–42,0 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 0,63 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 відносно холостого розчину проводять за $\lambda = 440$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію окситетрацикліну знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення окситетрацикліну з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять аліквоту досліджуваного розчину окситетрацикліну в межах 12,5–198,5 мкг/мл (кінцева концентрація), додають 5,0 мл 10,0 М розчину натрій гідроксиду та 10,0 мл $1,9 \cdot 10^{-3}$ М розчину ДНСК. Розчин доводять до мітки дистильованою водою та перемішують. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого

розчину проводять за $\lambda=470$ нм, $l=1$ см. Концентрацію окситетрацикліну знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення цефтазидиму з 8-оксихіноліном

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтазидиму в межах 3,8–191,3 мкг/мл, вносять 0,5 мл 12,0 М НСІ та 1,5 мл 0,06 М розчину NaNO_2 , додають 1,5 мл 0,09 М розчину сульфамінової кислоти, додають 2,5 мл $1,25 \cdot 10^{-2}$ М розчину 8-оксихіноліну приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda_{\text{макс}} = 553$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтазидиму знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення цефтазидиму з резорцином

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтазидиму в межах 2,75 – 185,5 мкг/мл (кінцева концентрація) вносять 0,5 мл 12,0М хлоридної кислоти, 1,4 мл 0,06 М розчину натрій нітриту, додають 2,5 мл $3,4 \cdot 10^{-2}$ М розчину резорцину приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda=519$ нм, $l=1$ см. Концентрацію цефтазидиму знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення цефтазидиму з 2-метилфенолом.

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтазидиму в межах 0,32–191,3 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 0,5 мл 12,0 М НСІ та 0,06 М розчину NaNO_2 , далі додають 2,5 мл $1,3 \cdot 10^{-2}$ М розчину 2-метилфенолу приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda_{\text{макс}} = 516$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтазидиму знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення цефтріаксону за продукт власного азосполучення

До мірної колби об'ємом 25,0 мл послідовно вводять 1,0 мл 0,1 М розчину НСІ, аліквотну частину досліджуваного розчину, що містить 5,5–55,5 мг цефтріаксону, додають 1,5 мл 0,01 М розчину NaNO₂. Отриману суміш перемішують і витримують за кімнатної температури впродовж 25 хв, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН=11,0. Доводять вміст колби до мітки дистильованою водою і розчин перемішують. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda=560$ нм, $l=1$ см. Концентрацію цефтріаксону знаходять методом градуювального графіка або способом порівняння.

Методика визначення цефтріаксону з 8-оксихіноліном

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтріаксону в межах 0,35 – 94,28 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 0,5 мл 12,0 М НСІ та 1,5 мл 0,06 М розчину NaNO₂, додають 2,5 мл $3,0 \cdot 10^{-2}$ М розчину 8-оксихіноліну приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda_{\text{макс}} = 550$ нм, $l = 1$ см. Концентрацію цефтріаксону знаходять способом порівняння, або за допомогою градуювального графіка.

Методика визначення цефтріаксону 2-метилфенолом

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додають аліквоту досліджуваного розчину цефтріаксону в межах 0,21–51,30 мкг/мл (кінцева концентрація) вносять 0,5 мл 12,0М хлоридної кислоти, 2,5 мл $9,3 \cdot 10^{-3}$ М розчину натрій нітриту, додають 2,5 мл $4,6 \cdot 10^{-3}$ М розчину 2-метилфенолу приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda=516$ нм, $l=1$ см. Концентрацію цефтріаксону знаходять способом порівняння, або за допомогою градуювального графіка.

4.2 Специфічність спектрофотометричного визначення амоксициліну та окситетрацикліну з первинними ароматичними амінами, цефтазидиму та цефтріаксону з фенольними сполуками за наявності допоміжних та діючих речовин

Препарати на основі антибіотика АМ випускають у лікарській формі таблеток, розчинів для ін'єкцій, порошку та суспензії. Ветеринарні та лікарські препарати ОТЦ випускають у формі таблеток, порошків, розчинів для ін'єкцій та мазі. Цефалоспоринові антибіотики ЦЕФТ та ЦЕФТР випускають лише у формі порошку для приготування розчину для ін'єкцій. Для отримання зазначених лікарських форм використовують допоміжні речовини – сполуки природного і синтетичного походження, які використовують в процесі отримання ліків як фармакокінетично обгрунтовані фізико-хімічні системи. Їх поділяють на наповнювачі, консерванти та стабілізатори, які, як правило, не впливають на діючі речовини, однак можуть заважати визначення їх вмісту за допомогою окремих реакцій. Тому для розроблення нової методики визначення діючих речовин необхідним етапом є дослідження впливу усіх компонентів лікарських форм на вибіркковість взаємодії діючої речовини з реагентом.

Препарати на основі ЦА не випускають у комбінованих формах. Серед усіх лікарських та ветеринарних препаратів амоксициліну та окситетрацикліну частину займають комбіновані лікарські препарати, які у своєму складі крім АМ або ОТЦ містять ще одну або декілька діючих речовин. Нами було досліджено вплив цих біологічно-активних речовин на визначення АН з досліджуваними реагентами. Була перевірена також селективність розроблених методик для сумішей, які містили діючі речовини у кількостях, що значно перевищували можливий їх вміст у лікарських засобах. Керуючись аналітично-нормативною документацією на препарати, критерієм селективності визначення ми обрали незмінність світлопоглинання розчинів отриманих продуктів реакції у межах 5%. Результати досліджень наведені в таблицях 4.6 – 4.8.

Таблиця 4.6 – Результати визначення АМ з САМ, СТЗ за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей діючих та допоміжних речовин. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$, $C_{\text{САМ}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 3,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$, $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,7 \text{ M}$, $C_{\text{СТЗ}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 3,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Допоміжні речовини	$v(\text{АМ}) : v(\text{P})^1$	$v(\text{АМ}) : v(\text{P})^2$	АМ-САМ	АМ-СТЗ
			Знайдений вміст АМ, %,	Знайдений вміст АМ, %,
Клавуланова кислота (діюча речовина)	1: 0,25	1: 0,3 Заважає визначенню	96,2±1,6	100,5±1,4
Натрій бензоат	1:0,03	1:100	99,5±1,2	94,5±1,3
Крохмаль*	1:0,5	1:50	100,4±1,2	100,1±1,5
Магній стеарат*	1:0,3	1:0,3 [^]	100,4±1,7	100,1±1,9
Натрій крохмаль гліколят тип А*	1:0,47	1:10	96,4±1,9	97,2±1,5
Кальцій стеарат*	1:0,015	1:10	99,6±1,9	98,9±2,1
Повідон*	1:0,03	1:50	100,4±1,6	100,1±1,6
Бутилгідрокситолуен	1:0,007	1:10	95,5±1,6	97,8±1,5
Алюміній моностеарат*	1:0,1	1:2	99,2±2,0	99,6±1,8
Бензиловий спирт	1:0,07	1:0,5	95,4±2,0	96,4±2,1
Кокосова олія*	1:0,007	1:0,007	94,6±2,1	94,2±2,3

1 – мольні співвідношення АМ та допоміжних речовин у ліках.

2 – максимальні мольні співвідношення АМ та досліджуваних допоміжних речовин.

* – компоненти не розчинні в умовах експерименту, вилучалися на етапі фільтрування.

[^] – вищі концентрації не досліджувались.

Як видно з даних табл. 4.6 взаємодії АМ з усіма реагентами не заважає натрій бензоат у кількостях набагато більших, ніж ті, що містяться у лікарських препаратах [221]. Було досліджено вплив крохмалю та магній стеарату на визначення АМ і не виявлено його заважаючої дії, оскільки дані речовини нерозчинні за умов проведення аналізу, тому легко вилучаються з системи фільтруванням на етапі пробопідготовки. Наявність у системі клавуланової кислоти у кількостях, які використовуються у лікарських засобах не заважає визначенню АМ за допомогою розроблених методик. Однак, якщо концентрація клавуланової кислоти перевищує її вміст у ліках вдічі, то в такому випадку вона заважає визначенню амоксицициліну, оскільки підвищує аналітичний сигнал.

Таблиця 4.7 – Результати визначення ОТЦ з фуксином та ДНСК за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей діючих речовин, наповнювачів та консервантів. $n=5$; $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}} = 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 0,01 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ДНСК}} = 2,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Діючі речовини, наповнювачі та консерванти	$\nu(\text{ОТЦ}) :$ $\nu(\text{P})^1$	$\nu(\text{ОТЦ}) :$ $\nu(\text{P})^2$	Окс–ДНСК	Окс–Фукс
			Знайдений вміст ОТЦ, %,	Знайдений вміст ОТЦ, %,
Норсульфазол	1:3,5	1:10 [^]	100,0±5,4	–
Триметоприм	1:1,1	1:5 [^]	99,4±5,9	99,1±4,9
MgCl ₂	1:4,9	–	–	–
Поліетиленгліколь-400	1:0,24	1:0,5	100,9±4,1	98,6±2,1
Бензиловий спирт	1:0,046	1:0,065	100,9±5,9	98,7±4,8

1 – мольні співвідношення ОТЦ та діючих і допоміжних речовин у ліках.

2 – максимальні мольні співвідношення ОТЦ та досліджуваних діючих і допоміжних речовин.

– – заважають визначенню.

[^] – вищі концентрації не досліджувались.

Як видно з даних табл. 4.7 взаємодії ОТЦ з обома реагентами заважає магній хлорид, він підвищує сигнал, оскільки утворює комплексну сполуку із окситетрацикліном, інші допоміжні речовини та досліджувані діючі речовини не заважають у кількостях більших, ніж ті, що містяться у лікарських препаратах.

Таблиця 4.8 – Результати визначення цефалоспоринів з 8-оксихіноліном, резорцином та 2-метилфенолом за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей Na_2CO_3 . $n=5$; $P=0,95$; Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{СК}}=1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{2\text{-Мет}}=7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Рез}}=1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$. Умови діазотування: $C_{\text{ЦЕФТР}}=7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}}=5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-мет}}=9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$; $l=1 \text{ см}$.

$v(\text{AM}) : v(\text{P})^1$	$v(\text{AM}) : v(\text{P})^2$	АН + 8-Окс	АН + 2-Мет	АН + Рез
		Знайдений вміст АН, %	Знайдений вміст АН, %	Знайдений вміст АН, %
Цефтазидим				
1:0,06	1: 18	100,9±3,8	99,98±4,0	100,1±3,4
Цефтріаксон				
1: 0,06	1: 18	100,8±4,1	100,5±3,7	?

1 – мольні співвідношення ЦА та допоміжних речовин у ліках

2–максимальні мольні співвідношення ЦА та досліджуваних допоміжних речовин

? – дослідження не проводилися.

Для отримання лікарських форм ЦА як допоміжну речовину використовують безводний натрій карбонат. Співвідношення ЦЕФТ до натрій карботу у ліках є 1:0,06. Ми провели дослідження впливу різних надлишків натрій карбонату на кількісне визначення ЦЕФТ та ЦЕФТР з фенольними реагентами 8-Окс, 2-Мет та Рез (табл. 4.8). Згідно із результатами експерименту навіть 18-кратний надлишок натрій карбонату не заважає кількісному визначенню цефалоспоринових антибіотиків [230, 231].

4.3 Спектрофотометричне визначення антибіотиків у модельних розчинах

Правильність розроблених спектрофотометричних методик визначення АМ з СА, ОТЦ з фуксином та ДНСК, ЦЕФТ з 8-Окс, 2-Мет та Рез, ЦЕФТР з 8-Окс та 2-Мет перевіряли при аналізі модельних розчинів, що містили відповідні антибіотики способом “введено-знайдено”. Результати досліджень наведено у табл. 4.9

Таблиця 4.9 – Результати спектрофотометричного визначення АМ з САМ та СТЗ; ОТЦ з Фукс та ДНСК; ЦЕФТ з 8-Окс, Рез та 2-Мет; ЦЕФТР з 8-Окс та 2-Мет у модельних розчинах, $n=5$, $P=0,95$

АМ: Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$;

Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,7 \text{ М}$, $C_{\text{СТЗ}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 5,6 \cdot 10^{-3} \text{ М}$;

Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

ОТЦ: Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ М}$, $C_{\text{Фукс}} = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$;

Умови азосполучення: $C_{\text{УБС}} = 0,01 \text{ М}$, $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

Умови азосполучення: $C_{\text{ДНСК}} = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{ОТЦ}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ М}$;

$\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

ЦЕФТ: Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{\text{СК}} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$;

Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{2\text{-Мет}} = 7,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{Рез}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$,

$C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$; $\lambda_{\text{max}(8\text{-Окс})} = 553 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}(2\text{-Мет})} = 516 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}(\text{Рез})} = 519 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

ЦЕФТР: Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 9,25 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$.

Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{2\text{-Мет}} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$;

$\lambda_{\text{max}(8\text{-Окс})} = 550 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}(2\text{-Мет})} = 516 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

Реагент	Внесено, мкг/мл	Знайдено АН $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$, мкг/мл	S_r
1	2	3	4
Амоксицилін			
САМ	9,0	$9,2 \pm 0,5$	0,041
СТЗ	18,50	$18,6 \pm 0,5$	0,022
Окситетрациклін			
Фуксин	19,86	$19,6 \pm 0,4$	0,017
ДНСК	99,3	$99,4 \pm 1,0$	0,008

Продовження таблиці 4.9

1	2	3	4
Цефтазидим			
8-Оксихінолін	66,0	$66,01 \pm 0,19$	0,002
2-Метилфенол	66,0	$66,0 \pm 0,8$	0,009
Резорцин	16,0	$15,7 \pm 0,8$	0,039
Цефтріаксон			
8-Оксихінолін	66,0	$65,57 \pm 0,28$	0,003
2-Метилфенол	15,0	$15,14 \pm 0,27$	0,014

Як видно з результатів наведених в табл. 4.9, одержані дані добре корелюють із введеною кількістю антибіотиків у модельних розчинах в межах похибки спектрофотометричного методу. Отримані результати вказують на те, що розроблені методики визначення амоксициліну, окситетрацикліну, цефтазидиму та цефтріаксону за допомогою досліджуваних реагентів можуть бути використані для аналізу готових лікарських препаратів.

4.4 Спектрофотометричне визначення амоксициліну у водопровідній воді

У зв'язку із масовим виробництвом АН на фармацевтичних підприємствах та їх неконтрольованим використанням у сільському господарстві є великий ризик потрапляння антибіотиків у навколишнє середовище зі стічними водами після очищення виробничих ліній на фармацевтичних виробництвах та стоками тваринницьких ферм. Саме з цієї причини як об'єкт досліджень ми обрали водопровідну воду, як найпростішу модельну систему. Важливим завданням було встановити як компоненти водопровідної води будуть впливати на визначення АМ із СА. Оскільки АМ у зразках водопровідної води не виявлено, його було внесено власноруч. Визначення проводили з використанням методу градуйованого графіка. Результати досліджень наведено в табл. 4.10

Таблиця 4.10 Визначення амоксициліну в зразках дистильованої та водопровідної води з використанням САМ та СТЗ. $n=5$, $P=0,95$, $l=1$ см. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6$ М, $C_{\text{САМ}}=4,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2}=7,2 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1$ М, $\text{pH}=10,5$; $\lambda_{\text{max}}=445$ нм. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,7$ М, $C_{\text{СТЗ}} = 3,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,6 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}= 0,1$ М, $\text{pH}= 10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 448$ нм.

Зразок	Введено АМ, мкг/мл	Знайено АМ, $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$, мкг/мл (S_r)	
		Методика з САМ	Методика з СТЗ
Дистильована вода	9,0	9,1 ± 0,5 (0,044)	9,14 ± 0,12 (0,011)
Водопровідна вода	9,0	9,2 ± 0,3 (0,030)	9,19 ± 0,27 (0,024)

Як показали результати наведені в таблиці 4.9, точність визначення амоксициліну у досліджуваних зразках дистильованої та водопровідної води можна вважати задовільною, оскільки негативний ефект компонентів водопровідної води не спостерігається, а значення відносної похибки не перевищує 3%. Таким чином, розроблені методики визначення амоксициліну із сульфаніламидами можуть бути рекомендовані для контролю вмісту АМ в змивних водах фармацевтичних корпорацій.

4.5 Спектрофотометричне визначення амоксициліну, окситетрацикліну, цефтазидиму та цефтріаксону у лікарських препаратах

Розроблені методики спектрофотометричного визначення АМ, ОТЦ з первинними ароматичними амінами, ЦЕФТ та ЦЕФТР з фенольними сполуками нами успішно використано для встановлення вмісту антибіотиків у одно- та багатокомпонентних лікарських та ветеринарних препаратах різних лікарських форм, а саме: АМ у таблетках, та суспензії; ОТЦ у порошку та розчині для ін'єкцій; ЦЕФТ та ЦЕФТР у порошку для приготування розчинів для ін'єкцій [221, 222, 226,

228, 230, 237]. Результати визначення вмісту антибіотиків у лікарських та ветеринарних засобах наведено в табл. 4.11.–4.12.

Пробопідготовка таблеток “Амоксил” та “Амоксиклав квіктаб” для визначення амоксициліну

У фарфоровій ступці розтирають 20 таблеток до порошку, відбирають наважку порошку, яка містить 250 мг АМ згідно з номінальним вмістом у препараті, вносять до мірної колби об'ємом 50,0 мл, розчиняють вміст в 0,1 М розчині хлоридної кислоти та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником. Для отримання витяжки амоксициліну отриману суміш струшують впродовж 1 год на механічному струшувачі. Далі каламутний розчин 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 5,0 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл доводять об'єм розчину 0,1 М хлоридною кислотою до мітки і перемішують. Робочий розчин містить номінально 250 мкг/мл амоксициліну.

Пробопідготовка порошку для оральної суспензії “Оспамокс” для визначення амоксициліну.

5,1 г порошку змішують з 56,0 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти для отримання 60 мл суспензії в конічній колбі об'ємом 100,0 мл, отриману суміш струшують на механічному струшувачі впродовж 20 хв. Після цього відбирають 5 мл отриманої суспензії при перемішуванні на магнітній мішалці і вносять в мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до мітки розчином 0,1 М хлоридної кислоти. Отриману суміш перемішують впродовж 5 хв і фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості (біла стрічка) у конічну колбу, відкидаючи перші 10–15 мл фільтрату. Отримують розчин із концентрацією ~1,25 мг/мл амоксициліну. Для отримання робочого розчину 12,5 мл фільтрату вносять в мірну колбу об'ємом 25,0 мл та доводять до мітки 0,1 М розчином хлоридної кислоти, ретельно перемішують.

Пробопідготовка суспензії для ін'єкцій "Амоксицилін 15% L.A." для визначення амоксициліну.

1,0 мл препарату змішують з 50 мл 1,5 М розчину хлоридної кислоти в конічній колбі об'ємом 100,0 мл, отриману суміш струшують на механічному струшувачі впродовж 20 хв, пропускають через гідрофобний мембранний тефлоновий фільтр PTFE L з розміром пор 0,45 мкм (відкидаючи перші 10 мл фільтрату). В колбу місткістю 100,0 мл вносять 5,0 мл фільтрату і доводять до мітки розчином 1,5 М хлоридної кислоти ретельно перемішують і використовують як робочий розчин.

Пробопідготовка порошку "Окситетрациклін HCl" для визначення окситетрацикліну

Відбирають наважку порошку, яка містить 15,5 мг ОТЦ згідно з номінальним вмістом у препараті, вносять до мірної колби номінальним об'ємом 25,0 мл, розчиняють вміст в 0,01 М розчині хлоридної кислоти та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником. Отриману суміш перемішують і використовують як робочий розчин.

Пробопідготовка порошку "Бровасептол" для визначення окситетрацикліну

Відбирають наважку порошку, яка містить 15,5 мг ОТЦ згідно з номінальним вмістом у препараті, вносять до мірної колби номінальним об'ємом 25,0 мл, додають 0,01 М розчин хлоридної кислоти для отримання витяжки окситетрацикліну, струшують впродовж 1 год на механічному струшувачі. Отриману суміш фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості у конічну колбу, відкидаючи першу порцію розчину об'ємом 5,0 мл. Отриманий фільтрат використовують як робочий розчин.

Пробопідготовка розчину для ін'єкцій "Окси-100" для визначення окситетрацикліну

Аліквоту розчину, яка теоретично містить 100 мг ОТЦ, вносять в мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять до мітки водою, перемішують та використовують як робочий розчин.

Пробопідготовка порошку для визначення цефтріаксону/цефтазидиму в порошках для приготування ін'єкційних розчинів "Цефтріаксон", "ЕМСЕФ", "Цефтазидим", "Денізид"

Наважку порошку цефтріаксону (цефтазидиму), що згідно з номінальним вмістом у препараті містить 1000 мг ЦА вносять до мірної колби об'ємом 100,0 мл, додають 50 мл дистильованої води, перемішують впродовж 10 хвилин та доводять вміст колби до мітки тим же розчинником (вихідний розчин). Готують робочий розчин ЦЕФТР (ЦЕФТ) розведенням вихідного розчину в 10 разів, для цього 5,0 мл отриманого розчину вносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою, перемішують та використовують як робочий розчин.

Таблиця 4.11 – Результати спектрофотометричного визначення АМ з САМ та СТЗ у лікарських препаратах. $n=5$, $P=0,95$, $l=1$ см. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6$ М, $C_{\text{САМ}} = 4,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,2 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$ М, $\text{pH}=10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,7$ М, $C_{\text{СТЗ}} = 3,6 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,6 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$, $\text{pH}=10,5$; $\lambda_{\text{max}} = 448$ нм.

Амоксицилін (регламентований вміст у препараті)	ВЕРХ згідно з аналітичною документацією		Спектрофото- метрично з САМ		Спектрофото- метрично з СТЗ	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
"Амоксил" таблетки, корпорація "Артеріум", ПАТ "Київмедпрепарат", Україна (допоміжні речовини – натрій крохмаль гліколят, повідон, кальцій стеарат)						
Амоксицилін тригідрат (250,0±12,5 г/таблетку)	255,1 ± 1,2	0,004	260,4 ± 1,6	0,005	256,4±4,7	0,016
"Амоксиклав Квіктаб" таблетки, Сандоз, Лек фармацевтична компанія д. д., Словенія (клавуланова 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)	510,6 ± 1,0	0,002	512,5 ± 8,3	0,014	510,30±6,0	0,010

Продовження таблиці 4.11

“Оспамокс” порошок по 5,1 г у флаконі для 60 мл оральної суспензії, Сандоз, ГмБХ-ТехОпс, Австрія (допоміжні речовини – кислота цитратна безводна, натрій бензоат (E211), аспартам (E 951), тальк, тринатрій цитрат безводний, гуарова камедь, кремній діоксид осаджений, лимонний ароматизатор порошкоподібний, персиково-абрикосовий ароматизатор порошкоподібний, апельсиновий ароматизатор порошкоподібний).						
Амоксицилін тригідрат (125,0 мг/5 мл±6,25 мг/5 мл)	121,4 ± 1,03	0,007	120,9 ± 5,9	0,010	125,5 ± 6,2	0,061
Суспензія для ін’єкцій, “Амоксицилін 15% L.A.”, Invesa, Іспанія допоміжні речовини – бутиленгідрокситолуен (1 мг), алюміній моностеарат (15 мг), бензиловий спирт (10 мг), розчинник (рафінована кокосова олія, до 1 мл).						
Амоксицилін тригідрат (150,0 мг±15,0 мг)	150,1 ± 1,2	0,007	150,4± 1,8	0,018	146,4± 3,2	0,027

Таблиця 4.12 – Результати спектрофотометричного визначення ЦЕФТР з 8-Окс, Рез та 2-Мет у лікарських препаратах. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-Мет}}=9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$. $\lambda_{\text{max}(8\text{-Окс})}=550 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{max}(2\text{-Мет})}=516 \text{ нм}$; $l=1 \text{ см}$.

Цефтріаксон (регламентований вміст у препараті – 1г/флакон)	ВЕРХ згідно з аналітичною документацією		Спектрофотометрично з 8-Окс		Спектрофотометрично з 2-Мет	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
“Цефтріаксон”, НСПС Хебейн Хуамін Фармасьютікал Компані Лімітед № 98 Хуан Роад, Китай						
Цефтріаксон 90 – 120% (0,90 – 1,20 г/флакон)	100,11±0,11 (1,001±0,001)	0,001	99,8±0,6 (0,998±0,006)	0,09	98,4±0,4 (0,984±0,04)	0,017
“ЕМСЕФ 1000”, Нектар Лафсайнс Лімітед, Індія						
Цефтріаксон 90 – 120% (0,90 – 1,20 г/флакон)	100,09 ± 0,15 (1,001±0,002)	0,001	99,2 ± 0,9 (0,992±0,01)	0,02	99,1± 1,4 (0,991±0,145)	0,03

Таблиця 4.13 – Результати спектрофотометричного визначення ЦЕФТ з 8-Окс, Рез та 2-Мет у лікарських препаратах. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{СК}}=1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=7,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Рез}}=1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{2\text{-Мет}}=1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}(8\text{-Окс})}=553 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{max}(\text{Рез})}=519 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}(2\text{-Мет})}=516 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

Цефтазидим (регламентований вміст у препараті – 1г/флакон)	ВЕРХ згідно з аналітичною документацією		Спектрофотометрично з 8-Окс		Спектрофотометрично з Рез		Спектрофотометрично з 2-Мет	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r						
“Цефтазидим” Свісс Перентерале Пвт. Лтд, Індія Допоміжна речовина – безводний натрій карбонат : ЦЕФТ \cong 1:9								
Цефтазидим 90 – 120% (0,90 – 1,20 г/флакон)	99,38 \pm 0,12 (0,994 \pm 0,001)	0,003	99,00 \pm 0,39 (0,990 \pm 0,004)	0,01	97,2 \pm 4,1 (0,972 \pm 0,041)	0,04	99,1 \pm 1,2 (0,991 \pm 0,012)	0,01
“Денізид” Свісс Перентерале Пвт. Лтд, Індія Допоміжна речовина – безводний натрій карбонат : ЦЕФТ \cong 1:9								
Цефтазидим 90 – 120% (0,90 – 1,20 г/флакон)	100,77 \pm 0,09 (1,008 \pm 0,001)	0,002	100,2 \pm 0,3 (1,002 \pm 0,003)	0,01	111,0 \pm 3,5 (1,110 \pm 0,035)	0,07	100,3 \pm 1,24 (1,003 \pm 0,012)	0,01

Таблиця 4.14 – Результати спектрофотометричного визначення ОТЦ з Фукс та ДНСК у лікарських препаратах. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=1,0 \text{ M}$, $C_{\text{Фукс}}=6,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{УБС}}=0,01 \text{ M}$, $\text{pH}=10,5$; $\lambda_{\text{max}}=440 \text{ нм}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ДНСК}}=7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=10,0 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}}=470 \text{ нм}$, $l=1 \text{ см}$.

Окситетрациклін гідроохлорид (регламентований вміст у препараті)	Спектрофотометрично за $\lambda=355 \text{ нм}$ згідно зТУ		Спектрофотометрично з ДНСК		Спектрофотометрично з Фуksiном	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
“Окситетрациклін НСІ” порошок НУ НВФ Бровафарма, м. Бровари						
Окситетрациклін (20,0 \pm 2,0 г/флакон)	18,9 \pm 0,2	0,006	19,2 \pm 0,2	0,009	18,4 \pm 0,4	0,017

Продовження таблиці 4.14

“Бровасептол” порошок НУ НВФ Бровафарма, м. Бровари Інші діючі речовини – норсульфазол (80 мг), сульгін (70 мг), триметоприм (30 мг), тилозин тартрат (20 мг)						
Окситетрациклін (45,0±4,5 мг/г)	ВЕРХ		48,3 ± 1,0	0,016	43,1 ± 1,4	0,027
	45,5±0,5	0,009				
“Окси-100” розчин для ін’єкцій Інтерхеми веркен “Де Аделаар” Есті АС, Естонія Допоміжні речовини – спирт бензиловий (1 мг), магній хлорид (200 мг), натрій формальдегідсульфоксилат (5 мг), моноетаноламін, поліетиленгліколь (20 мг), вода для ін’єкцій до 1 мл						
Окситетрациклін (100,0±10 мг/мл)	ВЕРХ		137,0 ± 1,5*	0,009	135,8 ± 1,98*	0,012
	100,8±1,1	0,009				

* – завищені результати

З наведених у табл. 4.11–4.14 даних видно, що визначення вмісту АМ з САМ та СТЗ є селективним та дозволяє визначати амоксицилін у двокомпонентних препаратах. Визначення ОТЦ з фуксином і ДНСК також є відносно селективним, однак не дозволяє кількісно визначити вміст окситетрацикліну у препараті “Окси-100”, оскільки він містить магній хлорид, який заважає визначенню ОТЦ. Визначення цефалоспоринових антибіотиків цефтріаксону та цефтазидиму дозволяє визначити їх кількість у ліках з високою точністю. Дані наведені в таблицях 4.12 – 4.13 свідчать про те, що вміст цефтазидиму та цефтріаксону в препаратах є в межах допусків щодо регламентованого вмісту діючої речовини згідно методик контролю якості. Значення S_f не перевищують типових значень похибок у спектофотометрії. Окрім того одержані дані вмісту антибіотиків у лікарських засобах добре корелюють з результатами отриманими методом ВЕРХ, що є рекомендованим для кількісного визначення АН згідно ДФУ 2.0 [21] та фармакопеї Сполучених Штатів Америки [28].

4.6 Валідація методики спектрофотометричного визначення амоксициліну у таблетках “Амоксил” 250 мг

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ)

250 мг субстанції АМ (точна наважка) розчиняють у 50 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти в мірній колбі об’ємом 100,0 мл, доводять об’єм тим самим

розчинником до мітки. Аліквоту 5,0 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл та доводять до мітки 0,1 М розчином хлоридної кислоти, ретельно перемішують. Отриманий робочий РСЗ містить 0,25 мг/мл АМ.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ)

Зважують 20 таблеток “Амоксил” та встановлюють середню масу таблетки. Після цього розтирають 20 таблеток у фарфоровій ступці, відбирають 380 мг порошку препарату (точна наважка) і вносять до мірної колби об’ємом 100,0 мл, додають 50 мл 0,1 М хлоридної кислоти для отримання витяжки АМ, струшують впродовж 30 хв, на механічному струшувачі. Отриману суміш перемішують і фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості (біла стрічка) у конічну колбу, відкидаючи перші 15–20 мл фільтрату. Аліквоту 5,0 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл та доводять до мітки 0,1 М розчином хлоридної кислоти, ретельно перемішують.

Приготування робочого розчину модельного зразка (РМЗ)

У мірну колбу об’ємом 100,0 мл вносять наважки амоксициліну (250,0 мг), натрій крохмальгліколяту (118,2 мг), повідону (8,0 мг), кальцій стеарату (3,8 мг), що відповідає номінальному вмісту речовин у таблетці. До отриманої суміші додають 50 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти. Всі наступні етапи приготування зразка проводять аналогічно як у випадку РДЗ.

Приготування робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП)

Змішують всі компоненти як у випадку РМЗ, за винятком амоксициліну. Приготування робочого РМЗП проводять аналогічно.

Визначення АМ з використанням САМ. До мірної колби об’ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,6 М хлоридної кислоти, додають 2,0 мл $5,6 \cdot 10^{-3}$ М розчину сульфаніламідру, додають 2,0 мл 0,1 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв при кімнатній температурі, додають аліквоту робочого РДЗ (або робочих РСЗ, РМЗ, РМЗП, відповідно), вносять 5,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять за $\lambda = 445$ нм, $l = 1$ см.

Вміст в препараті (m), в мг/г, розраховують за формулою:

$$m = \frac{A_x \cdot m_c}{A_c \cdot m_x} \quad (4.1)$$

де A_x – оптична густина робочого РДЗ;

A_c – оптична густина робочого РСЗ;

m_c – маса наважки АМ для приготування робочого РСЗ, мг;

m_x – досліджуваного препарату для приготування робочого РДЗ, г.

Валідація методик визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням сульфаніламідів

З метою порівняння ефективності запропонованих методик кількісного визначення АМ з використанням сульфаніламідів нами проведено валідацію визначення АМ у таблетках “Амоксил” 250 мг (виробник – Київмедпрепарат, Україна) з використанням САМ [238].

При проведенні валідації розробленої спектрофотометричної методики було досліджено ряд валідаційних параметрів згідно ДФУ, а саме: повну невизначеність результатів аналізу, яка складається з невизначеності пробопідготовки та кінцевої аналітичної операції; межі лінійності та обчислено параметри лінійних залежностей; специфічність, робасність, правильність, прецизійність та внутрішньолабораторну прецизійність розроблених методик.

Повна невизначеність результатів аналізу

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$ (препарати “Амоксил” обчислена згідно (Г.1) становить:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} досліджуваного препарату “Амоксил” обчислювали, виходячи з методик пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції визначення АМ. Результати обчислень наведені в табл.4.15.

Обчислена згідно (Г.2, Додаток Г) *невизначеність пробопідготовки становить:*

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 2 \cdot 0,12^2 + 3 \cdot 0,6^2 + 0,17^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,04^2} = \sqrt{1,2935} = 1,14\%,$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції обчислена відповідно до (Г.3) становить:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\% .$$

Таблиця 4.15 – Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення АМ у таблетках “Амоксил”.

Операція пробо підготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка АМ (дослід. препарату)	m_0	0,2%	0,01%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100,0 мл	100	0,12%	
3. Відбір аликвоти піпеткою 5,0мл	5	0,6%	
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17%	
5. Відбір аликвоти піпеткою 1,0 мл	1	0,6%	
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 25,0 мл	25	0,23%	

Повна невизначеність результатів аналізу визначення АМ у таблетках “Амоксил” обчислена згідно з (Г.4, Додаток Г) становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,14^2 + 0,3^2} = 1,2\% \leq 1,6\% .$$

Специфічність

Нами досліджено селективність взаємодії АМ з сульфаніламідом при наявності допоміжних речовин, які використовують для виготовлення таблеток “Амоксил”. З цією метою ми готували плацебо препаратів, що не містили діючих речовин і проводили з ними усі етапи аналізу.

При виготовленні таблеток “Амоксил” (виробник – Київмедпрепарат, Україна), що містять діючу речовину амоксицилін (250 мг), застосовують допоміжні речовини – натрій крохмальгліколят (118,2 мг), повідон (8,0 мг), кальцій стеарат (3,8 мг).

Для вилучення амоксициліну із таблеток застосовують 0,1 М НСІ при струшуванні, відфільтровуючи нерозчинні компоненти.

Специфічність методик кількісного визначення АМ перевіряли порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препарату. Вплив плацебо не має

перевищувати 0,51 % для препарату згідно (Г.5), від максимально допустимої невизначеності результатів аналізу (Δ_{As}), тобто:

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Результати досліджень специфічності визначення амоксициліну за допомогою САМ у таблетках “Амоксил” наведені на рис. 4.1.

Як видно з рис. 4.1 на спектрах світлопоглинання розчинів плацебо немає максимуму світлопоглинання за довжини хвилі 445 нм.

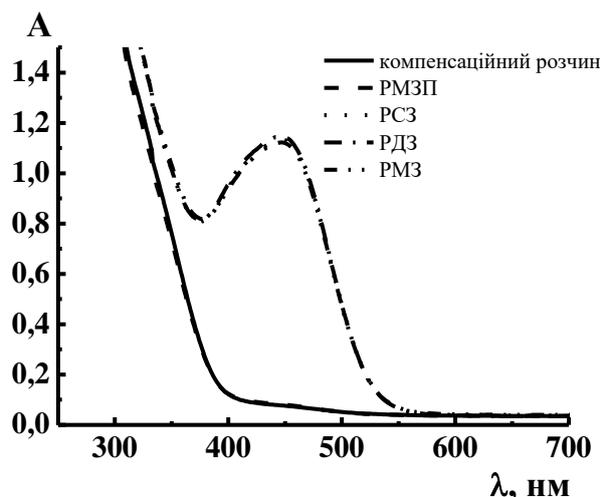


Рисунок 4.1 – Електронні спектри світлопоглинання досліджуваних розчинів під час аналізу таблеток “Амоксил” після проведення аналітичної реакції з САМ: Умови діазотування: $C_{HCl}=0,6M$, $C_{NaNO_2}=8,0 \cdot 10^{-3}M$, $C_{САМ}=4,5 \cdot 10^{-4}M$. Умови азосполучення: $C_{AM}=4,1 \cdot 10^{-5}M$, $C_{Na_2B_4O_7}=0,1M$, $pH=10,5$; $\lambda=445\text{ нм}$, $l=1\text{ см}$.

Вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу оцінюють згідно нерівності (Г.6):

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,0041}{1,0405} \cdot 100\% = 0,39\% \leq 0,51\% \quad \text{— для визначення АМ у таблетках “Амоксил” з САМ [221],}$$

де A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП; A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Як видно з розрахунків вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу є незначним, порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, відносно оптичної густини максимуму поглинання робочого РМЗ, яка становить 0,39 % у разі визначення АМ з використанням САМ у таблетках “Амоксил”.

Отже, згідно даних валідації, запропонована нами методика дозволяє проводити визначення АМ у присутності всіх інших компонентів таблеток “Амоксил” без їхнього попереднього розділення.

Робасність

Валідаційна характеристика *робасність* була нами частково досліджена при розробці методики спектрофотометричного визначення АМ. При дослідженні взаємодії амоксициліну з сульфаніламидами вивчено вплив різних чинників на проходження аналітичної реакції та відповідно на значення аналітичного сигналу у широких межах. При проведенні валідації нами досліджено умови максимального вилучення АМ з таблеток – встановлено час струшування, а також концентраційні межі розчинника.

У табл. 4.16 наведено результати дослідження робасності методики СФ визначення АМ – вплив концентрації хлоридної кислоти та вплив тривалості струшування на вилучення діючої речовини з препарату “Амоксил”.

Таблиця 4.16 – Дослідження робасності методики спектрофотометричного визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням САМ. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{HCl}=0,6$ М, $C_{AM}=4,1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{NaNO_2}=8,0 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{CAM}=4,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{Na_2B_4O_7}=0,1$ М, рН 10,5.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	$\delta, \%$	Критерій	Висновок	
Концентрація хлоридної кислоти	0,05 М	1,473	0,07	$\leq 0,51\%$	Відповідає	
	0,10 М	1,472	0,14			
	0,15 М	1,473	0,07			
Час струшування	15 хв	1,330	8,82		$\leq 0,51\%$	Не відповідає
	30 хв	1,461	0,07			Відповідає
	45 хв	1,465	0,21			

Як свідчать результати дослідження (табл. 4.16), зміна значень оптичної густини при зміні досліджуваних параметрів є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо вилучення АМ з таблеток

“Амоксил” проводити розчином 0,05–0,15М хлоридної кислоти. При цьому час струшування може становити 30–45 хв, за часу 15 хв вилучення АМ з препарату “Амоксил” відбувається не повністю. Для подальших досліджень для вилучення АМ з таблеток “Амоксил” ми обрали 0,10 М НСІ та час струшування 30 хв.

