

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМОКСИЦИЛІНУ ТРИГІДРАТУ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ КІНЕТИЧНИМ МЕТОДОМ

Ключові слова: кінетичний метод аналізу, амоксицилін, калій гідрогенпероксомоносульфат

Антибіотик пеніцилінового ряду амоксицилін належить до антибактерійних препаратів, займає значне місце у терапії інфекційних захворювань [10].

За хімічною будовою препарати пеніцилінового ряду є похідними 6-амінопеніцилятної кислоти (6-АПК) — конденсованої системи тіазолідинового і чотириланкового β-лактамового циклів, які різняться між собою радикалом R ацилу, з'єднаним з аміногрупою 6-АПК.

Для їх кількісного визначення рекомендовано різні методи: біологічні, хімічні, фізико-хімічні.

Біологічні методи засновано на безпосередній біологічній дії антибіотика на застосований тест-мікроорганізм, чутливий до даного антибіотика. Недоліками біологічних методів контролю є довготривалість, а також залежність точності результатів аналізу від багатьох зовнішніх факторів.

Для кількісного визначення препаратів пеніцилінового ряду рекомендовані методи ВЕРХ [12, 20, 21], спектрофотометрії [8, 10, 17], йодометрії [10], потенціометричного титрування [6]; для визначення амоксициліну також успішно застосовують метод потенціометрії з використанням ЙСЕ [9], різні варіанти вольтамперометрії [22], амперометрії [13], полярографічного аналізу [4], кінетики [5, 19].

Відомі також спектрофотометричні методики, які ґрунтуються на застосуванні фенольного реактиву Фоліна—Чокальтеу [2,3], взаємодії з солями міді (II) [1] та ін. [11, 14, 15, 16]. Ці методики дають можливість визначити пеніциліни в лікарських препаратах за наявності різноманітних допоміжних речовин.

Незважаючи на те, що в практиці аналізу використовують багато різноманітних фізико-хімічних методів, завдання удосконалення відомих та опрацювання нових методик кількісного визначення пеніцилінів залишається актуальним і надалі. Існуючі фармакопейні методики визначення препаратів цього ряду достатньо складні, довготривалі та вимагають використання складної висококоштовної апаратури [10]. Недоліком відомих достатньо простих у виконанні методик спектрофотометричного визначення пеніцилінів, які зводяться до визначення кінцевих продуктів їх гідролітичного розщеплення, є необхідність тривалого нагрівання.

Розроблена нами методика кінетичного визначення амоксициліну має ряд переваг перед уже відомими: дає можливість визначати їх у значно менших кількостях, ніж фармакопейним методом йодометрії; придатна для того самого інтервалу визначуваних концентрацій, що і за методом фотометрії продуктів гідролізу, але при цьому не вимагає тривалого нагрівання реакційної суміші, простіша за методику хроматографічного методу аналізу та швидша. Вона полягає у попередньому окисненні амоксициліну надлишком калію гідроген-

пероксомоносульфатом до відповідного S-оксиду з подальшим визначенням продукту гідролітичного перетворення його в лужному середовищі кінетичним методом у спектрофотометричному варіанті. Схему перетворень, які призводять до утворення продукту реакції, імовірно, заміщеного похідного N-акрил- β -пеніциламіну сульфінату (IV), наведено нижче на рис. 1.

