

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 543.422.3:[547.541.521+547.565]

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

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
кафедра аналітичної хімії

²Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок

АНАЛІЗ КОМБІНОВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ВМІСТ СУЛЬФАНІЛАМІДІВ

© Бойко М.Я., Врублевська Т.Я., Коркуна О.Я., Тесляр Г.Ю., 2011

Розроблена авторами методика кількісного визначення сульфаніламідів у комбінованих лікарських засобах ґрунтується на одержанні кольорового продукту азосполучення діазотованого сульфаніламіду з кислотним моноазобарвником тропеоліном О. Встановлено, що визначенню вмісту сульфаніламідів у комбінованих протимікробних лікарських засобах не заважають допоміжні речовини та інша діюча речовина триметоприм. Одержані, за допомогою розробленої методики, результати добре узгоджуються з результатами, одержаними арбітражним методом високоефективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: сульфаніламіди, тропеолін О, спектрофотометрія, комбіновані лікарські засоби.

The method of sulphanilamides spectrophotometric determination in codrugs is based on the obtaining of coloured product of azocoupling the diazotized sulphanilamides with acid monoazo dye Tropaeolin O. It was established, that active substance trimethoprim as well as excipients did not interfere on sulphanilamides determination in the antimicrobial codrugs. The results correlate well with the ones, obtained with the reference HPLC method.

Key words: sulphanilamides, tropaeolin O, spectrophotometry, codrugs.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Сульфаніламіди (СА), точніше їхні лікарські форми, були першими ефективними хіміотерапевтичними засобами, які стали системно використовувати в медичній практиці для боротьби з бактеріальними інфекціями. З появою інших бактеріостатиків, що за структурою належать до різних хімічних груп, виникла можливість використовувати комбінації цих антибактеріальних діючих речовин з СА, що значно розширило фармакологічний арсенал медиків та ветеринарних лікарів. Одним з найвдаліших виявилось поєднанням СА з триметопримом (ТМП). Комбінація двох бактеріостатиків, сульфаніламід–триметоприм (СА-ТМП), характеризується бактерицидним ефектом та широким спектром антибактерійної дії, зокрема мікрофлору, стійку до багатьох антибіотиків та звичайних СА. Цей комбінований препарат дуже швидко набув широкого застосування [1, 2]. До того ж виникла проблема контролю вмісту кожної діючої речовини цього комбінованого лікарського засобу (КЛЗ) в присутності іншої та їхніх залишків у біологічних об'єктах.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Визначання СА в СА-ТМП класичним фармакопейним методом нітритометричного титрування без попереднього виділення та очищення цього СА – неможливе, оскільки друга діюча речовина – ТМП, містить первинні ароматичні аміногрупи, які в

умовах титрування також діазотуються нітритом. З часом були розроблені численні хроматографічні методики визначення обох діючих речовин, які є довготривалішими і вимагають використання дорогого обладнання та реактивів, а також висококваліфікованих виконавців [3–6].

Пряме визначення СА в присутності ТМП (похідне піримідину) і ТМП в присутності СА, за їх власним поглинанням світла в УФ-ділянці спектра, є доволі непростим завданням, оскільки максимумами поглинання цих сполук перекриваються. В останнє десятиліття з'явилися повідомлення про застосування методу диференційної спектрофотометрії для розв'язання такої задачі [7–12]. Проте, одержані цим методом результати вимагають складного математичного оброблення, і мають обмеження під час аналізу багатокомпонентних зразків.

Згідно з Британською Фармакопеею в аналізі таких комбінованих препаратів застосовують попереднє розділення компонентів, зокрема проводять екстракцію ТМП хлороформом, залишаючи СА у водній фазі, з подальшим вимірюванням поглинання світла як водної, так і органічної фаз в УФ-області спектра [13].

