

УДК 543.552:615.281.9:[547.789.18+547.869.3+547.873]

ЗАСТОСУВАННЯ АЗОСПОЛУКИ ОКСИТЕТРАЦИКЛІНУ З 1-АМІНО-2-НАФТОЛ-4-СУЛЬФОКИСЛОТОЮ ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО АНАЛІЗУ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ

О. Костів^{1*}, О. Коркуна¹, Л. Янчук¹, М. Смолінська²

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

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та
кормових добавок, вул. Донецька, 11, 79019 Львів, Україна
e-mail: oksana.kostiw@lnu.edu.ua

Розроблено нову спектрофотометричну методику визначення окситетрацикліну з використанням 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти. Методика ґрунтується на азосполученні антибіотика з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислотою із утворенням азосполуки оранжево-червоного кольору ($\epsilon = 3,0 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), електронний спектр світлопоглинання водного розчину якого має широке плече при 450–550 нм з ΔA_{max} при 470 нм. Азосполучення діазосоли 1-аміно-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з окситетрацикліном відбувається у середовищі 10,0 М натрій гідроксиду під дією 2,5-кратного надлишку реагенту до антибіотика. Розроблена методика дає можливість визначити від 12,5 до 198,5 мкг/мл окситетрацикліну за відносної похибки визначення менше 2–3 % і характеризується високою чутливістю $C_n = 15,37 \text{ мкг/мл}$, $C_{\text{min}} = 5,12 \text{ мкг/мл}$. Методику апробовано під час аналізу модельних розчинів та одно- і багатокомпонентних ветеринарних препаратів.

Ключові слова: окситетрациклін, 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислота, азосполучення, спектрофотометрія, ветеринарні препарати, лікарські форми.

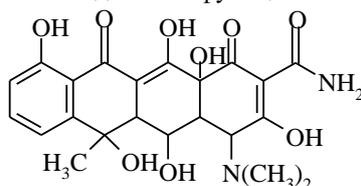
DOI: <https://doi.org/10.30970/vch.6201.156>

1. Вступ

Окситетрациклін (ОТЦ) – природний антибіотик групи тетрациклінів. Проявляє бактеріостатичну дію, активний проти грампозитивних та грамнегативних аеробних мікроорганізмів. Незважаючи на появу антибіотиків нових поколінь, ця група лікарських засобів не втрачає попиту і залишається на фармацевтичному ринку. Антибіотики тетрациклінового ряду, зокрема ОТЦ, особливо 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, у багатьох галузях бродильної промисловості як засоби боротьби із чужорідними мікроорганізмами, у наукових дослідженнях для інгібування певних етапів біохімічних перетворень, у харчовій промисловості під час консервування різних харчових продуктів [1,2]. Близько половини виготовлених антибіотиків використовують у тваринництві. Антибіотики здатні переходити в м'ясо, молоко, яйця птахів, інші продукти та можуть зумовити

токсичну, тератогенну і мутагенну дію на організм людини. Вміст антибіотиків у деяких харчових продуктах, таких як коров'яче молоко, сметана, сир, коливається в межах 10–125 мкг/кг, курячих яйцях – 350–1150 мкг/кг. У той же час гранично допустимі концентрації тетрациклінових антибіотиків у продуктах харчування становлять: м'ясо і птиця – до 500 мкг/кг, молоко коров'яче – до 100 мкг/кг [3, 4].

За хімічною структурою ОТЦ належить до ряду частково гідрованих похідних тетрацену (нафтацену), що містять декілька функціональних груп:



Окситетрациклін – кристалічний, жовтий, гігроскопічний порошок, не має запаху, гіркий на смак, розчинний у воді. ОТЦ виявляє амфотерні властивості: основні властивості зумовлені наявністю диметиламіно групи в положенні 4, а кислотні – фенольного гідроксиду в положенні 10 та енольних груп у положенні 3 і 12. ОТЦ іонізується у всьому діапазоні рН, існує в катіонній формі при рН нижче 3,3, як цвітер-йон між рН 3,3 і 7,7, і аніон при рН вище 7,7.