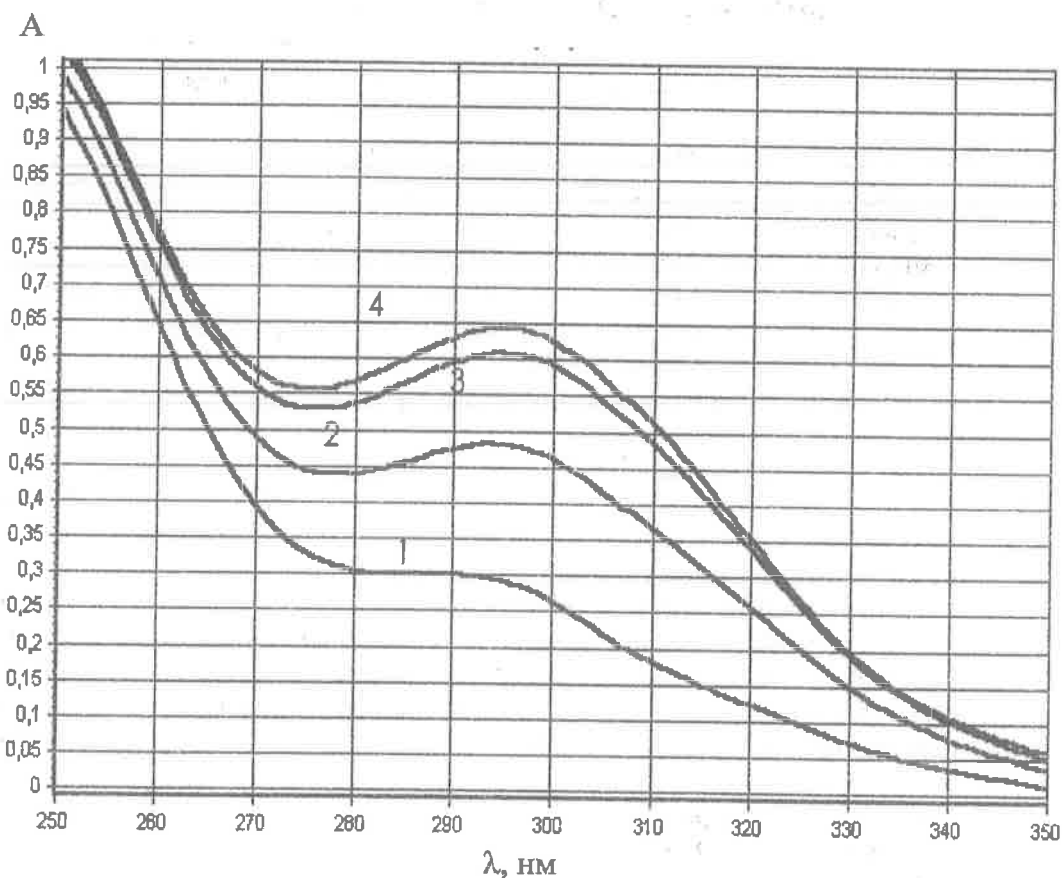


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання продукту реакції лужного гідролізу (1) та пергідролізу амоксициліну тригідрату (2-4) в часі: 1-0-20 хв, 2-5 хв, 3-10 хв, 4-15 хв. $c(\text{NaOH}) = 6,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $c(\text{KHSO}_5) = 2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $c(\text{амокс. т/г}) = 30$ мкг/мл

Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використовували препарат амоксициліну тригідрат (/2S-/ 2 альфа, 5 альфа, 6 бета(S) //-6-// Аміно-(4-гідроксифеніл) ацетил /аміно/-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло /3.2.0/ гептан-2-карбоксилату) в таблетках «ОСПАМОКС», 500 мг активної речовини, серії 158399, виробництва «Сандоз ГмбХ», Австрія, у капсулах «ГРАМОКС-А», 500 мг активної речовини, серії 081109, виробництва «СПЕРКО УКРАЇНА», Київ, Україна, близько 20 г гранулята для виготовлення 60 мл суспензії для вживання всередину складу: в 5 мл суспензії міститься 250 мг амоксициліну тригідрату, серії 050609, виробництва «СПЕРКО УКРАЇНА», Київ, Україна. Як окисник використовували пероксомоносульфатну кислоту у вигляді потрібної калієвої солі ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) кваліфікації «extra pure», який має комерційну назву «Оксон» з вмістом активного кисню $\leq 4,5$ %. Вибір реагента зумовлено його доступністю, хорошою розчинністю і достатньою стійкістю у воді.