Для визначення СА в присутності триметоприму використовують також взаємодію СА з деякими органічними реагентами, зокрема, з барвниками алізарином та хіналізарином. Методика є малоконтрастною та не дуже чутливою [14]. Використання ж, як реагента, 2-нафтолу полягає у попередньому діазотуванні СА та утворенні з діазосіллю кольорового продукту азосполучення, однак згідно з цією методикою треба усувати надлишок нітриту сульфаміновою кислотою та використовувати водно-етанольне середовище [15].

Мета роботи. Апробація розробленої методики визначення СА, яка ґрунтується на азосполученні діазотованого сульфаніламідів з кислотним моноазобарвником тропеоліном О з утворенням дисазобарвника з максимумом поглинання світла за довжини хвилі $\lambda_{\max} = 590\text{--}600$ нм [16, 17], під час аналізу різних лікарських форм КЛЗ, що містять СА та ТМП у різних співвідношеннях.

Матеріали та методи дослідження. У роботі використовували стандартні розчини сульфаметоксазолу (3-(*n*-амінобензенсульфонамідо)-5-метилоксазол), сульфадіазину (2-(*n*-амінобензенсульфонамідо)-піримідин), сульфадиметоксину (6-(*n*-амінобензенсульфонамідо)-2,4-диметоксипіримідин), сульфаметазину (2-(*n*-амінобензенсульфонамідо)-4-метилпіримідин), які готували розчиненням субстанцій фірми «Sigma» (вміст основної речовини не менше 99 %) у 0,1М розчині натрій гідроксиду (табл. 1). Усі розчини зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці. Також у роботі використовували субстанції триметоприму (5-(3,4,5- триметоксибензил) піримідин- 2,4- діамін) та допоміжні речовини (крохмаль, сахароза, целюлоза, лактоза, глюкоза, желатин, тальк, аеросил, Са стеарат, Mg стеарат, повідон, пропіленгліколь, бензиловий спирт, полісорбат, Na SDS, гліцерин, метилпарабен, пропілпарабен (вміст основної речовини не менше 99 %)) для приготування сумішей із сульфаніламидами під час дослідження вибірковості взаємодії.

Як реагент використовували розчин кислотного моноазобарвника – тропеоліну О (табл. 1), який готували розчиненням точної наважки реактиву фірми «Merck» (вміст основної речовини не менше ніж 88 %, решта – гігроскопічна вода та неорганічні солі (NaCl, KCl, Na₂SO₄, K₂SO₄)) у дистильованій воді.

Розчин натрій нітриту та натрій тетраборату готували розчиненням точної наважки реактиву кваліфікації «ч.д.а.» у дистильованій воді.

Робочі розчини хлоридної кислоти готували розбавленням концентрованої кислоти кваліфікації “х.ч.”, а розчини натрій гідроксиду готували розчиненням реактиву кваліфікації “х.ч.” у дистильованій воді.

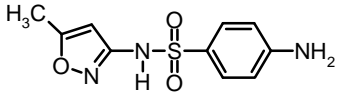
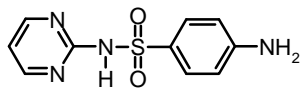
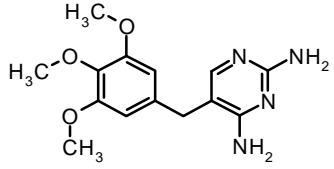
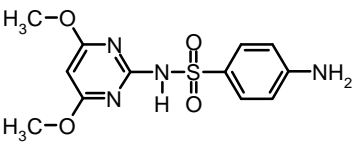
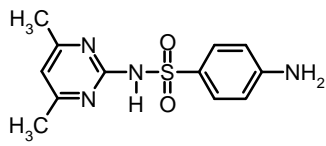
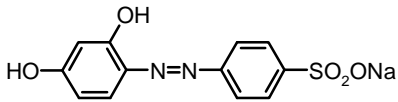
Спектрофотометричні вимірювання проводили на скануючому спектрофотометрі CARY.WIN – UV-VIS-50 (Varian, США) в кюветах з товщиною поглинаючого шару $l=1$ см. Величину рН вимірювали рН-метром РВ 11 (Sartorius, Німеччина) з аргентум хлоридним електродом порівняння. Необхідне значення кислотності середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти та натрій гідроксиду.