Перевірка лінійності

Лінійну залежність для таблеток “Амоксил” досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики. При цьому готували ряд розчинів, які одержували розведенням робочого РМЗ препарату з концентраціями АМ, що становили від 75% до 125% відносно вмісту вказаного виробником (9 розчинів). В табл. 4.17 наведені результати розрахунку концентрацій (C_i), середніх значень оптичних густин (A_i), а також значень X_i “введено” відносно концентрації розчину порівняння (C_i/C_{St}) та Y_i “знайдено” відносно оптичної густини розчину порівняння (A_i/A_{St}).

Таблиця 4.17 – Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації АМ у РМЗ таблеток “Амоксил” з використанням САМ.

Назва розчину	C_i , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{St}} \cdot 100\%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{St}} \cdot 100\%$
Розчин порівняння	20,00	100,00	1,359	100,00
№1 (75%)	15,05	75,25	1,022	75,20
№2 (75%)	15,05	75,25	1,025	75,42
№3 (75%)	15,05	75,25	1,019	74,98
№4 (100%)	20,01	100,05	1,359	100,00
№5 (100%)	20,01	100,05	1,354	99,63
№6 (100%)	20,01	100,05	1,376	101,25
№7 (125%)	25,15	125,75	1,699	125,02
№8 (125%)	25,15	125,75	1,707	125,60
№9 (125%)	25,15	125,75	1,691	125,42

На рис. 4.2 наведені електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації АМ для досліджуваного препарату при взаємодії із САМ.

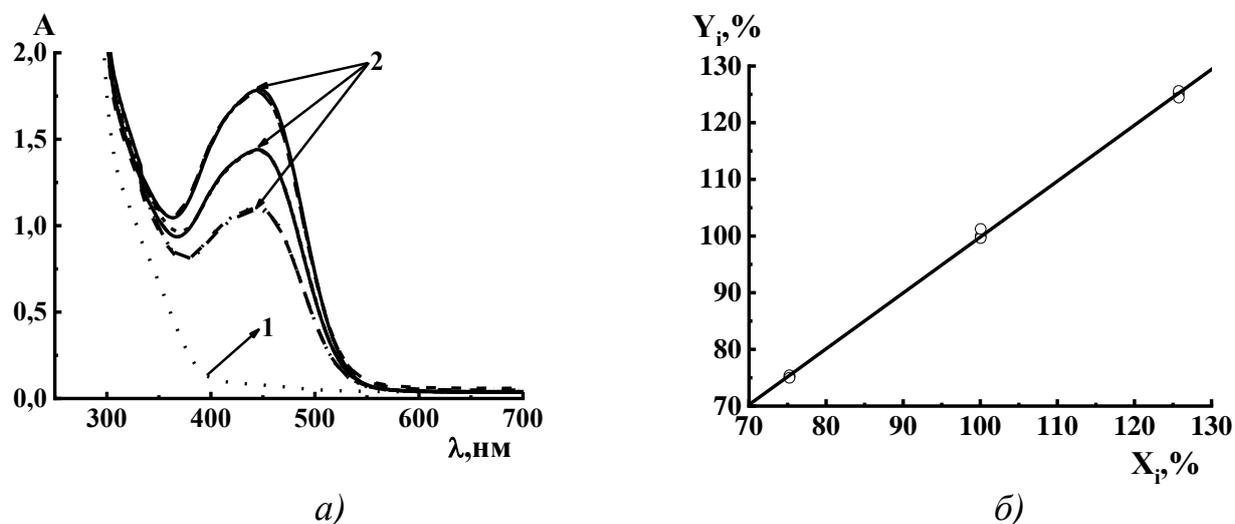


Рисунок 4.2 – Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації АМ. 1 – компенсацийний розчин, 2 – 10-кратне розведення РМЗ таблеток “Амоксил” з відповідними концентраціями АМ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6\text{M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0\cdot 10^{-3}\text{M}$, $C_{\text{SAM}}=4,5\cdot 10^{-4}\text{M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1\text{M}$, рН 10,5; $\lambda = 445\text{ нм}$, $l = 1\text{ см}$.

Таблиця 4.18 – Критерії лінійності і параметри лінійної залежності, критерії правильності і прецизійності, та обчислені їх значення при визначенні АМ у таблетках “Амоксил” з використанням САМ [236].

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
b	0,986	–	
S_b	0,011	–	
a	1,198	1) $\leq 2,064 $ 2) $\leq 2,760 $	Витримуються
RSD_0	0,489	–	
S_a	1,089	–	
RSD_0/b	0,496	$\leq 0,8445 $	Витримується
RSD_y	21,64	–	
r	$ 0,9996 $	$\geq 0,9992 $	Витримується
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

– не зазначають критерій для відповідного параметру

Як свідчать результати, проведених нами досліджень, у випадку таблеток “Амоксил” спостерігається лінійна залежність аналітичного сигналу від концентрації амоксициліну, обчислені параметри лінійної залежності відповідають критеріям лінійності, які до них ставляться (табл 4.18).

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики правильності та прецизійності розраховано з використанням результатів, отриманих при вивченні лінійності.

Результати проведеного аналізу модельних розчинів препарату та їх статистичну обробку подано в табл. 4.19.

Таблиця 4.19 – Результати аналізу РМЗ таблеток “Амоксил” з САМ та результати їх статистичної обробки.

№ з/п	$Y_i, \%$ (знайдено)	$X_i, \%$ (уведено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{уведено}} \cdot 100\%$
1	75,20	75,25	99,93
2	75,42	75,25	100,23
3	74,98	75,25	99,64
4	100,00	100,05	99,75
5	99,63	100,05	99,38
6	101,25	100,05	100,99
7	125,02	125,75	99,42
8	125,60	125,75	99,88
9	125,42	125,75	99,74
Середнє значення знайденого вмісту \bar{D}			99,88
Відносне стандартне відхилення $RSD_0, \%$			0,489
Критичне значення одностороннього інтервалу, $\Delta x = 0,910 \%$		$\Delta x \leq 1,6\%$	Витримується
Критерій незначимості систематичної похибки, $\delta = 0,12\%$		1. $\delta \leq 0,303\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$	Витримуються
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

Як видно з табл. 4.19 обчислені значення відносного довірчого інтервалу та систематичної похибки визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням САМ є меншими за максимальне допустиме значення цих параметрів відповідно до валідаційних критеріїв, що свідчить про те, що запропонована методика визначення АМ у цих препаратах відповідає вимогам критеріїв правильності та прецизійності.

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Аналіз проводили два аналітики, які використовували різний посуд і при цьому виконували по 5 паралельних вимірювань для однієї серії препарату в різні дні в одній лабораторії. Для всіх результатів обчислювали єдине середнє значення вмісту АМ (\bar{Z}_{intra}), відносне стандартне відхилення (S_{intra}) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra}). Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для таблеток “Амоксил” подано в табл. 4.20.

Таблиця 4.20 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики визначення АМ з використанням САМ у таблетках “Амоксил”.

№ аналізу	$Z_i, \%$	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
1	100,31	100,29
2	99,79	98,31
3	99,73	98,02
4	100,88	99,44
5	100,27	99,66
середнє (\bar{Z})	100,19	99,18
об'єднане середнє (\bar{Z}_{intra})	99,69	
S_m	0,47	0,98
$SD_{Z-intra}$	0,90	
Δ_{intra}	0,74	

Як видно з табл. 4.20 величини Δ_{intra} , обчислені при перевірці внутрішньолабораторної прецизійності для таблеток “Амоксил” з використанням САМ становить 0,74%. Отримані результати у двох випадках відповідають вимозі:

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 0,74\% \leq 1,6\%$$

Як видно з таблиць 4.19 із врахуванням припусків кількісного вмісту діючої речовини у препаратах 5%, отримані результати потрапляють в обумовлений діапазон вмістів, що є доказом правильності розробленої нами методики.

Крім цієї методики валідовано ще методики СФ визначення амоксициліну з САМ та СТЗ у суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” та цефтріаксону у порошку для приготування розчинів для ін’єкцій “Цефтріаксон” з 8-Оксихіноліном згідно вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [238, 239]. Результати цих валідацій наведені у Додатку Е.

З одержаних результатів описаних у цьому розділі можна зробити висновки:

- розроблено спектрофотометричні методики визначення мікрограмових кількостей антибіотиків АМ з САМ та СТЗ; ОТЦ з фуксином та ДНСК; ЦЕФТ з 8-Окс, Рез та 2-Мет; ЦЕФТР з 8-Окс та 2-Мет, розраховано їх метрологічні характеристики; найменша межа виявлення характерна для методик визначення АМ з СТЗ, $C_{\min} = 6,0 \cdot 10^{-7}$ М; ОТЦ з фуксином, $C_{\min} = 3,17 \cdot 10^{-6}$ М; ЦЕФТ з 2-Мет, $C_{\min} = 5,7 \cdot 10^{-7}$ М; ЦЕФТР з 2-Мет, $C_{\min} = 4,3 \cdot 10^{-7}$ М;
- досліджено селективність спектрофотометричного визначення антибіотиків за розробленими методиками за наявності допоміжних (неорганічних та органічних солей натрію, кальцію, магнію, алюмінію, бензилового спирту, бутилгідрокситолуену, крохмалю, повідону, кокосової олії) та діючих речовин різної природи (клавуланової кислоти (АМ); норсульфазолу, триметоприму (ОТЦ)); встановлено, що зважаючий вплив на визначення ОТЦ має лише магній хлорид, інші допоміжні та діючі речовини не заважають визначенню досліджуваних антибіотиків;
- правильність розроблених методик перевірено способом “введено-знайдено” при аналізі модельних розчинів;

- проведено визначення АМ в водопровідній воді;
- спектрофотометричні методики визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ та ЦЕФТР успішно апробовано при аналізі одно- та багатокomпонентних лікарських препаратів;
- проведено валідацію розроблених методик визначення АМ з САМ, СТЗ та ЦЕФТР з 8-Окс у деяких лікарських препаратах.

РОЗДІЛ 5

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ ТА ЦЕФТРІАКСОНУ НА ОСНОВІ ОТРИМАНИХ АЗОСПОЛУК

5.1. Дослідження електрохімічної поведінки продукту азосполучення солі діазонію цефтріаксону між собою у водних розчинах

Цефалоспорини є електрохімічно активними речовинами. Реакцію азосполучення не застосовували раніше для отримання аналітичних форм ЦА для їхнього ВА визначення. Відомі полярографічні методики визначення ЦЕФТР за відновленням його функціональних груп погано відтворюються через схильність цього АН адсорбуватися на ртутному електроді. Хоча азосполуки не застосовували у вольтамперометрії цефтріаксону, однак успішно використовували для його спектрофотометричного визначення [143, 151].

Метою нашого дослідження було вивчення електрохімічної поведінки сполуки, утвореної внаслідок власного азосполучення цефтріаксону. Оптимальні умови утворення цієї азосполуки підсумовано у розділі 3.3.1. Продукт власного азосполучення утворюється у хлориднокислому середовищі, починаючи від рН=3, що характерно для реакції азосполучення ароматичних амінів [181]. Однак саме діазотування ми проводили в досить м'яких умовах з вихідною концентрацією хлоридної кислоти 0,1 М, що згідно механізму діазотування, дає можливість протікати конкуруючим реакціям, крім власне азосполучення, тому у слабокислому реакційному середовищі із великою імовірністю можуть утворитися діазоіміносполука та аміноазосполука (розд. 1.3). Зважаючи на будову цефтріаксону (стеричні утруднення) і умови проведення реакції азосполучення в нашому випадку найімовірніше буде утворюватися саме азоіміносполука.

Для дослідження можливості ВА визначення ЦЕФТР у вигляді продукту власного азосполучення перш за все необхідно вивчити електрохімічну поведінку всіх реагентів, які використовують для одержання аналітичної форми (рис. 5.1).

Під час полярографування розчинів натрій нітриту в середовищі хлоридної кислоти на полярограмах не спостерігаються катодні піки, що вказує на

електрохімічну неактивність даної сполуки. Під час полярографування водного розчину ЦЕФТР на вольтамперограмі (рис 5,1 а)) за $\text{pH} = 11,0$ простежуються два катодні піки відновлення за потенціалу $-0,66 \text{ В}$ (пік 2) та за $E_{\text{к}}^{\text{п}} = -1,15$ (пік 3). Пік 2 імовірно відповідає за відновлення метилоксимової групи ЦЕФТР, а пік 3 за відновлення $-\text{C}=\text{C}-$ зв'язку у дигідротіазиновому кільці цефалоспорину [81] (див. Додаток Є, рис. Є.1, Є.2). Електрохімічне відновлення антибіотику є необоротним процесом, оскільки на циклічних вольтамперограмах не простежується відповідні анодні піки [240].

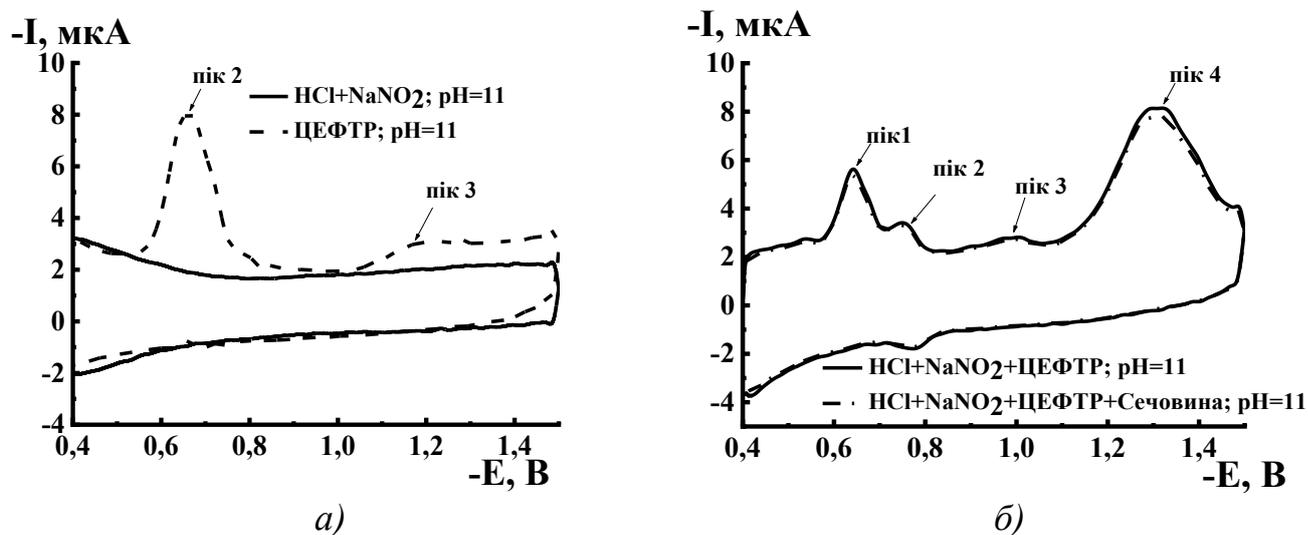


Рисунок 5.1. – Циклічні вольтамперограми розчинів натрій нітриту, а) цефтріаксону та б) продукту азосполучення солі діазонію цефтріаксону між собою. $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ М}$; $V = 2,5 \text{ В/с}$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{сечовини}} = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$.

Полярограми розчинів продукту власного азосполучення за наявності непрореагованого залишку натрій нітриту та аналогічного азопродукту після його усунення сечовиною є практично ідентичними (рис. 5.1 б)). Тому у подальших дослідженнях ми не усували непрореагований NaNO_2 . На полярограмах розчинів продукту власного азосполучення ЦЕФТР (рис. 5.1 б)) простежуються чотири катодні піки за потенціалів $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,64 \text{ В}$, $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,75 \text{ В}$, $E_{\text{к}}^{\text{п}3} = -0,98 \text{ В}$ та $E_{\text{к}}^{\text{п}4} = -1,31 \text{ В}$. Катодний пік сполуки, утвореної внаслідок власного азосполучення ЦЕФТР за $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,64 \text{ В}$, імовірно, відповідає відновленню азоіміногрупи до гідразоіміногрупи і може використовуватись для розробки ВА методики визначення

ЦЕФТР. Пік 1 за $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,64 \text{ В}$ частково накладається з піком відновлення метилоксимової групи (пік 2). Пік 3 за $E_{\text{к}}^{\text{п3}} = -0,98 \text{ В}$ ймовірно відповідає відновленню ненасиченого зв'язку дигідротіазинового кільця ЦА, а пік 4 за $E_{\text{к}}^{\text{п4}} = -1,31 \text{ В}$ – відновленню гідразоїміногрупи до відповідного аміну та гідразинопохідного ЦЕФТР. Загальні схеми відновлення цих груп наведено в додатку Є.

Методику вольтамперометричного визначення ЦЕФТР доречно розробляти за максимальної швидкості накладання напруги поляризації (для полярографічної установки, яку використовували у роботі $V_{\text{max.}} = 2,5 \text{ В/с}$) (рис. 5.2.), адже в такому випадку отримується вищий аналітичний сигнал.

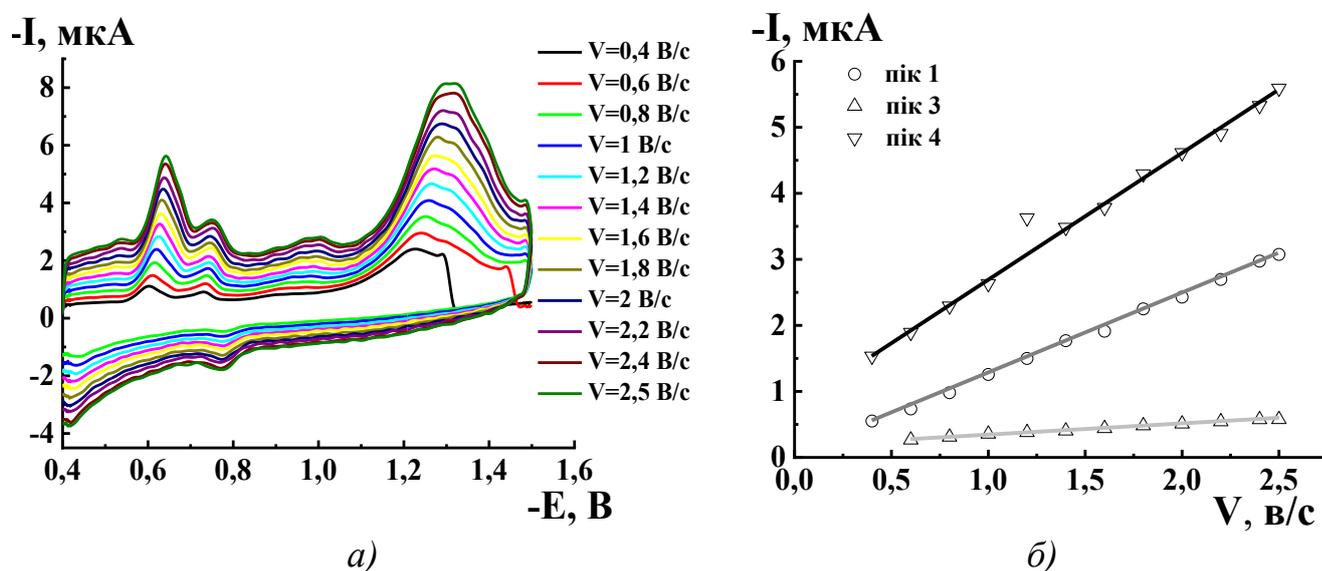


Рисунок 5.2. – Циклічні вольтамперограми у розчині продукту азосполучення солі діазонію цефтріаксону між собою *а)* та залежність висоти піків відновлення продукту азосполучення діазотованого цефтріаксону між собою від швидкості накладання напруги поляризації *б)*. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ М}$, $\text{pH} = 11,0$.

ВА визначення ЦЕФТР доцільно проводити за піком відновлення продукту власного азосполучення за потенціалу $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,64 \text{ В}$ в лужному середовищі ($\text{pH} 11,0$) та швидкості накладання напруги поляризації $2,5 \text{ В/с}$.

З вольтамперограм наведених на рис 5.2 *а)* видно, що катодні піки 1, 3 та 4 відповідають необоротним електрохімічним процесам. Натомість пік 2 відповідає квазіоборотному електрохімічному процесу.

Важливим етапом розробки ВА методики є дослідження вольтамперних характеристик піку, який відповідає за аналітичний сигнал, а також вивчення механізму електродного процесу та природу струму.

Для з'ясування природи катодного струму використано критерій Семерано, згідно з яким значення кутового коефіцієнта логарифмічної залежності $\lg I_{\text{к}}^{\text{II}} - \lg V$ вказує на лімітуючу стадію електрохімічного перетворення.

З графічних залежностей критерію Семерано, наведених на рис. 5.3, видно, що під час відновлення ЦЕФТР на ртутному крапельному електроді струм піків 1 та 4 має адсорбційну природу, що узгоджується із літературними даними [79]. Для відновлення катодного піку 3 характерна змішана (квазідифузійна) природа струму $d\lg I/d\lg V=0,55$.

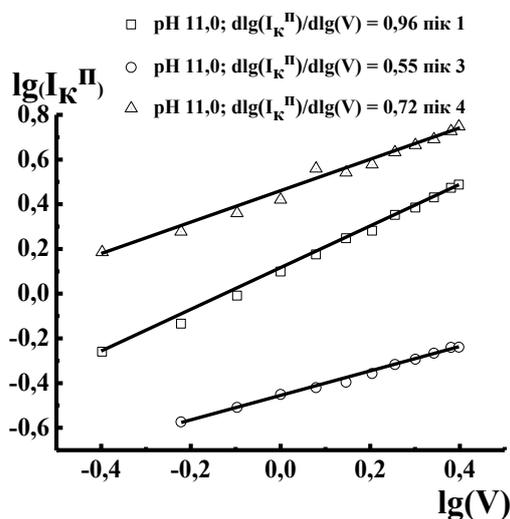


Рисунок 5.3. – Залежності критерію Семерано катодних піків на вольтамперограмах розчинів продукту азосполучення цефтріаксону та його діазосолі: Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ M}$, $\text{pH} = 11,0$.

Розраховану згідно графічної залежності $\lg \Delta I/I = f(E_{\text{к}})$ кількість електронів (n_{α}), що беруть участь у відновленні азогрупи продукту власного азосполучення ЦЕФТР наведено в табл. 5.1. Для піків 1 та 4 $n_{\alpha}=1$, у випадку піку 2 немає можливості розрахувати кількість електронів через часткове накладання з піком 1, для піку 3 неможливо виміряти висоту через нечіткість піку.

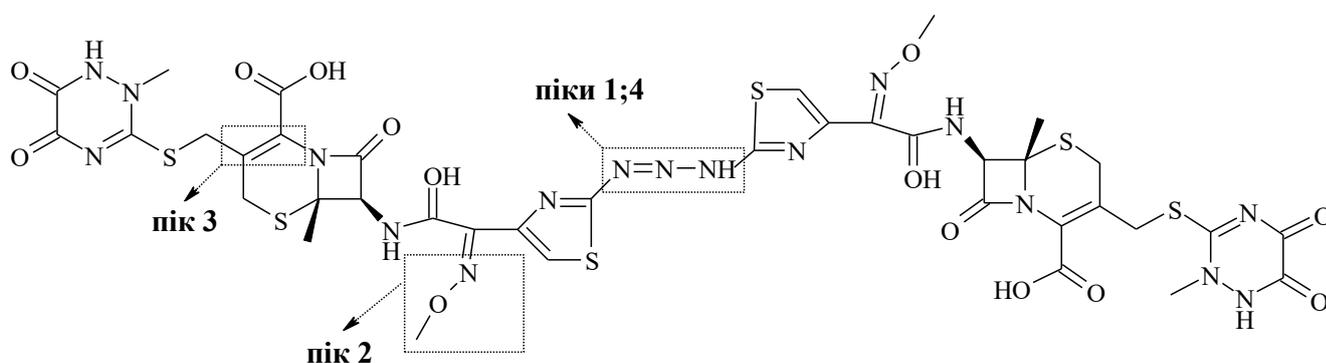
Таблиця 5.1 – Розраховані значення n_α катодних піків продукту власного азосполучення цефтріаксону

рН	Розрахована кількість електронів			
	пік 1	пік 2	пік 3	пік 4
11,0	1	? ^a	? ^b	1

?^a – неможливо виміряти через часткове накладання з піком 1

?^b – неможливо виміряти через нечіткість піку

Узагальнивши отримані результати, ми припускаємо, що в результаті власного азосполучення ЦЕФТР утворюється електрохімічно активна азоіміносполука, яка має імовірну формулу:

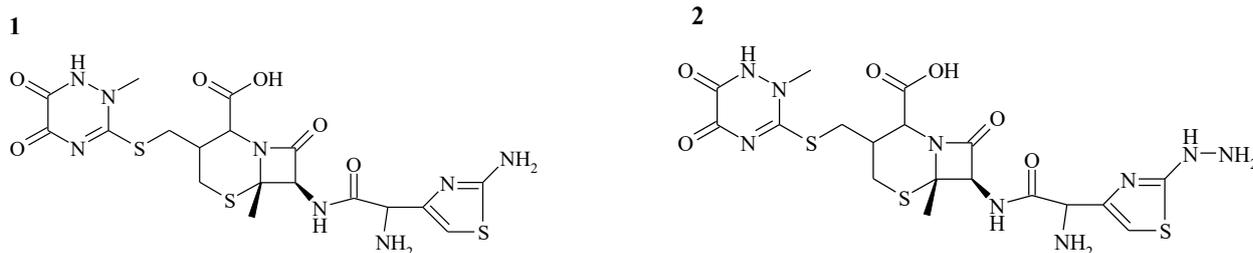


Схематично відновлення такої азоіміногрупи можна зобразити за допомогою рівнянь:



На першому етапі електрохімічного перетворення відбувається відновлення азоіміногрупи (пік 1) отриманої азоіміносполуки. Нами зафіксовано, що це перетворення відбувається за участю одного електрона, проте в літературних даних є відомості, що цей процес відбувається з перенесенням двох електронів, тобто він відповідає за процес відновлення азоіміноформи до гідразоіміноформи. Пік 2 відповідає двостадійному відновленню метилоксимової групи. Перша стадія відбувається з перенесенням двох електронів та приєднанням двох іонів гідрогену з утворенням іміносполуки, яка на наступній стадії відновлюється до відповідного аміну [81]. Проте в умовах експерименту імовірним є лужний гідроліз аміногрупи

ЦЕФТР з виділенням аміаку, тому на полярограмах не спостерігається пік, що відповідає другій стадії відновлення. У ділянці більш від'ємних потенціалів за $E_{\text{к}}^{\text{п3}} = -0,98 \text{ В}$ простежується пік 3, який, згідно літературних даних [81], відповідає двоелектродному відновленню ненасиченого $-\text{C}=\text{C}-$ зв'язку. На завершальному етапі електрохімічного перетворення азоіміносполуки ЦЕФТР відбувається відновлення гідразоіміноформи до аміну (1) та гідразинпохідного цефтріаксону (2) із розривом зв'язку (пік 4):



5.2. Вольтамперометричне дослідження азосполуки амоксициліну із діазосіллю сульфаніламідів

В літературі немає даних про використання азосполук як аналітичної форми для вольтамперометричного визначення амоксициліну, однак відомо, що азогрупа є електрохімічноактивною і здатна відновлюватися на ртутному крапельному електроді. Тому ми досліджували електрохімічну поведінку отриманої нами азосполуки АМ з діазотованим сульфаніламідом, умови утворення якої описано у розділі 3.1.1 [221] для розроблення ВА методики визначення цього антибіотика.

5.2.1 Дослідження електрохімічної поведінки та оборотності електродного процесу відновлення у водних розчинах АМ, САМ та продукту їхньої взаємодії

Першим етапом для вивчення можливості ВА виначення АМ стало дослідження електрохімічної поведінки всіх реагентів, які застосовували для отримання азосполуки (рис. 5.4).

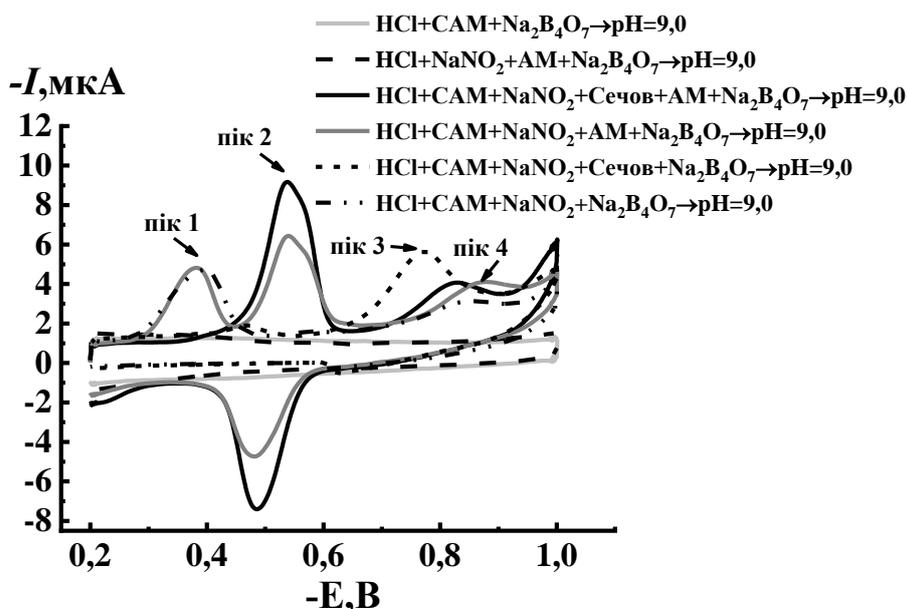


Рисунок 5.4. – Циклічні вольтамперограми у розчинах – сульфаніламідів та продуктів його азосполучення з амоксициліном. $V = 2,5$ В/с. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6$ М, $C_{\text{CAM}} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{NaNO}_2} = 3,75 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{Сечов}} = 3,75 \cdot 10^{-2}$ М. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}} = 3,75 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1$ М, $\text{pH} = 9,0$.

Як видно з рис. 5.4 на полярограмах розчинів САМ в лужному середовищі та АМ за наявності усіх компонентів реакції немає жодних піків, що свідчить про їхню електрохімічну неактивність. На полярограмах розчину азосполуки діазотованого САМ із АМ простежуються три катодні піки: перший необоротний за потенціалу $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,40$ В, другий роздвоєний оборотний за потенціалу $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,55$ та третій необоротний за $E_{\text{к}}^{\text{п}4} = -0,86$ В. На полярограмах діазотованого сульфаніламідів (холостого розчину) за наявності непрореагованого залишку натрій нітриту простежується два катодні піки відновлення за $\text{pH} 9,0$: $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,40$ В та $E_{\text{к}}^{\text{п}4} = -0,86$ В. Пік 4 за потенціалу $E_{\text{к}}^{\text{п}4} = -0,86$ В, який ймовірно відповідає відновленню новоутвореної азогрупи побічного продукту власного азосполучення діазотованого сульфаніламідів. Натомість пік 1 зникає якщо усувати залишок нітрит-іонів із холостого розчину реагенту за допомогою сечовини. Отже очевидно, що пік за $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,40$ В відповідає за відновлення нітритної групи, яка впроваджується в молекулу САМ під дією непрореагованого залишку натрій нітриту. На вольтамперограмах розчину продукту азосполучення діазотованого САМ із АМ за наявності непрореагованого залишку натрій нітриту простежується три піки: роздвоєний за

$E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,55 \text{ В}$, який відповідає відновленню азогрупи сполуки, утвореної внаслідок азосполучення амоксициліну із діазотованим САМ та два піки за $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,41 \text{ В}$ та $E_{\text{к}}^{\text{п}4} = -0,86 \text{ В}$, які характерні для холостого розчину реагенту. При усуненні непрореагованого залишку натрій нітриту на вольтамперограмі продукту взаємодії АМ із діазосіллю СА пік при $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,40 \text{ В}$ також зникає, а пік за $E_{\text{к}}^{\text{п}4}$ простежується при $-0,83 \text{ В}$. Проведення реакції діазотування та азосполучення за умови великого надлишку натрій нітриту за кімнатної температури сприятиме впровадженню нітросо групи в ароматичні кільця реагентів за умов узгодженої орієнтації, що може спричинити утворення інших побічних продуктів ніж у випадку його відсутності. На полярограмі холостого розчину діазотованого СА за умов застосування сечовини для руйнування залишку натрій нітриту простежується пік за $E_{\text{к}}^{\text{п}3} = -0,77 \text{ В}$, який може бути пов'язаний із відновленням іншого можливого побічного продукту азосполучення – триазину [222, 241, 242].

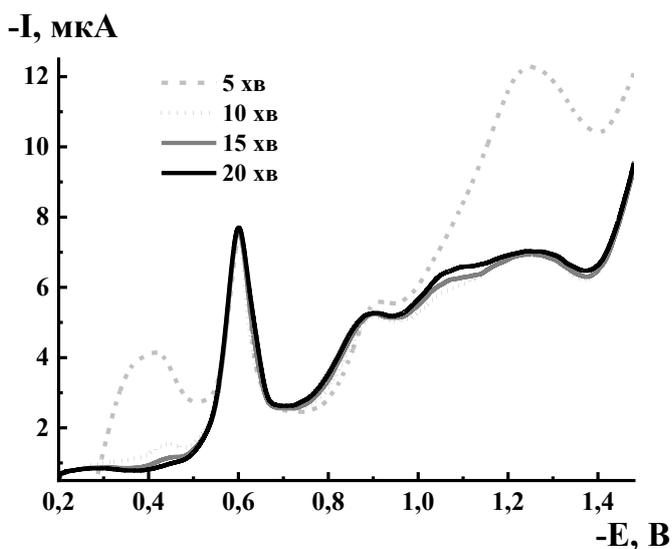


Рисунок 5.5 – Вольтамперограми розчину продукту азосполучення амоксициліну із діазотованим сульфаніламідом за різного часу барботування аргоном. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 3,75 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 3,75 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$; $V = 2,5 \text{ В/с}$.

Досліджено, що азосполука діазотованого САМ з АМ не змінює своєї форми існування у розчині під час зберігання, про що свідчить незмінність висоти піку азогрупи (рис. 5.5). Щоб уникнути заважаючого впливу кисню під час отримання полярограм через досліджуваний розчин потрібно барботувати аргон

протягом 15 хв, оскільки після 10 хв ще простежується пік кисню за потенціалу $\sim -0,45$ В [221, 222].

5.2.2 Дослідження впливу кислотності середовища при утворенні азосполуки АМ із САМ та швидкості накладання напруги поляризації на її електрохімічне відновлення

На наступному етапі розробки ВА методики вивчено вплив кислотності середовища на отримання максимального значення аналітичного сигналу. На рис. 5.6 наведено вольтамперограми розчинів продукту азосполучення АМ з діазосіллю САМ та холостого розчину в залежності від кислотності середовища. З вольтамперограм видно, що із збільшенням рН потенціал піку 2 зсувається у катодну область, а струм відновлення піку утвореної азосполуки АМ із діазосіллю САМ за $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,55$ В в інтервалі рН 9,0–10,5 зменшується (рис. 5.7). Такий характер залежностей спостерігається, тому що в процесі стадійного відновлення азогрупи беруть участь іони гідроксонію, концентрація яких в менш лужному розчині є значно більша. У сильно лужному середовищі за рН=11,5 величина струму досягає дещо вищого значення, проте в цих умовах на вольтамперограмі сам пік простежувався за потенціалу $-0,85$ В (рис. 5.6) та були наявні додаткові катодні піки, які частково накладались на пік відновлення азогрупи. Візуально спостерігалось значне знебарвлення розчину в часі, що ймовірно пов'язане з руйнуванням гідрозоформи азосполуки АМ з САМ за рахунок можливої реакції диспропорціонування до аміну та іміну, останній з яких схильний до гідролізу. З цієї причини для подальших ВА досліджень було обрано рН 9,0.

Як видно із рис. 5.7 збільшення швидкості накладання напруги поляризації веде до збільшення сили струму піку 2. З цієї причини методику ВА визначення АМ ми розробляли за максимальної можливої швидкості накладання напруги поляризації $V_{\text{max.}} = 2,5$ В/с.

Отож, для розроблення методики ВА визначення АМ ми пропонуємо використовуючи катодний пік 2, який відповідає відновленню азогрупи продукту

азосполучення АМ із діазосіллю САМ за потенціалу $E_{к}^{п2} = -0,55$ В за рН 9,0 та швидкості накладання напруги поляризації 2,5 В/с.

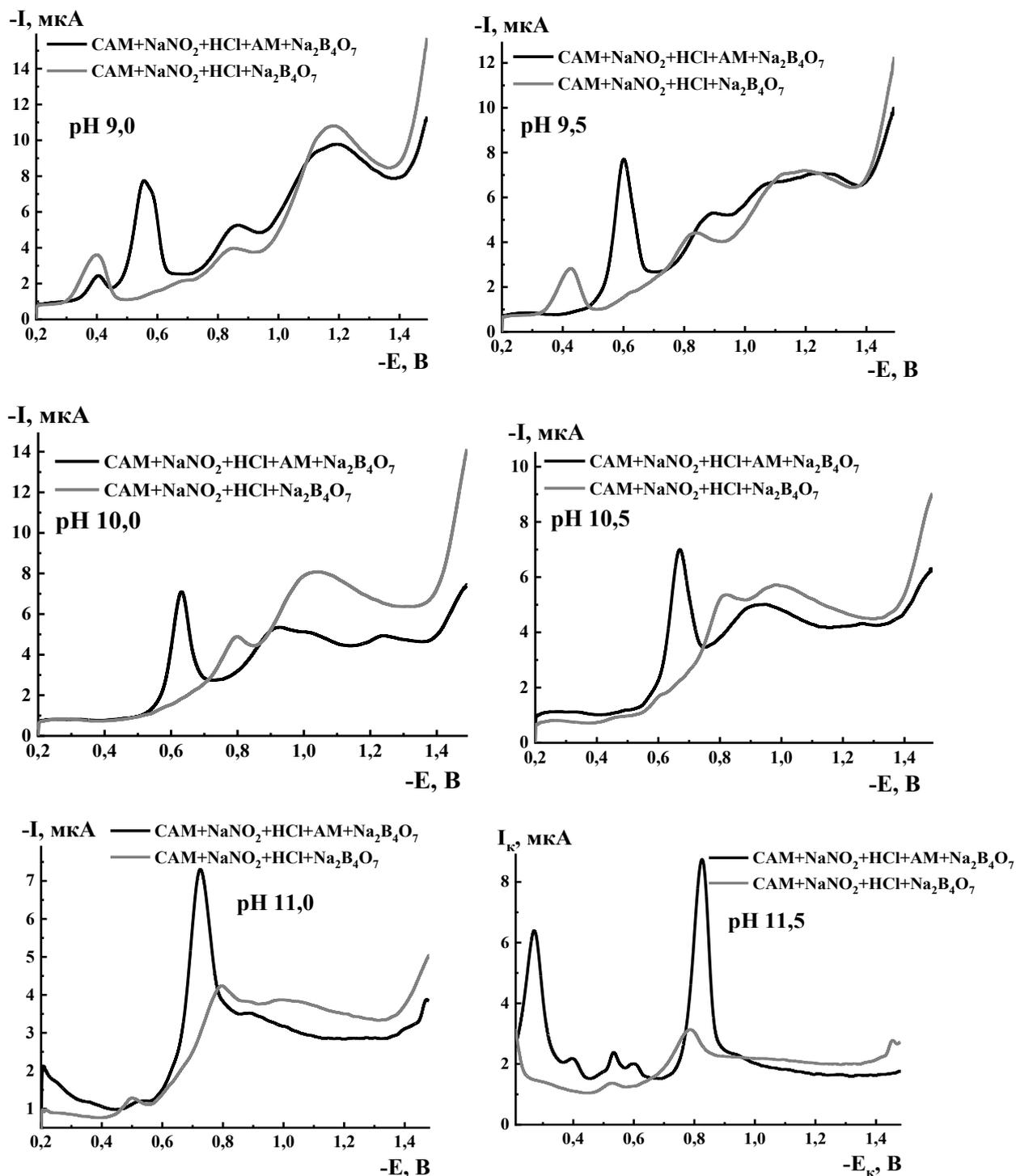


Рисунок 5.6 – Вольтамперограми розчинів діазотованого сульфаніламіду та продукту його азосполучення з амоксициліном за різних рН. Умови діазотування: $C_{HCl} = 0,6$ М, $C_{CAM} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,5 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{AM} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$ М, $V = 2,5$ В/с.