Хімічна будова антибіотиків тетрациклінового ряду дає змогу використовувати різні за своїми принципами методи їх визначення. Властивості ароматичного ядра, аміно-, гідрокси- і карбонільних груп дали можливість застосувати їх у кількісному хімічному та фізико-хімічному аналізі тетрациклінів. Найпоширенішим методом ідентифікації і кількісного визначення окситетрацикліну є хроматографія [5, 6]. Методи ВЕРХ ширше застосовують при визначенні антибіотиків у харчових продуктах. У визначенні тетрациклінів також використовують люмінесцентні методи [7, 8]. Фармакопейні методики для антибіотиків тетрациклінового ряду ґрунтуються на визначенні їх біологічної активності методом дифузії в агарі з тест-мікробом *Bacillus subtilis* [9]. Основним недоліком цих методів є складність, висока вартість обладнання і реагентів, а також довготривалість аналізу. Спектрофотометрію досить обмежено застосовують у кількісному аналізі антибіотиків тетрациклінового ряду, хоча спектрофотометричні методики зазвичай є простими, недорогими, чутливими та експресними. Як реагенти у спектрофотометричних методиках визначення ОТЦ використовують, головню, неорганічні реагенти, зокрема йони деяких металів: феруму (III) [3], купрум (II) [10]. Органічні речовини використовують як реагенти значно рідше [11, 12], зокрема для реакції азосполучення, у якій ОТЦ є азоскладовою. Тому ми досліджували взаємодію ОТЦ із 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислотою (ДНСК) (табл. 1) з метою отримання ефективної аналітичної форми для спектрофотометричного визначення.

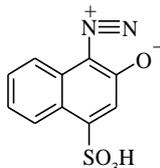
1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислоту добувають діазотуванням 1-аміно-2-нафтол-4-сульфокислоти (АНСК) у присутності йонів феруму (II) (1–30 ммоль FeSO_4 на 1 моль АНСК) для запобігання його окиснення [13]. У літературі є також дані про інші способи синтезу за відсутності мінеральних кислот, однак за наявності солей купрум (II). ДНСК широко використовують як діазоскладову для синтезу багатьох метал-азобарвників, які застосовують у текстильній промисловості. Зокрема, у праці [14] описано синтез азосполуки ДНСК з β -нафтолом та комплексів цієї сполуки із купрумом, кобальтом та хромом з метою застосування для фарбування тканин.

Таблиця 1

Структурна формула та деякі характеристики 1-аміно-2-нафтол-4-сульфоїкислоти

Table 1

Molecular structure and characteristics of 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid

Реагент	Деякі характеристики
1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислота (CAS № 887-76-3) 	Порошок коричневого кольору обмежено розчинний у воді (15,8 г/л), добре розчинний у 96 % сульфатній кислоті. Водні розчини жовто-коричневого кольору рН = 4,4.

2. Матеріали та методика експерименту

Усі водні розчини, які використовували у роботі, готували на дистильованій воді. Розчин окситетрацикліну 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. Робочі розчини зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці не більше тижня.

Вихідний стандартний розчин 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з концентрацією $\sim 10^{-3}$ М готували розчиненням точної наважки реактиву (вміст основної речовини не менше 99 %) фірми Sigma-Aldrich (Польща) в дистильованій воді. Розчини натрій гідроксиду готували розчиненням реактиву кваліфікації "х.ч." у дистильованій воді.

Кислотність середовища контролювали використовуючи рН-метр рН-150 М (РУП "Гомельський завод измерительных приборов", Білорусь) з комбінованим скляним електродом. Значення рН створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти чи натрій гідроксиду з концентраціями 1,0 та 0,1 М.

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

Усі дослідження проводили за кімнатної температури ~ 20 °С.

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 мл, розчиняють вміст у 0,01 М розчині хлоридної кислоти та доводять вміст колби до мітки тим самим 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, поміщають у мірну колбу номінальним об'ємом 25 мл, додають 0,01 М розчин хлоридної кислоти для отримання витяжки окситетрацикліну, струшують впродовж години на механічному струшувачі. Отриману суміш фільтрують крізь складчастий фільтр середньої пористості у конічну колбу, відкидаючи першу порцію розчину 5 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, вводять в мірну колбу ємністю 100 мл, доводять до мітки водою і перемішують (робочий розчин).

Методика спектрофотометричного визначення ОТЦ за власним поглинанням в УФ-ділянці спектра при $\lambda=355$ нм.

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

Методика визначення ОТЦ з 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислотою.

До мірної колби об'ємом 25 мл вводять аліквоту досліджуваного розчину окситетрацикліну в межах 12,5 – 198,5 мкг/мл (кінцева концентрація), додають 5,0 мл 10М розчину натрій гідроксиду та 10 мл $1,875 \times 10^{-3}$ М розчину ДНСК. Розчин доводять до мітки дистильованою водою та перемішують. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно холостого розчину проводять при $\lambda=470$ нм, $l=1$ см. Концентрацію окситетрацикліну знаходять за допомогою градуувального графіка або методом порівняння.