Оптимальні умови одержання кольорового продукту азосполучення діазосолі сульфаніламідів з азобарвником Тр О – дисазобарвника ($\lambda_{\max} = 595$ нм $\epsilon_{595} \sim 10^4$ М⁻¹ · см⁻¹) досягаються під час діазотування сульфаніламідів у середовищі 0,5 – 1,0 М хлоридної кислоти під дією ~ 10-кратного надлишку натрій

нітриту впродовж 20 хв при 20°C та азосполученні у середовищі 0,01 М натрій тетраборату при рН 10 – 11 під дією 1,5-кратного надлишку Тр О. Мінімальна визначувана концентрація сульфаніламідів за методикою з ТрО для сульфаметоксазолу становить 0,368 мкг/мл, для сульфадіазину – 0,379 мкг/мл, для сульфаметазину – 0,410 мкг/мл, для сульфадиметоксину – 0,400 мкг/мл, до того ж лінійність зберігається в межах 1,5 порядки визначуваних концентрацій [16, 17].

Таблиця 1

Структурні формули реагентів

<p>Сульфаметоксазол CAS 723-46-6</p> 	<p>Сульфадіазин CAS 68-35-9</p> 	<p>Триметоприм CAS 738-70-5</p> 
<p>Сульфадиметоксин CAS 122-11-2</p> 	<p>Сульфаметазин CAS 57-68-1</p> 	<p>Тропеолін О CAS № 547-57-9, С.І. 14270</p> 

Пробопідготовка таблеток для визначення сульфаніламідів у КЛЗ

У фарфоровій ступці розтирають двадцять таблеток до порошку, відбирають наважку, яка містить 100 мг сульфаніламіду згідно з номінальним вмістом у препараті, вносять до мірної колби номінальним об'ємом 100 мл, додають 50 мл 0,1 М натрій гідроксиду для одержання витяжки сульфаніламідів, перемішують впродовж 10 хв. та доводять вміст колби до мітки тим самим розчинником. Одержану суміш перемішують і фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості у конічну колбу (вихідний розчин). Робочий розчин сульфаніламідів готують розбавленням вихідного розчину в 10 разів, для чого 5 мл одержаного розчину вносять у мірну колбу місткістю 50 мл доводять об'єм розчину 0,1М розчином хлоридної кислоти до мітки і перемішують. Робочий розчин містить номінально 100 мкг/мл сульфаніламіду. Для аналізу відбирають аліквоту розчину 1 мл. Визначення вмісту сульфаніламіду проводять відповідно до методики його визначення з Тр О.

Пробопідготовка суспензії для визначення сульфаніламідів у КЛЗ

Аліквоту суспензії, яка теоретично містить 100 мг СА, вносять до мірної колби номінальним об'ємом 100 мл, доводять вміст колби 0,1М розчином натрій гідроксиду до мітки та перемішують. Робочий розчин СА готують розбавленням одержаного розчину в 10 разів, як у разі таблеток.

Пробопідготовка розчинів КЛЗ для орального застосування для визначення СА

Аліквоту розчину препарату, яка теоретично містить 100 мг СА, вносять до мірної колби номінальним об'ємом 100 мл, доводять вміст колби 0,1М розчином натрій гідроксиду до мітки та перемішують. Робочий розчин СА готують розбавленням одержаного розчину в 10 разів, як у разі таблеток.

Приготування робочих стандартних розчинів сульфаніламідів

100 мг субстанції СА (точна наважка) вносять до мірної колби номінальним об'ємом 100 мл, розчиняють у 50 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду доводять об'єм розчину 0,1М розчином натрій гідроксиду до мітки. Робочий розчин СА готують розбавленням одержаного розчину в 10 разів тим самим розчинником. Одержаний розчин містить номінально 100 мкг/мл СА. Для аналізу відбирають аліквоту розчину 1 мл.