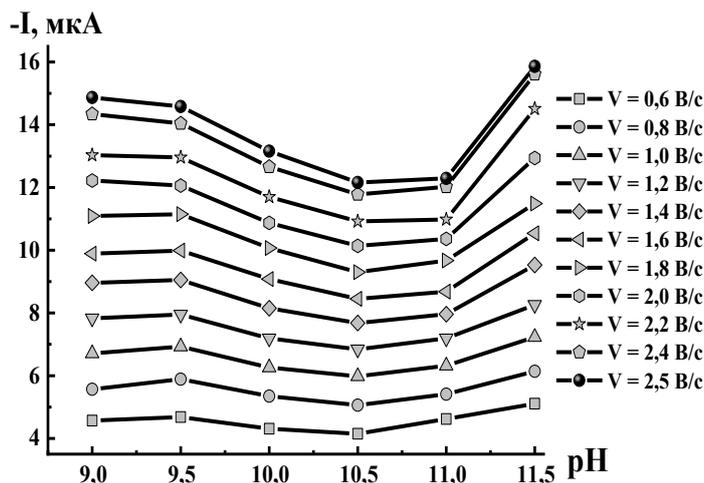


Рисунок 5.7 – Залежність струму піку 2 відновлення азогрупи продукту азосполучення діазотованого сульфаніламідів з амоксициліном від кислотності середовища за різної швидкості накладання напруги поляризації. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$, $C_{\text{CA}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$; $V = 2,5 \text{ V/c}$.

5.2.3 Дослідження впливу сечовини, яку використовують для усунення непрореагованого натрій нітриту на вигляд вольтамперограм азосполуки АМ із САМ

Реакцію діазотування первинних ароматичних амінів проводять під дією надлишку натрій нітриту, який у багатьох випадках потрібно усувати, адже він може спричинити негативні процеси внаслідок окисно-відновної взаємодії із азоскладовою. Для руйнування нітрит-іонів здебільшого використовують сечовину. З цієї причини нами було досліджено вплив усунення непрореагованого натрій нітриту, який використовували для діазотування САМ та подальше азосполучення діазотованого сульфаніламідів із АМ за допомогою сечовини на вигляд вольтамперограм азопродукту; досліджували концентрацію та тривалість дії сечовини.

На вольтамперограмах розчину продукту азосполучення діазотованого САМ із АМ за наявності непрореагованого залишку натрій нітриту (рис. 5.4) простежується три піки: роздвоєний за $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,40 \text{ V}$, $E_{\text{к}}^{\text{п2}} = -0,55 \text{ V}$ та $E_{\text{к}}^{\text{п4}} = -0,86$. Піки 1 і 2

характерні також для холостого розчину реагенту. При використанні сечовини для усунення непрореагованого залишку натрій нітриту на вольтамперограмі продукту та холостого розчину пік 1 за $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,40 \text{ В}$ зникає, а пік 2 збільшує свою інтенсивність. Тому нами було досліджено вплив концентрації сечовини та часу її взаємодії з непрореагованим натрій нітритом (рис. 5.8).

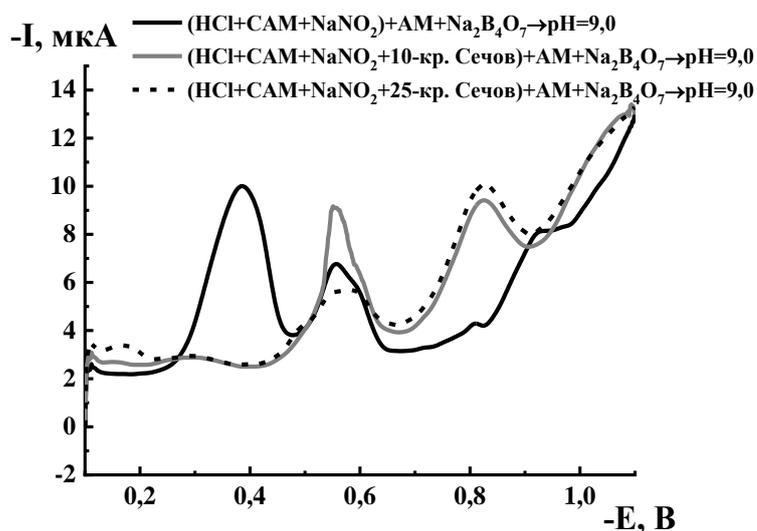


Рисунок 5.8 – Вольтамперограми розчинів азосполуки АМ з САМ за наявності та відсутності в досліджуваній пробі сечовини. $V = 2,5 \text{ В/с}$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{CAM}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$.

Вольтамперограми наведені на рис. 5.8 свідчать, що за використання 10-кратного надлишку сечовини стосовно кількості використаного у реакції діазотування САМ натрій нітриту призводить до збільшення аналітичного сигналу (пік за $E_{\text{к}}^{\text{п2}} = -0,55 \text{ В}$ зростає) Такий ефект вказує на доцільність знищення залишку NaNO_2 , проте, варто зауважити, що використання вже 25-кратного надлишку сечовини призводить до зменшення сили струму піку 2, з цієї причини залишок натрій нітриту доцільно усувати дією 10-кратного надлишку сечовини.

Результати проведених досліджень впливу концентрацій сечовини та часу її взаємодії з NaNO_2 у розчині діазотованого САМ підсумовано у табл. 5.2.

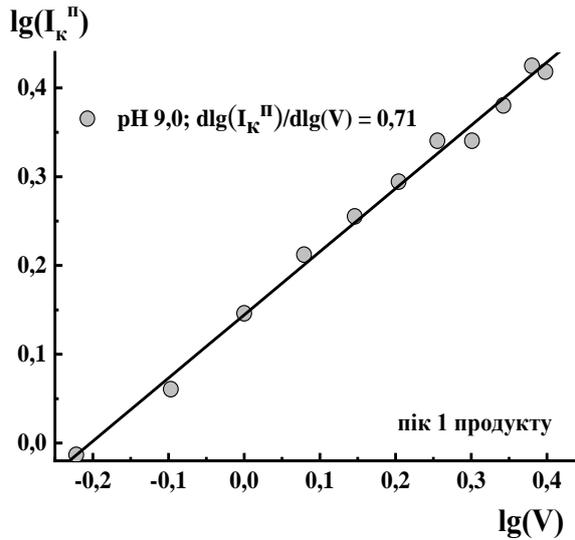
Таблиця 5.2 – Вплив концентрації сечовини та часу усунення надлишку NaNO_2 на аналітичний сигнал азосполуки діазотованого САМ з АМ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$; $V = 2,5 \text{ В/с}$.

Умови реакції	$I_{\text{к}}^{\text{п2}}$, мкА
$[\text{HCl} + \text{САМ} + \text{NaNO}_2]_{20\text{хв}} + \text{АМ} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \rightarrow \text{pH } 9,0$	4,44
$[(\text{HCl} + \text{САМ} + \text{NaNO}_2)_{20\text{хв}} + 10\text{-кр. надлишок сечов. до конц. NaNO}_2]_{10\text{хв}} + \text{АМ} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \rightarrow \text{pH } 9,0$	6,49
$[(\text{HCl} + \text{САМ} + \text{NaNO}_2)_{20\text{хв}} + 25\text{-кр. надлишок сечов. до конц. NaNO}_2]_{20\text{хв}} + \text{АМ} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \rightarrow \text{pH } 9,0$	2,82

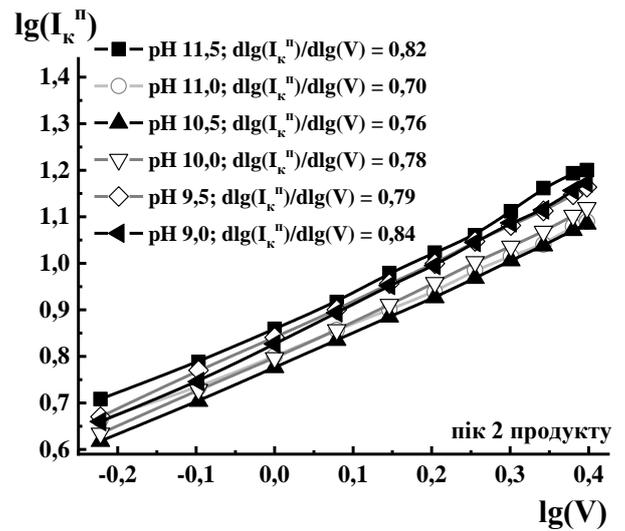
З'ясовано, що для ВА визначення АМ потрібно руйнувати непрореагований NaNO_2 під дією 10-кратного надлишку сечовини впродовж 10 хв (табл. 5.2). Наступне збільшення часу дії та концентрації сечовини призводить до суттєвого зменшення аналітичного сигналу.

5.2.4 Дослідження природи струму та механізму електрохімічного відновлення продукту азосполучення діазотованого сульфаніламідів з амоксициліном

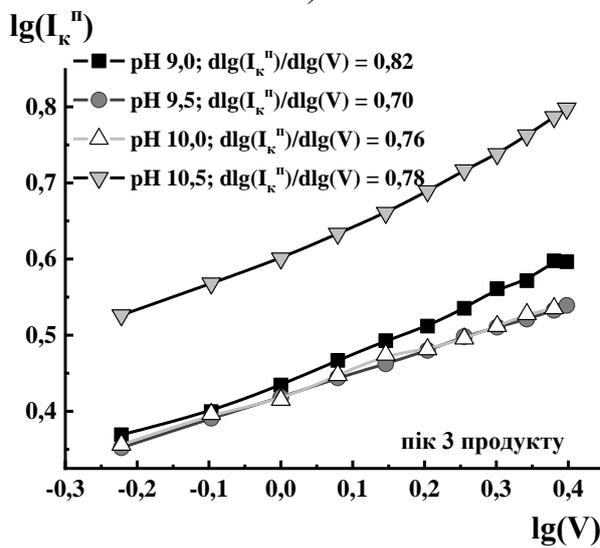
Одним з важливих етапів розроблення вольтамперометричної методики є встановлення природи струму та дослідження механізмів електродного процесу. Природу струму процесу, який відбувається на електроді оцінювали використовуючи критерій Семерано, згідно якого значення кутового коефіцієнта логарифмічної залежності $\lg I_{\text{к}}^{\text{п}} - \lg V$ вказує на лімітуючу стадію електрохімічного перетворення (додаток В).



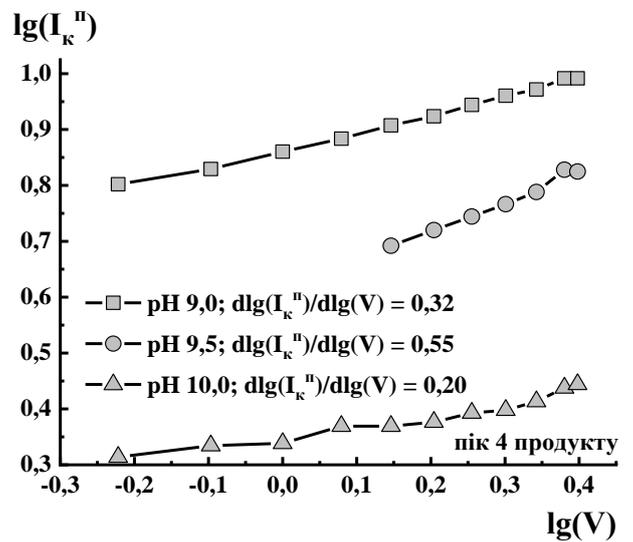
a)



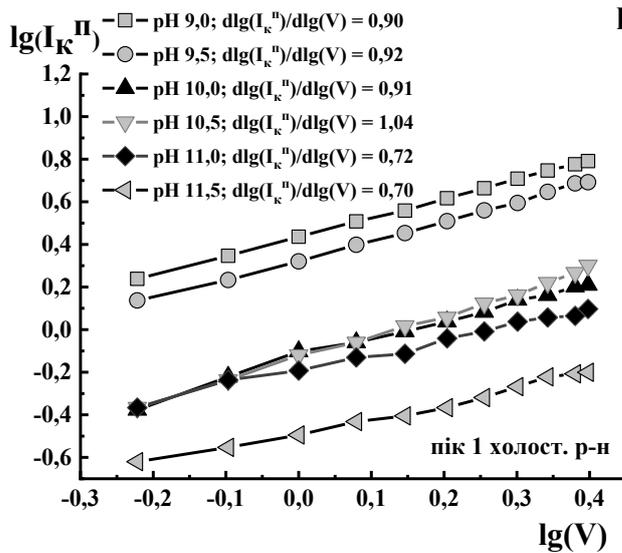
б)



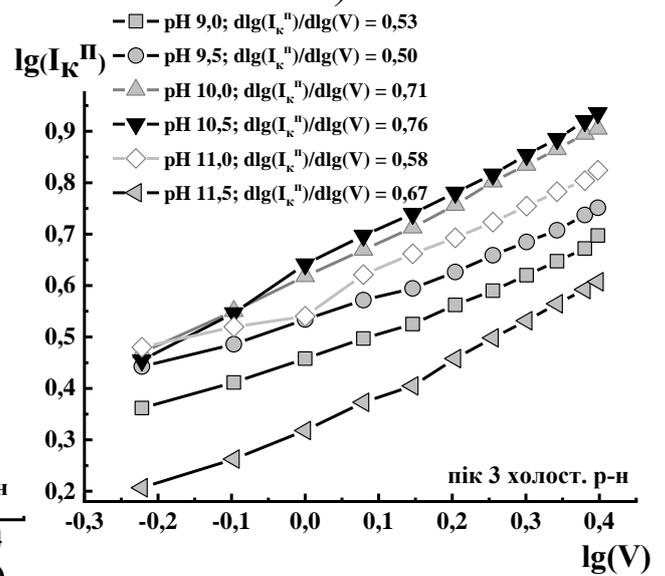
в)



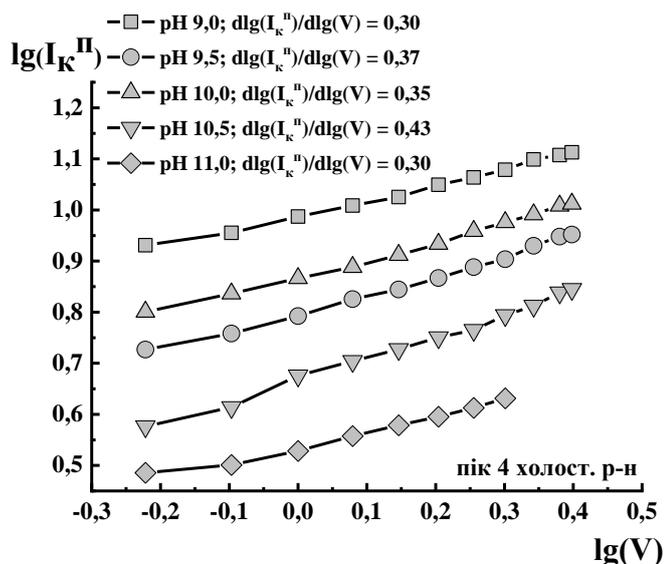
г)



д)



е)



ε)

Рисунок 5.9 – Залежності критерію Семерано катодних піків на вольтамперограмах розчинів: *a-ε)* – продукту азосполучення діазотованого сульфаніламідну з амоксициліном; *δ-ε)* – діазотованого сульфаніламідну (холостий розчин). Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ M}$, $C_{\text{SAM}} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 6,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ M}$; $V = 2,5 \text{ V/c}$.

На вольтамперограмах розчину азосполуки амоксициліну із діазотованим SAM за наявності непрореагованого залишку NaNO_2 (рис. 5.6) за pH 9,0 простежуються чотири катодні піки, перший з яких відповідає відновленню нітросо групи впровадженної в сульфаніламідний фрагмент молекули азопродукту, другий роздвоєний пік відповідає двостадійному електрохімічному відновленню азогрупи азосполуки AM із SAM, а інші два відповідають поетапному відновленню азогрупи побічного продукту взаємодії власного азосполучення діазотованого SAM.

З відповідних графічних залежностей критерію Семерано, зображених на рис. 5.9 видно, що природа струму піків 1, 2 та 3 є адсорбційною [241], а для піку 4 процес ускладнений кінетичними обмеженнями.

З графічних залежностей $\lg \Delta I / I = f(E_k)$ розраховано кількість електронів (n_a), які беруть участь у електрохімічному відновленні усіх електроактивних груп

азосполуки АМ з САМ. Обчислену кількість електронів для усіх катодних піків наведено в табл. 5.3.

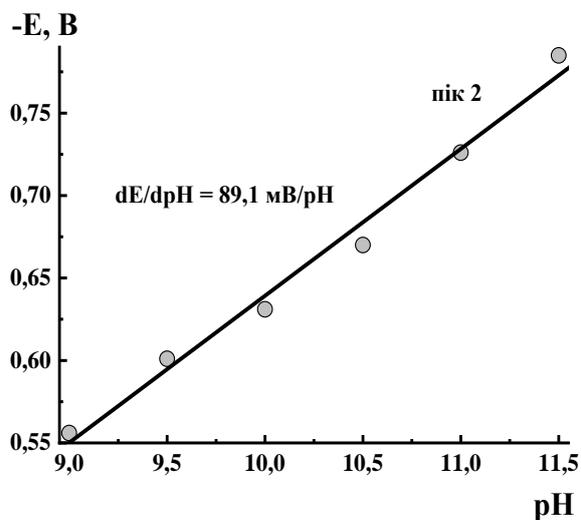
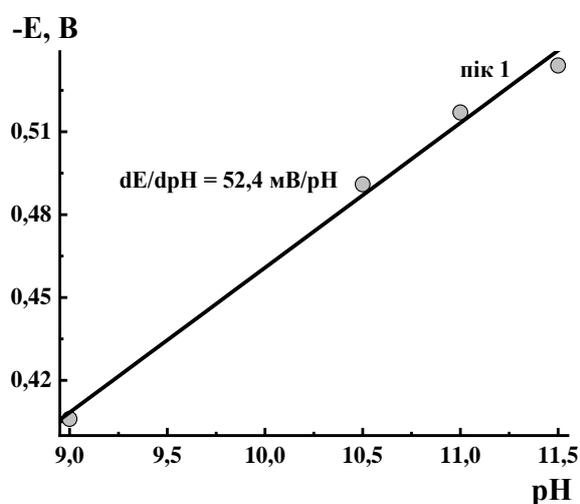
Таблиця 5.3 – Розраховані значення n_α катодних піків продукту азосполучення діазотованого сульфаніламиду з амоксициліном

рН	Розрахована кількість n_α			
	пік 1	Пік 2	пік 3	пік 4
9,0	1	3	1	1
9,5	–	3	1	1
10,0	–	3	1	1
10,5	–	3	1	–
11,0	?	2	?	–
11,5	?	2	?	–

– пік не простежується на вольтамперограмі,

? – неможливо розрахувати кількість електронів

Електрохімічне відновлення азосполуки АМ з САМ відбувається за участю іонів гідрогену про що свідчить прямолінійний характер залежності потенціалів піків відновлення азосполуки від рН (рис. 5.10). Кількість іонів гідрогену, які беруть участь в електрохімічному відновлення, розраховували із залежності потенціалу піку відновлення від кислотності середовища, кутовий коефіцієнт (тангенс кута нахилу) якої дорівнює $0,059 n_{\text{H}^+}/n_{\text{e}^-}$.



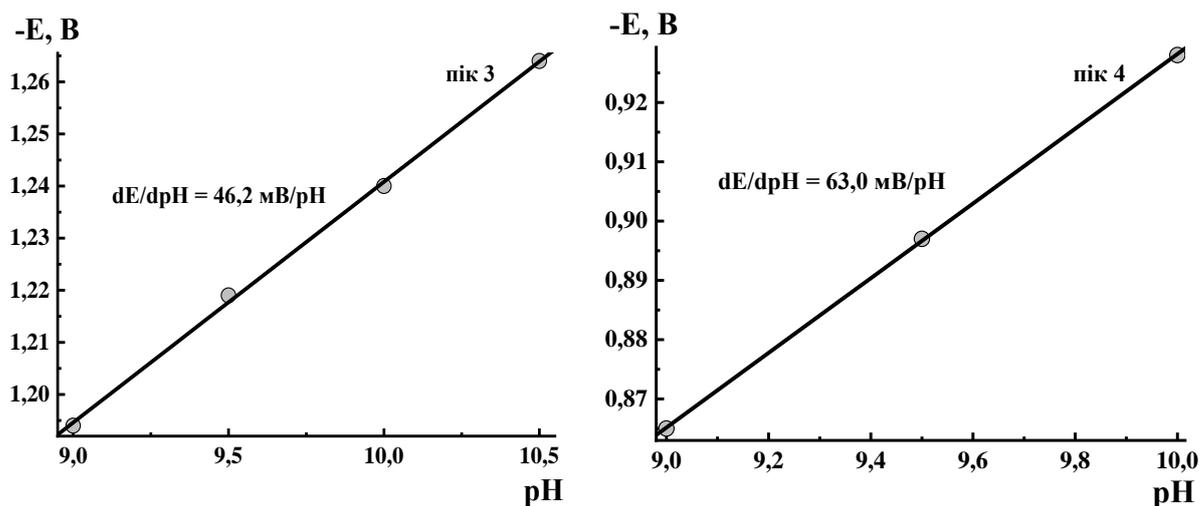


Рисунок 5.10 – Залежність потенціалу піків азосполуки від кислотності середовища. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,6 \text{ М}$; $C_{\text{CAM}}=5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaNO}_2}=7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; Умови азосполучення: $C_{\text{AM}}=5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1 \text{ М}$; $V = 2,5 \text{ В/с}$.

Поєднавши дані кутових коефіцієнтів залежностей зображених на рис. 5.10 з даними табл. 5.3 було розраховано кількість іонів гідрогену, які приєднуються на кожній стадії в процесі електрохімічного відновлення електроактивних груп азосполуки АМ з САМ (табл. 5.4).

Таблиця 5.4– Розраховані значення n_{H^+} для катодних піків азополуки.

Пік	1	2*	3	4
n_{H^+}	1	5(при рН $\leq 10,5$)	1	1
		3(при рН $\geq 11,0$)		

* – розрахована кількість електронів для першої частини роздвоєного піку.

Згідно даних табл. 5.3 і 5.4 відновлення нітрозо групи (пік 1) відбувається за участю 1 електрона та 1 іона гідрогену, хоча згідно літературних даних електрохімічне відновлення нітрозо групи повинно відбуватися за участі 4 електронів та 4 протонів [212]. Очевидно, що процес відновлення нітрозо групи є дуже швидким і ми не можемо зафіксувати усі стадії використовуючи метод осцилополярографії.

Електрохімічне відновлення азогрупи аналітичної форми (пік 2) відбувається у дві стадії, оскільки на вольтамперограмі простежується роздвоєний катодний пік. Нами встановлено, що на першій стадії відбувається перенесення 3-х електронів. Оскільки утворений на першій стадії інтермедіат є високореакційноздатною частинкою, то його подальше відновлення відбувається швидко і ми не можемо розрахувати кількість електронів, які беруть участь у другій стадії. Аналіз літературних даних свідчить, що електрохімічне відновлення азогрупи відбувається з перенесенням чотирьох електронів, тому ми припускаємо, що на другій стадії відбувається перенесення одного електрона. За значенням кутового коефіцієнта залежності потенціалу піку від кислотності середовища (рис. 5.10) ми встановили, що в інтервалі рН 9,0–10,5 відновлення азогрупи відбувається за участі п'яти іонів гідрогену.

З наведених на рис. 5.4 вольтамперограм видно, що катодні піки 1, 3 та 4 відповідають необоротним електродним процесам, оскільки на наведених вольтамперограмах не простежуються відповідні анодні піки.

Натомість відновлення піку 2 азогрупи аналітичної форми (рис. 5.4) є оборотним електрохімічним процесом, оскільки співвідношення висот катодного та анодного піків близьке до одиниці ($\alpha = 0,52$).

Проведені дослідження дали нам змогу уточнити імовірну схему утворення азосполуки [221], яка була запропонована на основі спектрофотометричних досліджень.

Підсумовуючи одержані експериментальні дані щодо розрахованої кількості перенесених електронів та приєднаних іонів гідрогену ми пропонуємо імовірну схему електрохімічного відновлення азосполуки АМ із САМ (рис 5.11):

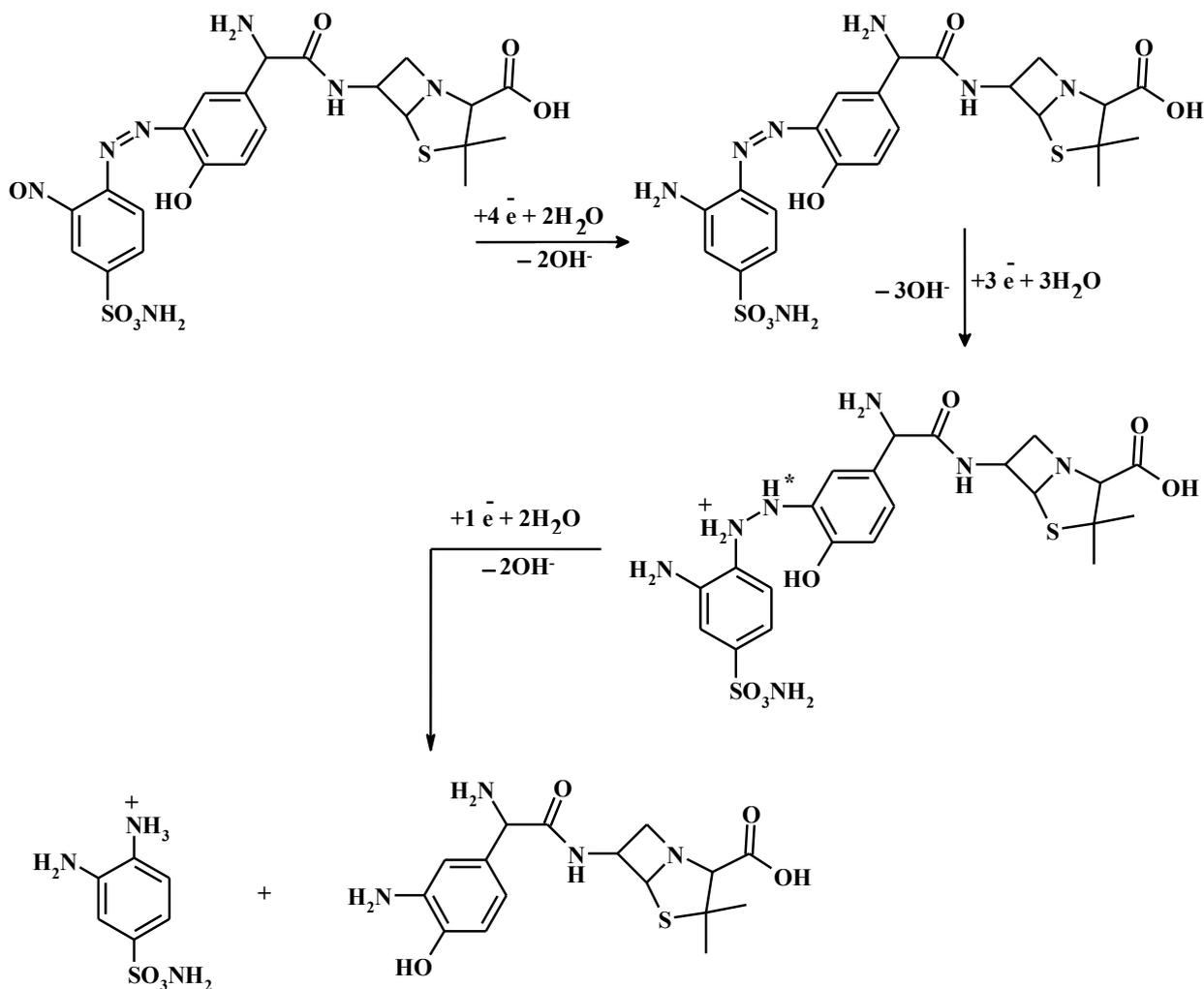


Рисунок 5.11 – Схема електрохімічного відновлення азосполуки АМ з САМ

5.3 Метрологічні характеристики вольтамперометричних методик визначення цефтріаксону та амоксициліну

На підставі дослідження залежності аналітичного сигналу від концентрації АН в процесі утворення азосполук визначено, що висота піку відновлення азоіміногрупи аналітичної форми цефтріаксону при $E_{\text{к}}^{\text{п}1} = -0,64 \text{ В}$ прямопропорційно залежить від концентрації цефтріаксону в розчині (рис 5.12 а)), та висота піку відновлення азогрупи азопродукту АМ–САМ за $E_{\text{к}}^{\text{п}2} = -0,55 \text{ В}$ (рис 5.12 б)) – від концентрації амоксициліну в розчині. Для системи АМ–САМ такі концентраційні залежності було побудовано для двох випадків, коли у реакційній суміші залишався непрореагований залишок натрій нітриту, та коли його усували сечовиною. Варто

зауважити, що залежність у обох випадках характеризується двома інтервалами лінійності аналітичного сигналу (рис 5.12 б)).

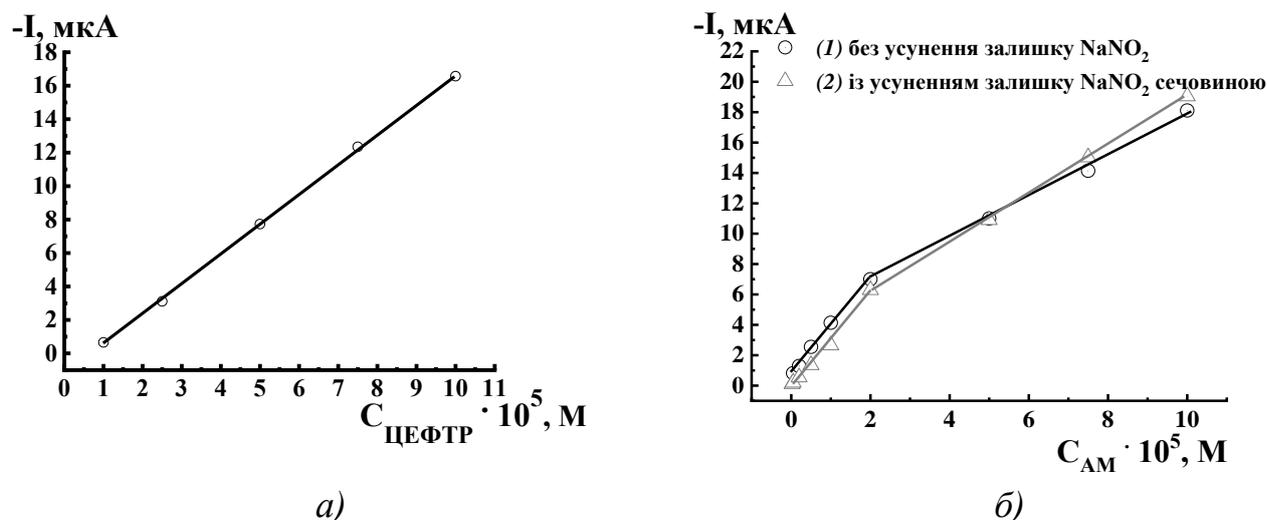


Рисунок 5.12 – Залежність висоти катодного піку азогрупи *а)* продукту власного азосполучення ЦЕФТР за $E_{\text{к}}^{\text{п2}} = -0,64 \text{ В}$, *б)* азосполуки САМ з АМ за $E_{\text{к}}^{\text{п2}} = -0,55 \text{ В}$ від концентрації антибіотика. $V = 2,5 \text{ В/с}$. *а)* Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Умови азосполучення: $\text{pH} = 11,0$; $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ М}$. *б)* Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{САМ}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{\text{Ссчов}} = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$.

Такий вигляд концентраційних залежностей, ймовірно, пов'язаний з перебігом конкуруючої реакції азосполучення діазотованого сульфаніламідів між собою та меншим концентраційним надлишком солі діазонію сульфаніламідів при вищих концентраціях амоксициліну. Наприклад, для низьких концентрацій амоксициліну вихід аналітичної форми є вищим, не зважаючи на паралельне азосполучення діазотованого сульфаніламідів між собою, бо вищою є швидкість реакції. Натомість при зростанні концентрації амоксициліну вихід продукту азосполучення є меншим, оскільки концентраційний надлишок солі діазонію сульфаніламідів щодо амоксициліну є меншим, бо концентрація сульфаніламідів стала, а також відбувається паралельна реакція молекул реагенту між собою. Додатковим чинником є час витримування розчинів, оскільки усі вольтамперограми одержують за один і той же однаковий час, то у випадку вищих

вмістів амоксициліну для забезпечення аналогічного виходу азосполуки імовірно необхідно затратити більший час.

Розроблені методики (табл. 5.5) характеризуються високою чутливістю визначення (на рівні мікрокількостей). Інтервал визначуваних концентрацій знаходиться в межах двох концентраційних порядків визначення АМ та одного концентраційного порядку визначення ЦЕФТР. Якщо порівнювати чутливість обох варіатів методики визначення АМ, то чутливішою є методика за піком відновлення азосполуки за умов усунення непрореагованого натрій нітриту сечовиною. Це може бути пов'язано з впливом піку відновлення нітрозогрупи (пік 1) на фонову лінію, коли непрореагований натрій нітрит не усувати.

Таблиця 5.5 – Метрологічні характеристики методики вольтамперометричного визначення антибіотиків. $V = 2,5$ В/с.

АМ: Умови діазотування: $C_{HCl}=0,6$ М, $C_{CAM}=5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2}=7,5 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{Ссчов}=7,5 \cdot 10^{-2}$ М. Умови азосполучення: $C_{Na_2B_4O_7}=0,1$ М, $pH=9,0$.

ЦЕФТР: Умови діазотування: $C_{HCl}=0,1$ М, $C_{NaNO_2}=5,0 \cdot 10^{-4}$ М. Умови азосполучення: $pH = 11,0$; $C_{NaCl} = 0,5$ М.

Параметр	АМ без усунення залишку $NaNO_2$	АМ при усунення залишку $NaNO_2$	ЦЕФТР
Потенціал піку(V)	-0,55	-0,55	-0,64
Межі лінійності (моль/л)	$(0,05 - 2,0) \cdot 10^{-5}$	$(0,026 - 2,0) \cdot 10^{-5}$	$(1,0 - 10) \cdot 10^{-6}$
	$(0,2 - 1,0) \cdot 10^{-4}$	$(0,2 - 1,0) \cdot 10^{-4}$	
Коефіцієнт кореляції, R	0,9977	0,9981	0,9982
	0,9988	0,9998	
Коефіцієнт b (мкА моль/л)	$3,17 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^5$	$1,79 \cdot 10^5$
Δb	$1,24 \cdot 10^4$	$4,71 \cdot 10^3$	$2,84 \cdot 10^3$
Коефіцієнт, a (мкА)	0,78	0,033	1,21
Δa	0,13	0,048	0,057
Межа виявлення (моль/л)	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$2,3 \cdot 10^{-6}$
Межа визначення (моль/л)	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$7,2 \cdot 10^{-7}$	$6,9 \cdot 10^{-6}$

Методика вольтамперометричного визначення цефтріаксону

До мірної колби ємністю 25,0 мл послідовно вносять 1,0 мл 0,1 М розчину HCl, аліквотну частину досліджуваного розчину, що містить 5,5–55,5 мг цефтріаксону, додають 1,5 мл 0,01 М розчину NaNO₂. Отриману суміш перемішують і витримують за кімнатної температури впродовж 25 хв, після чого додають 3,0 мл 4,0 М розчину NaCl та встановлюють рН=11,0 за допомогою розчину NaOH. Доводять вміст колби до мітки дистильованою водою і розчин перемішують. Досліджуваний розчин вводять в електролітичну комірку і барботують очищеним аргонем упродовж 15±1 хв. Вимірювання сили струму піка відновлення утвореної азосполуки проводять за кімнатної температури (~20°C) на вольтамперометричній цифровій установці з триелектродною коміркою за швидкості розгортки потенціалу V=2,5 В/с та E_{поч}=-0,4 В і E_{кін}=-1,4 В. Вміст цефтріаксону розраховують за висотою піка за E_к^{п1} = -0,64 В за попередньо отриманим градуйованим графіком або способом порівняння.

Методика вольтамперометричного визначення амоксициліну з допомогою сульфаніламідів

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,6 М хлоридної кислоти, додають 1,0 мл 1,25·10⁻² М розчину сульфаніламідів, додають 1,0 мл 0,18 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв при кімнатній температурі. [Непрореагований надлишок натрій нітриту усувають за допомогою додавання 1,0 мл 1,8 М розчину сечовини, після перемішування суміш витримують протягом 10 хв.] Додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 0,2 – 7,3 мкг/мл або 7,3 – 36,5 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 10,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують додаванням 1,0 мл 3,0 М розчину натрій гідроксиду до рН 9,0. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Досліджуваний розчин вносять в електролітичну комірку і видаляють розчинений кисень продуванням очищеного аргону упродовж 15±1 хв. Вимірювання сили струму піку відновлення утвореної азосполуки проводять на вольтамперометричній цифровій установці з триелектродною коміркою за швидкості розгортки потенціалу V=2,5 В/с та E_{поч}=-0,2 В і E_{кін}=-1,1 В, час затримки –

3,6 с. Вольтамперограми реєструють за кімнатної температури ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). Вміст амоксициліну розраховують за висотою піку 2 ($E_k^{\text{II}} = -0,55 \text{ В}$), висота якого пропорційна концентрації визначуваного амоксициліну в досліджуваному розчині, за попередньо отриманим градуїтованим графіком або методом порівняння.

5.4 Вибірковість взаємодії амоксициліну з діазосіллю сульфаніламідів за наявності допоміжних та біологічно-активних речовин.

Лікарські препарати на основі амоксициліну випускають у різних лікарських формах, для отримання яких застосовують різні допоміжні речовини. Серед лікарських препаратів АМ частина є комбінованими, які у складі містять, крім АМ, ще одну активну речовину клавуланову кислоту, яку використовують в ЛЗ у комбінації з амоксициліном з метою запобігти руйнуванню АМ бактеріями, що виробляють β -лактамазу. Лікарські препарати на основі цефтріаксону випускають у формі порошку для приготування розчину для ін'єкцій, який не містить жодних допоміжних речовин. Для розроблення нової методики визначення діючої речовини необхідним етапом є дослідження впливу усіх компонентів лікарських форм як допоміжних та інших біологічно-активних речовин на вибірковість взаємодії діючої речовини з реагентом.