3. Результати досліджень та їх обговорення

Електронні спектри світлопоглинання (ЕСП) розчинів окситетрацикліну за різних рН наведено на рис.1. На ЕСП окситетрацикліну простежуються два максимуми світлопоглинання при 270 та 360 нм. Характер спектрів антибіотика не змінюється за зміни кислотності середовища, однак інтенсивність світлопоглинання на максимумах відрізняється при рН=9 порівняно з рН=2.

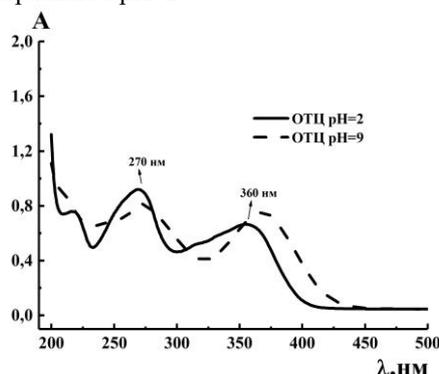


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання розчинів окситетрацикліну за різних рН. $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \times 10^{-5}$ М

Fig. 1. Absorption spectra of oxytetracycline solutions at different pH. $C_{\text{OXT}} = 5.0 \times 10^{-5}$ M

Як бачимо зі спектрів світлопоглинання розчинів (рис. 2 а) між окситетрацикліном та 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислотою, в кислому середовищі немає прямої взаємодії. Однак продукт взаємодії 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислоти з ОТЦ вдалося отримати в середовищі концентрованого лугу (10,0 М NaOH). Про утворення ефективної аналітичної форми визначення окситетрацикліну (рис. 2 б) свідчить поява на спектрі продукту азосполучення ДНСК з ОТЦ широкого плеча

світлопоглинання з максимальним значенням оптичної густини при $\lambda=470$ нм. Імовірно, поява плеча на спектрі абсорбції продукту взаємодії пов'язана із поглинанням новоутвореної азогрупи (внаслідок електронного переходу $n \rightarrow \pi^*$), що характерно для молекул із площинним розміщенням спряженої системи хромофорів [15, 16].

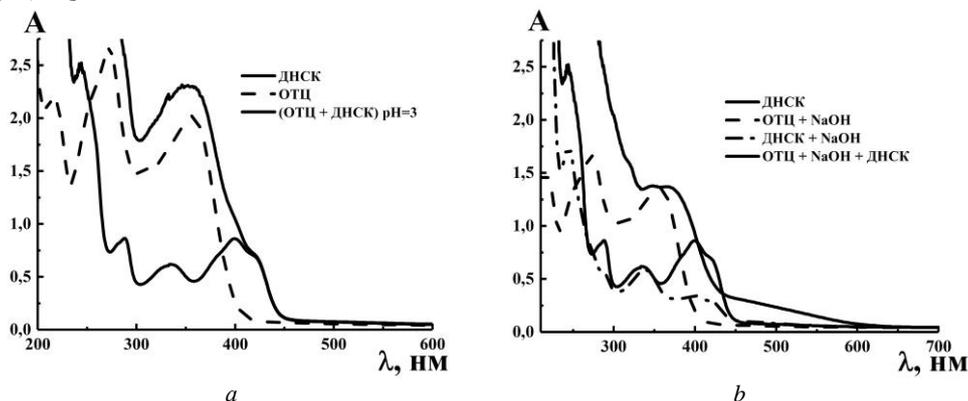


Рис. 2. Електронні спектри поглинання розчинів ДНСК, ОТЦ та продуктів їхньої взаємодії: $C_{\text{ДНСК}} = 2,625 \times 10^{-4}$ М; $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \times 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 10,0$ М
Fig. 2. Absorption spectra of DNSA, OXT solutions and products of their interaction. $C_{\text{DNSA}} = 2.625 \times 10^{-4}$ М; $C_{\text{OXT}} = 1.5 \times 10^{-4}$ М; $C_{\text{NaOH}} = 10.0$ М

На рис. 3 наведено схему азосполучення 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти (1) з окситетрацикліном (2) у середовищі концентрованого лугу з утворенням азосполуки (3), забарвленої в оранжево-червоний колір.