Методика визначення СА з використанням тропеоліну О

До мірної колби ємністю 25 мл вносять 5,0 мл 0,5М хлоридної кислоти, аліквоту досліджуваного розчину 1 мл (кінцева концентрація СА в межах 0,4–10,0 мкг/мл), додають 0,5 мл $1,25 \cdot 10^{-2}$ М розчину натрій нітриту. Після перемішування суміш витримують впродовж 20 хв за кімнатної температури, додають 1,0 мл $1,25 \cdot 10^{-3}$ М розчину тропеоліну О, 2,5 мл 0,1М розчину натрій тетраборату та нейтралізують розчином натрій гідроксиду (2,5 мл 1М NaOH) і доводять рН до значення 10,5. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять при $\lambda=595$ нм, $l=1$ см. Концентрацію СА знаходять способом порівняння.

Результати досліджень та їх обговорення. Вибрані нами для аналізу КЛЗ, що містять іншу діючу речовину – ТМП, випускають у формі таблеток, суспензій та розчинів для орального застосування. Для одержання зазначених лікарських форм використовують допоміжні речовини – наповнювачі, консерванти, стабілізатори, що, як правило, не впливають на визначення вмісту діючих речовин. Були проведені дослідження з впливу триметоприму та допоміжних речовин, які входили до складу вибраних нами для аналізу КЛЗ, на кількісне визначення СА. Більше того була перевірена селективність розробленого методу для сумішей, які містили допоміжні речовини у кількостях, що значно перевищували можливий їх вміст у КЛЗ. Критерієм селективності визначення ми обрали незмінність величини світлопоглинання розчинів утворюваних дисазобарвників СА–Тр О у межах 5%. Результати досліджень наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначення СА за наявності в досліджуваній пробі різних кількостей допоміжних речовин (n=5, P=0,95)

Допоміжна речовина (ДР)	m(СА) : m(ДР)*	m(СА) : m(ДР)**	Знайдений вміст СА, %, $\bar{x} \pm S \cdot t_a / \sqrt{n}$
Триметоприм	1:0,2	1:50	99,8±1,1
Крохмаль	1:0,1	1:25	101,8±1,5
Сахароза	1:1	1:250	101,9±1,7
Целюлоза	1:0,1	1:25	99,1±1,6
Лактоза	1:1	1:250	100,5±1,4
Глюкоза	1:1	1:125	99,0±2,1
Желатин	1:0,1	1:10	98,8±1,5
Тальк	1:0,03	1:50	99,2±1,2
Аеросил	1:0,1	1:5	95,3±2,1
Са стеарат	1:0,01	1:1	95,4±1,9
Mg стеарат	1:0,01	1:2	98,1±2,2
Повідон	1:0,1	1:10	97,4±2,2
Пропіленгліколь	1:0,025	1:5	98,6±1,8
Бензиловий спирт	1:0,01	1:10	95,5±2,2
Полісорбат	1:0,01	1:1	96,3±2,3
Na SDS	1:0,1	1:10	97,6±2,1
Гліцерин	1:0,1	1:5	95,0±2,5
Метилпарабен	1:0,005	1:25	96,7±2,3
Пропілпарабен	1:0,001	1:30	97,5±1,5
Крейда	1:1,5	1:25	97,7±1,8

*Масові співвідношення СА та допоміжних речовин у досліджуваних ліках [18].

**Максимальні масові співвідношення СА та допоміжних речовин досліджені нами.

***C(СА) = 4 мкг/мл.

Результати наведені в табл. 2 свідчать, що ТМП та допоміжні речовини не впливають на спектрофотометричне визначення СА.

Як видно з табл. 3, результати, одержані за допомогою розробленої методики з використанням тропеоліну О, добре відтворюються, характеризуються низьким відносним стандартним відхиленням ($S_r = 0,023-0,035$) та добре корелюють з результатами, одержаними за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.