Нами досліджено вплив декількох допоміжних речовин та клавуланової кислоти на визначення АМ. Критерієм селективності визначення було обрано незмінність струму піку 2, який відповідає відновленню азогрупи деривату АМ, у межах 5%. Як видно з даних табл. 5.6, визначенню АМ з САМ не заважає повідон, кальцій стеарат та крохмальгліколят у кількостях набагато більших, ніж ті, що містяться у лікарських препаратах. Кальцій стеарат та натрій крохмальгліколят не впливають на визначення АМ оскільки дані речовини нерозчинні за умов проведення аналізу і їх вилучають з системи фільтруванням.

Як видно з даних табл. 5.6 та рис. 5.13 наявність у системі клавуланової кислоти у кількостях, які використовують у лікарських засобах, заважає визначенню АМ за допомогою розробленої методики. Клавуланова кислота є електрохімічно

активною речовиною і має пік відновлення при тому самому потенціалі, що і продукт азосполучення амоксициліну із діазотованим сульфаніламідом.

Таблиця 5.6 – Результати ВА визначення АМ з САМ за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей допоміжних речовин. $V = 2,5$ В/с. Умови діазотування: $C = 0,6$ М, $C_{САМ} = 5,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,5 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{АМ} = 7,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$ М, $pH = 9,0$.

Допоміжні Речовини	m(ДР) : m(АМ)*	m(ДР) : m(АМ)**	САМ+АМ Знайдений вміст АМ, % $\bar{x} \pm S \cdot t_{\alpha} / \sqrt{n}$
Клавуланова кислота	1:0,25	1:0,035	112,6±2,0
Кальцій стеарат	1:0,015	1:10	95,1±1,9
Повідон	1:0,03	1:0,06	96,02±2,6
Натрій крохмальгліколят тип А	1:0,47	1:2,5	95,7±3,2

* – масові співвідношення АМ та допоміжних речовин у ліках.

** – максимальні масові співвідношення АМ та досліджуваних допоміжних речовин, що не заважають визначенню.

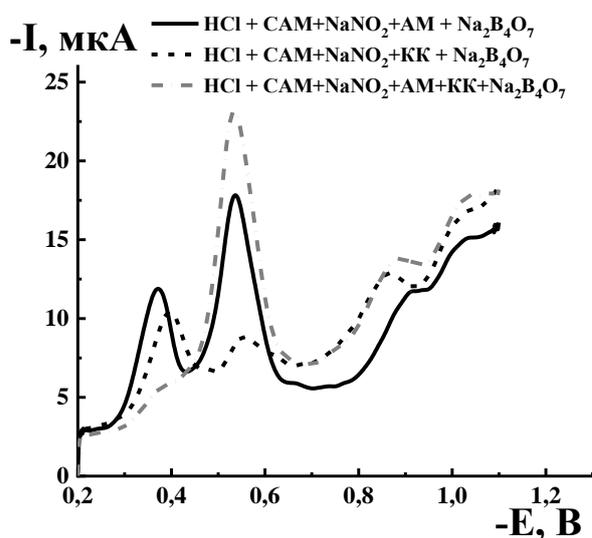


Рисунок 5.13 – Вольтамперограми у розчинах азосполуки АМ з САМ за наявності та відсутності в досліджуваній пробі клавуланової кислоти. $V = 2,5$ В/с. Умови діазотування: $C = 0,6$ М, $C_{САМ} = 5,0 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,5 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{АМ} = 7,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{КК} = 1,8 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$ М, $pH = 9,0$.

Отримані результати дають підставу рекомендувати ВА метод із застосуванням реакції азосполучення для визначення вмісту ЦЕФТР та АМ у складі готових лікарських форм, щоб спростити та здешевити аналіз. Проаналізувавши літературні дані, варто зауважити, що нами вперше запропоновано азосполучення з метою утворення аналітичної форми для розробки вольтамперометричної методики визначення амоксициліну та цефтріаксону. За метрологічними характеристиками запропонована нами методика не поступається відомим вольтамперометричним методикам визначення амоксициліну. Розроблені нами методики визначення АМ із використанням сульфаніламідів та ЦЕФТР на основі власної азосполуки є досить експресними та чутливими і можуть використовуватись для визначення антибіотиків у ліках.

5.5 Апробація методики вольтамперометричного визначення амоксициліну та цефтріаксону у лікарських препаратах

Розроблені ВА методики визначення амоксициліну та цефтріаксону було апробовано при визначенні антибіотиків у лікарських препаратах.

Нами було визначено вміст амоксициліну у таблетках “Амоксил” та порошку для оральної суспензії “Оспамокс” (виробник – Сандоз, ГмбХ-ТехОпс, Австрія). Склад препаратів наведено у табл. 4.11.

Після проведення пробопідготовки багатокомпонентного порошку “Оспамокс” та отримання розчину азосполуки на його основі ми зняли вольтамперограми, які наведено на рис. 5.14.

Як видно з рис. 5.14 вольтамперограма у розчині зразка практично повністю співпадає із вольтамперограмою азосполуки отриманої для стандартного розчину АМ. Тому ми можемо стверджувати, що після відфільтрування нерозчинних компонентів суспензії ті, що розчинилися на вольтамперометричне визначення амоксициліну не впливають.

Результати визначення вмісту амоксициліну у лікарських препаратах наведено у табл. 5.7.

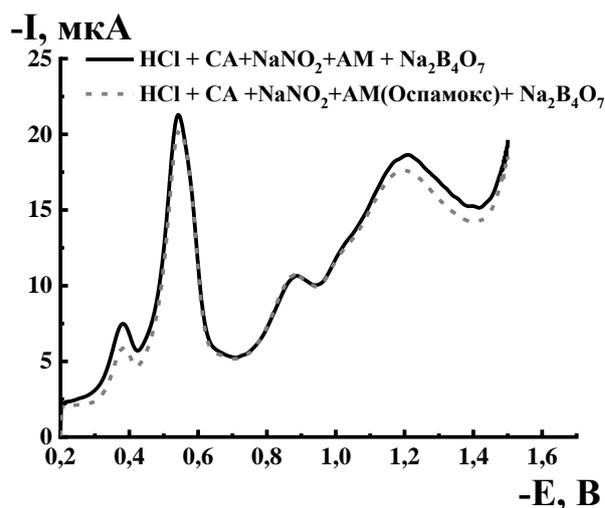


Рисунок 5.14 –Вольтамперограми розчинів утвореної азосполуки АМ з СА із стандартним розчином амоксициліну та розчином зразка суспензії “Оспамокс”. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{CA}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{AM}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$; $V = 2,5 \text{ В/с}$.

Таблиця 5.7 – Результати вольтамперометричного визначення амоксициліну з використанням сульфаниламідів в лікарських препаратах. $n = 3$, $P = 0,95$; $V = 2,5 \text{ В/с}$; $\mu = 0,3 \text{ М}$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{CAM}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,1 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$.

Амоксицилін (регламентований вміст у препараті)	Встановлений вміст			
	Спектрофотометричний метод		Вольтамперометричний метод	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
“Амоксил” таблетки, корпорація “Артеріум”, ПАТ “Київмедпрепарат”, Україна				
Амоксицилін тригідрат ($250,0 \pm 12,5 \text{ г/таблетку}$)	$260,0 \pm 2,2$	0,007	$249,0 \pm 10,0$	0,013
“Оспамокс” порошок по 5,1 г у флаконі для 60 мл оральної суспензії, Сандоз, ГмбХ-ТехОпс, Австрія				
Амоксицилін тригідрат ($125,0 \text{ мг/5 мл} \pm 6,25 \text{ мг/5 мл}$)	$120,9 \pm 5,93$	0,010	$122,5 \pm 2,97$	0,013

Як видно з даних табл. 5.7 результати кількісного визначення АМ, отримані вольтамперометричним методом, добре узгоджуються з результатами, отриманими спектрофотометричним методом [221, 242] та є в межах допустимих вмістів згідно аналітично нормативної документації фірм виробників для обох препаратів (допустиме відхилення 5 % від номінального вмісту амоксициліну).

Вольтамперометричну методику визначення амоксициліну за реакцією азосполучення із діазотованим САМ у таблетках “Амоксил” успішно валідовано. Результати валідації наведено у додатку Е.

На основі розробленої методики визначення ЦЕФТР було визначено його вміст у порошку для приготування розчину для ін’єкцій “Цефтриаксон”, який не містить у своєму складі допоміжних речовин (табл. 5.8).

Таблиця 5.8 – Результати вольтамперометричного визначення ЦЕФТР. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ М}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, Умови азосполучення: $C_{\text{NaCl}} = 0,5 \text{ М}$, $\text{pH} = 11,0$.

Цефтріаксон (регламентований вміст у препараті – 1г/флакон)	ВЕРХ згідно з ДФУ		Вольтамперометрично	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
Цефтриаксон", НСПС Хебейн Хуамін Фармасьютікал Компані Лімітед № 98 Хуан Роад, Китай				
Цефтріаксон 90 – 120% (0,90 – 1,20 г/флакон)	100,11±0,11 (1,001±0,001)	0,001	98,8±1,97 (0,989±0,019)	0,023

Як видно з даних табл. 5.8 результати визначення вмісту ЦЕФТР, отримані вольтамперометричним методом [240], добре узгоджуються з результатами, отриманими фармакопейним методом ВЕРХ та є в межах допустимих вмістів згідно методики контролю якості фірми виробника (допустиме відхилення 5 % від номінального вмісту).

Використання вольтамперометричного методу із застосуванням реакції азосполучення для визначення вмісту амоксициліну та цефтріаксону дає змогу визначати їх у складі готових лікарських форм, дозволяє спростити та здешевити аналіз порівняно із фармакопейним методом ВЕРХ, що підтверджують отримані результату.

Результати описані у цьому розділі можна підсумувати такими тезами:

- вперше досліджено можливість застосування азосполуки амоксициліну та солі арендізонію САМ, а також азоіміносполуки на основі цефтріаксону для розробки методик вольтамперометричного визначення АМ та ЦЕФТР. Вивчено, що азоіміносполука ЦЕФТР відновлюється за потенціалу $E_{\text{к}}^{\text{п1}} = -0,64 \text{ В}$, а азосполука АМ–САМ має пік відновлення за $E_{\text{к}}^{\text{п2}} = -0,55 \text{ В}$. Встановлено, що природа струму обох цих піків є адсорбційною;
- на основі проведених досліджень розроблені нові вольтамперометричні методики визначення АМ та ЦЕФТР та розраховано їх метрологічні характеристики: для АМ – $C_{\text{min}} = 3,8 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ (за наявності непрореагованого натрій нітриту), $C_{\text{min}} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ (методика з усуненням непрореагованого натрій нітриту під дією сечовини); для ЦЕФТР – $C_{\text{min}} = 2,3 \cdot 10^{-6} \text{ М}$;
- на основі проведених вольтамперометричних досліджень запропоновано імовірні схеми відновлення азосполуки амоксициліну з сульфаніламідом та азоіміносполуки цефтріаксону;
- вольтамперометричні методики визначення амоксициліну та цефтріаксону успішно апробовано при аналізі лікарських препаратів. ВА методику визначення АМ з САМ, у таблетках “Амоксил” успішно валідовано.

ВИСНОВКИ

На підставі вивчення хіміко-аналітичних характеристик β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків отримано нові аналітичні форми для спектрофотометричного визначення цефтріаксону, цефтазидиму, амоксициліну та окситетрацикліну у лікарських засобах з використанням реакції азосполучення. Показано, що цефалоспоринові антибіотики (ЦЕФТ і ЦЕФТР) виступають як діазоскладові і азосполучаються із фенольними реагентами (8-оксихіноліном, 2-метилфенолом, резорцином), а амоксицилін та окситетрациклін як азоскладові сполучаються із солями арендіазонію первинних ароматичних амінів (сульфаніламідів: САМ і СТЗ, фуксину, ДНСК). Вперше запропоновано використовувати азосполуки амоксициліну та цефтріаксону для їх вольтамперометричного визначення.

1. З'ясовано оптимальні умови діазотування реагентів САМ та СТЗ для подальшого азосполучення із АМ; Фукс – для азосполучення із ОТЦ; природу та концентрацію кислоти (0,6–1,0 М хлоридна кислота), концентрацію діазотуючого реагенту (10–15-кратний надлишок відносно концентрації реагента), тривалість реакції діазотування (10–20 хв). Вперше досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей реагентів з антибіотиками – кислотність середовища (для САМ, СТЗ, Фукс – рН 10,5, ДНСК (визначення ОТЦ) в середовищі 10,0 М NaOH), надлишок реагенту (для САМ та СТЗ – 5-кратний стосовно АМ, для Фукс – 1,33-кратний надл. ОТЦ, для ДНСК – 2,5-кратний стосовно ОТЦ), стійкість утворених сполук: АМ–САМ (СТЗ) – 10 хв; ОТЦ–Фукс – 3 год, ОТЦ–ДНСК – 10 хв.

2. Оптимізовано умови отримання солей діазонію ЦЕФТ та ЦЕФТР – концентрація хлоридної кислоти (12,0 М), концентрація діазотуючого реагенту (10-кратний надлишок відносно концентрації антибіотика). Вперше досліджено умови максимального виходу забарвлених сполук діазосолей ЦА з фенольними реагентами – кислотність середовища (кінцева концентрація NaOH=0,16 М), надлишок реагенту (для систем 8-Окс–ЦЕФТ та 8-Окс–ЦЕФТР 7-кратний; для Рез–ЦЕФТ, 2-Мет–ЦЕФТ, 2-Мет–ЦЕФТР – 10-кратний). Показано, що утворені азосполуки ЦЕФТ–8-Окс (Рез, 2-Мет) та ЦЕФТР–8-Окс (2-Мет) стійкі у розчині впродовж 1 год.

3. На основі проведених досліджень розроблені нові спектрофотометричні методики визначення АМ, ОТЦ, ЦЕФТ, ЦЕФТР та розраховано їх метрологічні характеристики, встановлено, що найчутливішою методикою визначення АМ є з СТЗ, $C_{\min} = 6,0 \cdot 10^{-7}$ М; ОТЦ з фуксином, $C_{\min} = 3,17 \cdot 10^{-6}$ М; ЦЕФТ з 2-Мет, $C_{\min} = 5,7 \cdot 10^{-7}$ М; ЦЕФТР з 2-Мет, $C_{\min} = 4,3 \cdot 10^{-7}$ М. Запропоновані методики чутливі, селективні доволі експресні (10–30 хв) та успішно апробовані на модельних розчинах методом “введено-знайдено”.

4. Вивчено селективність спектрофотометричного визначення антибіотиків за розробленими методиками у присутності допоміжних (неорганічних та органічних солей натрію, кальцію, магнію, алюмінію, бензилового спирту, бутилгідрокситолуену, крохмалю, повідону, кокосової олії) та діючих речовин різної природи (клавуланової кислоти (АМ); норсульфазолу, триметоприму (ОТЦ)).

5. Вперше запропоновано використовувати азосполуку амоксициліну з сіллю арендізонію САМ, а також азоіміносполуку на основі власного азосполучення діазосолі цефтріаксону для розробки методик вольтамперометричного визначення АМ та ЦЕФТР. Вивчено, що азоіміносполука ЦЕФТР відновлюється за потенціалу $E_k^{n1} = -0,64$ В, а азосполука АМ–САМ має пік відновлення за $E_k^{n2} = -0,55$ В. Встановлено, що природа струму піків відновлення є адсорбційною. На основі проведених досліджень розроблено нові вольтамперометричні методики визначення АМ та ЦЕФТР та розраховано їх метрологічні характеристики: АМ – $C_{\min} = 3,8 \cdot 10^{-7}$ М (за наявності непрореагованого натрій нітриту), $C_{\min} = 2,4 \cdot 10^{-7}$ М (методика з усуненням непрореагованого NaNO_2 під дією сечовини); ЦЕФТР – $C_{\min} = 2,3 \cdot 10^{-6}$ М.

6. Проведено апробацію методик визначення антибіотиків з досліджуваними реагентами під час аналізу одно- та багатокомпонентних лікарських та ветеринарних препаратах. Вперше валідовано спектрофотометричні методики визначення АМ з сульфаніламидами та ЦЕФТР з 8-оксихіноліном, а також вольтамперометричну методику визначення АМ з САМ у лікарських формах та показано можливість їх застосування для контролю вмісту цих біологічно активних речовин у лікарських засобах.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Etebu E. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives / E. Etebu, I. Arikekpar // *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* – 2016. – Vol.4, No.6. – P.90 – 101.
2. Bird A. E. Amoxicillin: Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients / A. E. Bird, Ed. H. G. Brittain – Surrey: Academic Press. – 1994. – Vol.23. – P.1–52.
3. Alekseev V.G. Acid-base hroperties of amoxycillin acid-baseproperties of Amoxycillin / V.G. Alekseev, E.V. Demskaya, E.A. Milashs, V.V. Igolkin // *Russ. J. Gen. Chem.* – 2005. – Vol. 75, No.7. – P.1147–1150.
4. Abounassif M.A. Analitical profile of Ceftazidime / M.A. Abounassif, N.A. Mian, M.S. Mian // *Analitical profile of drug substances.* – 1990. –Vol.19. – P. 95 – 121.
5. Алексеев В.Г. Кислотно-осноные равновесия в водном растворе цефтазидима / В.Г. Алексеев, М.В Голубева // *Вестник ТеГУ. Серия Химия.* – 2012. Вип. 14. – С. 4–9.
6. Jenke D.R. Drug binding by reservoirs in elastomeric infusion devices / D.R. Jenke // *Pharm. Res.* – 1994. – Vol.11, No.7. – P.984–989.
7. El-Shaboury S.R. Analysis of cephalosporin antibiotics. Review / S. R. El-Shaboury, G. A. Saleh, F. A. Mohamed [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol.45, No. 1. – P.1–19.
8. Owens H. M. Ceftriaxone Sodium: Comprehensive Profile / H. M. Owens, A. K. Dash // *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* – 2003. – Vol.30. – P. 21–57.
9. Голубева М.В. Ионные равновесия в водном растворе цефтриаксона / М.В.Голубева, В.Г Алексеев // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – Vol. 6, No.2. – P. 494–497.
- 10.Sassman S. A. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange / S. A. Sassman, L. S. Lee // *Environ. Sci. Technol.* – 2005, – Vol.39, No.19. – P. 7452–7459.
- 11.National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 54675779, Oxytetracycline. Retrieved April 5, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytetracycline>.

12. Loke M.-L. Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure / M.-L. Loke, J. Tjornelund, B. Halling-Sorensen // *Chemosphere* – 2002. – Vol.48, No. 3. – P.351–361.
13. Aristilde L. Interactions of oxytetracycline with a smectite clay: a spectroscopic study with molecular simulations / Cl. Marichal, J. Miéché-Brendlé, B. Lanson, L. Charlet // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – Vol.44, No. 20. – P.7839–7845.
14. Амоксицилін / Нормативно – директивні документи МОЗ України. – [Цит. 2021, 9 березня]. – Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=24543>
15. Чекман І.С. Фармакологія: підручник для студ. мед. ф-тів / Чекман І. С., Горчакова Н. О., Казак Л. І. [та ін.]; за ред. проф. І. С. Чекмана. – Вид. 4-те. – Вінниця: Нова Книга, 2017. – 784 с.
16. Arumugham V.B. Cascella M. Third Generation Cephalosporins. [Updated 2021 Jan 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>
17. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Мелентьева. – В 2-х т. – М.: Медицина, 1976. – Т. I. – 780 с., Т. II. – 827 с.
18. Лекарственные препараты / Ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – Д.: НПП “Морион Лтд”, 1997. – 1030 с.
19. Білоусов Ю.Б. Взаємодія лікарських препаратів з їжею / Ю.Б. Білоусов, К.Г. Гуревич // *Фармацевтичний журн.* – 2002. – № 6. – С.42–45.
20. Чекман І.С. Клініко-фармакологічні властивості антибіотиків / І.С. Чекман // *Сучасні інфекції.* – 2001. – № 2. – С.76–89.
21. Державна Фармакопея України в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. — Т. 2. — 724 с.
22. Hasan H. M. I. Mercurimetric titration of some beta lactam antibiotics in bulk and pharmaceutical products / H. M. I. Hasan, I. H. Habib, S. K. Omar // *Der Pharmacia Sinica.* – 2012. – Vol. 3, No. 3. – P. 327-331.

23. De Diego M. Chemical stability of ceftriaxone by a validated stability-indicating liquid chromatographic method / M. De Diego, G. Godoy, S. Mennickent // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2010. – Vol.55, No.3. – P. 335–337.
24. Kumar R. N. Stability indicating fast LC method for determination of ceftriaxone and tazobactam for injection related substances in bulk and pharmaceutical formulation / R. N. Kumar, G.N. Rao, P. Y.Naidu // *Int. J. Appl. Biol. Pharm.* – 2010. – Vol.1, No.1. – P. 145–157.
25. Lukaszewicz P. A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique / P. Lukaszewicz¹, A. Bialk-Bielinska, J. Dolzonek [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – Vol.410. – P. 1697–1707.
26. Patyra E. Quantification of veterinary antibiotics in pig and poultry feces and liquid manure as a non-invasive method to monitor antibiotic usage in livestock by liquid chromatography mass-spectrometry / E. Patyra, K. Kwiatek, C. Nebot [et al.] // *Molecules.* – 2020. – Vol.25, No.14. – P.3265.
27. British Pharmacopoeia (BPh), British Pharmacopoeia Commission, TSO (The Stationery Office), 2019.
28. United States Pharmacopoeia, USP 41–NF 36 Convention Inc., Rockville, MD XXVI, 2017.
29. European Pharmacopoeia (Eur. Ph.). 7-th Ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010.
30. Sabry S.M. Development and validation of HPLC-DAD method for the simultaneous determination of amoxicillin, metronidazole and rabeprazole sodium. Application to spiked simulated intestinal fluid samples system / S.M. Sabry, M.H. Abdel-Hay, T.S. Belal [et al.] // *Ann Pharm Fr.* – 2015. – Vol. 73, No 5 – P. 351–360.
31. Foroutan S. M. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection / S. M. Foroutan, A. Zarghi, Al. Shafaati [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 45, No 3 – P. 531–534.

32. Li W. Simultaneous determination of amoxicillin and ranitidine in rat plasma by high-performance liquid chromatography / W. Li, F. Tan, K. Zhao // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – Vol. 41, No 2 – P. 594–598.
33. Hoizey G. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection / G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 30, No 3 – P. 661–666.
34. Dhoka M. High-performance liquid chromatographic method for determination of amoxicillin trihydrate and bromhexine hydrochloride in oral dosage forms / M. Dhoka, V. Gawande, Pr. Joshi // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 2, No 1 – P. 129–133.
35. Rele R. V. Simultaneous validation of amoxicillin trihydrate and carbocisteine in pharmaceutical dosage by reverse phase high performance liquid chromatography / R. V. Rele, Pr. P. Tiwatane // *Res. J. Recent Sci.* – 2018. – Vol. 7, No 3 – P. 8–13.
36. Teixeira da Trindade M. A critical review of analytical methods for determination of ceftriaxone sodium / M. Teixeira da Trindade, H.R. Nunes Salgado // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2018. – Vol. 48, No. 2. – P. 95–101.
37. Ascalone V. Determination of ceftriaxone, a novel cephalosporin, in plasma, urine and saliva by high-performance liquid chromatography on an NH₂ bonded-phase column / V. Ascalone, L. DAL Bó // *J. Chromatogr.* – 1983. – Vol. 273, No. 2. – P. 357–366.
38. Patel K. P. Development and validation of stability-indicating method for determination of the related substance of ceftriaxone in ceftriaxone for injection USP by RP-HPLC / K. P Patel, U. Shaoo, A.K. Sen [et al.] // *Pharma Sci. Monit. Asian J. Chem.* – 2013. – Vol. 4, No. 1. – P. 3535–3550.
39. Campos M. Ceftriaxone pharmacokinetics by new simple and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography method / M. Campos, J. Alonso, E. Martins, J. Oliveira, R. Peccinini // *Diagn. Micr Infec Dis.* – 2017. – Vol. 88, No. 1. – P. 95–99.
40. Yeh H.-H. Determination of Ceftazidime in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic chromatography with direct sample injection / H.-H. Yeh,

- Y.-H. Yang, Y.-W. Chou, J.-Y. Ko, C.-A. Chou, S.-H. Chen // *Electrophoresis*. – 2005. – Vol.26, No. 4–5. – P. 927–934.
41. Nawaz M. Simultaneous determination of cefpirome, cefaclor, ceftazidime, and cephadrine in pharmaceutical formulations by reversed phase HPLC / M. Nawaz, M. S. Arayne, N. Sultana // *Acta Chromatographica*– 2011. – Vol.23, No. 2. – P.205–213.
42. Humberta T. Ceftazidime determination in serum by high-pressure liquid chromatography / T. Humberta, A. Rumelina, U. Fauthb Forsch. // *Drug Res.*– 2004.– Vol.54, No.6. – P. 320–322.
43. Hassouna M. E. M. Stability indicating Rp-HPLC method for simultaneous estimation of ceftazidime pentahydrate and its impurity product pyridine in powder used for making solution in vial for IM and Iv injections / M.E.M. Hassouna, M.A Mohamed // *Ann. Rev. Resear.*– 2018. – Vol.1, No. 3. – P. 1–9.
44. Лінійчук Н.В. Визначення залишкових кількостей тетрациклінів у продуктах тваринного походження / Н. В. Лінійчук // *Біологія тварин*. – 2012.– Т. 14, №1–2.– P. 668–672.
45. Coyne R. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle / R. Coyne, O. Bergh, O.B. Samuelsen // *J. Chromatogr. B.*– 2004.– Vol.810, No. 2.– P. 325–328.
46. Cooper A.D. Improved method for the on-line chelate affinity chromatography – high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products / A.D. Cooper, G.W.E. Stubbings, M. Kelly [et al.] // *J. Chromatogr. A.*– 1998.– Vol.812, No. 1–2.– P. 321–326.
47. Papadoyannis I.N. A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the determination of oxytetracycline in commercial pharmaceuticals / I.N. Papadoyannis, V.F. Samanidou, L.A. Kovatsi // *J. Pharmaceut. Biomed.*– 2000.– Vol.23, No. 2–3.– P. 275–280.
48. Khsay G. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of oxytetracycline and related impurities / G. Khsay, F. Shraim, Ph. Villatte [et al.] // *J. Pharmaceut. Biomed.*– 2013.– Vol.75.– P. 199–206.

49. Sebaiy M. M. Developing a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of oxytetracycline, tinidazole and esomeprazole in human plasma / M. M. Sebaiy, W. S. Hassan, M. E. Elhennawy // *J. Chromatogr. Sci.* – 2019.– Vol.57, No. 2 – P. 1–6.
50. Sversut R. A. A critical review of properties and analytical methods for the determination of oxytetracycline in biological and pharmaceutical matrices / R.A. Sversut, A.A. da Silva, T.F. Mazon Cardoso [et al.] // *Crit Rev Anal Chem.* – 2017.– Vol.47, No. 2 – P. 154–171.
51. Han J. Simultaneous determination of olaquinox, oxytetracycline and chlorotetracycline in feeds by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection adopting online synchronous derivation and separation / J. Han, D. Jiang, T. Chena [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2020.– Vol.1125. – Article 122253.
52. Maia P.P. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection / P.P. Maia, S. Rath, F.G.R.Reyes. // *Food Chem.* – 2008.– Vol. 109, No. 1. – P. 212–218
53. Taokaenchan N. Determination of tetracycline antibiotic residues in honey samples collected from northern part of Thailand by HPLC / N. Taokaenchan, S. Sangsrichan // *KMITL Sci. J.*– 2008.– Vol. 8, No. 2,(B) – P. 18–25.
54. Kawata S. Liquid-chromatographic determination of oxytetracycline in swine tissues / S. Kawata, K. Sato, Y. Nishikawa, K. Iwama // *J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Int.*– 1996.– Vol.79, No. 6.– P. 1463–1465.
55. Savage A.L. A novel screening method for tetracycline in milk combining sensitized – Eu (III) fluorescence and immunoaffinity techniques / A.L. Savage, H.S. Siti, Y. Baird // *Anal.Chim. Acta.*– 1998.– Vol. 375, No. 1–2.– P. 1–4.
56. Uddin M. N. Simultaneous determination of amoxicillin and chloramphenicol and their drug interaction study by the validated UPLC method system / M. N. Uddin, S. Das, S. H. Khan // *J. Taibah Univ. Sci.* – 2016. – Vol. 10, No 5. – P. 755–765.
57. Li H. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry /

- H. Li, X. Xia, Y. Xue [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – Vol. 900, No 1.– P. 59–63.
- 58.Liu Ch. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Ch. Liu, H. Wang, Y. Jiang [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879, No 7–8 – P. 533–540.
- 59.Wang B. Quantitative analysis of amoxicillin, amoxicillin major metabolites, and ampicillin in chicken tissues via ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry / B. Wan, M. Pang, X. Xie [et al.] // *Food Anal. Methods* – 2017. – Vol. 10 – P. 1–14.
- 60.Saini A. Fluoremetric determination of amoxicillin drug in aqueous medium using hybrid framework of organic–inorganic nanoparticles system / A. Saini, J. Singh, R. Kaur [et al.] // *Sens. Actuators, B.* – 2015. – Vol. 209, No 31. – P. 524–529.
- 61.Ma L. Flow-injection chemiluminescence determination of penicillin antibiotics in drugs and human urine using luminol-Ag(III) complex system / L. Ma, W. Kang. X. Xu [et al.] // *J. Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 67, No 3. – P. 219–225.
- 62.Hasanpour F. Simultaneous chemiluminescence determination of amoxicillin and clavulanic acid using least squares support vector regression system / F. Hasanpour, Ali A. Ensafi, T. Khayamian // *Anal. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 607, No 1–2. – P. 44–50.
- 63.Витюкова Е.О. Определение окситетрациклина в молоке с использованием сенсibiliзированной люминесценции ионов Eu (III) / Е.О. Витюкова, А.В. Егорова, С.В. Бельтюкова і ін. // *Вісник ОНУ.* – 2004. – Т.9, Вип. 6. – С. 97–105.
- 64.Wang M. Ethyl substituted fluorimetric method for the determination of trace amounts of oxytetracycline in rine, serum, feed of chook and milk / M. Wang, F. Hou, C. Jiang // *J. Luminescence.*– 2005.– Vol.113, No. 1–2.– P. 94–99.
- 65.Chen G. Europium-sensitized luminescence determination of oxytetracycline in catfish muscle / G. Chen, M.J. Schneider, A.M. Darwish [et al.] // *Talanta.*– 2004.– Vol.64, No. 1.– P. 252–257.

66. Brahman Pr. K. Conducting polymer film based electrochemical sensor for the determination of amoxicillin in micellar media / Pr.K. Brahman, R.Ah. Dar, Kr.S. Pitre // *Sens. Actuators, B.* – 2012. – Vol. 176 – P. 207–314.
67. Karimi-Maleh H. A novel biosensor for liquid phase determination of glutathione and amoxicillin in biological and pharmaceutical samples using a ZnO/CNTs nanocomposite/catechol derivative modified electrode / H. Karimi-Maleh, F. Tahernejad-Javazmi, V. K. Gupta [et al.] // *J. Mol. Liq.* – 2014. – Vol. 196 – P. 258–263.
68. Ojani R. A novel voltammetric sensor for amoxicillin based on nickel–curcumin complex modified carbon paste electrode / R. Ojani, J.-B. Raoof, S. Zamani // *Bioelectrochem.* – 2012. – Vol. 85 – P. 44–49.
69. Norouzi B. Electrochemical sensor for amoxicillin using Cu/poly (*o*-toluidine) (sodium dodecyl sulfate) modified carbon paste electrode / B. Norouzi, T. Mirkazemi // *Russ. J. Electrochem.* – 2016. – Vol. 52, No 1 – P. 37–45.
70. Pollap A. Sensitive voltammetric amoxicillin sensor based on TiO₂ sol modified by CMK-3-type mesoporous carbon and gold nanoparticles / A. Pollap, P. Knihnicki, P. Kustrowski, J. Kozak, M. Golda-Cepa, A. Kotarba, J. Kochana // *Electroanal.* – 2018. – Vol. 30, No.10– P. 2386–2396.
71. Absalan Gh. Highly sensitive determination and selective immobilization of amoxicillin using carbon ionic liquid electrode / Gh. Absalan, M. Akhond, H. Ershadifar // *J. Solid State Electrochem.* – 2015. – Vol. 19, No 8 – P. 2491–2499.
72. Deroco P. B. A new and simple method for the simultaneous determination of amoxicillin and nimesulide using carbon black within a dihexadecylphosphate film as electrochemical sensor / P.B. Deroco, R.C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho // *Talanta.* – 2018. – Vol. 179 – P. 115–123.
73. Santos D. P. Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film / D. P. Santos, M. F. Bergamini, M. Valnice, B. Zanoni // *Sens. Actuators, B.* – 2008. – Vol. 133, No 2. – P. 398–403.
74. Chen C. Amoxicillin on polyglutamic acid composite three-dimensional graphene modified electrode: Reaction mechanism of amoxicillin insights by computational

- simulations / C. Chen, X. Lv, W. Lei, Y. Wu [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2019.- Vol. 1073, No 27.– P. 22–29.
75. Wong A. A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices / A. Wong, A. M. Santos, F. H. Cincottoc [et al.] // *Talanta.* –2020. – Vol. 206. – P. 111–118.
76. Prasad B.B. Application of polymer-modified hanging mercury drop electrode in the indirect determination of certain β -lactam antibiotics by differential pulse, ion-exchange voltammetry / B.B. Prasad, Bh. Arora // *Electroanal.* – 2003. – Vol. 15. – No. 14 – P. 1212–1218.
77. Kapetanović V. Bestimmung des Ni(II)-Amoxicillin-Komplexes durch derivativpolarographie. Determination of the Ni(II)-amoxicillin-complex by derivative polarography / V. Kapetanović, D. Veselinović // *Arch Pharm.* – 1988. – Vol. 321, No.9 – P. 559 – 560.
78. Rizk M. Polarographic behaviour and determination of some penicillins after bromometric oxidation / M. Rizk, M.I. Walash, A.A Abou-Ouf, [et al.] // *Pharm Weekblad.* – 1984. – Vol. 6, No 3 –P. 114–117.
79. Aleksic M. M. Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of ceftazidime, cefuroxime-axetil and ceftriaxone / M. M. Aleksic, N. Lijeskic, J. Pantic [et al.] // *Facta Universitatis.* – 2013. – Vol. 11, No 1. – P. 55 – 66.
80. Sengun F. I. Analytical investigations of cephalosporins – II. Polarographic behavior of ceftriaxone, cefuroxime, cefatotaxime and ceftizoxime and assay of their formulations / F.I. Sengun, K. Ulas, I. Fedai // *J. Pharmaceut. Biomed.* – 1985. – Vol.3, No.2. – P. 191–199.
81. Nikolic K. Voltammetric and theoretical studies of the electrochemical behavior of cephalosporins at a mercury electrode / K. Nikolic, M. M. Aleksic, V. Kapetanovic [et al.] // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2015. – Vol.80, No.8. – P. 1035–1049.
82. El Maali N.A. Cathodic stripping voltammetric determination of the cephalosporin antibiotic ceftriaxone at the mercury electrode in aqueous and biological media /

- N. A. El Maali, A. M. M. Ali, M. Khodari [et al.] // *J. Electroanal. Chem.* – 1991. – Vol.321, No.26. – P. 485–492.
83. Altinoz S. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of ceftriaxone at a static mercury dropping electrode / S. Altinoz, A. Temize // *J. Pharm. Sci.* – 1990. – Vol. 79, No. 4. – P. 351–353.
84. Reddy G.V.S. Estimation of cephalosporin antibiotics by differential pulse polarography / G.V.S. Reddy, S.J. Reddy // *Talanta.* – 1997. – Vol. 44, No. 4. – P. 627–631.
85. Ogorevc B. Electrochemical analysis of cephalosporin antibiotics / B. Ogorevc, S. Gomiscek // *J. Pharmaceut. Biomed.* – 1991. – Vol.9, No.3. – P. 225 – 236.
86. Tarinc D. Electrochemical investigation and determination of ceftazidime in pharmaceutical dosage forms and human urine / D. Tarinc, B. Dogan-Topal, A. I. Golcu, S.A. Ozkan // *J. of Anal. Chem.* – 2014. – Vol.69, No. 9. – P. 899–908.
87. Ferreira V. S. Differential pulse polarographic determination of ceftazidime in urine samples with and without prior extraction / V. S. Ferreira, M. Valnice, B. Zanon, M. Furlana, A.G. Fogg // *Anal. Chim. Acta.* – 1997. – Vol.351, No.1–3. – P. 105–114.
88. Ferreira V.S. Cathodic stripping voltammetric determination of ceftazidime with reactive accumulation at a poly-L-lysine modified hanging mercury drop electrode / V.S. Ferreira, M. Valnice, B. Zanon [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 1999. – Vol.384, No. 2. – P. 159–166.
89. Pereira A.V. Do voltammetry electrodes modified with MIPs really work? The role of large molecules: folic acid as a prob / A.V. Pereira, P. Cervini, E.T.G. Cavalheiro // *Anal Methods.* – 2014. – Vol. 17, No. 6. – P. 6658–6667.
90. Cervini P. Evaluation of the analytical potentialities of a composite electrode modified with molecularly imprinted polymers / P. Cervini, E.T.G. Cavalheiro // *Anal. Lett.* – 2009. – Vol. 42, No. 13. – P. 1940–1957.
91. Clarindo J. E. S. Determination of tetracycline using a graphite polyurethane composite electrode modified with a molecularly imprinted polymer /

- J. E. S. Clarindo, R. B. Viana, P. Cervini [et al.] // *Anal. Lett.*– 2020. – Vol. 53, No. 12, P. 1–14.
92. Ni Y. Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods / Y. Ni, S. Li, S. Kokot // *Food Chemistry.*– 2011.– Vol.124, No. 3.– P. 1157–1163.
93. Толстенко Ю.В. Визначення антибіотиків тетрациклінового ряду в промисловій продукції методом амперметричного титрування / Ю.В. Толстенко, О.В. Лабяк, В.І. Ткач // *Вопросы химии и хим. технологии.* – 2009. – №1. – С.79–83.
94. Толстенко Ю.В. Аналітичний моніторинг вмісту окситетрацикліну гідрохлориду в молочних продуктах електрохімічними методами / Ю.В. Толстенко, Т.М. Деркач, В.І. Ткач // *Методи об'єкти хим. анал.* – 2008. – Т. 3, №2. – С.192–201.
95. Kurzawa M. Electrochemical determination of oxytetracycline in veterinary drugs / M. Kurzawa, A. Kowalczyk-Marzec // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004.– Vol. 34, No. 1.– P. 95–102.
96. Nagamalleswari G. Quantitative analysis of amoxicillin and dicloxacillin in combined dosage form by first derivative and simultaneous equation method in application to the determination of content uniformity / G. Nagamalleswari, D. Phaneendra, V. Bhavana, N. Ramarao // *Int. J. Adv. Pharm. Anal.* – 2014. – Vol. 4, No. 2. – P. 53–57.
97. Jain D. Simultaneous spectrophotometric determination of amoxicillin and probenecid in tablet dosage form / D. Jain; D.K Jain, P. Trivedi // *Indian J. Pharm. Sci.* – 1998. – Vol. 60, No. 5. – P. 318–320.
98. Rajinder S. G. Simultaneous determination of potassium clavulanate and amoxicillin trihydrate in bulk, pharmaceutical formulations and in human urine samples by UV spectrophotometry / S. G. Rajinder // *Int. J. Biomed Sci.* – 2010. – Vol. 6, No. 4. – P.335–343.
99. Rele R.V. Simultaneous spectrophotometric estimation of amoxicillin and carbocisteine by second order derivative spectroscopy method in combined dosage form / R.V. Rele // *Int. J. Chem. Sci.* – 2014. – Vol. 12, No. 4. – P. 1587–1595.