Розчин робочого стандартного зразка (РСЗ) амоксициліну тригідрату — 500 мкг/мл. 500 мг РСЗ амоксициліну тригідрату розчиняли у 2,0 мл диметилформаміду (ДФМ) та доводили дистильованою водою у 100 мл мірній колбі до позначки при температурі 20 °С.

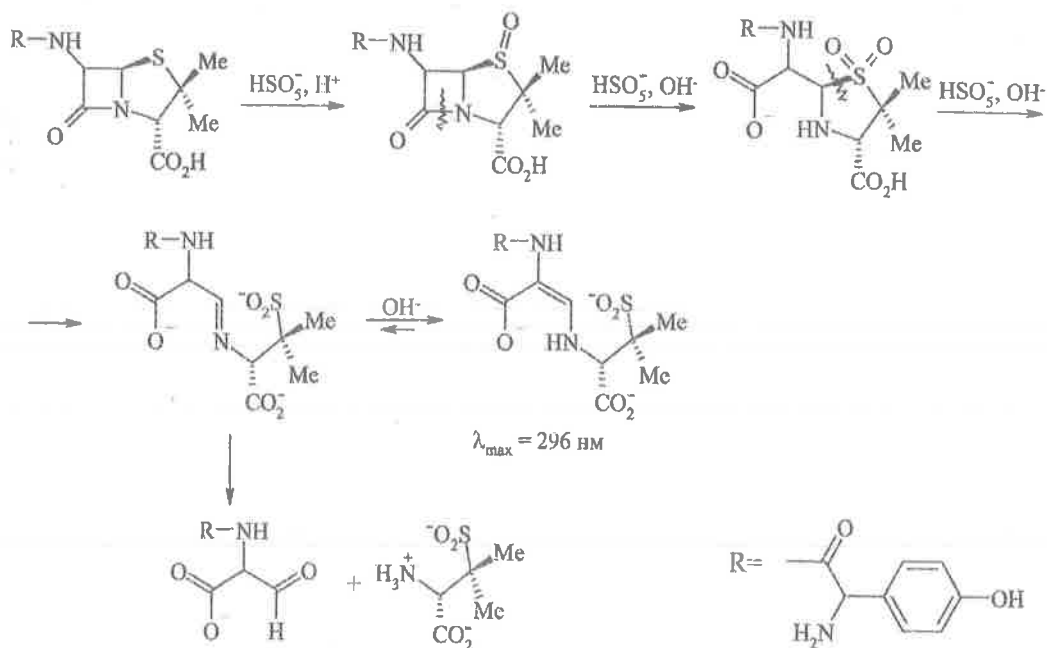
Виготовлення РСЗ калію гідрогенпероксомоносульфату, $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Наважку 0,615 г «Оксону» розчиняли у 100,0 мл двічі дистильованої води при температурі 20 °С. Концентрацію розчину контролювали методом йодометричного титрування, для чого відбирали за допомогою піпетки 10 мл одержаного розчину, переносили в мірну колбу місткістю 100 мл та доводили об'єм до позначки. Відбирали 10,0 мл розчину за допомогою піпетки та переносили у конічну колбу місткістю 75 мл, додавали 1 мл 0,1 моль/л сульфатної кислоти та 1 мл 5 % КІ при перемішуванні. Одразу вивільнений йод відтитровували 0,02 моль/л розчином натрію тіосульфату, вимірюючи об'єм за допомогою напівмікробюретки місткістю 10 мл з точністю до $\pm 0,01$ мл. Як РСЗ амоксициліну тригідрату використовували субстанцію амоксициліну тригідрату фармакопейної чистоти з точно відомим вмістом основної речовини. Електронні спектри реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО); кінетику вивчали за світлопоглинанням утвореного продукту реакції при 296 нм. Для вимірювання оптичної густини розчинів використовували кювету з товщиною поглинального шару $l=1$ см; розчини перед зливанням термостатували у термостаті UTU-2 («Zeamit», «Horizont Krakow-Poland»), час фіксували секундоміром з моменту змішування розчинів. Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду, який не містив карбонатів. Обробку результатів здійснювали методом «тангенсів» (диференціальний варіант). Швидкість оцінювали за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої A — час ($\text{tg}\alpha_{\text{анг}}$, у хв^{-1}).