Таблиця 3

Результати кількісного визначення сульфаніламідів у різних лікарських формах КЛЗ (n=5, P=0,95)

Визначуваний сульфаніламід (регламентований вміст у препараті)	Встановлений вміст		S_r (СА з Тр О)
	Хроматографічно згідно USP[4]	Спектрофотометрично з Тр О [16, 17]	
1. «Трисульффон» суспензія для о/з «КРКА» Словенія (триметоприм (80 мг/мл), допоміжні речовини – целюлоза, полісорбат, етилбензоат, метилпарабен, пропілпарабен)			
Сульфаметоксазол (400,0±40,0)	425,0±15,9	414,0±20,3	0,035
2. «Триметофарм розчин» «Pharmavet» Сирія (триметоприм (32 мг/мл), допоміжні речовини – бензиловий спирт, пропіленгліколь)			
Сульфадіазин (160,0±16,0)	152,7±6,7	152,2±7,0	0,032
3. «Тримератинвет» таблетки «Ветсинтез» м. Харків (триметоприм (80 мг), допоміжні речовини – крохмаль, тальк, Са стеарат)			
Сульфадимезин (400,0±40,0)	394,2±11,8	389,9±17,4	0,028
4. «Бі-септ-Фармак» таблетки «Фармак» м. Київ (триметоприм (80 мг), допоміжні речовини – лактоза, Na SDS, повідон, аеросил, Mg стеарат)			
Сульфаметоксазол (400,0±40,0)	401,4±12,3	402,6±13,1	0,023
5. «Тримероксин» таблетки «O.L.KAR-АгроЗоовет-Севіс» Угорщина (триметоприм (50 мг), допоміжні речовини – глюкоза, крейда, крохмаль, тальк, Mg стеарат)			
Сульфадиметоксин (250,0±25,0)	248,3±9,4	246,9±12,1	0,031

Отже, як показали одержані результати, спектрофотометричну методику визначення сульфаніламідів за допомогою кислотного моноазобарвника тропеоліну О можна успішно використовувати для їх визначення у комбінованих лікарських формах, що містять триметоприм та різні допоміжні речовини. Вона вирізняється простотою, відтворюваністю та експресністю.

1. Овчинников Ю.А. Биорганическая химия / Ю.А. Овчинников – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
2. Аляутдина Р.А. Фармакологія / Под ред. Р.А. Аляутдина. – 3-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 592 с.
3. Mengelers M. J. Determination of sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, trimethoprim and their main metabolites in porcine plasma by column switching HPLC / M.J. Mengelers, M.B. Oorsprong, H.A. Kuiper, M.M. Aerts, E.R. van Gogh, A.S. van Miert // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1989. – Vol. 7, № 12. – С. 1765–1776.
4. United States Pharmacopoeia, USP Convention Inc., Rockville, MD XXVI, 2006.
5. Croubels S. Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in animal feed by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection / S. Croubels, P. Wassink, P. De Backer, S. Croubels // Analytica Chimica Acta. – 2002. – Vol. 473, № 1–2. – С. 183–194.
6. Gochin R. The simultaneous determination of trimethoprim, sulphamethoxazole and N4-acetyl-sulphamethoxazole in biological fluids by high pressure liquid chromatography / R. Gochin, I. Kanfer, J.M. Haigh // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1981. – Vol. 223, № 1. – P. 139–145.
7. Lopez-Martinez L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxy-pyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. / L. Lopez-Martinez, P.L. Lopez-de-Alba, L.M. De-Leon-