100. Rele R.V. Assay of amoxicillin trihydrate and bromhexine hydrochloride by UV spectrophotometric third order derivative method in combined dosage form / R.V. Rele // *Res. J. Pharm. Sci.* – 2017. – Vol. 6, No. 4. – P. 1–5.
101. Rele R.V. Spectrophotometric simultaneous estimation of ambroxal hydrochloride and amoxicillin by third order derivative method in combined dosage form / R. V. Rele // *Der Pharmacia Lett.* – 2016. – Vol. 8, No. 19. – P. 191–196.
102. Sinaga S.M. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanate potassium in dry syrup by derivative spectrophotometry / S. M. Sinaga, F. Arinawati, M. Bachri // *Int. J. Pharmtech. Res.* – 2016. – Vol. 9, No. 1. – P. 79–89.
103. Toral M.I. Determination of oxytetracycline from salmon muscle and skin by derivative spectrophotometry / M.I. Toral, T. Sabay, S.L. Orellana, [et al.] // *J. AOAC Int.* – 2015, – Vol.98, No. 3. – P. 559-565.
104. Riad S. M. Validated univariate and multivariate spectrophotometric methods for the determination of pharmaceuticals mixture in complex wastewater / S. M. Riad, H. Salemb, H. T. Elbalkiny [et al.] // *Spectrochim Acta A.* – 2015. – Vol.140. – P. 451–461.
105. Sversut R. A. Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of oxytetracycline associated with diclofenac sodium or with piroxicam in veterinary pharmaceutical dosage form / R. A. Sversut, J. C. Vieira, A. M. Rosa, [et al.] // *Arab. J. Chem.* – 2020, – Vol.13, No. 1. – P. 3159–3171.
106. Arun K.C. UV-Spectrophotometric determination of ceftazidime in pure and pharmaceutical formulation / K.C. Arun, R. Saravanan, M.V. Balachandar, B. Kumuthavalli // *J Chem. Pharm. Res.* –2010. – Vol.2, No.1. –P. 424 – 431.
107. Shah H.B. Method development and validation for ceftazidime injection by UV-VIS spectrophotometer / H.B. Shah, A.K. Sen, A. Zanwar, A.K. Seth // *Pharm. Sci. Monitor.* – 2013. – Vol. 4, No.3 – P. 333 – 342.
108. Buchra M. U. Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of ceftazidime in bulk and pharmaceutical formulation / M. U. Buchra, F. Rahman, N. Huda, A.S. Aziz // *Int. Res. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 4, No. 11. – P.26 – 29.

109. Bhaskar Reddy C.M. Development and validation of UV–Spectrophotometric methods for estimation of Ceftriaxone in bulk and tablet dosage form / C.M. Bhaskar Reddy, G.V.Subbareddy // *Int. J. Chem. Tech Res.* – 2013. – Vol.5, No. 1. – P.472–477.
110. Belal F. Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms / F. Belal, M.M. El-Kerdawy, S.M. El-Ashry [et al.] // *Farmaco.* – 2000. – Vol. 55, No 11. – P. 680–686.
111. Шкумбатюк Р.С. Екстракційно-фотометричне визначення амоксициліну з основними барвниками / Р.С. Шкумбатюк, Я.Р. Базель, С.В. Мурмяк, О.Й. Шкумбатюк // *Вісник УжНУ. Серія Хімія.* – 2009. Вип. 2. – С. 26–31.
112. Issopoulos P. V. Analytical investigations of β -lactam antibiotics in pharmaceutical preparations - II. Spectrophotometric determination of cephalixin, cephradine, ampicillin and amoxycillin using copper (II) acetate as a complexing agent / P. V. Issopoulos // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1988. – Vol. 6, No 3. – P. 321–327.
113. El-Walily A.F. Quantitative determination of some thiazole cephalosporins through complexation with palladium (II) chloride / A.F. El-Walily, A.A. Gazy, S.F. Belal, E.F. Khamis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2000. – Vol.22, No. 2. – P.385–392.
114. Фармацевтическая химия / Под. ред. А.П. Арзамасцева. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2005. – 640 с.
115. Lopez Paz J.L. Copper carbonate as a solid-bed reactor for spectrophotometric determination of doxycycline and oxytetracycline in an unsegmented continuous flow assembly / J.L. Lopez Paz, J. Martinez Calatayud // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1993.– Vol.11, No. 11/12.– P. 1093–1098.
116. Mohamed G.G. Spectrophotometric determination of ampicillin, dicloxacin, flucloxacillin and amoxicillin antibiotic drugs: ion-pair formation with molybdenum and thiocyanate / G.G. Mohamed // *J Pharm Biomed Anal.* –2001. – Vol. 24, No 4. – P. 561–567.

117. Amin S. A. Pyrocatechol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some β -lactam antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms / S. A. Amin // *Farmaco.* – 2001. Vol. 56, No.3. – P. 211–218.
118. Mrudul R.K. A new spectrophotometric method for determination of amoxicillin using bromcresol green / R. K. Mrudul, M. J. Ravin // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 3, No. 2. – P. 1340–1348.
119. Fafelelbom Kh.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation / Kh.M.S. Fafelelbom // *Am. J. Pharm. Toxicol.* – 2008.– Vol. 3, No. 3.– P. 212–218.
120. Jelkic-Stankov M. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations using sodium molybdate as analytical reagent / M. Jelkic-Stankov, D. Veselinovic, D.Malesev [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1989.– Vol. 7, No. 12.– P. 1565–1570.
121. Saha U. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate / U. Saha, A.K. Sen, T.K. Das, S.K. Bhowal // *Talanta.* – 1990.– Vol. 37, No. 12.– P. 1193–1196.
122. Ayad M. 4-amino antipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of oxytetracycline and tetracycline / M. Ayad, M. El-sadik, S. Mostaffa // *Anal. Lett.*– 1986.– Vol.19, No. 21–22.– P. 2169–2181.
123. Saleh G.A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins / G.A. Saleh, H.F. Ackal, M.F. Radwan, M. A. Omar // *Talanta* – 2001. – Vol. 54, No. 6.– P. 1205–1215.
124. Rageh A.H. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) / A.H. Rageh, S.R. El-Shaboury, G.A. Saleh, F. A. Mohamed // *Nat. Sci.* – 2010. – Vol.2, No.8. –P. 793–802.
125. Sun Y. Spectrophotometric determination of ceftazidime using sodium nitroprusside / Y. Sun, W.U. Chengke, L.I. Quanmin // *Chin. J. Appl. Chem.* – 2012. – Vol.29, No.9. –P. 1082–1086.

126. Тарханова О.О. Застосування солей тетразолію для кількісного визначення антибіотиків цефалоспоринового ряду / О.О. Тарханова, А.М. Постика, Ю.В. Монайкіна і ін. // Актуал. пит. фарм. і мед. наук. та практ. – 2012. – Том 9, №2. – С. 66–73.
127. Salem H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt / H. Salem, H. ACKal // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 29, No 1–2. – P. 347–354.
128. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics / H. Salem, G. A. Saleh // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 28, No 6. – P. 1205–1213.
129. Haidar O. I. Simple indirect spectrophotometric determination of amoxicillin in pharmaceutical preparations / Omed I. Haidar // JNSR. – 2016. – Vol. 5, No 16. – P. 142–146.
130. Gamal A. S. Two selective spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin and cefadroxil /A. S. Gamal // Analyst. – 1996. – Vol. 121, No. 3. – P. 641–645.
131. Nagaraja P. Spectrophotometric method for the determination of drugs containing phenol group by using 2, 4-dinitrophenylhydrazine / P. Nagaraja, A.K. Shrestha // E-J. of Chem. – 2010. – Vol. 7, No. 2. – P. 395–402.
132. Singh D.K. Spectrophotometric determination of penicillins in pure and pharmaceutical formulations using Folin-Ciocalteu reagent / D.K. Singh, G. Maheshwari // Drug Test. Anal. – 2010. – Vol. 2, No10. – P. 503–506.
133. Amin A.S. Spectrophotometric estimation of cefuroxime and ceftazidime in bulk and in dosage forms / A.S. Amin, H.M. Khallil, H.M. Saleh // Sci. Pharm. – 2001. – Vol. 69, No2. – P. 143–150.
134. Omar M. A. Kinetic spectrophotometric determination of certain cephalosporins in pharmaceutical formulations / M.A. Omar, H. Osama, H. Abdelmageed, T.Z. Attia // Int. J Anal. Chem.– 2009. – Vol. 2009.– Article ID 596379. – 12p.
135. Rania A.S. Use of silver – gelatin complex for the determination of cefoperazone sodium, ceftazidime pentahydrate and cefotaxime sodium in pure and

- pharmaceutical dosage forms / A.S. Rania, S.H. Wafaa, Y.M. El-Mamml, A. Shalaby // *Che. Sci. Rev. Lett.* – 2012. – Vol.1, No.1. – P. 10–17.
136. Al-Uzri W. A. Spectrophotometric determination of amoxicillin in pharmaceutical preparations through diazotiation and coupling / W. A. Al-Uzri // *Iraqi J. Sci.* – 2012. – Vol. 53, No 4. – P. 713–722.
137. Salem H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations / H. Salem // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 515, No 2. – P. 333–341.
138. Khammas Z. A-A. A new visible spectrophotometric approach for mutual determination of amoxicillin and metoclopramide hydrochloride in pharmaceuticals after cloud point extraction / Z. A-A. Khammas, H. M. Abdulkareem // *J. Anal. Chem.* – 2016. – Vol. 4, No. 5. – P. 66–76.
139. El-Ashry S. M. Spectrophotometric determination of some phenolic antibiotics in dosage forms / S. M. El-Ashry, F. Belal, M. M. El-Kerdawy [et al.] // *Mikrochim. Acta.* – 2000. – Vol. 135, No 3. – P. 191–196.
140. Qader H.A. Spectrophotometric determination of amoxicillin trihydrate in pure and pharmaceutical dosage forms / H.A. Qader, N.A. Fakhri // *Ibn Al-Haitham Jour. for Pure and Appl. Sci.* – 2015. – Vol. 28, No 3. – P. 142–153.
141. Al-Abbasi K.M.H. Spectrophotometric determination of tetracycline by azo dye formation with diazotised *p*-nitroaniline – application to pharmaceutical preparation and biological fluids / K.M.H. Al-Abbasi // *J. Raf. Sci.* – 2009. – Vol. 20, No. 1. – P. 61–74.
142. Othman N.S. Spectrophotometric determination of tetracycline by coupling with diazotised 4-aminoantipyrine in presence of cetylpyridinium chloride / N.S. Othman, R.J. Al-Ashow // *Raf. J. Sci.* – 2012. – Vol.23, No. 2. – P. 72–84.
143. Uri V.J. Colorimetric detection and spectrophotometric determination of the aminothiazolylalkoxyimino β -lactams / V.J. Uri, T.C. Jain // *J. Antibiot.* – 1985. – Vol. 39, No. 5. – P. 669–675.

144. Roopa K.P. Spectrophotometric determination of some cephalosporins in bulk and in pharmaceutical formulations / K.P. Roopa, B.K. Jayanna // *Anal. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 6, No. 2. – P.143–152.
145. Adegoke O.A. Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azodye formation with *p*-dimethylaminobenzaldehyde / O.A. Adegoke, M.O. Quadri // *Arabian J Chem.* –2016. – Vol.9, No.2. –P. s1272–s1282.
146. Dung N. T. Development of spectrophotometric method for determination of ceftazidime with the Bratton-Marshall reagent in pharmaceutical preparation / N.T. Dung, D.T. Dao, G.D. Hoat, N.A. Son // *J Sci. Technol.* – 2017. – Vol. 55, No. 2. – P. 220–228.
147. Hiremath B. Development and validation of spectrophotometric methods for determination of Ceftazidime in pharmaceutical dosage forms / B. Hiremath, H. M. Bennikallu, Mruthyunjayaswamy // *Acta. Pharm.* – 2008. –Vol.58, No. 1. – P. 275–285.
148. Mruthyunjayaswamy B.H.M. spectrophotometric estimation of ceftazidime in pure and pharmaceutical forms / B.N.M. Mruthyunjayaswamy, B. Hiremath, S.M. Malipatail, S. A. Raju // *Asian J. Chem.* – 2007. – Vol. 19, No. 5 – P. 3770–3774.
149. Jambulingam M. A Simple spectrophotometric estimation of ceftriaxone sodium in bulk and sterile formulation / M. Jambulingam, S.A. Thangathurai, D. Kamalakannan [et al.] // *Pharma Tutor.* – 2015– Vol.3, No 9. – P. 48–52.
150. Chandra Sekhar M. Spectrophotometric determination of ceftriaxone in pharmaceutical preparations / M. Chandra Sekhar, Y.N. Manohara, K. Srinivasa Rao, S. Appala Rajut // *J. Ind. Council Chem.* – 2006. – Vol.23, No.2. – P.124–126.
151. Chandra Sekhar M. Validated spectrophotometric metods for the estimation of ceftriaxone in pharmaceutical preparations / M. Chandra Sekhar, Y.N. Manohara, K. Srinivasa Rao, S. Appala Rajut // *Asian J. Chem.* – 2006. – Vol. 18, No. 4. – P. 2523–2527.

152. Бурлака Ю.В. Спектрофотометричне визначення цефтріаксону / Ю.В. Бурлака, О.О. Тарханова, С.О. Васюк // Запорізький медичний журнал. – 2009. – Том 11, №6. – С. 93–94.
153. Ahmed A. W. Spectrophotometric method for the estimation of ceftriaxone in pure form and pharmaceuticals / A. W. Ahmed; S. A. H. Al-Ameri // J. Pure Appl. Sci. – 2020. – Vo. 33, No. 2. – P. 33-42.
154. Васильев В. П. Аналитическая химия. Книга 2. Физико-химические методы анализа / В. П. Васильев. – М.: Дрофа, 2007. – 383с.
155. Singh D. Electroluminescent materials: metal complexes of 8-hydroxyquinoline / D. Singh, V. Nishal, S. Bhagwan [et al.] // Mater. Des.– 2018. – Vol.156. – P. 215–228.
156. Saylam A. Azo-8-hydroxyquinoline dyes: the synthesis, characterizations and determination of tautomeric properties of some new phenyl- and heteroarylazo-8-hydroxyquinolines / A. Saylam, Z. Seferoglu, N. Ertan // J. Mol. Liq. – 2010. – Vol. 195. – P. 267-276.
157. Chen H. W. Effect of Pt/TiO₂ characteristics on temporal behavior of *o*-cresol decomposition by visible light-induced photocatalysis / H. W. Chen, Y. Ku, Y. L. Kuo // Water Res. – 2007. – Vol. 41, No. 10. – P. 2069–2078.
158. Jemaat Z. Partial nitritation and *o*-cresol removal with aerobic granular biomass in a continuous airlift reactor / Z. Jemaat, M. E. Suárez-Ojeda, J. Pérez, J. Carrera // Water Res. – 2014. – Vol. 48. – P. 354–362.
159. Zhang J-Zh., A simplified resorcinol method for direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater / J-Zh. Zhang, Ch. J. Fischer // Mar. Chem. – 2006. – Vol. 99, No. 1–4. – P. 220–226.
160. Ossowska-Chrusciel M. D. Mesomorphic properties of resorcinol / M. D. Ossowska-Chrusciel, E. Juszyńska-Gałązka, W. Zajac [et al.] // J. Mol. Struct.– 2015. –Vol.1082. – P. 103–113.
161. Сульфаніламідні препарати / Фармакологія / Online Библиотека. – [Цит. 2016, 15 травня]. Режим доступа: <http://readbookz.com/book/194/7355.html>

162. Смолінська М. Я. Методи спектрофотометричного визначення сульфаніламідів. Огляд / М. Я. Смолінська, О. Я. Коркуна, І. Я. Коцюмбас, Т. Я. Врублевська, Г. Ю. Тесляр // Методы и объекты химического анализа. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 51–81.
163. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч: Учебн. пособие. Ч. 2 – 4-е изд., перераб. и доп. / В.Г. Беликов – М.: МЕДпресс-информ, 2007.– 624 с.
164. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия: Учеб. пособие / Под ред. А.П. Арзамасцева.– М.: ГОЭТАР-МЕД, 2004. – 640 с.
165. Лікарські засоби – похідні амідів сульфанілової кислоти / Хімічні властивості та ідентифікація. – [Цит. 2021, 15 травня]. Режим доступу: <http://studall.org/all-30096.html>
166. Davis B.J. High resolution with a new diazo reagent, hexazonium pararosaniline / B.J. Davis, L.J. Ornstein // J. Histochem. Cytochem.– 1959. – Vol. 7, No. 5.– P. 297–298.
167. Lillie R. D. Histochemical azo coupling reactions of the pigments of obstructive icterus and of hematoïdin I. Diazonium salts used / R. D. Lillie, P. Pizzolato // J. Histochem. Cytochem. –1969. – Vol. 17, No. 11. – P. 738–748.
168. Kiernan JA. Hexazonium pararosaniline as a fixative for animal tissues / JA Kiernan // Biotech. Histochem. –2004. – Vol. 79, No. 5–6. – P. 203–210.
169. Kiernan JA. Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes / JA Kiernan // Biotech. Histochem. –2007. –Vol. 82, No. 2. – P. 73–103.
170. Тараян В.М. Экстракционно-фотометрическое определение золота (III) фуксином / В.М. Тараян, Д.А. Микаелян // Арм. хим. журн.– 1969.– Т. 22, №. 4.– С. 369–370.
171. Геокчян Н.О. Экстракционно-абсорбциометрическое определение микрограммовых количеств осмия (IV) основным красителем фуксином / Н.О. Геокчян, А.А. Егиазарян, Дж.А. Микаелян, А.Г. Хачатрян // Доклады НАН РА.– 2002.– Т. 102, №. 1.– С. 52–56.
172. Геокчян Н.О. Изучение взаимодействия йодидного анионного комплекса палладия (II) с трифенилметановым красителем фуксином в сернокислой среде

- экстракционно-абсорбциометрическим методом / Н.О. Геокчян, Дж.А. Микаелян, М.Г. Арутюнян // Хим. журн. Арм.– 2008.– Т. 61, №. 3–4.– С. 382–387.
173. Губен-Вейль. Методы органической химии. Том 2. Методы анализа. 2-е изд., стереотипн. – М.: Изд-во Химия, 1967. –1032 с.
174. Геокчян Н.О. Определение оксациллина в лекарственных препаратах трифенилметановым красителем фуксином экстракционно-спектрофотометрическим методом / Н.О. Геокчян // Медицин. Наук. Армении НАН РА.– 2011.– Vol. 51, No. 4.– P. 64–69.
175. Пат. 4777246 США, С 07 С 113/00. 1-Diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid by iron-catalyzed diazotization: Пат. 4777246 США, С 07 С 113/04. / Bruno Fiirtsch, Ramlinsburg, Switzerland; Ciba-Geigy Corporation, Ardsley, NY.– № 847395; заявл. 19.03.1986; опубл. 11.11.1988. – 4с.
176. Turcas C.V. Azo dyes complexes synthesis and tinctorial properties / C.V. Turcas, I.Sebe // U.P.B. Sci. Bull., Series B.– 2012.– Vol. 74, No. 1.– P. 109–118.
177. Аминонафтолсульфоокислоты. – [Цит. 2021, 6 червня]. – Режим доступа: <https://xumuk.ru/encyklopedia/223.html>
178. Zollinger H. Diazo chemistry I: aromatic and heteroaromatic compounds / H. Zollinger, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994. – 453 p.
179. Szele I. Azo coupling reactions structures and mechanisms / I. Szele H. Zollinger // Top. Curr. Chem. – 1983. – Vol. 112. – P. 1–60.
180. Лучкевич Є.Р. Особливості механізму реакції діазотування ароматичних амінів (огляд) / Є.Р. Лучкевич, М.Г. Мокляк // Вісник Прикарп. ун-ту ім. В.Стефаника. Сер. Хімія. – 2009. – Вип. VII. – С. 4 – 23.
181. Кривенько А. П. Ароматические диазо- и азосоединения: Учеб.-метод. Пособие для студентов Института химии / А. П. Кривенько, Н. В. Поплевина. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2012. – 68 с.
182. Цоллингер Г. Химия азокрасителей / Г. Цоллингер. Пер. с нем. Порай-Кошиц Б.А. – Л.: Госхимиздат, 1960.– 364 с.

183. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей / Б.И. Степанов – М.: Химия, 1977. – 365 с.
184. Горічко М.В. Ароматичні аміни та діазополуки: навч. посібник / М.В. Горічко. – К.: 2006. – 21 с.
185. Агрономов А.Е. Избранные главы органической химии: учеб. пособие для вузов / А.Е. Агрономов. – М.: Химия, 1990. – 560 с.
186. Гордієнко О.В. Електрофільне та нуклеофільне заміщення в ароматичному ядрі: навч. посібник / О.В. Гордієнко, М.Ю. Корнілов, Ю.М. Воловенко. – К.: 2009. – 92 с.
187. Prakash K. Spectrophotometric estimation of amoxicillin trihydrate in bulk and pharmaceutical dosage form / K.Prakash, P.N. Raju, K.S. Kumari [et al.] // E. J. Chem. – 2008. – Vol. 5, No. 2 – P. 1114–1116
188. Шемякин М.М., Хохлов А.С., Колосов М.Н. и др. *Химия антибиотиков*. - М.:Изд. Акад.наук СССР, 1961. Т. 1. – С. 734.
189. Park S.-Yo. Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. / S.-Yo. Park, P. Ghosh, S. O. Park [et al.] // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6, No. 12, – P. 9812–9821.
190. Zheng Y. Kinetics and mechanism of the reaction between ozone and o-cresol in aqueous solutions / Y.Zheng, C.H.Kuo // Chem. Eng. Comm. – 1996. – Vol. 145, – P.33–51.
191. Li T. Mechanism of base-catalyzed resorcinol formaldehyde and phenol-resorcinol-formaldehyde condensation reactions: a theoretical study / T. Li, M. Cao, J. Liang, X. Xie, G. Du // Polymers. – 2017. – Vol. 9, No.9. – P. 426–440.
192. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 2-е вид. — Доповнення 1. – Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2016. – 360 с.
193. Шарло Г. Методы аналитической химии. Количественный анализ неорганических соединений. Часть 1. Общие методы анализа – Москва: Химия, 1969. – 667 с

194. Amin D. Titrimetric determination of cresols / D. Amin, K. Y. Saleem // Intern. J. Environ. Anal. Chem. – 1984.– Vol. 17, No. 3–4.– P. 275–278.
195. Magenta and magenta production. – [Цит. 2021, 8 червня]. – Режим доступу: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-13.pdf>
196. Винюкова, Г.Н. Химия красителей / Г.Н. Винюкова. – М.: Химия, 1979. – 296 с.
197. Некрасов В.В. Руководство к малому практикуму по органической химии. Изд. 5-е, доп., М.: Химия, 1975. – 328 с.
198. Пацай І. Потенціостат для полярографії зі швидкою розгорткою потенціалу / І. Пацай, П. Ридчук, О. Тимошук // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2017. – Вип. 58., Ч.1 – С. 219–224.
199. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин.– Л.: Химия, 1986.– 432 с.
200. Пешкова В.М. Практическое руководство по спектрофотометрии и колориметрии / В.М. Пешкова, М.И. Громова.– М.: Изд-во МГУ, 1965.– 235 с.
201. Пешкова В.М. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии / В.М. Пешкова, М.И. Громова. [Под ред. И.П. Алимарина].– М.: Высш. Школа, 1976.– 280 с.
202. Гейровский Я., Кута Я. Основы полярографии.– М.: Мир, 1965.– 559с.
203. Семерано Дж. Исследование в области осциллографической полярографии с линейным характером изменения напряжения в итальянском центре полярографии при национальном совете исследовательских работ / Дж. Семерано, Е. Вианелло // Доклады иностранных ученых. VII Менделеевский съезд.– М.– 1959.– С.97–99.
204. Ватаман И.И. К вопросу об оценке природы полярографического тока по критерию скорости / И.И. Ватаман, В.Т. Мерян // Электрохимия.– 1975. – Т.11, №2.– С.298–300.
205. Антропов Я.И. Теоретическая электрохимия / Я.И. Антропов – М.: Высш. школа, 1975.–364с.

206. Гороховская В.И., Гороховский В.М. Практикум по осциллографической полярографии. – М.: Высш. школа, 1973.–112 с.
207. Будников Г.К. Современное состояние осциллографического метода анализа / Г.К. Будников // Успехи хим. – 1971.– Т.40, №11.– С. 2047–2080.
208. Nicholson R.S. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems / R.S. Nicholson, Y. Shain // *Analyt. chem.* – 1964. – Vol. 36, No. 4. – P. 706–723.
209. Гохштейн Я.П. Осциллографическая полярография. Уравнение нисходящей ветви полярографической волны и его приложения / Я.П. Гохштейн, А.Я. Гохштейн // *Журн. физич. хим.* – 1960.– Т.34, №7.– С. 1654– 1657.
210. Дамаскин Б.Б. Электрохимия / Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий. – М.: Высшая школа., 1987.– 295с.
211. Gosser D.K. Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms / D.K. Gosser. – New York: VCH Publishers., 1993. –156 p.
212. Органическая электрохимия: В двух книгах: Кн. 1 / Под ред. М. Бейзера и Х. Лунда.– Пер. с англ. / Под ред. В. А. Петросяна и Л. Г. Феоктистова.– М.: Химия, 1988. – 469 с.
213. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / К. Доерфель. [Пер. с нем. И.С. Шаплыгина. Под ред. В.В. Налимова].– М.: Мир, 1969.– 247 с.
214. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. – *Фармаком.*–2006. – №1/2. – С.35–44.
215. Гризодуб А. И., Леонтьев Д. А., Денисенко Н. В., Подпужников Ю.В. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта. – *Фармаком.* – 2004.– №3.С. 3–17.
216. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів” – 2-е вид. – Х.: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. Т. 1 – 1128 с.

217. Юргель Н. В. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Н. В. Юргель, А.Л. Младенцев, А. В. Бурдейн и др. – М.: Изд. “Спорт и Культура – 2000”, 2007. – 192 с.
218. Сverdlova O.V. Электронные спектры в органической химии. 2-е изд., перераб. – Ленинград: Химия, 1985. – 248 с.
219. Алукер Н.Л., Спектрофотометрическое исследование солей нитратов и нитритов и их водных растворов / Н.Л. Алукер, М.Е. Herrmann, Я.М. Суздальцева // Оптика и спектроскопия. – 2019. –Т. 127, № 6. – С. 906–911.
220. Толстенко Ю.В. Іонометричне визначення антибіотиків тетрациклінового ряду в промисловій продукції / Ю.В. Толстенко, О.В. Лабяк, В.І. Ткач // Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii. – 2009. – №3. – С. 125–131.
221. Kostiv O. Development and validation of the simple and sensitive spectrophotometric method of amoxicillin determination in tablets using sulphanimides / O. Kostiv, O. Korkuna, P. Rydchuk // Acta Chim. Slov. – 2020, Vol. 67, No. 1. – P. 23–35.
222. Патент України на винахід № 120717. МПК G01N 27/00 (2020). Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах / О.Я. Коркуна, П.В. Ридчук, О.І. Костів. – №а201801406. – заявл. 13.02.2018; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. Заявник і власник – Львівський національний університет імені Івана Франка.
223. Костів О.І., Коркуна О.Я. Застосування реакції азосполучення для спектрофотометричного визначення амоксициліну // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2016”, 18–22 жовтня 2016, Київ. – С. 130–131.
224. Костів О.І., Коркуна О.Я. Оптимальні умови взаємодії амоксициліну з деякими реагентами, що містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу // Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2017): зб. тез допов. десятої Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю /

- Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 27–29 березня 2017, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2017. – С.19.
225. Костів О.І., Коркуна О.Я. Нові спектрофотометричні методики визначення амоксициліну з діазотованими реагентами: сульфаніловою кислотою, стрептоцидом, сульфатіазолом та бензидином // Зб. наук. праць XVI наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2017”, 28 травня – 31 травня 2017, Львів. – С. У10.
226. Костів О.І., Коркуна О.Я. Спектрофотометричне визначення амоксициліну у лікарських препаратах із застосуванням реакції азосполучення // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2017” / Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 18–21 жовтня 2017, Київ. – С. 168–169.
227. Костів О.І., Коркуна О.Я., Янчук Л.В., Спектрофотометричне визначення окситетрацикліну за реакцією азосполучення з фуксином та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою // Зб. тез допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2020”, 21–23 жовтня, Наукове видання, Київ: “LAT&K”, 2020. – С. 24.
228. Костів О. Застосування азосполуки окситетрацикліну з 1-аміно-2-нафтол-4-сульфо кислотою для спектрофотометричного аналізу ветеринарних препаратів / О. Костів, О. Коркуна, Л. Янчук, М. Смолінська // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2021. – Вип. 62. – С. – 156–167.
229. Tutunaru V. Ceftriaxone Degradation in the presence of sodium halides investigated by electrochemical methods assisted by UV-Vis spectrophotometry / V.Tutunaru, A.Samide, S. Iordache [et all.] // Appl. Sci. – 2021. – Vol. 11, No. 4. – 1376. – P. 1–14.
230. Костів О.І. Реакція азосполучення цефалоспоринових антибіотиків з 8-оксихіноліном та її застосування в аналізі лікарських засобів / О. Костів, О. Коркуна, М. Орнат // Methods Objects Chem. Anal. – 2020. – Vol. 15, No. 3. – P. 144–155.
231. Костів О.І. Спектрофотометричне визначення цефтазидиму у ліках із застосуванням резорцину та 2-метилфенолу / О.І. Костів, О.Я. Коркуна, М.В. Шередько // *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii.* – 2021. – No. 1, – P. 35–44.

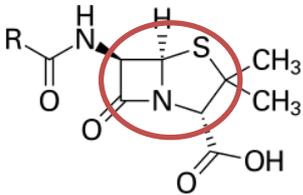
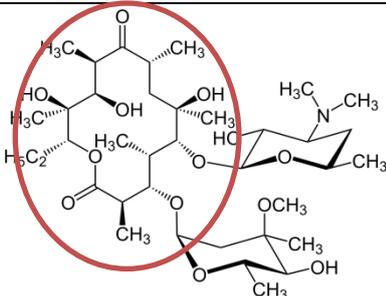
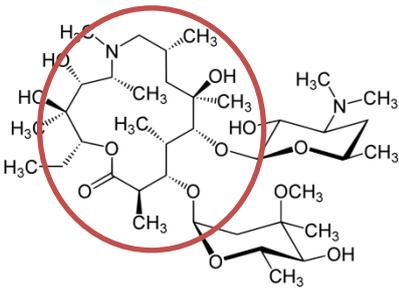
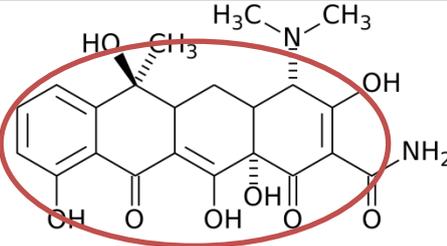
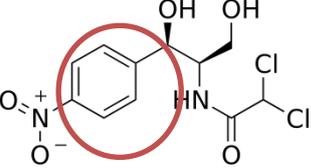
232. Костів О.І., Шерedyкo М.В., Максимів І.Р., Коркуна О.Я. Встановлення оптимальних умов діазотування цефтазидиму та подальшого його азосполучення з фенольними реагентами // Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2019): зб. тез допов. XII Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 19–21 березня 2019, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2019. – С.12.
233. Костів О.І., Коркуна О.Я., Орнат М.П., Футрик А.Н. Азосполука цефтріаксону з 2-метилфенолом, як дериват для спектрофотометричного визначення антибіотика у ліках // V Всеукр. наук. конф. “Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи”. Зб. матеріалів конф., 15 квітня 2021, Житомир, 2021. – С. 25.
234. Костів О.І., Орнат М.П., Коркуна О.Я., Скробала В.Е. Спектрофотометричне визначення цефтріаксону в лікарських засобах за допомогою 8-оксихіноліну // Зб. тез Всеукр. наук.-практич. конф. з міжнар. участю “Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020”, 5–6 березня 2020, Запоріжжя. – С. 16.
235. Справочник химика / Редкол.: Никольский Б.П. и др.. – 3-е изд., испр. – Л.: Химия, 1971. – Т. 2. – 1168 с.
236. Костів О.І., Коркуна О.Я., Грийцаровська І.А. Використання сульфаніламіду та сульфатіазолу для визначення вмісту амоксициліну у лікарських формах та валідація розроблених методик // Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези допов. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народж. д. фарм. н., проф. О. М. Гайдукевича, 12–13 квітня 2018, Харків: НФаУ. – С. 333
237. Костів О.І., Коркуна О.Я. Реакція азосполучення в аналізі β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків // Зб. наук. праць: XVIII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2021”, 31 травня – 2 червня, Львів: Видавництво від А до Я, 2021. – С. У19.
238. Костів О.І., Грийцаровська І.А., Коркуна О.Я., Хавчук М.М. Валідація спектрофотометричної методики визначення амоксициліну на основі реакції азосполучення у суспензії для ін’єкцій “Амоксицилін 15% L.A” // Тези доп. XXI

- міжнар. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених “Сучасні проблеми хімії”/ Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 20–22 травня 2020, Київ. – С. 24.
239. Костів О.І., Коркуна О.Я., Орнат М.П. Валідація спектрофотометричної методики визначення цефтріаксону за допомогою 8-оксихіноліну у порошку для приготування розчинів для ін’єкцій “Цефтріаксон” // XIII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів “Хімічні Каразінські читання – 2021”, 20–21 квітня, Харків, 2021. – С. 38–39.
240. Костів О. Вольтамперометричне визначення цефтріаксону за реакцією азосполучення / О. Костів, П. Ридчук, О. Коркуна // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2019. – Вип. 60., Ч.1 – С. 200–209.
241. Костів О.І., Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Застосування реакції азосполучення для вольтамперометричного визначення амоксициліну // Зб. наук. праць XVII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2019”, 2–5 червня 2019, Львів. – С. У43.
242. Костів О.І., Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Валідація вольтамперометричної методики визначення амоксициліну // Сьомий наук. семін. студентів, аспірантів і молодих учених “Прикладні аспекти електрохімічного аналізу”, 15–16 жовтня 2020, Львів: Малий видавн. центр хім. та фізичн. факульт. ЛНУ ім. І. Франка, 2020. – С. 21.