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті дослідження з'ясовано, що порядок змішування розчинів суттєво впливає на кінетику та вихід продукту реакції. Найвища швидкість накопичення продукту спостерігалась лише після попереднього змішування розчину зразка досліджуваного амоксициліну з калію гідрогенпероксомоносульфатом, а відтак — розчином лугу. Максимальна активність калію гідрогенпероксомоносульфату в реакції досягалась при його концентрації $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Встановлено, що оптимальна концентрація лугу, при якій спостерігалась найбільша швидкість утворення продукту реакції — $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. За відсутності калію гідрогенпероксомоносульфату в зазначених вище умовах упродовж перших 30 хв (час спостереження) утворення продукту реакції не відбувалось. Такий необхідний надлишок калію гідрогенпероксомоносульфату може бути пояснено його участю у процесі подальшого гідролітичного розщеплення — реакції пергідролізу, утвореного на першій стадії реакції відповідного S-оксиду амоксициліну у сильно лужному середовищі (нуклеофільний каталіз гідролізу β -лактамного та тіазолідинового циклів) (див. схему).

На рис. 1 наведено електронні спектри світлопоглинання продукту реакції лужного гідролізу (1) та пергідролізу амоксициліну тригідрату (2–4) впродовж реакції. Як видно, максимальне поглинання новоутвореного продукту спостерігається при 296 нм. Тому саме цю довжину хвилі було обрано для дослідження кінетики реакції як аналітичну. Швидкість реакції оцінювали за тангенсом кута нахилу початкової ділянки кінетичних кривих, побудованих у координатах світлопоглинання A від часу.

Схема спряжених реакцій пероксикислотного окиснення та пергідролізу амоксициліну тригідрату з утворенням заміщеного похідного *N*-акрил- β -пеніциламіну сульфінату (IV)



На рис. 2 наведено градувальний графік кількісного визначення амоксициліну. Він свідчить, що в межах від 5 до 50 мкг/мл концентраційна залежність величини $tg\alpha$, яка пропорційна швидкості реакції, зберігає лінійний характер. Цей факт дає змогу здійснювати визначення амоксициліну опрацьованим методом у зазначеному інтервалі концентрацій методом стандарту.

Побудова градувального графіка. У мірні колби місткістю 50 мл за допомогою мікробюретки послідовно відміряють 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,50 мл РСР амоксициліну, додають в кожену по 5 мл $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину калію гідрогенпероксидомоносульфату, ретельно збовтують та витримують одну хвилину. Потім у кожену колбу послідовно доливають по 5,0 мл 0,06 моль/л розчину натрію гідроксиду, доводять об'єм до позначки дистильованою водою і ретельно перемішують. Після додавання розчину лугу вмикають секундомір і