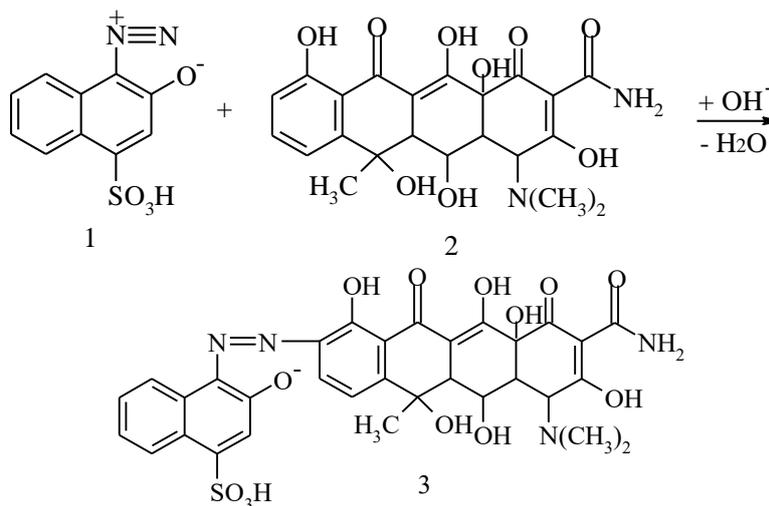


Рис. 3. Схема взаємодії 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з ОТЦ
Fig. 3. Scheme of interaction of 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid with OXT

Досліджено вплив концентрації NaOH на взаємодію 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислоти з ОТЦ. Як показали результати досліджень, у лужному середовищі рН 9–12 реагенти між собою не взаємодіють (рис. 4,а). Однак, як бачимо з рис. 4,б, взаємодія між ОТЦ і ДНСК все – таки відбувається у присутності концентрованих розчинів NaOH. Тому досліджено вплив концентрації натрій гідроксиду на утворення продуктів азосполучення, а також з'ясовано, що для максимального виходу продукту потрібно використовувати луг із концентрацією не менше ніж 9,0–10,0 М. у подальших дослідженнях ми використовували для азосполучення ОТЦ з ДНСК 10,0 М NaOH.

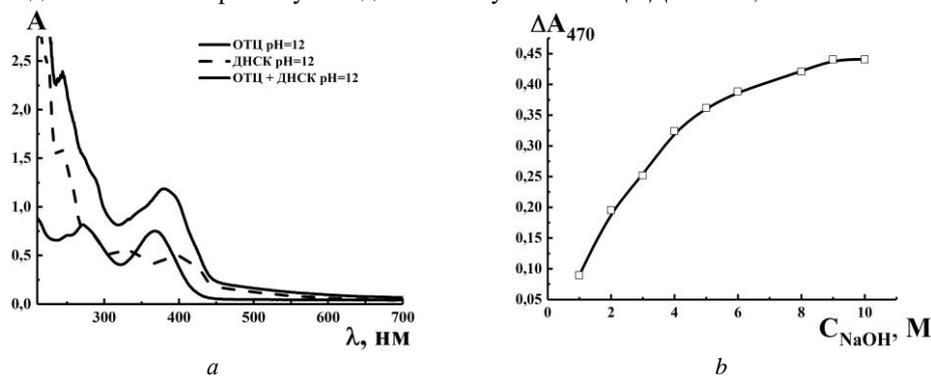


Рис. 4. Вплив концентрації натрій гідроксиду на світлопоглинання продуктів азосполучення ДНСК з ОТЦ. $C_{\text{ДНСК}} = 2,625 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

Fig. 4. Effect of sodium hydroxide concentration on absorbance of azocoupling products of the DNSA with OXT. $C_{\text{DNSA}} = 2.625 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{OXT}} = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$

Для реакції азосполучення характерна взаємодія компонентів у співвідношенні 1:1, проте, як відомо, надлишок реагенту сприяє зміщенню рівноваги реакції в бік утворення продуктів реакції, що дає можливість отримати максимальний вихід забарвленої аналітичної форми. Тому було досліджено залежність величини світлопоглинання утвореної азосполуки від надлишку 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислоти.

Як бачимо з рис. 5, максимальний вихід забарвленої сполуки досягається за 2,5-кратного надлишку ДНСК до окситетрацикліну і залишається постійним за подальшого збільшення кількості реагенту.