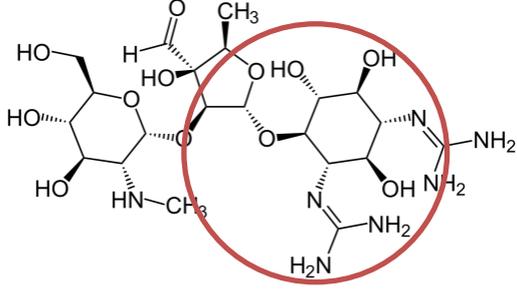
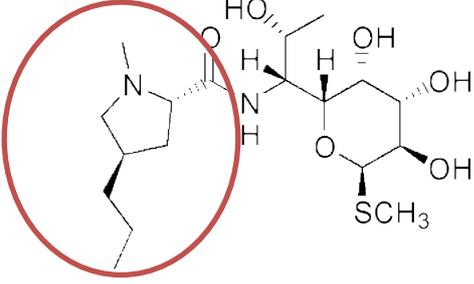
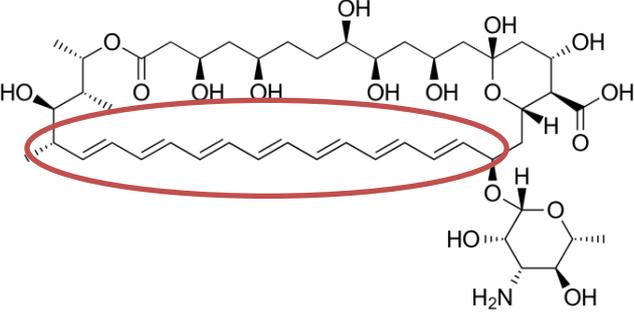
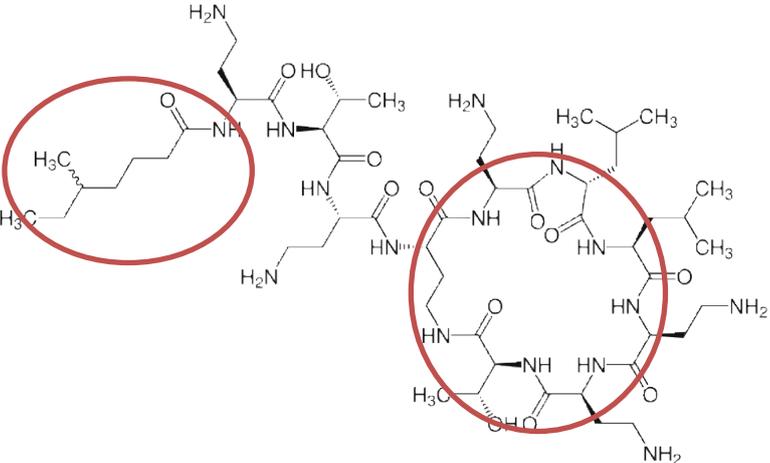
ДОДАТКИ

ДОДАТОК А КЛАСИ АНТИБІОТИКІВ

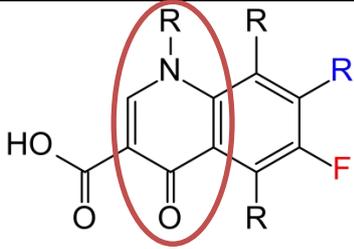
Таблиця А1. Класифікація антибіотиків за хімічною будовою

Клас антибіотиків	Представник, функціональна група
<p>β-лактами, містять β-лактамне кільце</p> <p>Пеніциліни Цефалоспорини Карбапенеми Монобактами</p>	 <p>Пеніцилін</p>
<p>Макроліди і азаліди, містять макроциклічне лактонне кільце</p>	 <p>Еритроміцин</p>  <p>Азитроміцин</p>
<p>Тетрацикліни, містять чотири конденсованих шестичленних цикли</p>	 <p>Тетрациклін</p>
<p>Амфеніколи, містять структуру фенілу</p>	 <p>Левоміцетин</p>

Продовження таблиці А1

Клас антибіотиків	Представник, функціональна група
<p>Аміноглікозиди, містять аміносахариди, що з'єднані глікозидним зв'язком із агліконовим фрагментом</p>	 <p>Стрептоміцин</p>
<p>Лінкозаміди, містять з амінокислоту та моносахариди</p>	 <p>Лінкоміцин</p>
<p>Полієни – містять 4 і більше спряжених подвійних зв'язків</p>	 <p>Амфотерицину В</p>
<p>Поліміксини, складаються із циклічного пептиду і гідрофобного хвоста.</p>	 <p>Колістин</p>

Продовження таблиці А1

<p>Хінолони – похідні 4-хінолону і мають в своєму складі піперазиновий цикл.</p> <p>Фторхінолони</p>	 <p>Загальна структура хінолонів</p>
---	--

ДОДАТОК Б МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКІВ

Таблиця Б 1 Хроматографічні методи визначення антибіотиків АМ, ОЦ, ЦЕФТР та ЦЕФТ

Умови хроматографування			Об'єкт аналізу	Літера- тура
Колонка	Рухома фаза	Детектор		
1	2	3	4	5
Амоксицилін				
“Kromasil” C ₁₈ ” (250 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	рухома фаза А – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 1:99; рухома фаза В – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 20:80. Урівноважують колонку рухомою фазою зі співвідношенням рухомих фах А : В = 92:8	УФ-254 нм	Субстанція, таблетки	[21]
“Hypersil” ODS” (250 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	рухома фаза А – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 1:99; рухома фаза В – ацетонітрил : фосфатний буферний розчин (рН=5,0) = 20:80. А : В = 92:8	УФ-220 нм	Таблетки що диспергуються	[28]
“Superspher” 100 RP- 18e” (125 мм×4,0 мм, d=4,0 мкм)	фосфатний буферний розчин з (рН=6,5) : ацетонітрил = 97:3	УФ-210 нм	Порошок для приготування суспензій	[28]
Цефтріаксон				
C ₁₈ (250 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	тетрадециламоній броміду, тетрагептиламоній броміду : фосфатний буферний розчин (рН=7,0) : цитратний буферний розчин (рН=5,0) : ацетонітрил=44 : 5,5 : 0,5 : 50	УФ-254 нм	Субстанція	[21]
L 1, C ₁₈ (150 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	фосфатний буферний розчин (рН=7,0) : ацетатний буферний розчин (рН=5,0) : ацетонітрил : вода = 0,4 : 4,4 : 40 : 55,2	УФ-270 нм	Розчин для ін'єкцій	[28]

Продовження таблиці Б 1

1	2	3	4	5
Цефтазидим				
C ₁₈ (250 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	Амоній дигідрофосфат (рН=7,0) : ацетонітрил : вода= 8:24:86	УФ-255 нм	Субстанція, Розчин для ін'єкцій	[21]
L 1, C ₁₈ (150 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	фосфатний буферний розчин (рН=7,0) : ацетонітрил : вода= 10 : 2 : 88	УФ-264 нм	Розчин для ін'єкцій	[28]
Окситетрациклін				
C ₁₈ (250 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	рухома фаза А – 0,15% 2-метил-2-пропанол : , фосфатний буферний розчин (рН=7,5) : 10 г/л тетрабутиламодій гідрофосфат (рН=7,5) : 0,4 г/л натрій едетат (рН=7,5) : вода = 20 : 6 : 5 : 1:68. рухома фаза Б – 0,5% 2-метил-2-пропанол : , фосфатний буферний розчин (рН=7,5) : 10 г/л тетрабутиламодій гідрофосфат (рН=7,5) : 0,4 г/л натрій едетат (рН=7,5) : вода = 20 : 6 : 5 : 1 : 68. Урівноважують колонку рухомою фазою зі співвідношенням рухомих фаз А : В = 70:30	УФ-254 нм	Субстанція	[21]
C ₁₈ (150 мм×4,6 мм, d=5 мкм)	0,2% ортофосфатна кислота : ацетонітрил = 80 : 20	УФ-350 нм	Фармацевтичні препарати	[28]

Таблиця Б2 Електрохімічні методи визначення амоксициліну

Метод, $E_{1/2}$, В	Електрод та умови визначення	Межі лінійності	C_n	C_{min}	Об'єкт аналізу	Літера-тура
1	2	3	4	5	6	7
Диференційно імпульсна ВА +0,48 В	вуглецевий пастовий електрод модифікований 8,9-дигідрокси-7-метил-12Н-бензотіазоло [2,3- <i>b</i>] хіназолін-12-оном та наноккомпозитом ZnO/CNT, фосфатний буфер (рН 7,0)	$1,0 \cdot 10^{-6} - 9,5 \cdot 10^{-4}$, моль/л	–	$5 \cdot 10^{-7}$, моль/л	сеча, ліки	[67]
Скануюча диференційно імпульсна ВА +0,8 В	вуглецевий пастовий електрод, модифікований поліаніліновою плівкою, 0,2 М ацетатний буфер (рН 3,5), 3 мМ натрій лаурилсульфат	$5,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^{-4}$, моль/л	$1,5 \cdot 10^{-9}$, моль/л	$3,5 \cdot 10^{-10}$, моль/л	біологічні зразки, фармацевтичні препарати	[66]
Скануюча квадратно-хвильова адсорбційна ВА + 0,8 В		$7,0 \cdot 10^{-6} - 2,0 \cdot 10^{-4}$, моль/л	$5,4 \cdot 10^{-9}$, моль/л	$7,3 \cdot 10^{-10}$, моль/л		
Хроноамперометрія +0,57 В	вуглецевий пастовий електрод, модифікований Ni–куркуміном, лужне середовище (0,1 М NaOH)	$8 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-4}$, моль/л	–	$5 \cdot 10^{-6}$, моль/л	Фармацевтичні препарати, сеча	[68]
Квадратно-хвильова ВА +0,9 В	скловуглецевий електрод модифікований глутаровим альдегідом та поліглутаміновою кислотою (PGA / GLU), 0,1 М ацетатний буфер (рН=5,2)	$2,0 \cdot 10^{-6} - 25,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л	–	$9,2 \cdot 10^{-7}$ моль/л	сеча	[73]

Продовження таблиці Б2

1	2	3	4	5	6	1
Циклічна ВА +0,4 В	вуглецевий електрод, отриманий на основі термічного спікання суміші графіту та іонної рідини N-октилпіридиній гексафторфосфату, фосфатний буферний розчин	$5,0 \cdot 10^{-6} - 4,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л	—	$8 \cdot 10^{-7}$ моль/л	сеча, ліки	[71]
Диференційно імпульсна ВА -0,20 В	підвісний ртутний краплинний електрод, модифікований полі (N-хлораніл N, N, N', N'-тетраметилетилендіамоній-дихлоридом), фосфатний буферний розчин (рН 7,4)	—	—	$2,12 \cdot 10^{-9}$ моль/л	ліки, плазма крові	[76]
Диференційна полярографія -0,76 В	ртутний електрод, рН 6,1	$4,0 \cdot 10^{-5} - 1,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л	—	—	ліки	[77]
Циклічна ВА -0,6 В	ртутний краплинний електрод окиснення 0,1 М бромат/бромідною сумішню в хлоридноокислому середовищі, 0,1 М натрій хлорид	0,02 – 0,12 мг/мл	—	—	ліки	[78]
Циклічна ВА +0,02В	вуглецевий електрод модифікований золам титан діоксиду (TiO ₂), наночастинками золота (AuNPs), мезопористим вуглецем типу СМК-3 і Nafion, фосфатний буферний розчин (рН 6,0)	$0,5 \cdot 10^{-6} - 2,5 \cdot 10^{-6}$ $2,5 \cdot 10^{-6} - 1,33 \cdot 10^{-4}$ моль/л	—	$3 \cdot 10^{-4}$ моль/л	ліки, продукти харчування	[70]

Продовження таблиці Б2

1	2	3	4	5	6	7
Квадратно-хвильова ВА +0,72 В	скловуглецевий електрод модифікований вуглецевою сажею з іммобілізованою дигексадецилфосфатною плівкою, фосфатний буферний розчин (рН 7,0)	$2,0 \cdot 10^{-6} - 18,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л	—	$0,12 \cdot 10^{-6}$ моль/л	біологічні зразки, сеча та об'єкти навколишнього середовища	[72]
Квадратно-хвильова ВА +0,1 В	скловуглецевого електрод (GCE), модифікований тривимірним графеном (3D-GE) та поліглутаміною кислотою (PGA), фосфатний буферний розчин (рН 5,0)	$2,0 \cdot 10^{-6} - 6,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л	—	$1,18 \cdot 10^{-7}$ моль/л	сеча	[74]
Квадратно-хвильова ВА +0,88 В	скловуглецевий електрод модифікований плівкою полі-(3,4-етилендіокситіофен) полістирол сульфонату з квантовими точками кадмій телуриду та дрібнодисперсного карбону Printex 6L Carbon, фосфатний буферний розчин (рН 6,0)	$0,9 \cdot 10^{-6} - 6,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л	—	$5,0 \cdot 10^{-8}$ моль/л	ліки, сеча, молоко	[75]

— Дані відсутні

—

Таблиця Б3 Електрохімічні методи визначення цефалоспоринів

Метод, антибіотик, $E_{1/2}$, В	Електрод та умови визначення	Межі лінійності	C_n	C_{min}	Об'єкт аналізу	Літера- тура
1	2	3	4	5	6	7
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТР -0,88 В,	стаціонарна ртутна крапля, буфер Брітона-Робінсона (рН = 10,5 ЦЕФТР), (рН = 3,5 ЦЕФТ)	$5,5 \cdot 10^{-2} - 4,5 \cdot 10^{-1}$ мкг/мл	$5,39 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл	$1,62 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл	фармацевтичні препарати	[79]
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТ -0,36 В		$1,2 \cdot 10^{-1} - 6,3 \cdot 10^{-1}$ мкг/мл	$1,12 \cdot 10^{-1}$ мкг/мл	$4,34 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл		
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТР, -0,504 В, -0,788 В	ртутний крапельний електрод, 5% диметилформаміду (ДМФ) або диметилформамід-метанол (60:40 об./об.)	9,1 – 45,6 мкг/мл	–	–	фармацевтичні препарати	[80]
Циклічна, катодна інверсійна ВА, ЦЕФТР, -1,2 В	стаціонарна ртутна крапля, універсальний буфер (рН = 4,8)	10 – 100 нмоль/л	–	0,5 мкмоль/л	фармацевтичні препарати, сироватка крові	[82]
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТР, -0,78 В	стаціонарна ртутна крапля, універсальний буфер (рН = 3,0)	$3,31 \cdot 10^{-11} - 2,17 \cdot 10^{-6}$ моль/л	–	–	фармацевтичні препарати	[83]

Продовження таблиці Б3

1	2	3	4	5	6	7
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТР -0,72 В	ртутний крапельний електрод, універсальний буфер (рН = 4,0)	$2,5 \cdot 10^{-8} - 1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$2,4 \cdot 10^{-8}$ моль/л	–	ліки, плазма крові	[84]
Диференційно імпульсна ВА, ЦЕФТ -0,608 В						
Диференційно імпульсна ВА ЦЕФТР -0,63 В	ртутний крапельний електрод, універсальний буфер (рН = 4,2)	0,2 – 20,0 мкг/мл	$2,0 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл	–	Фармацевтичні препарати	[85]

– Дані відсутні

Таблиця Б4 Методики спектрофотометричного визначення амоксициліну

Реагент	Умови визначення		Межі визначуваних концентрацій, C_{min}	Література
	Середовище	λ_{max} , нм		
1	2	3	4	5
<i>n</i> -амінобензойна кислота	1·10 ⁻³ М розчин реагенту, 1·10 ⁻³ М розчин натрій нітриту, 1 М розчин хлоридної кислоти → ретельно струшують → 2,38·10 ⁻⁴ М розчин амоксициліну, 2 М розчин NH ₄ OH → витримують 15 хв	435	0,4 – 10 мкг/мл, 0,39 мкг/мл	[136]
прокаїн		450	0,4 – 14 мкг/мл, 0,39 мкг/мл	
ацетон	розчин амоксициліну, конц. HNO ₃ , конц. H ₂ SO ₄ , → витримують 10 хв, розчин ацетону, розчин KOH	390	8 – 24 мкг/мл	[137]
купрум(II) ацетат	3% розчин натрій нітриту, 1% розчин купрум (II) ацетату, 1 М розчин розчин хлоридної кислоти → витримують протягом 25 хв на кипл. водяній бані	520	4 – 14 мкг/мл	
<i>o</i> -нітроанілін	10% розчин <i>o</i> -нітроаніліну, 3% розчин натрій нітриту → витримують 10 хв, розчин амоксициліну, 1М розчин NaOH, → витримують 5 хв	435	1 – 5 мкг/мл	
<i>o</i> -нітроанілін + сульфат купруму (II)	10% розчин <i>o</i> -нітроаніліну, 3% розчин натрій нітриту, → витримують 10 хв, розчин амоксициліну, 1 М NaOH, → витримують 5 хв, 0,125М розчин купрум (II) сульфату, 2 М розчин H ₂ SO ₄ → екстрагують хлороформом.	415	1 – 4 мкг/мл	[138]
метоклопрамід	розчин амоксициліну, 0,5 мМ діазотованого метаклопраміду [0,5 % розчин МКА, 1М HCl → витримують 5 хв на “льодяній” бані, NaNO ₂], 0,5 М Na ₂ CO ₃ , 10% Tritin X-114 → переносять в центрифужну пробірку → термостатують (50 °С) протягом 20 хв	479	0,3 – 3 мкг/мл, 0,25 мкг/мл	

Продовження таблиці Б4

1	2	3	4	5
бензокаїн	$2 \cdot 10^{-3}$ М розчин бензокаїну, 0,5 М розчин H_2SO_4 , 0,1% розчин $NaNO_2$ → витримують 15 хв, розчин амоксициліну → витримують 5 хв, розчин триетиламіну → витримують 20 хв	455	2 – 16 мкг/мл, 2 мкг/мл	[139]
сульфанілова кислота	0,5% розчин реагенту, 0,2% розчин $NaNO_2$, 0,01 М розчин хлоридної кислоти → розчин амоксициліну, 0,5 М розчин Na_2CO_3	455	0,3 – 30 мкг/мл	[140]
паладій (II) хлорид	розчин амоксициліну, 1 М розчин хлоридної кислоти → витримують 60 хв на кипл. водяній бані, 1 М розчин $NaOH$, розчин реагенту, розчин KCl , УБС буфер (0,04 М H_3BO_3 , 0,04 М H_3PO_4 і 0,04 М CH_3COOH) рН 6,0	335	10 – 40 мкг/мл	[110]
Мо (V) + амоній тіоціанат	0,08 М амоній молібдат, 4 М розчин хлоридної кислоти, 10% амоній тіоціанат, 10% розчин аскорбінової кислоти → витримують 15 хв, 0,2 М розчин амоксициліну → витримують 15 хв → екстрагують метиленхлоридом	467	7,5 – 75 мкг/мл 7,4 мкг/мл	[116]
купрум (II) ацетат	розчин амоксициліну, розчин Cu (II) ацетату, 0,2 М розчин Na ацетату → струшують → витримують протягом 5 хв при 20 °С	650	–	[112]
бромкрезоловий зелений	розчин амоксициліну, 0,01 М розчин бромкрезолового зеленого в диметосульфоксиді → доводять диметлсульфоксидом до мітки	630	1 – 13 мкг/мл	[118]
піракатехіновий фіолетовий	розчин амоксициліну, 5 мМ розчину піракатехінового фіолетового, боратний буфер рН = 8,5 → витримують 3 хв за 25 °С	641	2 – 28 мкг/мл	[117]

Продовження таблиці Б4

1	1	1	1	1
хлорид 2-[4' N,N-дипропіл-аміностирил]- 1,3,3 триметил- 3Н-індолій (ДАТІ)	розчин амоксициліну, 0,2 мМ розчину ДАТІ, аміачно-ацетатний буфер рН =8,0, 5 мл води → екстрагують бутилацетатом протягом 40 с	540	0,1 – 14,6 мкг/мл	[111]
Се (IV)	розчин амоксициліну, 4 М розчин хлоридної кислоти, реагент → витримують 5 хв при 255 °С	397	5 – 30 мкг/мл	[128]
Fe (III)			5 – 30 мкг/мл	
калій перманганат	розчин амоксициліну, розчин КМnO ₄ , рН < 3,0	525	0,1 – 1,6 мкг/мл	[129]
2, 4-динітрофенілгідразин	розчин амоксициліну, 0,08% розчин реагенту, 0,15% розчин КІО ₄ , 10 Н розчин NaOH	520	4 – 33 мкг/мл 3,9 мкг/мл	[131]
реагент Фоліна-Чікалтеу (суміш молібденової, вольфрамкової кислот та літій сульфату)	розчин амоксициліну, 10% розчин натрій карбонату, 20% розчин реагенту → витримують на водяній бані (98 °С) протягом 40 хв	720	2 – 10 мкг/мл 1,8 мкг/мл	[132]
N-бромсукцинімід або N-хлорсукцинімід	розчин амоксициліну, 0,1 М NaOH, 0,05 % реагенту → доводять метанолом до мітки	354	1 – 20 мкг/мл	[130]

Таблиця Б 5 Методики спектрофотометричного визначення цефтазидиму

Реагент	Умови визначення		Межі визначуваних концентрацій; C_{\min}	Література
	Середовище	λ , нм		
1	2	3	4	5
за власним поглинанням	розчин цефтазидиму в 0,1 М НСІ	261	2 – 10 мкг/мл	[106]
за власним поглинанням (перша похідна)	розчин цефтазидиму, вода	255,8	4 – 24 мкг/мл; 0,5 мкг/мл	[107]
за власним поглинанням	розчин цефтазидиму, суміш метанолу і води	266	2 – 20 мкг/мл; 0,079 мкг/мл	[108]
натрій нітрит	водний розчин цефтазидиму + 0,2 мл 1% цитратної + 0,2 мл 0,5% розчину натрій нітриту за кімнатної температури	500	12,5 – 200 мкг/мл; 10 мкг/мл	[143]
<i>n</i> -диметиламінобензальдегід	розчин цефтазидиму, NaNO_2 при 0–5 °С + підкислений <i>n</i> -диметиламінобензальдегід → витримують 5 хв + 5 мл CH_3OH	420	5 – 35 мкг/мл; 1,901 мкг/мл	[145]
реактив Браттона-Маршалла <i>N</i> -(1-нафтил) етилендіаміндігідрохлорид	розчин цефтазидиму, $\text{HCl}_{\text{конц}}$, 1% NaNO_2 → витримують впродовж 5 хв при 0–5 °С, 3% сульфамінова кислота → витримують 5 хвилин, розчин реагенту → витримують впродовж 3 хв	575	1 – 50 мкг/мл; 0,278 мкг/мл	[146]
	розчин цефтазидиму, HCl , NaNO_2 → охолоджують до 0°С, розчин $\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ → перемішують впродовж 5 хв, розчин реагенту	567	10 – 50 мкг/мл; 0,50 мкг/мл	[147]

Продовження таблиці Б5

1	2	3	4	5
3-амінофенол	розчин цефтазидиму, NaNO_2 , 1М HCl , → охолоджують на крижаній бані ($-2 - -3$ °С), перемішують протягом 10 хв, сульфамінова кислота, 0,3% реагент → охолоджують протягом 10 хв	505	24 – 168 мкг/мл; 0,7773 мкг/мл	[144]
1-нафтол	розчин цефтазидиму, $\text{HCl}_{\text{конц.}}$, NaNO_2 , розчин $\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 1-нафтол	562	10 – 50 мкг/мл	[148]
2,2'-біпіридин	розчин цефтазидиму, FeCl_3 , спиртовий розчин реагента → витримують впродовж 5 хв на водяній бані → охолоджують до кімнатної температури	520	2 – 10 мкг/мл	
окиснення калій перманганатом	розчин цефтазидиму, $\text{NaOH} + \text{KMnO}_4$ → витримують 15хв	610	5 – 15 мкг/мл; 0,233 мкг/мл	[134]
4-хлоро-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазол	розчин цефтазидиму, 0,5 М NaOH → витримують на киплячій водяній бані протягом 30 хв → охолоджують до кімнатної температури. Аліквота отриманого гідролізом розчину, розчин реагенту, $\text{HCl}_{\text{конц.}}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	390	20 – 160 мкг/мл; 4,88 мкг/мл	[124]
натрій нітропрусид	розчин цефтазидиму, розчин натрій нітропрусиду → струшують і витримують при температурі 40 °С протягом 20 хв	528	2,5 – 810 мг/л; 1,38 мг/л	[125]
сіль Рейнеке ($\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NCS})_4(\text{NH}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$)	розчин цефтазидиму, розчин реагенту в кислому середовищі при 25 ± 2 °С, ацетон	358,6	5 – 30 мкг/мл	[127]
3-метилбензотіазолін-2-ону гідразон	розчин цефтазидиму, FeCl_3 , розчин реагенту → витримують впродовж 5 хв, 0,1 М HCl → утворюється комплекс синього кольору	628	2 – 10 мкг/мл; 0,15 мкг/мл	[147]

Продовження таблиці Б5

1	2	3	4	5
паладій хлорид	розчин цефтазидиму в CH_3OH + PdCl_2 , ацетатний буфер (рН 4,8) → витримують 45 хв в термостатованій водянній бані ($T=80^\circ\text{C}$) → охолоджують до кімнатної температури	354	8 – 28 мкг/мл; 0,29 мкг/мл	[113]
йод	розчин цефтазидиму у 1,2-дихлоретані, розчин реагенту → витримують 20 хв за $25\pm 5^\circ\text{C}$	364	10 – 40 мкг/мл; 2,01 мкг/мл	[123]
2,3-дихлор-5,6-діціано- <i>n</i> -бензохінон	розчин цефтазидиму у метанолі, реагент → витримують 20 хв за $25\pm 5^\circ\text{C}$	460	80 – 300 мкг/мл; 3,96 мкг/мл	
7,7,8,8-тетраціанохінодиметан	розчин цефтазидиму в ацетонітрилі, реагент → витримують 45 хв за $25\pm 5^\circ\text{C}$	843	6 – 22 мкг/мл; 0,27 мкг/мл	
аргентум нітрат + желатиновий розчин	розчин цефтазидиму, NaOH → нагрівають на киплячій водянній бані 15 хв → охолоджують до кімнатної температури, розчин реагенту NaOH (рН 11) → витримують 20 хв при кімнатній температурі → розводять і витримують ще 5 хв	350	14 – 76 мкг/мл; 6,68 мкг/мл	[135]

Таблиця Б6 Методики спектрофотометричного визначення цефтріаксону

Реагент	Умови визначення		Межі визначуваних концентрацій, C_{min}	Література
	Середовище	λ , нм		
1	2	3	4	5
NaNO ₂	розчину цефтріаксону, 1 мл 0,1% розчину NaNO ₂ , 1 мл 0,5 М розчину HCl → витримують протягом 5 хв при кімнатній температурі, 1 мл 2% розчину NaOH	559	50 – 150 мкг/мл	[151]
<i>N</i> -(1-нафтил)-етилендіамін дигідрохлорид	розчин цефтріаксону, розчин натрій нітриту 0,145 М, розчин хлоридної кислоти → витримують 10 хв, розчин 0,008 М <i>N</i> -(1-нафтил)-етилендіаміну дигідрохлориду	559	50 – 150 мкг/мл	[150]
флороглюцин	розчин цефтріаксону, розчин натрій нітриту, розчин хлоридної кислоти → витримують 10 хв, розчин флороглюцинолу	460	20 – 100 мкг/мл	[150]
резорцин	розчин цефтріаксону, розчин натрій нітриту, розчин хлоридної кислоти → витримують 10 хв, розчин резорцину	518	10 – 50 мкг/мл	[150]
метол	розчин цефтріаксону, буферна суміш (250 мл води, 0,2 М калій фталат, 0,1 М HCl), розчин 0,005 М метолу, розчин 0,01 М K ₂ Cr ₂ O ₇ → витримують протягом 5 хв при 50 °С	520	0,8 – 26,5 мкг/мл	[133]
Cu (II) + <i>n</i> -пропіловий спирт + амоній сульфат	розчин Cu(II) з вмістом 50 мкг, розчин цефтріаксону, 3 мл <i>n</i> -пропілового спирту, 2 мл буферної суміші (HCl, KCl), розчин амоній сульфату → струшують 1 хв	510	0,7 – 32 мкг/мл	[138]
бромфеноловий синій	розчин цефтріаксону, 0,1% розчин бромфенолового синього в ацетоні	414	12 – 19,2 мкг/мл 1,1 мкг/мл	[152]

Таблиця Б7 Методики спектрофотометричного визначення окситетрацикліну

Реагент	Умови визначення		Межі визначуваних концентрацій, C_{\min}	Література
	Середовище	λ , нм		
1	2	3	4	5
<i>n</i> -нітроанілін	водний розчин <i>n</i> -нітроаніліну + 1,5 мл HCl _к (р-н охолоджують до 5 °С) → 1% NaNO ₂ перемішують суміш 5 хв при охолодженні (5 °С) → поміщають на 15 хв в темне місце (5 °С) + окситетрациклін + NaOH	569	0,08 – 16,0 мкг/мл	[141]
4-аміноантипірин	4-аміноантипірин + 3 мл HCl _к з нагріванням впродовж 5 хв → охолоджують при 0-5 °С + 0,017 г NaNO ₂ перемішують суміш 5 хв + холодна дистильована вода до 100 мл → охолоджують в холодильнику впродовж 1 години + окситетрациклін + Na ₂ CO ₃	537	1,0 – 30,0 мкг/мл	[142]
натрій молібдат	розчин натрій молібдату, розчин натрій нітриту, розчин окситетрацикліну → ацетатний буфер рН = 5,5	404	2,48 – 34,78 мкг/мл 2,5 мкг/мл	[120]
<i>N,N</i> -диметилформамід	розчин окситетрацикліну, розчин реагенту → аміачний буфер рН = 8,0	406	0 – 120 мкг/мл	[121]
4-аміноантипірин	розчин окситетрацикліну → амоній гідроксид до рН = 9,8, розчин K ₃ Fe(CN) ₆ , розчин реагенту	435	0,04 – 0,16 мкг/мл	[122]

ДОДАТОК В

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ПРИРОДИ СТРУМУ ТА ХАРАКТЕРУ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОГО ПРОЦЕСУ

У роботі ми використовували ряд діагностичних критеріїв та вивчали вплив фізико-хімічних факторів на процес відновлення органічних аналітів, з метою оцінки природи струму та характеру їх процесу відновлення з водних розчинів.

Якщо лімітуючою стадією електродного процесу є швидкість дифузії відновленої чи окисненої форми деполяризатора, то висота піку пропорційна до концентрації визначуваної речовини, числа електронів у степені 3/2 та швидкості зміни напруги поляризації V у степені 1/2, згідно рівняння:

$$I_n^k = K n^{3/2} C V^{1/2} \quad (B.1)$$

Співвідношенню Нернста підлягають лише рівноважні потенціали. Точних методів розрахунку рівноважних потенціалів не відомо і на сьогодні. Приблизне рівняння для рівноважного потенціалу дозволяє орієнтовно їх оцінити:

$$E_p = \alpha E_n^k + \beta E_n^a \quad (B.2)$$

Різниця потенціалів катодного та анодного піків залежить від двох факторів: швидкості накладання напруги поляризації та швидкості електродного процесу [202].

Величину полярографічного струму та потенціал процесу відновлення визначають за кінетичними, дифузійними та адсорбційними параметрами електродного процесу.

Прологарифмувавши рівняння (B.1), за сталої концентрації деполяризатора для конкретного процесу відновлення та змінній швидкості накладання поляризаційної напруги, отримаємо його в лінійному вигляді [203]:

$$\lg I_n^k = x \lg V + \text{const} \quad (B.3).$$

В залежності від природи катодного струму кутовий коефіцієнт логарифмічної залежності $\lg I_n^k - \lg V$ (критерій Семерано) може набувати таких значень:

$x = d \lg I_c^p / d \lg V = 0,5$ – процес характеризує дифузійну природу струму;

$x = d \lg I_c^p / d \lg V < 0,5$ – процес ускладнений кінетичними обмеженнями;

$x = d \lg I_c^p / d \lg V > 0,5$ – процес контролюється дифузією та адсорбцією деполяризатора.

Величину αn_α знаходили шляхом обробки висхідної вітки вольтамперограми, згідно з роботою [204, 205]. Тангенс кута нахилу залежності $\lg((I_d^k - I_i^k)/I_i^k) - E_p^k$ рівний $0,059/\alpha n_\alpha$, де $\alpha = I_d^k/(I_d^k - I_d^a)$ - коефіцієнт перенесення заряду, n_α - кількість електронів, перенесених на стадії електродного процесу. Значення потенціалу у точці $\lg((I_d^k - I_i^k)/I_i^k) = 0$ відповідає значенню потенціалу півхвилі (у випадку осцилографічної вольтамперометрії потенціалу півпіку ($E_{p/2}$)) [211].

Оборотність/необоротність процесу відновлення нами досліджена виходячи з апаратурних можливостей та особливостей одержаних вольтамперограм. Для дослідження оборотності/необоротності електродного процесу використовували такі критерії [206–209]:

- відсутність на вольтамперограмі анодного піку при накладанні на комірку напруги із трикутною формою розгортки потенціалу вказує на необоротність електродного процесу;

- для оборотного процесу різниця потенціалів катодного (E_p^k) та анодного (E_p^a) піків дорівнює величині $0,059/n$ В і не залежить від швидкості накладання напруги поляризації V та концентрації деполяризатора C ;

- для необоротного процесу $E_p^k - E_p^a > 0,059/n$ В;

- для оборотного процесу співвідношення висоти катодного (I_p^k) та анодного (I_p^a) піків дорівнює 1 і не залежить від V та C , значне відхилення від одиниці вказує на необоротність процесу;

- збільшення швидкості накладання напруги поляризації у 10 разів у випадку необоротного процесу призводить до зсуву потенціалу піку відновлення в катодну область на величину $0,03/\alpha n_\alpha$ В, а різниця потенціалів піку та півпіку дорівнює $0,048/\alpha n_\alpha$ В.

Процедура розрахунку кількості іонів гідрогену, що беруть участь в електрохімічному процесі наведено в розділі 2.4.

ДОДАТОК Г

ВАЛІДАЦІЙНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ВИМОГИ ДО НИХ

Відповідно до вимог для аналітичної методики щодо випробування «Кількісне визначення» необхідно визначати такі валідаційні характеристики: *специфічність, робасність, лінійність, правильність, прецизійність, внутрішньолабораторну прецизійність.*

Максимально допустиму невизначеність результату аналізу, $\max \Delta_{AS}$ обчислюють за формулою:

$$\Delta_{AS} \leq B \cdot 0,32 \quad (\text{Г.1})$$

де B – допуски вмісту, виражені у відсотках до номінального вмісту визначуваної речовини у препараті, які вказані виробником у нормативній документації.

Невизначеність пробопідготовки, Δ_{SP} :

Невизначеність пробопідготовки розраховується, виходячи з методики пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції за формулою:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{\sum_i \Delta_i^2}, \quad (\text{Г.2})$$

де Δ_i – окрема складова невизначеності

Невизначеність кінцевої аналітичної операції, розраховують за формулою:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot S_1^2}{3}} \quad (\text{Г.3})$$

де $S_1 = 0,1\%$ - НВ вимірювання струму (за паспортом приладу);

Невизначеність пробопідготовки та невизначеність кінцевої аналітичної операції складають **повну невизначеність результатів аналізу**, яку обчислюють за формулою:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} \quad (\text{Г.4})$$

Специфічність перевіряють порівнянням вольтамперограм модельних розчинів препарату та розчинів плацебо. На вольтамперограмах робочого розчину плацебо має бути відсутній пік характерний для відовлення (окиснення) визначуваної речовини. У разі присутності піку при аналітичному потенціалі відновлення хвилі, його сила струму (I_{pl}) має бути незначущою у порівнянні з

максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу відносно сили струму модельного розчину препарату (I_m):

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (\text{Г.5})$$

$$\delta = \frac{I_{pl}}{I_m} \leq \max \delta \quad (\text{Г.6})$$

де I_{pl} – сила струму модельного розчину плацебо;

I_m – сила струму модельного розчину препарату.

Валідаційна характеристика **робасність** досліджується на стадії розробки методики та включає в себе перевірку різних чинників, які впливають на процес пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції, і відповідно, на значення аналітичного сигналу. Зміна значень сили струму при зміні вказаних умов у певному діапазоні, повинна бути незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу.

Валідаційна характеристика **діапазон застосування** використовується при визначенні валідаційних характеристик “Правильність”, “Прецизійність”, “Лінійність”. Мінімальний допустимий діапазон застосування аналітичної методики кількісного визначення амоксициліну повинен охоплювати концентрацію від 80 до 120 % від номінального вмісту визначуваної речовини у готовій лікарській формі.

Валідаційну характеристику **лінійність** досліджують в межах діапазону застосування аналітичної методики. Графік сили струму від концентрації аналіту повинен мати лінійний характер у цілому діапазоні застосування методики. Вимоги до лінійності встановлені, виходячи з вимог до максимально допустимої невизначеності результатів аналізу і діапазону застосування методики (80 – 120% від номінального).

• Вимоги до вільного члена (a):

1) Критерій статичної незначимої відмінності вільного члена від нуля, тобто:

$$a \leq t(95\%; g - 2) \cdot s_a = 1,8946 \cdot S_a \quad (\text{Г.7})$$

де t – односторонній коефіцієнт Стюдента для ймовірності 95% і числа ступенів свободи $g - 2 = 7$;

g – число розчинів, що використовуються для вивчення лінійності.

S_a – відносне стандартне відхилення, виражене у відсотках, розраховане для співвідношення знайдено/введено для всіх 9 розчинів.

- 2) У тому випадку, якщо рівність (Г.7) не виконується (тобто вільний член статистично значно відрізняється від нуля), можна використовувати критерій статистичної незначимості вільного члена у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу, тобто, враховуючи (1):

$$a \leq \left| \frac{0,32 \cdot \Delta_{As}}{1 - (C_{\min} / \bar{C})} \right| \quad (\text{Г.8})$$

де C_{\min} – мінімальна концентрація для модельних розчинів, що використовуються для вивчення лінійності;

\bar{C} – концентрація, яка відповідає номінальному вмісту аналіту в препараті.

• Вимоги до залишкового стандартного відхилення:

RSD_0/b (відношення залишкового стандартного відхилення прямої до кутового коефіцієнта):

$$\frac{RSD_0}{b} \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%; g - 2)} \quad (\text{Г.9})$$

• Вимоги до коефіцієнта кореляції (r):

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As} / t(95\%; g - 2)}{SD_Y} \right)^2} \quad (\text{Г.10})$$

$$SD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \bar{C})^2}{\bar{C}^2 \cdot (g - 1)}} \cdot 100\% \quad (\text{Г.11})$$

де C_i – концентрація кожного модельного розчину, що використовується для вивчення лінійності;

t – односторонній коефіцієнт Стюдента для ймовірності 95 % і числа ступенів свободи $g-2=7$.

Для модельних розчинів методом найменших квадратів розраховують лінійну залежність:

$$\frac{I_i}{I_{St}} \cdot 100 = b \cdot \frac{C_i}{C_{St}} \cdot 100 + a \quad (\text{Г.12})$$

$$Y_i = b \cdot X_i + a, \quad (\text{Г.13})$$

де, I_{St} – сила струму стандартного розчину визначуваного компоненту;

I_i – сила струму модельного розчину препарату;

$C_{St.}$ – концентрація розчину стандартного розчину визначуваного компоненту (100%);

C_i – концентрація модельного розчину препарату.

Валідаційні характеристики **правильність** та **прецизійність** розраховують використовуючи результати, отримані при вивченні лінійності.

Правильність та **прецизійність** характеризують двома критеріями:

- 1) Критерій відсутності статистичної значимої систематичної похибки методики ($\delta\% = | \bar{D} - 100 |$). Це означає, що відхилення від 100 % середнього значення (\bar{D}), розрахованого для співвідношення знайдено/введено для всіх 9 розчинів (використаних для вивчення лінійності), повинно незначуще відрізнятися від нуля, тобто, не повинно перевищувати фактичний односторонній довірчий інтервал середнього результату для ймовірності 95%, розрахований для даних співвідношень знайдено/введено:

$$\delta\% = | \bar{D} - 100 | \leq \frac{\Delta x}{\sqrt{g}} \quad (\text{Г.14})$$

де Δx – односторонній довірчий інтервал;

$$\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^{i=9} D_i}{g} \quad (\text{Г.15})$$

$$\Delta x = RSD_0(\%) \cdot t(95\%, g - 2) \leq \Delta_{As} \quad (\text{Г.16})$$

$$RSD_0(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=9} (D_i - \bar{D})^2}{g - 1}} \quad (\text{Г.17})$$

\bar{D} – середнє значення знайденого вмісту аналіту в модельних розчинах;

D_i – відношення “знайдено/введено” для кожного модельного розчину.

RSD_o – відносне стандартне відхилення, виражене у відсотках, розраховане для відношення “знайдено/введено” для всіх модельних розчинів.

- 2) В тому випадку, коли дане співвідношення статистичної незначимості не виконується (величина δ значуще відрізняється від нуля, тобто має місце

статистично значима систематична похибка методики), можна використовувати критерій незначимості цієї систематичної похибки у порівнянні з максимально допустимою визначеністю аналізу:

$$\delta\% = \left| \bar{D} - 100 \right| \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (\text{Г.18})$$

Перевірку валідаційної характеристики **внутрішньолабораторної прецизійності** проводять аналізуючи одну серію лікарського засобу різними аналітиками, які використовують різний посуд і при цьому виконують по n паралельних вимірювань (прийнято 5 вимірювань) для однієї серії препарату в різні дні в одній лабораторії (m вимірювань). Всі отримані результати (Z_i) мають належати до однієї генеральної сукупності. Для всіх результатів обчислюють єдине середнє значення вмісту визначуваного компоненту (\bar{Z}_{intra}), єдине відносне стандартне відхилення ($SD_{Z-intra}$) і єдиний відносний довірчий інтервал (Δ_{intra}). Величина Δ_{intra} , не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність аналітичної методики.

$$\bar{Z}_{intra} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} Z_i}{n} \quad (\text{Г.19})$$

$$SD_{Z-intra} (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (Z_i - \bar{Z}_{intra})^2}{n-1}} \quad (\text{Г.20})$$

$$\Delta_{intra} = \frac{SD_{Z-intra} (\%) \cdot t(95\%, n-1)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Г.21})$$

де Δ_{intra} – єдиний відносний довірчий інтервал визначення вмісту аналіту в препараті;

\bar{Z}_{intra} – єдине середнє значення знайденого вмісту аналіту в препараті;

Z_i – значення знайденого вмісту аналіту в препараті;

$SD_{Z-intra}$ – єдине відносне стандартне відхилення визначення вмісту аналіту в препараті.