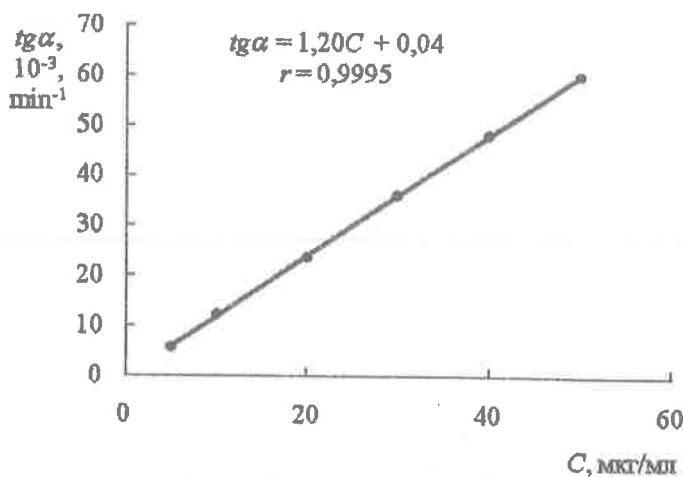


Рис. 2. Градувальний графік кількісного визначення амоксициліну т/г $c(\text{KHSO}_5) = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $c(\text{NaOH}) = 1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л

починають відлік часу. Одержані розчини фотометрують у кварцовій кюветі завтовшки 1 см при 296 нм проти дистильованої води (компенсаційний розчин) упродовж 10 хв щохвилини при температурі 20 °С і будують кінетичні криві залежності оптичної густини від часу. Заданими нахилу лінійних ділянок кінетичних кривих будують градувальну залежність $tg\alpha$ від концентрації амоксициліну (C, мкг/мл).

Таблиця

Результати кінетичного визначення амоксициліну за реакцією з пероксомоносульфатною кислотою ($P=0,95, n=5$)

Узято амоксициліну, мг	Знайдено		Метрологічні характеристики
	мг	%	
<i>Оспамокс</i> -- таблетки по 500 мг амоксициліну «Сандоз ГмБХ», Австрія			
492,0*(серія 158399)	486,7	97,3	$\bar{x} = 493$ (99%) $S = \pm 5,5$ $S_x = \pm 2,5$ $\Delta \bar{x} = \pm 6,8$ $S_r = \pm 1,1\%$ $\varepsilon = \pm 1,4\%$ $\delta = + 0,1\%$
	488,2	97,6	
	492,05	98,4	
	497,0	99,4	
	499,5	99,9	
<i>Грамокс-Д</i> – порошок для приготування суспензії «Сперко Україна» Вінниця, Україна (у 5 мл суспензії міститься 250 мг амоксициліну)			
250,8*(серія 050609)	243,6	97,4	$\bar{x} = 247$ (99%) $S = \pm 3,1$ $S_x = \pm 1,4$ $\Delta \bar{x} = \pm 3,8$ $S_r = \pm 1,25\%$ $\varepsilon = \pm 1,55\%$ $\delta = -1,3\%$
	248,6	99,4	
	250,6	100,2	
	249,5	99,8	
	244,6	97,8	
<i>Грамокс-А</i> – капсули по 500 мг амоксициліну «Сперко Україна» Вінниця, Україна			
496,0*(серія 081109)	491,8	99,15	$\bar{x} = 497$ (99%) $S = \pm 9,9$ $S_x = \pm 3,8$ $\Delta \bar{x} = \pm 9,2$ $S_r = \pm 2,0\%$ $\varepsilon = 1,85\%$ $\delta = +0,1\%$
	479,8	96,7	
	501,6	101,1	
	499,8	100,8	
	512,5	103,3	
	497,2	100,2	
496,6	100,1		

Примітка. * Вміст амоксициліну, вказаний у сертифікаті якості

З наведених у таблиці результатів видно, що кількісне визначення амоксициліну тригідрату можливе в різних лікарських формах опрацьованим методом із задовільною точністю: $RSD \leq 2,0\%$, $\delta = (+0,1...-1,3)\%$.

Методика кількісного визначення амоксициліну в капсулах. Близько 500 мг (точна наважка) препарату переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 2 мл ДМФА, доводять об'єм розчину до позначки дистильованою водою і перемішують. 3,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу місткістю 50 мл і далі виконують аналіз, як при побудові градуовального графіка. Отриманий розчин фотометрують у кюветі завтовшки 1 см при 296 нм, використовуючи дистильовану воду як компенсаційний розчин, щохвилини протягом 15 хв та будують кінетичну криву залежності світлопоглинання розчину від часу. Визначають тангенс кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої, $tg\alpha$.