Rodrigues, M.L. Yopez Murrieta // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 20, № 30. – P. 77–85. 8. Zhou T. Nonlinear partial squares method for simultaneous derivative spectrophotometric determination of two components in compound sulfamethoxazole / T. Zhou, J.Y. Zhong, J. Feng // *Spectroscopy and Spectral Anal.* – 2004. – № 24. – P. 616–618. 9. Toral M.I. Spectral Study and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by digital derivative spectrophotometry / M.I. Toral, N. Lara, A.E. Tapai, C. Torres, P. Richter // *Boletin De la Sociedad Chilena De Quimica.* – 2002. – № 47. – P. 241–251. 10. Sun Z.X. Determination of sulfamethoxazole in compound sulfamethoxazole tablet by first derivative ratio spectrometry / Z.X. Sun, R.Z. Li, Y.M. Li, K.X. Wang, Q.F. Zhang, J.Y. Zhou // *Spectroscopy and Spectral Anal.* – 2001. – № 21. – P. 713–715. 11. Geng X. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in tablets with robust regression by spectrophotometry / X. Geng, J.H. Li, L.R. Gao, X.H. Zhu // *Chinese J. Anal. Chem.* – 2001. – № 29. – P. 1036–1038. 12. Granero G. Second derivative spectrophotometric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in the presence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD) / G. Granero, C. Garnero, M. Longhi // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – № 29. – P. 51–59. 13. The British Pharmacopoeia (BP) / Intern. Ed. London: H.M. Stationary Office, 2006. 14. Issa Y.M. Spectrophotometric microdetermination of sulfamethoxazole and trimethoprim using alizarin and quinalizarin / Y.M. Issa, A.S. Amin // *Anal.Lett.* – 1994. – 27. – P. 1147–1158. 15. Shamsa F. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Pharmaceuticals by Visible and UV Spectrophotometry / F. Shamsa, L. Amani // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* – 2006. – № 1. – P. 31–36. 16. Бойко М.Я. Використання деяких азобарвників для спектрофотометричного визначення сульфаніламідів: матеріали Всеукр. конф. студ. та асп. [«Хімічні паразитські читання – 2010» (ХКЧ'10)], / М.Я. Бойко, Л.Я. Стоколоса // (Харків, 19–22 квітня 2010 р). / Вид-во ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2010. – С. 58. 17. Бойко М.Я. Спектрофотометрія сульфаніламідів з тропеоліном О та 4-(2-піридилазо резорцином): матеріали Наук. конф. присвяченої до 100 річниці з дня народження професора І.В. П'ятницького / М.Я. Бойко, Т.Я. Врублевська, О.Я. Коркуна. – К., 10–13 жовтня 2010. – С. 50. 18. Аванесьянц Э. М. Технология изготовления лекарственных форм / Под ред. Э. М. Аванесьянца. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2002. – 444 с.

УДК 663.12/14

О.В. Швабюк, Л.Я. Паляниця, Н.І. Березовська,
Р.Б. Косів, О.С. Гродзіцька, З.Г. Піх
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології органічних продуктів

СПЕЛЬТА ЯК АЛЬТЕРНАТИВНА СИРОВИНА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ СПИРТОВОЇ БРАЖКИ

© Швабюк О.В., Паляниця Л.Я., Березовська Н.І., Косів Р.Б., Гродзіцька О.С., Піх З.Г., 2011

Для приготування сусел використано альтернативну крохмалевмісну сировину – спельту. Досліджено оптимальні умови для розварювання та зброджування цієї сировини. Одержано результати, схожі із традиційною сировиною – пшеницею.

Ключові слова: спельта, помел зерна, ферментний препарат, сусло, бражка.

For the worts preparation was used alternative material – spelta. Optimal conditions for preparing and fermentation of this material was investigated. The results were similar with traditional material – wheat.

Key words: spelta, milling grain, enzyme preparation, sush, brazhka.

Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими завданнями. В останні роки спиртова галузь України зазнала істотних змін у зв'язку із недостатнім постачанням сировини через природні зміни агрокліматичних умов, перепрофілюванням підприємств на виробництво спирту технічного призначення [1].

Сьогодні як сировину використовують пшеницю або жито, які потребують оброблення від шкідників, тому створюють проблеми під час вирощування, оскільки пшениця вибаглива до