ДОДАТОК Д
ВОЛЬТАМПЕРОГРАМИ РОЗЧИНІВ АЗОСПОЛУК ОТЦ З ФУКСИНОМ
ТА ЦА З 8-ОКСИХІНОЛІНОМ

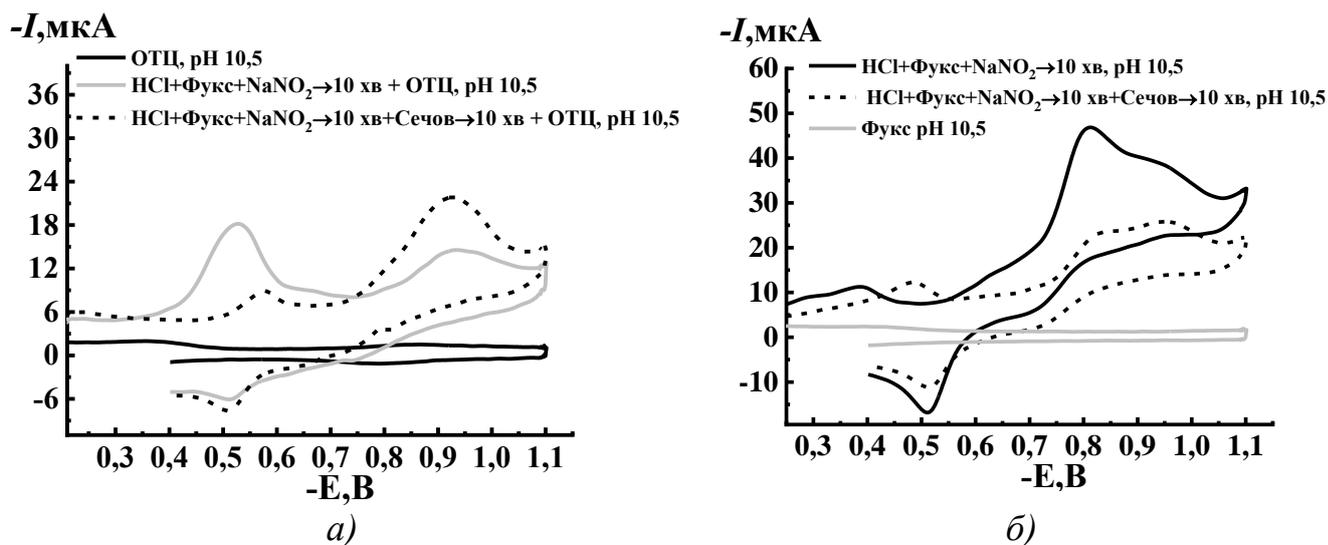


Рисунок Д.1 – Циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення ОТЦ із Фукс. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$, $C_{\text{фукс.}} = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{ОТЦ}} = 8,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{УБС}} = 0,01 \text{ M}$, $\text{pH} = 10,5$.

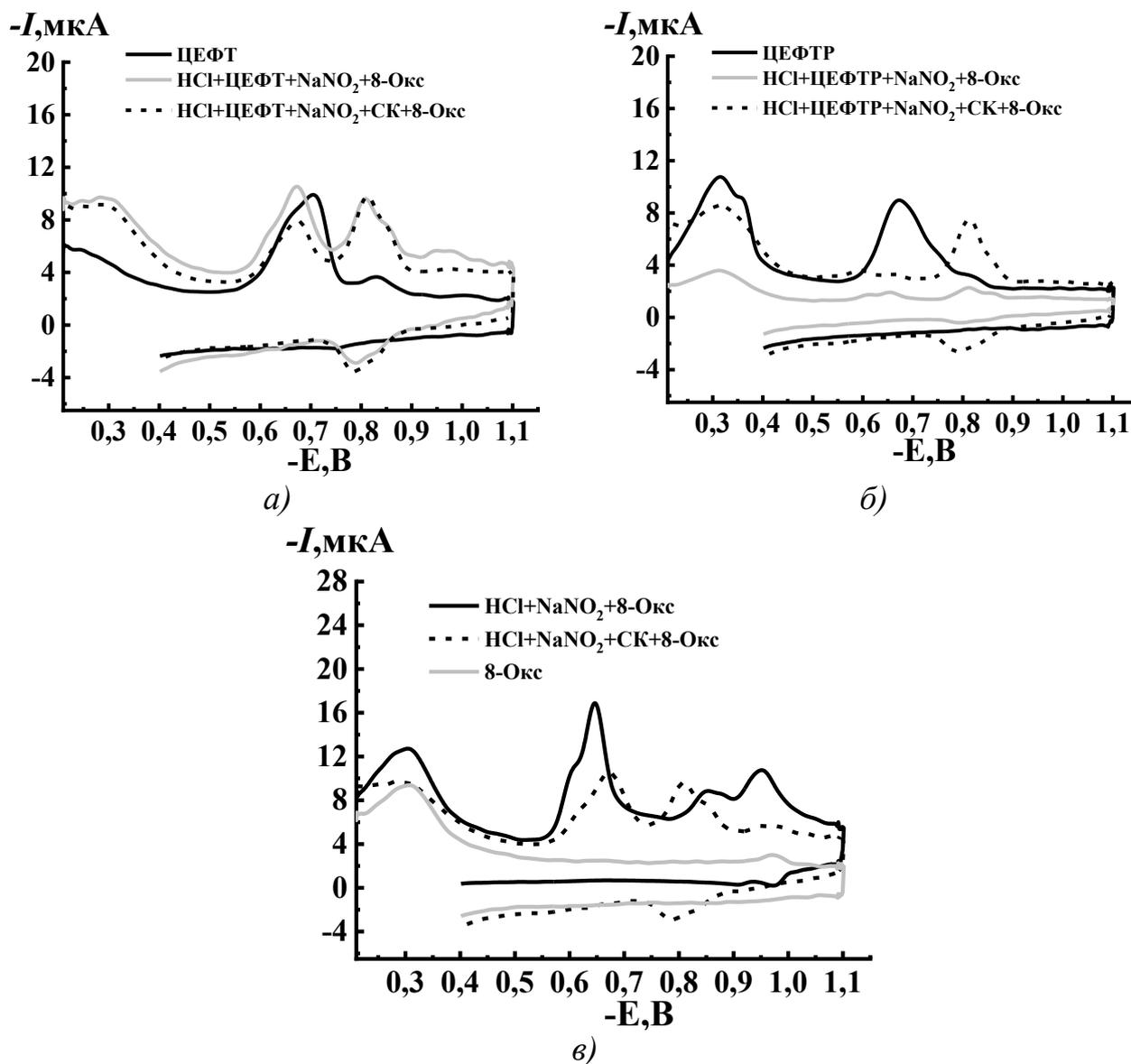


Рисунок Д.2 – Циклічні вольтамперограми у розчинах продуктів азосполучення ЦЕФТ та ЦЕФТР із 8-Окс. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТ}}=C_{\text{ЦЕФТР}}=7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{CK}}=11,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}}=5,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}}=0,16 \text{ M}$; $V=2,5 \text{ В/с}$.

ДОДАТОК Е

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ ТА ЦЕФТРИАКСОНУ

Валідація методики визначення амоксициліну в таблетках “Амоксил” з використанням сульфатіазолу

Методики приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ), робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ), робочого розчину модельного зразка (РМЗ), робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП) наведено в пункті 4.6.

Методика визначення АМ з використанням СТЗ

До мірної колби об'ємом 25 мл вносять 5,0 мл 0,7М хлоридної кислоти, додають 2,0 мл $4,5 \cdot 10^{-3}$ М розчину сульфатіазолу, додають 2,0 мл 0,08 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв при кімнатній температурі, додають аліквоту робочого РДЗ (або робочих РСЗ, РМЗ, РМЗП, відповідно), вносять 5,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 10,5. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять при $\lambda=448$ нм, $l=1$ см.

Вміст в препараті (m), в мг/г, розраховують за формулою:

$$m = \frac{A_x \cdot m_c}{A_c \cdot m_x}$$

де A_x – оптична густина робочого РДЗ;

A_c – оптична густина робочого РСЗ;

m_c – маса наважки АМ для приготування робочого РСЗ, мг;

m_x – досліджуваного препарату для приготування робочого РДЗ, г.

Повна невизначеність результатів аналізу

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$ таблетки “Амоксил” обчислена згідно (Г.1) становить:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} препарату “Амоксил” обчислювали, виходячи з методики пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції визначення АМ. Результати обчислень представлені в табл. Е1.

Таблиця Е1 – Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення АМ у таблетках “Амоксил”.

Операція пробо підготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка АМ (дослід. препарату)	m_0	0,2%	0,01%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100,0 мл	100	0,12%	
3. Відбір аліквоти піпеткою 5,0мл	5	0,6%	
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17%	
5. Відбір аліквоти піпеткою 1,0 мл	1	0,6%	
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 25,0 мл	25	0,23%	

Обчислена згідно (Г.2) невизначеність пробопідготовки становить:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 2 \cdot 0,12^2 + 3 \cdot 0,6^2 + 0,17^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,04^2} = \sqrt{1,2935} = 1,14\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції обчислена відповідно до (Г.3)

становить:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу визначення АМ у таблетках “Амоксил” обчислена згідно з (Г.4) становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,14^2 + 0,3^2} = 1,2\% \leq 1,6\%$$

Специфічність

Досліджено селективність взаємодії АМ з СТЗ за наявності усіх компонентів таблеток “Амоксил”.

Специфічність методики визначення АМ перевірено порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препаратів.

Максимально допустимої невизначеності результатів аналізу (Δ_{As}):

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Результати досліджень специфічності визначення АМ представлені на рис. Е1.

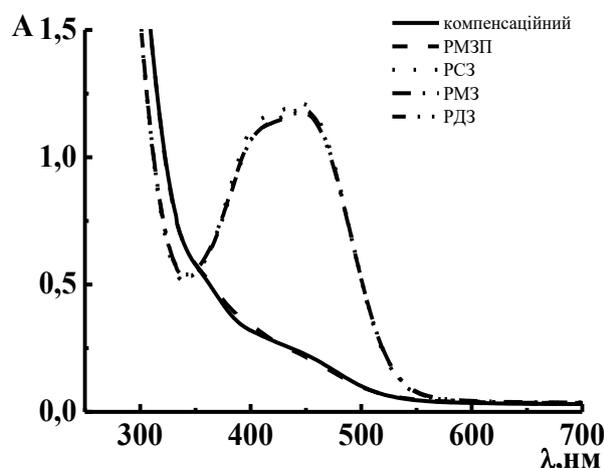


Рисунок Е 1 – Електронні спектри поглинання досліджуваних розчинів після проведення аналітичної реакції з СТЗ: $C_{HCl}=0,7M$, $C_{AM}=4,1 \cdot 10^{-5}M$, $C_{NaNO_2}=6,4 \cdot 10^{-3}M$, $C_{СТЗ}=3,6 \cdot 10^{-4}M$, $C_{Na_2B_4O_7}=0,1M$, $pH = 10,5$; $\lambda = 448 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Як видно з рис.Е1 на спектрах світлопоглинання розчинів плацебо немає максимуму світлопоглинання за 448 нм.

Вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу оцінюють згідно нерівності (Г.6):

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,0046}{1,026} \cdot 100\% = 0,45\% \leq 0,51\% \quad \text{— для визначення АМ у таблетках “Амоксил” з СТЗ,}$$

де A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП; A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Як видно з розрахунків вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу є незначним, порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, відносно оптичної густини максимуму

поглинання робочого РМЗ, яка становить 0,45 % для визначення АМ з СТЗ у таблетках “Амоксил”.

Робасність

Досліджено умови вилучення АМ з таблеток – встановлено оптимальний час струшування та концентраційні межі розчинника.

У табл. Е 2 наведено результати дослідження робасності методики СФ визначення АМ – вплив концентрації хлоридної кислоти, а також вплив тривалості струшування на вилучення діючої речовини з препарату “Амоксил”. Результати проведених досліджень свідчать, що зміна значень оптичної густини при зміні досліджуваних параметрів є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо вилучення АМ з таблеток “Амоксил” проводити розчином 0,05–0,15М хлоридної кислоти. При цьому час струшування може становити 30–45 хв, за 15 хв струшування вилучення АМ з таблеток відбувається не повністю. Встановлено, що вилучення АМ з таблеток “Амоксил” оптимально проводити під час струшування протягом 30 хв розчином 0,10 М НСІ.

Таблиця Е 2 – Дослідження робасності методики СФ визначення АМ у таблетках “Амоксил”. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,7\text{M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=6,4 \cdot 10^{-3}\text{M}$, $C_{\text{СТЗ}}=3,6 \cdot 10^{-4}\text{M}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}}=4,1 \cdot 10^{-5}\text{M}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,1\text{M}$, рН 10,5.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	$\delta, \%$	Критерій	Висновок
Концентрація хлоридної кислоти	0,05 М	1,238	0,17	$\leq 0,51\%$	Відповідає
	0,1 М	1,237	0,08		
	0,15 М	1,239	0,24		
Час струшування	15 хв	1,251	1,34		Не відповідає
	30 хв	1,269	0,08		Відповідає
	45 хв	1,269	0,08		

Перевірка лінійності

Лінійну залежність для таблеток “Амоксил” досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики. Для цього готували 15 розчинів, які одержували розведенням робочого РМЗ препарату з концентраціями амоксициліну, що становили від 80% до 120% відносно вмісту, вказаного виробником. В табл. Е3 представлені результати розрахунку концентрацій (C_i), середніх значень оптичних густин (A_i), а також значень X_i “введено” відносно концентрації розчину порівняння (C_i/C_{St}) та Y_i “знайдено” відносно оптичної густини розчину порівняння (A_i/A_{St}).

Таблиця Е 3 – Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації АМ у РМЗ таблеток “Амоксил”.

Назва розчину	C_i , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{St}} \cdot 100\%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{St}} \cdot 100\%$
Розчин порівняння	15,00	100,00	1,246	100,00
№1 (80%)	12,05	80,33	1,021	81,94
№2 (80%)	12,05	80,33	1,015	81,46
№3 (80%)	12,05	80,33	1,019	81,78
№4 (90%)	13,52	90,13	1,119	89,81
№5 (90%)	13,52	90,13	1,122	90,05
№6(90%)	13,52	90,13	1,125	90,29
№7 (100%)	14,98	99,87	1,246	100,00
№8 (100%)	14,98	99,87	1,240	99,52
№9 (100%)	14,98	99,87	1,242	99,68
№10 (110%)	16,44	109,60	1,353	108,59
№11 (110%)	16,44	109,60	1,381	110,83
№12 (110%)	16,44	109,60	1,362	109,31
№13 (120%)	17,90	119,36	1,471	118,06
№14(120%)	17,90	119,36	1,482	118,94
№15(120%)	17,90	119,36	1,475	118,38

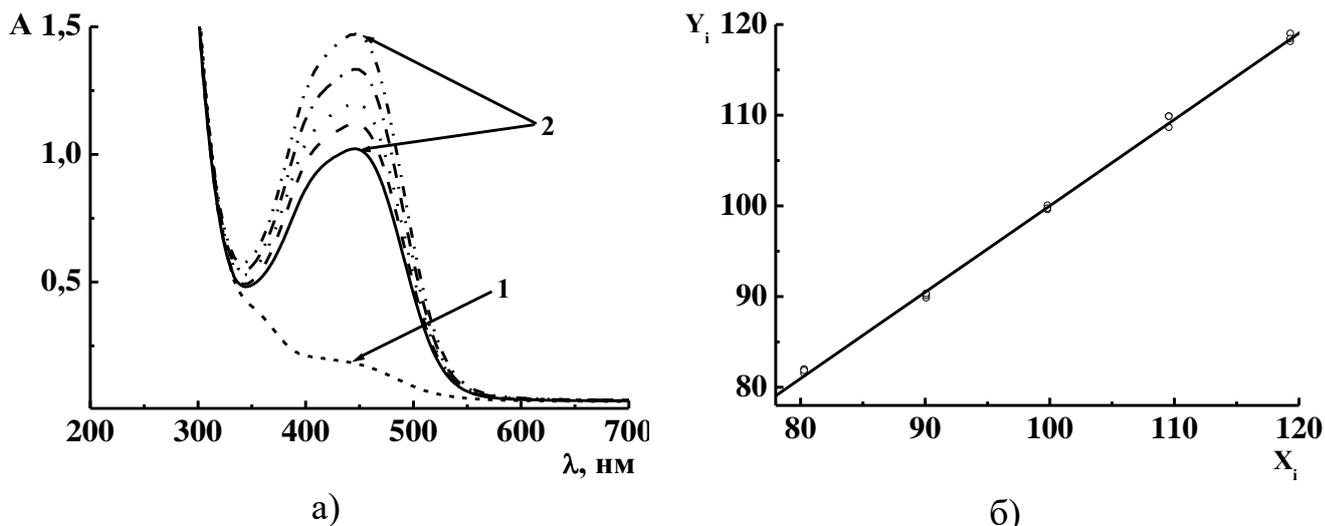


Рисунок Е 2 – Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації АМ. 1 – компенсаційний розчин, 2 – 10-кратне розведення РМЗ препарату з відповідними концентраціями АМ. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}}=0,7\text{M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=6,4\cdot 10^{-3}\text{M}$, $C_{\text{СТЗ}}=3,6\cdot 10^{-4}\text{M}$, Умови азосполучення: $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7}=0,25\text{M}$, рН 10,5; $\lambda = 448\text{ nm}$, $l = 1\text{ cm}$.

Таблиця Е 4 – Критерії лінійності і параметри лінійної залежності, критерії правильності і прецизійності, та обчислені їх значення при визначенні АМ у таблетках “Амоксил”.

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
b	0,952	–	
S_b	0,009	–	
a	4,837	1) $\geq 2,395 $ 2) $\leq 6,072 $	Витримується
RSD_0	0,667	–	
S_a	0,990	–	
RSD_0/b	0,710	$\leq 0,9034 $	Витримується
RSD_y	14,22	–	
r	$ 0,9993 $	$\geq 0,9973 $	Витримується
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

– не зазначають критерій для відповідного параметру

Результати проведених нами досліджень свідчать, що у випадку таблеток “Амоксил” спостерігається лінійна залежність аналітичного сигналу від концентрації АМ, обчислені параметри лінійних залежностей відповідають критеріям, які до них ставляться.

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики правильності та прецизійності розраховано з використанням результатів, отриманих при вивченні лінійності, та наведено у табл. Е 5.

Таблиця Е 5 – Результати аналізу РМЗ таблеток “Амоксил” з СТЗ та результати їх статистичної обробки.

№ з/п	Y _i , % (знайдено)	X _i , % (уведено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{уведено}} \cdot 100\%$
1	81,94	80,33	102,00
2	81,46	80,33	101,41
3	81,78	80,33	101,81
4	89,81	90,13	99,64
5	90,05	90,13	99,91
6	90,29	90,13	100,18
7	100,00	99,87	100,13
8	99,52	99,87	99,65
9	99,68	99,87	99,81
10	108,59	109,60	99,08
11	110,83	109,60	100,21
12	109,31	109,60	100,19
13	118,06	119,36	98,91
14	118,94	119,36	99,65
15	118,38	119,36	98,18
Середнє значення знайденого вмісту \bar{D}			100,18
Відносне стандартне відхилення RSD_0 , %			0,667
Критичне одностороннього інтервалу, $\Delta x = 1,181$ %	значення довірчого	$\Delta x \leq 1,6\%$	Витримано
Критерій систематичної похибки, $\delta = 0,18\%$	незначимості	1. $\delta \leq 0,394\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$	Витримано
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

Обчислені значення відносного довірчого інтервалу та систематичної похибки визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням СТЗ (табл. Е 5) є меншими за максимальне допустиме значення цих параметрів відповідно до валідаційних критеріїв.

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Процедуру виконання перевірки внутрішньолабораторної прецизійності наведено у пункті 4.6. Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для таблеток “Амоксил” подано в табл. Е 6.

Таблиця Е 6 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики визначення АМ з СТЗ у таблетках “Амоксил”.

№ аналізу	$Z_i, \%$		
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)	3 день (дослід 3)
1	96,84	98,06	97,47
2	97,70	98,89	99,14
3	99,91	101,14	98,34
4	97,33	98,53	97,93
5	100,10	101,32	100,17
середнє (\bar{z})	98,38	99,59	98,61
об'єднане середнє (\bar{z}_{intra})	98,68		
S_m	1,52	1,43	1,07
$SD_{Z-intra}$	1,30		
Δ_{intra}	1,02		

Як видно з табл. Е 6 величина Δ_{intra} , обчислена при перевірці внутрішньолабораторної прецизійності для таблеток “Амоксил” з використанням СТЗ – 1,02%. Отримані результати відповідають вимозі:

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 1,02\% \leq 1,6\%$$

Отримані результати підтверджують те, що розроблена нами методика відповідають вимогам валідаційних критеріїв та є придатними для кількісного визначення АМ у досліджуваних лікарських засобах.

Валідація методики СФ визначення амоксициліну у ветеринарному лікарському засобі суспензії для ін'єкцій “Амоксицилін 15% L.A.”

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ)

150 мг субстанції АМ (точна наважка) розчиняють у 50 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти в мірній колбі об'ємом 100,0 мл, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки. Відбирають 5 мл отриманого розчину в колбу місткістю 50,0 мл, доводять до мітки 0,1 М НСІ. Отриманий робочий розчин РСЗ містить 0,15 мг/мл амоксициліну.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ)

1,0 мл препарату змішують з 50 мл 1,5 М розчину хлоридної кислоти в конічній колбі об'ємом 100,0 мл, отриману суміш струшують на механічному струшувачі впродовж 20 хв, пропускають через гідрофобний мембранний тефлоновий фільтр PTFE L з розміром пор 0,45 мкм (відкидаючи перші 10 мл фільтрату). В колбу місткістю 100,0 мл вносять 5,0 мл фільтрату і доводять до мітки розчином 1,5 М хлоридної кислоти.

Приготування робочого розчину зразка (РМЗ)

У хімічний стакан об'ємом 100 мл вносять 150 мг субстанції АМ (точна наважка), бутиленгідрокситолуену (1 мг), алюміній моностеарату (15 мг), бензилового спирту (10 мг), кокосової олії (1 мл нагрітої на водяній бані до 40°C), що відповідає номінальному вмісту речовин у препараті. Суміш ретельно перемішують і нагрівають на водяній бані при 40°C. Для аналізу відбирають 1 мл суспензії і переносять в конічну колбу об'ємом 100,0 мл, додають 50 мл 1,5 М хлоридної кислоти. Всі наступні етапи приготування зразка проводять аналогічно як у випадку РДЗ.

Приготування робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП)

Змішують всі компоненти як у випадку РМЗ, за винятком амоксициліну. Приготування робочого РМЗП проводять аналогічно.

Визначення АМ у суспензії для ін'єкцій “Амоксицилін 15 % L.A.” з використанням САМ

Методику визначення амоксициліну з використанням САМ наведена у пункті 4.6.

Валідація методик визначення АМ в препараті “Амоксицилін 15 % Л.А.” з використанням САМ

Проведено валідацію визначення амоксициліну у суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.” (виробник – Invesa, Іспанія) з використанням сульфаніламідів.

Повна невизначеність результатів аналізу

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$ (“Амоксицилін 15 % Л.А.” обчислена згідно (Г.1) становить:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Результати обчислень невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} препарату “Амоксицилін 15 % Л.А.” наведені в табл.Е 7.

Таблиця – Е 7 – Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення АМ у суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.”

Операція пробо підготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка АМ (дослід. препарату)	m_0	0,2%	–
2. Відбір аліквоти досліджуваного препарату	1	–	0,6%
3. Доведення до об'єму в мірній колбі 100,0 мл	100	0,12%	
4. Відбір аліквоти піпеткою 5,0 мл	5	0,6%	
5. Доведення до об'єму в мірній колбі на 50,0 мл.	50	0,17%	

Обчислена згідно (Г.2) невизначеність пробопідготовки становить:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{2 \cdot 0,12^2 + 4 \cdot 0,6^2 + 0,2^2 + 0,17^2} = \sqrt{1,5377} = 1,24\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції обчислена відповідно до (Г.3) становить:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу визначення АМ у суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.” обчислена згідно з (Г.4) становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,24^2 + 0,3^2} = 1,3\% \leq 1,6\% .$$

Обраховані значення повної невизначеності результатів аналізу перепарату “Амоксицилін 15 % Л.А.” не перевищують максимальної невизначеності результатів аналізу.

Специфічність

Специфічність методики визначення АМ перевіряли порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препарату. Вплив плацебо не має перевищувати 0,51 % для препарату (Г.5), від максимально допустимої невизначеності результатів аналізу (Δ_{AS}), тобто:

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{AS} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Результати досліджень специфічності розробленої методики з використанням САМ для суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.” наведено на рис.Е 3.

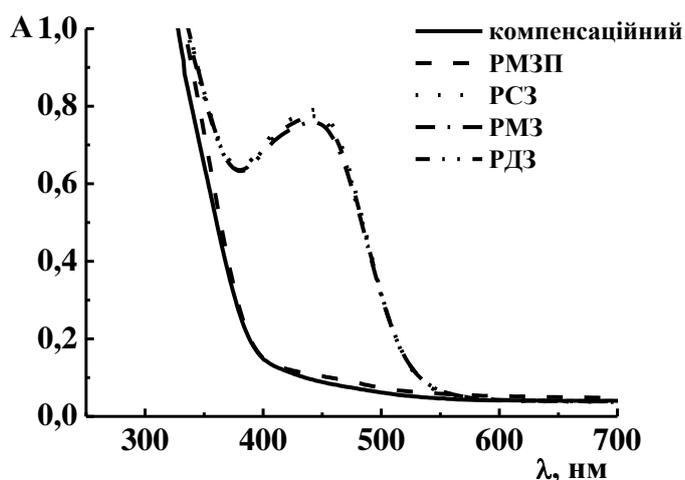


Рисунок Е 3 – Електронні спектри поглинання досліджуваних розчинів після проведення аналітичної реакції з САМ. Умови діазотування: $C_{HCl} = 0,6 \text{ M}$, $C_{NaNO_2} = 8,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $C_{SAM} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Умови діазотування: $C_{AM} = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1 \text{ M}$, $pH = 10,5$; $\lambda = 445 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$.

Як видно з рис. Е 3 на спектрах світлопоглинання розчинів плацебо немає максимуму світлопоглинання за довжини хвилі 445 нм у випадку взаємодії з САМ.

Вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу оцінюють згідно нерівності (Г.6):

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,0033}{0,6664} \cdot 100\% = 0,50\% \leq 0,51\%$$

– для визначення АМ у суспензії
“Амоксицилін 15 % Л.А.” з
САМ

де A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП; A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Вплив оптичної густини розчинів плацебо на результати аналізу є незначним і становить 0,50 %, що не перевищує значення максимальної невизначеності результатів аналізу (0,51 %). Результати перевірки специфічності методики визначення з використанням САМ свідчать про те, що компоненти суспензії для ін'єкцій “Амоксицилін 15 % Л.А.” не заважають визначенню АМ у її складі.

Робасність

Досліджено умови вилучення АМ зі суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.”, зокрема, вплив концентрації розчинника (HCl). Встановлено, що вилучення можна проводити 1,25–1,75 М хлоридною кислотою, адже невизначеність даної операції є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу (табл. Е 7). У разі використання HCl меншої концентрації не досягається повного вилучення АМ з суспензії. Вилучення АМ з препарату “Амоксицилін 15 % Л.А.” оптимально проводити 1,5 М HCl при струшуванні вродовж 20 хв.

Таблиця Е 7 – Дослідження робасності методики спектрофотометричного визначення АМ у суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.”, з використанням САМ. $n=5$, $P=0,95$. Умови діазотування: $C_{HCl}=0,6M$, $C_{AM}=4,1 \cdot 10^{-5}M$, $C_{NaNO_2}=8,0 \cdot 10^{-3}M$. Умови азосполучення: $C_{CAM}=4,5 \cdot 10^{-4}M$, $C_{Na_2B_4O_7}=0,1M$, рН 10,5.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	$\delta, \%$	Критерій	Висновок
Концентрація хлоридної кислоти	1,00 М	0,497	31,2	$\leq 0,51\%$	Не відповідає
	1,25 М	0,698	0,43		Відповідає
	1,50 М	0,684	0,29		Відповідає
	1,75 М	0,695	0,21		Відповідає

Перевірка лінійності

Процедуру проведення перевірки параметрів лінійності описано у пункті 4.6.

Таблиця Е 8 – Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації АМ у РМЗ суспензії “Амоксицилін 15 % Л.А.” з використанням САМ.

Назва розчину	C_i , МКГ/МЛ	$X_i = \frac{C_i}{C_{Sr}} \cdot 100\%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{Sr}} \cdot 100\%$
Розчин порівняння	12,00	100,00	0,547	100,00
№1 (75%)	9,00	75,00	0,409	74,95
№2 (75%)	9,00	75,00	0,411	75,13
№3 (75%)	9,00	75,00	0,406	74,22
№4 (100%)	11,99	99,92	0,548	100,18
№5 (100%)	11,99	99,92	0,545	99,63
№6(100%)	11,99	99,92	0,546	99,81
№7 (125%)	15,06	125,50	0,685	125,22
№8 (125%)	15,06	125,50	0,688	125,77
№9 (125%)	15,06	125,50	0,687	125,87

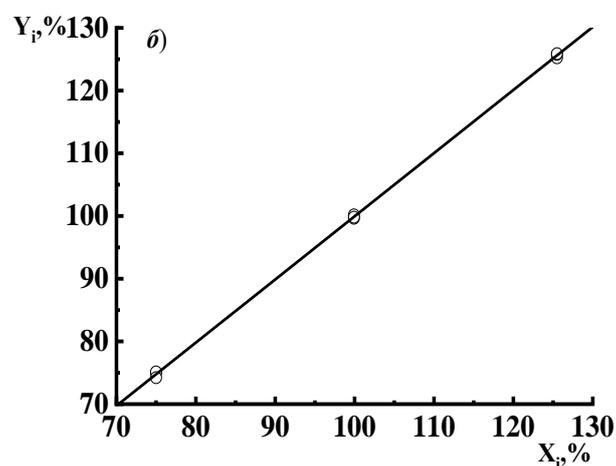
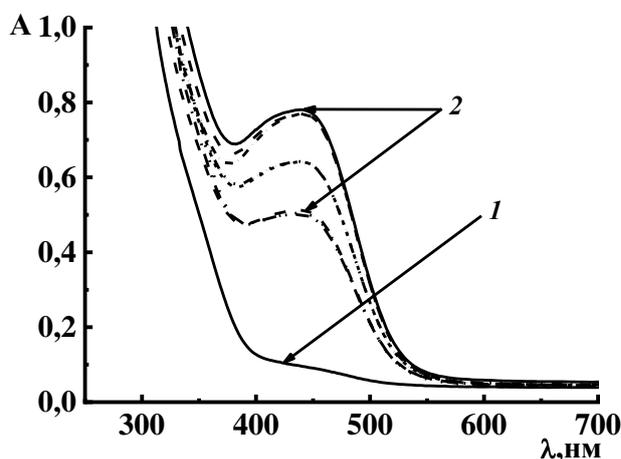


Рисунок Е 4 – Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації АМ. 1 – компенсаційний розчин, 2–10-кратне розведення РМЗ препарату з відповідними концентраціями АМ. Умови діазотування: $C_{HCl}=0,6M$, $C_{NaNO_2}=8,0 \cdot 10^{-3}M$, $C_{САМ}=4,5 \cdot 10^{-4}M$. Умови діазотування: $C_{Na_2B_4O_7}=0,1M$, рН 10,5; $\lambda = 445$ нм, $l = 1$ см.

Таблиця Е 9 – Критерії лінійності і параметри лінійної залежності, критерії правильності і прецизійності, та обчислені їх значення при визначенні АМ у суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” з використанням САМ.

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
Перевірка лінійності			
b	1,001	–	
S_b	0,006	–	
a	-0,754	1) $\leq 1,102 $ 2) $\leq 5,529 $	Витримуються
RSD_0	0,417	–	
S_a	0,582	–	
RSD_0/b	0,417	$\leq 0,844 $	Витримується
RSD_y	21,85	–	
r	0,9998	$\geq 0,9993 $	Витримується
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

– не зазначають критерій для відповідного параметру

Результати, проведених досліджень, показали, що у випадку суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” спостерігається лінійна залежність аналітичного сигналу від концентрації АМ. Розраховані параметри лінійної залежності відповідають критеріям, які до них ставляться.

Перевірка правильності та прецизійності

Розраховані валідаційні характеристики правильності та прецизійності наведено в табл. Е 10.

Як видно з табл. Е 10 обчислені значення відносного довірчого інтервалу та систематичної похибки визначення АМ у суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” з використанням сульфаніламідів є меншими за максимальне допустиме значення які висуваються до цих параметрів відповідно до валідаційних критеріїв.

Таблиця Е 10 – Результати аналізу РМЗ суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” з САМ та результати їх статистичної обробки.

№ з/п	Y _i , % (знайдено)	X _i , % (уведено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{уведено}} \cdot 100\%$
1	74,95	75,00	99,93
2	75,13	75,00	100,17
3	74,22	75,00	98,96
4	100,18	99,92	100,26
5	99,63	99,92	99,71
6	99,81	99,92	99,89
7	125,22	125,50	99,78
8	125,77	125,50	100,22
9	125,87	125,50	100,29
Середнє значення знайденого вмісту \bar{D}			99,91
Відносне стандартне відхилення RSD_0 , %			0,417
Критичне значення одностороннього довірчого інтервалу, $\Delta x = 0,776\%$	$\Delta x \leq 1,6\%$	Витримано	
Критерій незначимості систематичної похибки, $\delta = 0,09\%$	1. $\delta \leq 0,259\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$	Витримано	
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Процедуру перевірки внутрішньолабораторної прецизійності наведено у пункті 4.6. Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності суспензії для ін'єкцій “Амоксицилін 15 % L.A.” наведено в табл. Е 11.

Значення відносного довірчого інтервалу розраховано при перевірці внутрішньолабораторної прецизійності для суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.” з використанням САМ становить 1,04%.

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 1,04\% \leq 1,6\%$$

Таблиця Е 11 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики визначення АМ з використанням САМ у суспензії “Амоксицилін 15 % L.A.”

№ аналізу	$Z_i, \%$		
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)	3 день (дослід 3)
1	99,68	100,22	99,28
2	99,61	102,89	100,16
3	99,18	100,06	99,56
4	99,46	103,12	98,62
5	99,67	101,45	101,05
середнє (\bar{z})	99,52	101,55	99,73
об'єднане середнє (\bar{z}_{intra})	100,27		
S_m	0,21	1,44	0,92
$SD_{Z-intra}$	1,32		
Δ_{intra}	1,04		

Валідація методики визначення цефтріаксону у порошку для приготування розчину для ін'єкцій “Цефтриаксон”

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ)

100 мг субстанції ЦЕФТР (точна наважка) розчиняють у 50 мл дистильованої води в мірній колбі об'ємом 100,0 мл, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки. Аліквоту 5 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл та доводять до мітки 0,1М розчином хлоридної кислоти, ретельно перемішують. Отриманий робочий РСЗ містить 0,1 мг/мл ЦЕФТР.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ)

1,0 г препарату (точна наважка) зважують і вносять до мірної колби об'ємом 100,0 мл, додають 50 мл дистильованої води, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки. Аліквоту 5 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл та доводять до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують.

Приготування робочого розчину модельного зразка (РМЗ)

У мірну колбу об'ємом 100,0 мл вносять ЦЕФТР (1000,0 мг), що відповідає номінальному вмісту речовини у флаконі. Всі наступні етапи приготування зразка проводять аналогічно як у випадку РДЗ.

Приготування робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП)

Оскільки це однокомпонентний препарат РМЗП є дистильована вода

Визначення ЦЕФТР з використанням 8-оксихіноліну.

У колбу місткістю 25,0 мл вносять 1,0 мл $9,3 \cdot 10^{-4}$ М розчину цефтріаксону, додають 0,5 мл 12,0 М розчину HCl, 1,0 мл 0,1 М розчину NaNO₂ витримують впродовж 5 хвилин та додають 2,5 мл $2,5 \cdot 10^{-3}$ М розчину 8-оксихіноліну, приготованого на 4,0 М натрій гідроксиді. Після цього доводять об'єм розчину до мітки дистильованою водою. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять при $\lambda=550$ нм, $l=1$ см.

Вміст в препараті (m), в мг/г, розраховують за формулою:

$$m = \frac{A_x \cdot m_c}{A_c \cdot m_x}$$

де A_x – оптична густина робочого РДЗ;

A_c – оптична густина робочого РСЗ;

m_c – маса наважки ЦЕФТР для приготування робочого РСЗ, мг;

m_x – досліджуваного препарату для приготування робочого РДЗ, г.

З метою вивчення ефективності запропованої методики кількісного визначення ЦЕФТР з використанням фенольного реагенту 8-оксихіноліну було проведено валідацію визначення цефтріаксону у порошок для приготування розчину для ін'єкцій “Цефтриаксон”.

Повна невизначеність результатів аналізу

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$ (препарат “Цефтриаксон” обчислена згідно (Г.1) становить:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Результати обчислень *Невизначеності пробопідготовки* Δ_{SP} досліджуваного препарату “Цефтриаксон” представлені в табл. Е.12.

Таблиця Е 12 – Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення ЦЕФТР у порошку “Цефтриаксон”.

Операція пробопідготовки	Параметр розрахунку-вої формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка ЦЕФТР (дослід. препарату)	m_0	0,2%	0,01%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100,0 мл	100	0,12%	
3. Відбір аліквоти піпеткою 5,0 мл	5	0,6%	
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17%	
5. Відбір аліквоти піпеткою 1,0 мл	1	0,6%	
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 25,0 мл	25	0,23%	

Обчислена згідно (Г.2) *невизначеність пробопідготовки* становить:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 2 \cdot 0,12^2 + 3 \cdot 0,6^2 + 0,17^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,04^2} = \sqrt{1,2935} = 1,14\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції обчислена відповідно до (Г.3) становить:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу визначення ЦЕФТР у порошку “Цефтриаксон” обчислена згідно з (Г.4) становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,14^2 + 0,3^2} = 1,2\% \leq 1,6\%$$

Специфічність

Вивчено селективність взаємодії ЦЕФТР з 8-Окс. Специфічність методики кількісного визначення ЦЕФТР перевіряли порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препарату. Вплив плацебо не має перевищувати 0,51 % для

препарату згідно (Г.5), від максимально допустимої невизначеності результатів аналізу (Δ_{As}), тобто:

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Як можна побачити з рис. Е 5 на спектрах світлопоглинання розчинів плацебо немає максимуму світлопоглинання при довжинах хвиль 550 нм у випадку взаємодії з 8-оксихіноліном.

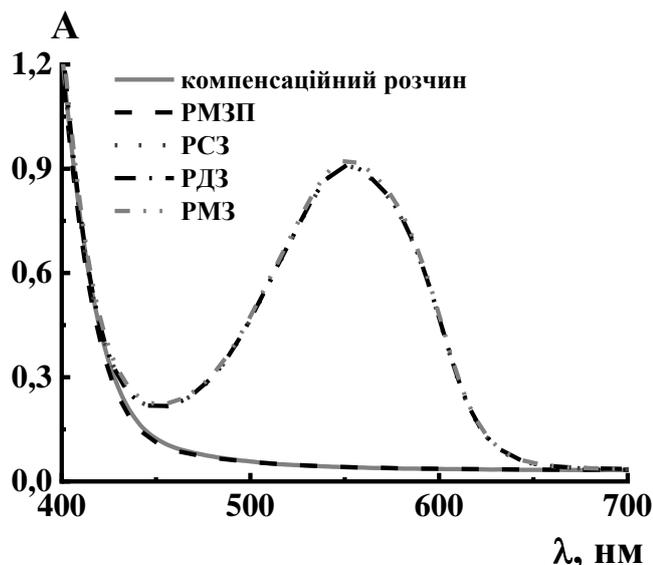


Рисунок Е 5 – Електронні спектри світлопоглинання досліджуваних розчинів під час аналізу порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон”. Умови діазотування: $C_{HCl} = 12,0$ М, $C_{ЦЕФТР} = 7,5 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{NaNO_2} = 9,3 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{діазот.} = 5$ хв. Умови азосполучення: $C_{8-Окс} = 9,3 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaOH} = 0,16$ М; $\lambda_{max} = 550$ нм, $l = 1$ см.