Методика кількісного визначення амоксициліну в таблетках. Близько 671 мг препарату (розтерті таблетки) переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 2 мл ДМФА, доводять об'єм розчину до позначки дистильованою водою та перемішують. Фільтрують. Відбирають за допомогою мікробюретки 10,00 мл розчину і доводять до позначки у 100 мл мірній колбі. Далі виконують аналіз аналогічно методиці кількісного визначення амоксициліну в капсулах.

Методика кількісного визначення амоксициліну в суспензії. Перевертають флакон, щоб порошок відокремився від дна. Додають дистильовану воду до першої

позначки флакона та ретельно збовтують. Потім додають дистильовану воду до другої позначки і знову ретельно збовтують до утворення однорідної суспензії. 60 мл суспензії містить 250 мг амоксициліну. Відбирають за допомогою піпетки 10 мл суспензії у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять дистильованою водою до позначки. Одержаний розчин після перемішування розбавляють точно у 10 разів. Далі виконують аналіз аналогічно методиці кількісного визначення амоксициліну в капсулах. Вміст $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, у мг, ($x_{\text{амокс}}$) розраховують за формулою:

$$x_{\text{амокс}} = \frac{a_{\text{ст}} \cdot \text{tg}\alpha \cdot w \cdot 0,8713 \cdot \bar{a}}{a \cdot \text{tg}\alpha_{\text{ст}}},$$

де: $a_{\text{ст}}$ — маса наважки РСЗ амоксициліну тригідрату, мг;

$\text{tg}\alpha_{\text{ст}}$ — тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з досліджуваним розчином амоксициліну тригідрату, хв^{-1} ;

w — масова частка основної речовини у РСЗ амоксициліну тригідрату;

a — маса наважки випробуваного препарату амоксициліну тригідрату, мг;

\bar{a} — середня маса препарату у капсулі, таблетці чи флаконі, мг;

$\text{tg}\alpha$ — тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з досліджуваним розчином амоксициліну тригідрату, хв^{-1} ;

0,8713 — коефіцієнт перерахунку амоксициліну тригідрату у безводний амоксицилін.

Висновки

1. Вивчено кінетику спряжених реакцій S-окиснення та пергідролізу амоксициліну за наявності калію гідрогенпероксомоносульфату у водному середовищі.

2. З'ясовано умови, розроблено методику та показано можливість здійснення кількісного визначення амоксициліну кінетичним методом за світлопоглинанням продукту реакції пергідролізу з калієвою сіллю кислоти Каро. $RSD \leq 2,00\%$. Результати, одержані за новоопрацьованою та стандартною фармакопейною методиками, добре узгоджуються між собою $\delta = (+0,1...-1,3)\%$.

1. Алексеев В.Г., Лашин С.В. // Вопр. биолог., мед. и фармац. химии. — 2007. — № 1. — С. 27–30.
2. Алексеев В.Г., Ромашова О.А. // Вестник ТвГУ. — 2007 — № 2. Сер. хим. Вып. 4. — С. 157–161.
3. Ахмад А., Рахман Н., Ислам Ф. // Журн. аналит. химии. — 2004. — Т. 59, № 2. — С. 138–142.
4. Блажеєвський М.Є. // Укр. хим. журн. — 2005. — Т. 71, № 10. — С. 90–93.
5. Блажеєвський М.Є. // Фармац. журн. — 2003. — № 5. — С. 66–78.
6. Демская Е.В., Алексеев В.Г. // Вестник ТвГУ. — 2005. — № 2. Сер. хим. Вып. 8. — С. 177–179.
7. Зайцева К.В., Алексеев В.Г. // Там же. — 2007. — № 2. Сер. хим. Вып. 3. — С. 112–115.
8. Коржова А. // Вопр. химии и хим. технол. — 2004. — № 2. — С. 12–13, 218, 224, 230.
9. Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И. // Журн. аналит. химии. — 2004. — Т. 59, № 9. — С. 971–975.
10. Туркевич М., Владзімірська О., Лесик Р. Фармацевтична хімія (стероїдні гормони, їх синтетичні замінники і гетероциклічні сполуки як лікарські засоби). — 2003. Підручник. — Вінниця: Нова книга, 2003. — 464 с. 10. Al-Momani I.F. // Anal.Lett. — 2004. — Vol. 37, № 10. — P. 2099–2110.
11. Chico J., Rubies A., Centrich F. et al. // J. Chromatogr. — 2008. — Vol. 1213, № 2. — P. 189–199.
12. De Baere S., Cherlet M., Baert K. et al. // Anal. Chem. — 2002. — Vol. 74, № 6. — P. 1393–1401.
13. European Pharmacopoeia. — 4th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2001. — P. 32.
14. Ferreira J., Straathof A., Li X. et al. // Ind. and Eng. Chem. Res. — 2006. — Vol. 45, № 20. — P. 6740–6744.