Вплив оптичної густини розчину плацебо на результати аналізу оцінюють згідно нерівності (Г.6):

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,001}{0,8828} \cdot 100\% = 0,11\% \leq 0,51\%$$

де A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП; A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Розрахований вплив оптичної густини розчину плацебо на результати аналізу є незначним (0,11 %) у порівнянні з максимальною невизначеністю

результатів аналізу (0,51 %) у разі визначення ЦЕФТР з використанням 8-Окс у препараті “Цефтриаксон”

Робасність

У табл. Е 13. наведено результати дослідження робасності методики СФ визначення ЦЕФТР – вплив часу діазотування, а також порядок змішування реагентів. Результати проведених досліджень свідчать, що зміна оптичної густини при зміні досліджуваних параметрів є незначною порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо діазотування ЦЕФТР проводити у всіх запропонованих нами послідовностях (табл. Е.13), час діазотування може становити 5–10 хв.

Таблиця Е.13 – Дослідження робасності методики спектрофотометричного визначення ЦЕФТР у порошку для приготування розчинів для ін’єкцій “Цефтриаксон” з використанням 8-оксихіноліну.

Умови діазотування: $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$,

Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ М}$, $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	$\delta, \%$	Критерій	Висновок
Час діазотування	0 хв	0,473	0,67	$\leq 0,51\%$	Не відповідає
	3 хв	0,564	0,52		Відповідає
	5 хв	0,9232	0,17		
	7 хв	0,9248	0,12		
	10 хв	0,431	0,61		Не відповідає
Послідовність змішування	ЦЕФТР+HCl+NaNO ₂ +8-Окс(NaOH)	0,8053	0,21	$\leq 0,51\%$	Відповідає
	ЦЕФТР+NaNO ₂ +HCl+8-Окс(NaOH)	0,8220	0,18		
	HCl+ЦЕФТР+NaNO ₂ +8-Окс(NaOH)	0,9265	0,13		

Перевірка лінійності

Лінійну залежність визначення ЦЕФТР у порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики. Процедура перевірки лінійності аналогічна як у пункті 4.6. Результати експерименту та розрахунки параметрів лінійності наведено у табл. Е 14 – Е 15.

На рис. Е.6 наведені електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації ЦЕФТР для досліджуваного препарату при взаємодії із 8-Окс.

Таблиця Е.14 – Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації ЦЕФТР у РМЗ для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” з використанням 8-Окс.

Назва розчину	C_i , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{sr}} \cdot 100\%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{sr}} \cdot 100\%$
Розчин порівняння	80,00	100,00	1,481	100,00
№1 (75%)	60,00	75,00	1,108	74,87
№2 (75%)	60,00	75,00	1,113	75,20
№3 (75%)	60,00	75,0	1,119	75,61
№4 (100%)	80,00	100,00	1,484	100,20
№5 (100%)	80,00	100,00	1,482	100,14
№6 (100%)	80,00	100,00	1,491	100,74
№7 (125%)	100,00	125,00	1,849	124,93
№8 (125%)	100,00	125,00	1,851	125,07
№9 (125%)	100,00	125,00	1,859	125,61

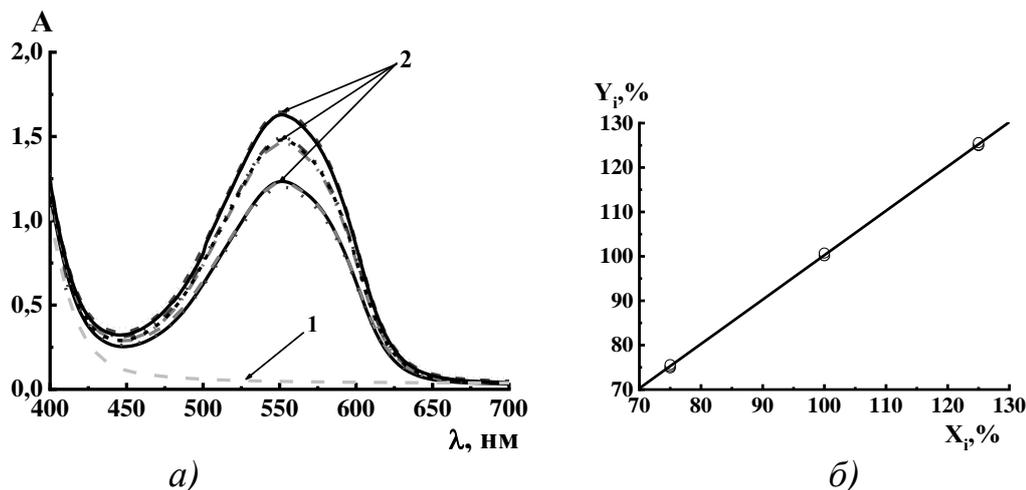


Рисунок Е 6 – Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації ЦЕФТР. 1 – компенсаційний розчин, 2–10-кратне розведення РМЗ порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” з відповідними концентраціями ЦЕФТР. Умови діазотування: $C_{\text{HCl}} = 12,0 \text{ M}$, $C_{\text{ЦЕФТР}} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 9,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{діазот.}} = 5 \text{ хв}$. Умови азосполучення: $C_{8\text{-Окс}} = 9,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{NaOH}} = 0,16 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

У табл. Е.15 наведено критерії лінійності і обчислено параметри лінійної залежності визначення ЦЕФТР у РМЗ порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” за допомогою 8-Окс. Обчислені параметри лінійних залежностей відповідають критеріям, які до них ставляться.

Таблиця Е .15 – Критерії лінійності і параметри лінійної залежності, критерії правильності і прецизійності, та обчислені їх значення при визначенні ЦФТР у порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон”.

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
b	0,999	–	
S_b	0,006	–	
a	0,311	1) $\leq 0,524 $ 2) $\leq 1,063 $	Витримуються
RSD_0	0,343	–	
S_a	0,561	–	
RSD_0/b	0,343	$\leq 0,8445 $	Витримується
RSD_y	21,65	–	
R	$ 0,9999 $	$\geq 0,9992 $	Витримується
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

“–“ не зазначають критерій для відповідного параметру

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики правильності та прецизійності розраховано з використанням результатів, отриманих при вивченні лінійності.

Результати проведеного аналізу модельного розчину препарату та статистичну обробку подано в табл. Е.16.

Таблиця Е.16 – Результати аналізу РМЗ порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” з 8-Окс та результати їх статистичної обробки.

№ з/п	Y _i , % (знайдено)	X _i , % (введено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{введено}} \cdot 100\%$
1	74,87	75,00	99,82
2	75,20	75,00	100,27
3	75,61	75,0	100,81
4	100,20	100,00	100,20
5	100,14	100,00	100,14
6	100,74	100,00	100,74
7	124,93	125,00	99,95
8	125,07	125,00	100,05
9	125,61	125,00	100,49
Середнє значення знайденого вмісту \bar{D}			100,27
Відносне стандартне відхилення RSD_0 , %			0,343
Критичне значення одностороннього довірчого інтервалу, $\Delta x = 0,638$ %	$\Delta x \leq 1,6\%$		Витримано
Критерій незначимості систематичної похибки, $\delta = 0,27\%$	1. $\delta \leq 0,213\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$		Витримано
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Процедура провєння перевірки внутрішньолабораторної прецизійності наведена вище (пункт 4.6). Результати перевірки внутрішньолабораторної

прецизійності для порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” подано в табл. Е 17

Таблиця Е 17 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики визначення ЦЕФТР з використанням 8-Окс у порошку для приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон”

№ аналізу	$Z_i, \text{г/флакон}$	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
1	1,29	1,14
2	1,12	0,96
3	1,33	1,16
4	1,20	1,22
5	1,16	1,34
середнє (\bar{z})	1,22	1,16
об'єднане середнє (\bar{z}_{intra})	1,19	
S_m	0,09	0,14
$SD_{Z-intra}$	0,11	
Δ_{intra}	0,10	

Як видно з табл. Е 18 обчислені значення Δ_{intra} , становить 0,1%. Отримані результати відповідають вимозі:

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 0,1\% \leq 1,6\%$$

Валідація методики вольтамперометричного визначення амоксициліну в таблетках “Амоксил”

Проведено валідацію розробленої вольтамперометричної методики визначення амоксициліну з використанням діазотованого сульфаніламід у за умов усунення непрореагованого залишку натрій нітриту сечовиною.

Усі розчини готували аналогічно до пункту 4.6.

Визначення АМ з використанням САМ

До мірної колби об'ємом 25,0 мл вносять 5,0 мл 0,6 М хлоридної кислоти, додають 1,0 мл $1,25 \cdot 10^{-2}$ М розчину САМ, додають 1,0 мл 0,18 М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв при кімнатній

температурі. Непрореагований надлишок натрій нітриту усувають за допомогою додавання 1,0 мл 1,8 М розчину сечовини, після перемішування суміш витримують протягом 10 хв. Додають аліквоту досліджуваного розчину амоксициліну в межах 0,2–7,3 мкг/мл або 7,3–36,5 мкг/мл (кінцева концентрація), вносять 10,0 мл 0,25 М розчину натрій тетраборату, нейтралізують додаванням 1,0 мл 3,0 М розчину натрій гідроксиду до рН 9,0. Доводять розчин до мітки дистильованою водою. Досліджуваний розчин вносять в електролітичну комірку і видаляють розчинений кисень продуванням очищеного аргону упродовж 15 ± 1 хв. Вимірювання сили струму піку відновлення утвореної азосполуки проводять на вольтамперометричній цифровій установці з триелектродною коміркою за швидкості розгортки потенціалу $V = 2,5$ В/с та $E_{\text{поч}} = -0,2$ В і $E_{\text{кін}} = -1,1$ В, час затримки – 3,6 с. Вольтамперограми реєструють при кімнатній температурі ($\sim 20^\circ\text{C}$). Вміст амоксициліну розраховують за висотою піку 2 ($E_{\text{к}}^{\text{п}} = -0,55$ В), висота якого пропорційна концентрації амоксициліну в досліджуваному розчині, за попередньо отриманим градуйованим графіком або методом порівняння.

Вміст амоксициліну розраховують за висотою піку 2 ($E_{\text{к}}^{\text{п}} = -0,55$ В), висота якого пропорційна концентрації амоксициліну в досліджуваному розчині. Вміст амоксициліну (Z), у мг/табл для таблеток розраховують за формулою:

$$Z = \frac{I_{\text{пр.}} \times m_{\text{СЗ}} \times P_{\text{СЗ}} \times t}{I_{\text{СЗ}} \times m_{\text{пр.}} \times 100},$$

де $m_{\text{СЗ}}$ – точна маса наважки стандартного зразка (РСЗ) амоксициліну, використана для приготування розчину його РСЗ, мг;

$m_{\text{пр.}}$ – маса наважки препарату, що містить амоксицилін, мг;

$I_{\text{СЗ}}$ – значення струму катодного піку РСЗ ;

$P_{\text{СЗ}}$ – вміст основної речовини амоксициліну у СЗ згідно зі сертифікатом якості фірми-виробника, %;

$I_{\text{пр.}}$ – значення струму катодного піку розчину РДЗ препарату;

t – середня маса таблетки, мг;

100 – фактор перерахунку відсотків у частки одиниці.

Повна невизначеність результатів аналізу

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{AS} при допусках вмісту $B = 5\%$ обчислена згідно рівняння (Г.1) становить:

$$\Delta_{AS} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Результати розрахунків *Невизначеності пробопідготовки* Δ_{SP} таблеток “Амоксил”. наведені в табл. Е 18.

Невизначеність пробопідготовки обчислена відповідно до рівняння (Г.2) становить:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 2 \cdot 0,12^2 + 3 \cdot 0,6^2 + 0,17^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,04^2} = \sqrt{1,2935} = 1,14\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції обчислена згідно рівняння (Г.3)

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot s_1^2}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot 0,1^2}{3}} = 0,08\%$$

Таблиця Е 18 – Результати розрахунків невизначеності пробопідготовки для визначення амоксициліну у таблетках “Амоксил”.

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка АМ (досліджуваного препарату)	m_0	0,2%	0,01%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100,0 мл	100	0,12%	
2. Відбір аліквоти піпеткою 5,0 мл	5	0,6%	
3. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17%	
4. Відбір аліквоти піпеткою 1,0 мл	1	0,6%	
2. Відбір аліквоти досліджуваного препарату	25	0,23%	

Повна невизначеність результатів аналізу розрахована відповідно до рівняння (Г.4) становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,24^2 + 0,08^2} = 1,14\% \leq 1,6\%$$

Розраховане значення повної невизначеності результатів аналізу (1,14 %) не перевищує максимальної невизначеності результатів аналізу (1,6 %).

Специфічність

Нами досліджено специфічність взаємодії АМ з САМ при наявності деяких допоміжних речовин у досліджуваному препараті.

Специфічність методики кількісного визначення АМ перевіряли порівнюючи вольтамперограми робочих РМЗП та РМЗ препаратів (рис. Е 7). Вплив плацебо не має бути вищим ніж 0,51% для препарату “Амоксил” згідно (Г.5), від максимально допустимої невизначеності результатів аналізу (Δ_{As}):

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Вплив сили струму піку 2 (рис. Е 7) розчину плацебо на результат аналізу є незначним порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, обчислену (Г.6), відносно сили струму робочого РМЗ, яка становить 0,45 %.

$$\delta = \frac{I_{pl}}{I_m} = \frac{0,0189}{4,1588} \cdot 100\% = 0,45\% \leq 0,51\%$$

де, I_{pl} – сила струму робочого РМЗП;

I_m – сила струму робочого РМЗ.

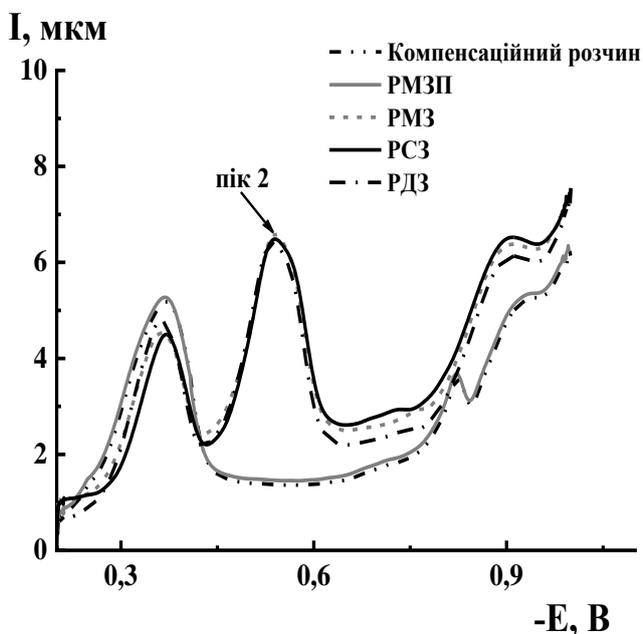


Рисунок – Е 7 Вольтамперограми розчинів робочих зразків після проведення аналітичної реакції азосполучення з діазотованим сульфаніламідом. Умови діазотування: $C_{HCl} = 0,6$ М, $C_{CA} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{NaNO_2} = 7,5 \cdot 10^{-3}$ М. Умови азосполучення: $C_{AM} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{Na_2B_4O_7} = 0,1$ М, pH = 9,0; V = 2,5 В/с.

Робасність

Досліджено валідаційну характеристику робасність, вивчено концентраційні межі розчинника та час струшування.

У табл. Е 19 наведено результати дослідження робасності методики ВА визначення АМ. Встановлено, що зміна сили струму при зміні досліджуваних параметрів є незначною у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо вилучення амоксициліну з таблеток “Амоксил” проводити розчином 0,05–0,15М НСІ. Час струшування може бути 30–45 хв. За 15 хв вилучення АМ з препарату відбувається не повністю.

Таблиця Е 19 – Дослідження робасності методики вольтамперометричного визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням САМ. $n=5$; $P=0,95$. Умоаи діазотування: $C_{\text{НСІ}} = 0,6 \text{ М}$, $C_{\text{СА}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $C_{\text{NaNO}_2} = 7,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, $C_{\text{Ссчов}} = 7,5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$. Умови азосполучення: $C_{\text{АМ}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,05 \text{ М}$, $\text{pH} = 9,0$; $V = 2,5 \text{ В/с}$.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Сила струму, мкА	$\delta, \%$	Критерій	Висновок
Концентрація хлоридної кислоти	0,05 М	11,07	0,07	$\leq 0,51\%$	Відповідає
	0,1 М	11,38	0,11		
	0,15 М	10,98	0,27		
Час струшування	15 хв	10,33	8,82		Не відповідає
	30 хв	11,31	0,12		Відповідає
	45 хв	11,43	0,21		

Перевірка лінійності

Лінійну залежність досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики, для чого готували 9 розчинів, які отримували розведенням робочого РМЗ препарату з концентраціями амоксициліну, що становили від 75%, до 125% по відношенні до вмісту вказаного виробником. В табл. Е 20 представлені результати розрахунку концентрацій (C_i), середніх значень сили струму (I_i), а також значень X_i “введено” відносно концентрації розчину порівняння (C_i/C_{St}) та Y_i “знайдено” відносно сили струму розчину порівняння (I_i/I_{St}).

Таблиця Е 20 – Результати дослідження лінійної залежності сили струму від концентрації АМ у РМЗ таблеток “Амоксил” з використанням СА.

Назва розчину	C_i , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\%$	I_i	$Y_i = \frac{I_i}{I_{st}} \cdot 100\%$
№1 (75%)	13,70	75,00	8,53	75,08
№2 (75%)	13,70	75,00	8,59	75,62
№3 (75%)	13,70	75,00	8,54	75,18
№4 (100%)	18,27	100,00	11,48	101,06
№5 (100%)	18,27	100,00	11,36	100,00
№6(100%)	18,27	100,00	11,40	100,35
№7 (125%)	22,84	125,00	14,18	124,82
№8 (125%)	22,84	125,00	14,32	126,06
№9 (125%)	22,84	125,00	14,29	125,79

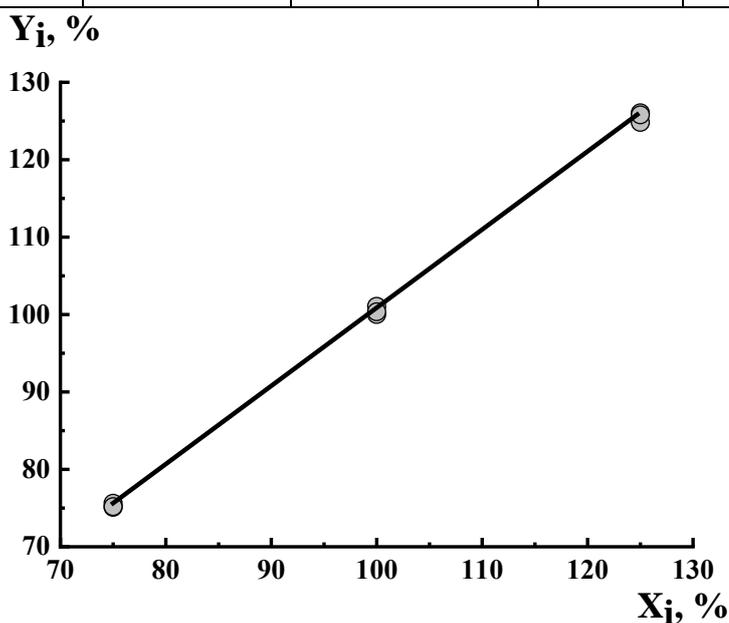


Рисунок Е 8 – Графік лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації АМ в нормалізованих координатах. $V = 2,5$ В/с. Умови діазотування: $C_{HCl} = 0,6$ М, $C_{CAM} = 6,3 \cdot 10^{-4}$ М; $C_{NaNO_2} = 9,4 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{Сечов} = 9,4 \cdot 10^{-2}$ М. Умови азосполучення: $C_{Na_2B_4O_7} = 0,05$ М, $pH = 9,0$.

Таблиця Е 21 – Критерії лінійності і параметри лінійної залежності, критерії правильності і прецизійності, та обчислені їх значення при визначенні АМ у таблетках “Амоксил”.

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
b	1,006	–	
S_b	0,008	–	
a	0,087	1) $ 0,598 $ 2) $\leq 1,512 $	Витримано
RSD_0	0,420	–	
S_a	0,798	–	
RSD_0/b	0,417	$\leq 0,844 $	Витримано
RSD_y	41,692	–	
R	$ 0,9998 $	$\geq 0,9997 $	Витримано
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

– критерій для відповідного параметру не зазначають

Результати проведених досліджень свідчать, що при валідації методики визначення АМ у таблетках “Амоксил” всі критерії лінійності є витримані.

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики правильності та прецизійності розраховано з використанням результатів, отриманих при вивченні лінійності. Результати аналізу модельних розчинів препарату та їх статистичну обробку подано в табл. Е 22.

Таблиця Е 22 – Результати аналізу РМЗ препарату “Амоксил” з САМ та результати їх статистичної обробки.

№ з/п	$Y_i, \%$ (знайдено)	$X_i, \%$ (уведено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{уведено}} \cdot 100\%$
1	75,08	75,00	100,12
2	75,62	75,00	100,82
3	75,18	75,00	100,23
4	101,06	100,00	101,06
5	100,00	100,00	100,00

Продовження таблиці Е 22

6	100,35	100,00	100,35
7	124,82	125,00	99,85
8	126,06	125,00	100,85
9	125,79	125,00	100,63
Середнє значення знайденого вмісту \bar{D}			100,44
Відносне стандартне відхилення RSD_0 , %			0,420
Критичне значення одностороннього довірчого інтервалу, $\Delta x = 0,78\%$		$\Delta x \leq 1,6\%$	Витримано
Критерій незначимості систематичної похибки, $\delta = 0,44\%$		1. $\delta \leq 0,261\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$	Витримано
Загальний висновок щодо методики:			Коректна

Розраховане значення відносного довірчого інтервалу та систематичної похибки (табл. Е 22) ВА визначення АМ у таблетках “Амоксил” з використанням САМ є меншими ніж максимальне допустимі значення цих параметрів відповідно до валідаційних критеріїв.

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Для перевірки критерію внутрішньолабораторної прецизійності аналіз проводили два аналітики, які використовували різний посудод і виконували по 5 паралельних вимірювань для однієї серії препарату в одній лабораторії в різні дні. Для всіх результатів розраховували єдине середнє значення вмісту амоксициліну (\bar{z}_{intra}), відносне стандартне відхилення (S_{intra}) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra}). Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для таблеток “Амоксил” представлено в табл. Е 23.

Таблиця Е 23 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики визначення АМ з використанням САМ у таблетках “Амоксил”.

№ аналізу	$Z_i, \text{мг/таблетку}$	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
1	251,2	250,8
2	249,3	248,7
3	249,9	249,1
4	253,1	248,6
5	249,6	250,3
середнє (\bar{z})	250,6	249,5
Об'єднане середнє (\bar{z}_{intra})	250,1	
S_m	1,56	0,99
$SD_{Z-intra}$	1,37	
Δ_{intra}	1,12	

Як видно з результатів представлених у табл. Е 23 обчислені при перевірці внутрішньолабораторної прецизійності величини Δ_{intra} , для таблеток “Амоксил” з використанням розробленої ВА методики становить 1,12%. Отримані результати відповідають критерію:

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 1,12\% \leq 1,6\%.$$

Як видно з таблиці Е 23 отримані результати є в діапазоні допустимого вмісту діючої речовини (АМ) у препараті 5%, що є доказом правильності розробленої ВА методики.

ДОДАТОК Є

МЕХАНІЗМИ ВІДНОВЛЕННЯ ДЕЯКИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП

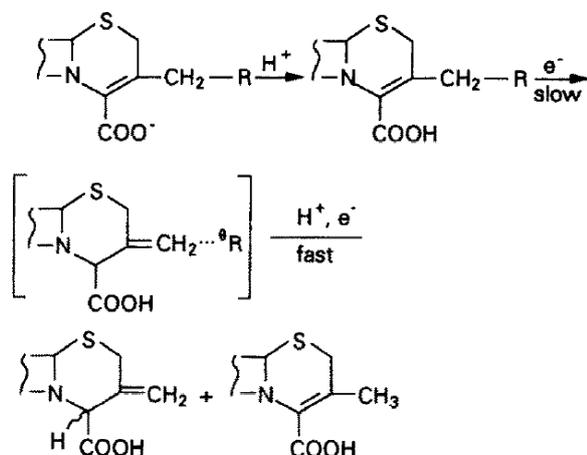


Рисунок Є.1 – Механізм відновлення подвійного C=C зв'язку у цефалоспоринів [36]

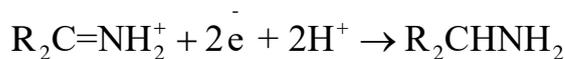
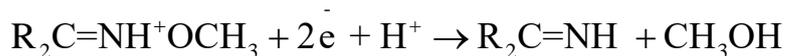
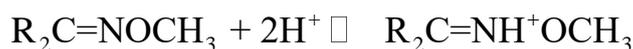


Рисунок Є.2 – Механізм відновлення метоксиімінової групи у цефалоспоринів [30]

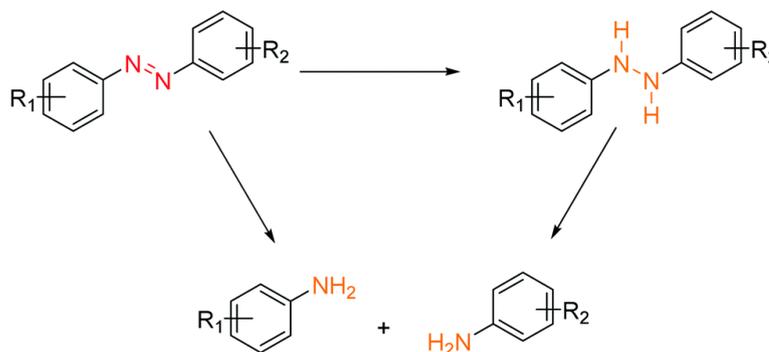


Рисунок Є.3 – Механізм відновлення азогрупи [76]

ДОДАТОК Ж

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації у наукових фахових виданнях, які включено до міжнародних наукометричних баз

1. **Kostiv O.** Development and validation of the simple and sensitive spectrophotometric method of amoxicillin determination in tablets using sulphanimides / **O. Kostiv**, O. Korkuna, P. Rydchuk // Acta Chim. Slov. – 2020, Vol. 67, No. 1. – P. 23–35. (*IF=1,263; Scopus, квартиль Q3*). *(Особистий внесок здобувача: спектрофотометричне дослідження оптимізації умов діазотування САМ та СТЗ та вивчення умов азосполучення отриманих солей діазонію із амоксициліном, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення статті).*

2. **Костів О.І.** Реакція азосполучення цефалоспоринових антибіотиків з 8-оксихіноліном та її застосування в аналізі лікарських засобів / **О.І. Костів**, О.Я. Коркуна, М.П. Орнат // Methods Objects Chem. Anal. – 2020. – Vol. 15, No. 3. – P. 144–155. (*Web of Science*). *(Особистий внесок здобувача: спектрофотометричне дослідження умов діазотування ЦЕФТ та ЦЕФТР та вивчення умов азосполучення отриманих солей діазонію із фенольним реагентом 8-оксихіноліном, визначення цефалоспоринових антибіотиків у лікарських формах, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення статті).*

3. **Костів О.І.** Спектрофотометричне визначення цефтазидиму у ліках із застосуванням резорцину та 2-метилфенолу / **О.І. Костів**, О.Я. Коркуна, М.В. Шередько // Vorprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii. – 2021. – No. 1, – P. 35-44. (*Scopus, квартиль Q3*). *(Особистий внесок здобувача: спектрофотометричне дослідження умов діазотування цефтазидиму та вивчення умов азосполучення солі діазонію ЦЕФТ із фенольними реагентами резорцином та 2-метилфенолом,*

визначення ЦЕФТ у лікарських засобах, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення статті).

Статті у наукових фахових виданнях України

1. **Костів О.** Вольтамперометричне визначення цефтріаксону за реакцією азосполучення / **О. Костів**, П. Ридчук, О. Коркуна // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2019. – Вип. 60., Ч.1 – С. 200–209. (*Особистий внесок здобувача: вольтамперометричне дослідження процесу відновлення продукту власного азосполучення на ртутному крапельному електроді, ВА визначення ЦЕФТР у лікарських засобах, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення статті*).

2. **Костів О.**, Коркуна О., Янчук Л., Смолінська М. Застосування азосполуки окситетрацикліну з 1-аміно-2-нафтол-4-сульфо кислотою для спектрофотометричного аналізу ветеринарних препаратів / **О. Костів**, О. Коркуна, Л. Янчук, М. Смолінська // Вісн. Львів. ун-ту. Серія хім. – 2021. – Вип. 62. – С. –156–167. (*Особистий внесок здобувача: спектрофотометричне вивчення умов азосполучення солі діазонію 1-аміно-2-нафтол-4-сульфо кислоти із окситетрацикліном, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення статті*).

Патенти України на винахід

1. Патент України на винахід № 120717. МПК G01N 27/00 (2020). Спосіб вольтамперометричного визначення амоксициліну у фармацевтичних препаратах / О.Я. Коркуна, П.В. Ридчук, **О.І. Костів**. – №а201801406. – заявл. 13.02.2018; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. Заявник і власник – Львівський національний університет імені Івана Франка. (*Особистий внесок здобувача: вольтамперометричне дослідження процесу відновлення продукту азосполуки АМ із САМ на ртутному крапельному електроді, ВА визначення АМ у лікарських засобах, участь у формулюванні основних положень та висновків. Написання та оформлення патенту*).

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

1. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Застосування реакції азосполучення для спектрофотометричного визначення амоксициліну // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2016”, 18–22 жовтня 2016, Київ. – С. 130–131. *(заочна участь)*

2. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Оптимальні умови взаємодії амоксициліну з деякими реагентами, що містять у своїй структурі первинну ароматичну аміногрупу // Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2017): зб. тез допов. десятої Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 27–29 березня 2017, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2017. – С.19. *(Заочна участь)*

3. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Нові спектрофотометричні методики визначення амоксициліну з діазотованими реагентами: сульфаніловою кислотою, стрептоцидом, сульфатіазолом та бензидином // Зб. наук. праць XVI наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2017”, 28 травня – 31 травня 2017, Львів. – С. У10. *(Очна участь, усна доповідь)*

4. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Спектрофотометричне визначення амоксициліну у лікарських препаратах із застосуванням реакції азосполучення // Тези допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2017” / Київ. нац. ун.-т ім. Т. Шевченка, 18–21 жовтня 2017, Київ. – С. 168–169. *(Очна участь, усна доповідь)*

5. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Грийцаровська І.А. Використання сульфаніламідів та сульфатіазолу для визначення вмісту амоксициліну у лікарських формах та валідація розроблених методик // Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези допов. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народж. д. фарм. н., проф. О. М. Гайдукевича, 12–13 квітня 2018, Харків: НФаУ. – С. 333. *(Заочна участь)*

6. **Костів О.І.**, Шередько М.В., Максимів І.Р., Коркуна О.Я. Встановлення оптимальних умов діазотування цефтазидиму та подальшого його азосполучення з фенольними реагентами // Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2019): зб. тез допов.

XII Української наук. конф. студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецьк. нац. ун.-т ім. В. Стуса, 19–21 березня 2019, Вінниця, ТОВ “Нілан-ЛТД”, 2019. – С.12. *(Заочна участь)*

7. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Застосування реакції азосполучення для вольтамперометричного визначення амоксициліну // Зб. наук. праць XVII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2019”, 2–5 червня 2019, Львів. – С. У43. *(Очна участь, усна доповідь)*

8. **Костів О.І.**, Орнат М.П., Коркуна О.Я., Скробала В.Е. Спектрофотометричне визначення цефтріаксону в лікарських засобах за допомогою 8-оксихіноліну // Зб. тез Всеукр. наук.-практич. конф. з міжнар. участю “Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020”, 5–6 березня 2020, Запоріжжя. – С. 16. *(Заочна участь)*

9. **Костів О.І.**, Грийцаровська І.А., Коркуна О.Я., Хавчук М.М. Валідація спектрофотометричної методики визначення амоксициліну на основі реакції азосполучення у суспензії для ін’єкцій “Амоксицилін 15% L.A” // Тези доп. XXI міжнар. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених “Сучасні проблеми хімії”/ Київ. нац. ун.-т ім. Т. Шевченка, 20–22 травня 2020, Київ. – С. 24. *(Заочна участь)*

10. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Янчук Л.В., Спектрофотометричне визначення окситетрацикліну за реакцією азосполучення з фуксином та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою // Зб. тез допов. Київської конф. з аналітичної хімії “Сучасні тенденції 2020”, 21–23 жовтня, Наукове видання, Київ: “LAT&K”, 2020. – С. 24. *(Заочна участь)*

11. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Ридчук П.В., Хавчук М.М. Валідація вольтамперометричної методики визначення амоксициліну // Сьомий наук. семін. студентів, аспірантів і молодих учених “Прикладні аспекти електрохімічного аналізу”, 15–16 жовтня 2020, Львів: Малий видавн. центр хім. та фізичн. факульт. ЛНУ ім. І. Франка, 2020. – С. 21. *(Он-лайн стендова доповідь)*

12. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Орнат М.П. Валідація спектрофотометричної методики визначення цефтріаксону за допомогою 8-оксихіноліну у порошку для

приготування розчинів для ін'єкцій “Цефтриаксон” // XIII Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів “Хімічні Каразінські читання – 2021”, 20–21 квітня, Харків, 2021. – С. 38–39. *(Заочна участь)*

13. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я., Орнат М.П., Футрик А.Н. Азосполука цефтріаксону з 2-метилфенолом, як дериват для спектрофотометричного визначення антибіотика у ліках // V Всеукр. наук. конф. “Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи”. Зб. матеріалів конф., 15 квітня 2021, Житомир, 2021. – С. 25. *(Заочна участь)*

14. **Костів О.І.**, Коркуна О.Я. Реакція азосполучення в аналізі β -лактамних та тетрациклінових антибіотиків // Зб. наук. праць: XVIII Наук. конф. “Львівські хімічні читання – 2021”, 31 травня – 2 червня, Львів: Видавництво від А до Я, 2021. – С. У19. *(Очна участь, усна доповідь)*

ДОДАТОК 3
ВПРОВАДЖЕННЯ

Державна служба України з питань
безпеки харчових продуктів
та захисту споживачів
Держпродспоживслужба



State Service for Food Safety and
Consumer Protection
of Ukraine
SSUFSCP

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНИХ
ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

STATE SCIENTIFIC RESEARCH CONTROL
INSTITUTE OF VETERINARY MEDICAL
PRODUCTS AND FEED ADDITIVES

вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019
тел.: (032) 252 33 72; факс: (032) 252 27 78
e-mail: secretar@scivp.lviv.ua www.scivp.lviv.ua
СДРПОУ 00485670

Donetska str., 11, Lviv, 79019, Ukraine
tel.: +38 032 252 33 72; fax: +380 32 252 27 78
e-mail: secretar@scivp.lviv.ua www.scivp.lviv.ua
EDRPOU 00485670

12.03.2021 № 740-кор/06
на № _____ від _____

Акт впровадження

методики спектрофотометричного визначення окситетрацикліну в ветеринарних
препаратах порошках та розчинах для інекцій

Підтверджуємо, що Лабораторією високоефективної рідинної хроматографії ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок апробовано та впроваджено в роботу методику спектрофотометричного визначення антибіотика тетрациклінового ряду – окситетрацикліну, які розроблені аспіранткою Костів О.І. в межах дисертаційної роботи, виконаної у Львівському національному університеті імені Івана Франка під керівництвом к.х.н., доцента Коркуни О.Я.

Методика визначення окситетрацикліну з фуксином ґрунтується на попередньому діазотуванні фуксину та наступному азосполученні з окситетрацикліном з утворенням продукту жовтого кольору, водний розчин якого має максимум світлопоглинання при $\lambda_{\text{max}} = 440$ нм.

Інша методика визначення окситетрацикліну ґрунтується на його взаємодії з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфо кислотою з утворенням азосполуки оранжевого кольору, електронний спектр поглинання водного розчину якого має широке плече світлопоглинання при 450–550 нм, $\Delta\lambda_{\text{max}} = 470$ нм.

Розроблені методику спектрофотометричного визначення кількісного вмісту окситетрацикліну у ветеринарних препаратах є простими та експресними у виконанні, використані для визначення реактиви та обладнання є доступними та недорогими, а самі методику є чутливими, що дає змогу використовувати їх під час проведення серійних аналізів лікарських засобів та на перспективу для визначення залишкових кількостей у біологічних рідинах після відповідної пробопідготовки зразків.

Акт не є основою для фінансових розрахунків.

Завідувач Лабораторії
високоефективної
рідинної хроматографії, к.б.н.

Заступник директора інституту по
науковій роботі, д.вет.н.

 Коробова О.В.
 Музика В.П.





МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

ХІМІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

79005, м. Львів, вул. Кирила і Мефодія, 6
Тел. (032) 260-03-91, 239-45-10
e-mail: chemistry.faculty@lnu.edu.ua
chemdek@lnu.edu.ua

№ 39

19.03 2021 року

Акт впровадження методики спектрофотометричного визначення амоксициліну

Підтверджуємо, що методику спектрофотометричного визначення амоксициліну у таблетках “Амоксиклав квіктаб” за реакцією азосполучення із діазотованим сульфаніламідом впроваджено у лабораторний практикум дисципліни за вибором студента “Аналіз лікарських засобів” для студентів освітнього рівня “магістр” хімічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Методику розроблено аспіранткою Костів О.І. в межах дисертаційної роботи, виконаної на кафедрі аналітичної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка під керівництвом к.х.н., доц. Коркуни О.Я.

Методика спектрофотометричного визначення амоксициліну у таблетках “Амоксиклав квіктаб” ґрунтується на попередньому діазотуванні реагенту сульфаніламідів та наступному азосполученні отриманої діазосоли з амоксициліном у лужному середовищі з утворенням продукту забарвленого у жовтий колір, водний розчин якого має максимум світлопоглинання при $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм. Світлопоглинання отриманого продукту азосполучення пропорційно залежить від концентрації амоксициліну у розчині проби в межах 0,7–32,9 мкг/мл. Для методики характерна проста пробопідготовка, достатня експресність та селективність аналізу.

Завідувачка кафедри
аналітичної хімії, доц.

Л.О. Дубенська

Декан хімічного факультету, доц.



Г.С. Дмитрів