15. Horimoto S., Mayumi T., Aoe K. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 30, № 4. — P. 1093–1102.
16. Huang Cheng Zhi, Feng Ping, Li Yuan Fang // Anal. and Bioanal. Chem. — 2005. — Vol. 382, № 1. — P. 85–90.
17. Nagaralli B., Seetharamappa J., Melwanki M. // J. Pharm. and Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 29, № 5. — P. 859–864.
18. Nozal L., Arce L., Rhos A. // Anal. Chim. Acta. — 2004. — Vol. 523, № 1. — P. 21–28.
19. Rodante F., Vecchio S., Tomassetti M. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 29, № 8. — P. 613–614.
20. Wibawa J., Fowkes D., Shaw P. et al. // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 774, № 2. — P. 141–148.
21. Yoon K., Lee S., Kim W. et al. // J. Chromatogr. B. — 2004. — Vol. 813, № 1–2. — P. 121–127.
22. Zeng J., Tao F. // Chin. J. Appl. Chem. — 2005. — Vol. 22, № 6. — P. 195–199.

Надійшла до редакції 04.06.2010.

Н.Е.Блажеевский, С.П.Карпова

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМОКСИЦИЛЛИНА ТРИГИДРАТА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ключевые слова: кинетический метод анализа, амоксициллин, калий гидропероксомоносульфат

Изучена кинетика сопряженных реакций S-окисирования и пергидролиза амоксициллина тригидрата с калия пероксомоносульфатом в щелочной среде по светопоглощению образующегося продукта при 296 нм. Оптимизированы условия и разработана методика количественного определения амоксициллина в капсулах, таблетках, суспензии спектрофотометрически-кинетическим методом с использованием в качестве реагента раствора тройной калиевой соли кислоты Каро («Оксон»). RSD ≤ 2,00 %. Результаты анализа препарата, полученные с помощью разработанной и стандартной фармакопейной методики, хорошо согласуются между собой $\delta = (+0,1...-1,3) \%$.

М.Ye.Blazheevskiy, S.P.Karpova

QUANTITATIVE ANALYSIS AMOXICILLINE TRIHYDRATE IN PHARMACEUTICAL PREPARATION BY THE KINETIC METHOD

Key words: spectrophotometry, amoxicilline, peroxomonosulfate acid

SUMMARY

The kinetic of coupled reactions of S-oxidation and perhydrolysis of amoxicilline with potassium peroxomonosulfate in alkaline medium is studied by light absorbance increase of a forming product at 296 nm. The procedure of the quantitative analysis of amoxicilline in capsules, pills and suspension by spectrophotometric-kinetic method is elaborated with using triple potassium Caro's salt solution («Oxone») as a reagent. RSD ≤ 2,00 %. The results of analysis by the method developed and standard pharmacopoeic techniques have been conformed well $\delta = (+0,1...-1,3) \%$.