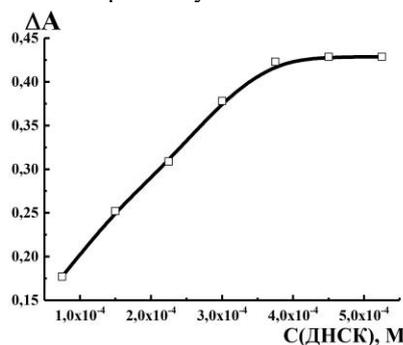


Рис. 5. Вплив концентрації ДНСК на світлопоглинання продуктів її азосполучення із ОТЦ: $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $\lambda = 470 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$

Fig. 5. Effect of DNSA concentration on absorbance of its azocoupling products with OXT. $C_{\text{OXT}} = 1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $\lambda = 470 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$

Досліджено послідовність змішування реагентів у системі ДНСК з ОТЦ. З'ясовано що азосполучення 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з окситетрацикліном (табл. 2) найефективніше проводити у такій послідовності: до розчину ОТЦ додавати 10,0 М розчин натрій гідроксиду і тоді розчин ДНСК. Імовірно, концентрований луг сприяє переведенню окситетрацикліну в йонізовану форму, яка легше вступає в реакцію азосполучення.

Таблиця 2

Порядок додавання реагентів під час взаємодії ДНСК з ОТЦ.

$C_{\text{ДНСК}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$

Table 2

The order of addition of reagents during the interaction of DNSA with OXT.

$C_{\text{DNSA}} = 3.75 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{OXT}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$

	Порядок додавання реагентів	ΔA
Азосполучення	[ДНСК+ОТЦ+NaOH]	0,369
	[ДНСК + NaOH +ОТЦ]	0,293
	[ОТЦ +NaOH + ДНСК]	0,463

Співвідношення компонентів в азосполучі 1-діазо-2-нафтол-4-сульфоїкислоти з ОТЦ 1:1 визначено методом ізомольарних серій (рис. 6).

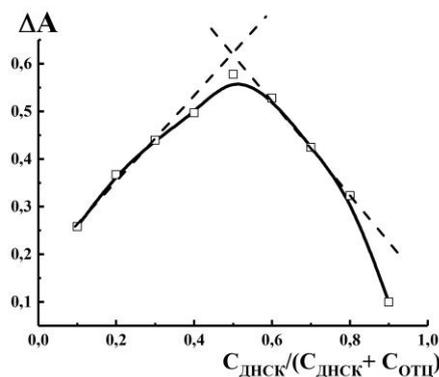


Рис. 6. Визначення співвідношення компонентів у системі ДНСК–ОТЦ методом ізомольарних серій. $C_{\text{ДНСК}} + C_{\text{ОТЦ}} = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$

Fig. 6. The method of continuous variations. $C_{\text{DNSA}} + C_{\text{OXT}} = 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$

У розробці спектрофотометричної методики визначення ОТЦ важливе значення має стабільність аналітичної форми у часі, саме тому досліджено стійкість утвореного продукту взаємодії ДНСК з ОТЦ.

Як показали результати досліджень (рис. 7), максимальна оптична густина продукту взаємодії ДНСК з ОТЦ досягається через 15 хв, а утворений продукт стабільний лише 10 хв, проте цього часу є достатньо для проведення необхідних вимірювань оптичної густини та визначення вмісту аналіту.

З'ясовано, що значення аналітичного сигналу забарвленого продукту азосполучення окситетрацикліну з ДНСК лінійно залежить від концентрації ОТЦ у розчині. Метрологічні характеристики спектрофотометричного визначення ОТЦ наведено у табл. 3.

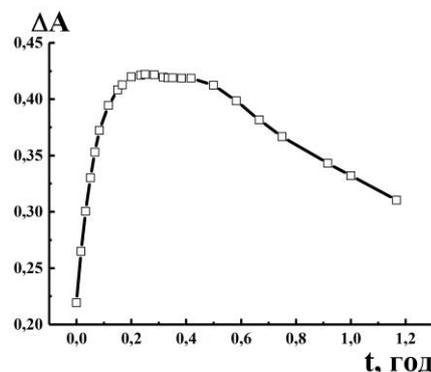


Рис. 7. Стабільність у часі світлопоглинання продукту азосполучення ДНСА з ОТЦ.
 $C_{\text{ДНСА}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$; $l = 1 \text{ см}$
 Fig. 7. Effect of the keeping time on the absorbance of azocoupling products of DNSA with
 OTC. $C_{\text{DNSA}} = 3.75 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{OXT}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $\lambda = 470 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$

Таблиця 3

Аналітичні характеристики спектрофотометричного визначення ОТЦ з використанням ДНСА.
 $C_{\text{ДНСА}} = 7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ см}$; $n = 5$; $P = 0,95$.

Table 3

Analytical characteristics of OTC spectrophotometric determination with DNSA.
 $C_{\text{DNSA}} = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $l = 1 \text{ cm}$; $n = 5$; $P = 0.95$

Параметри/Характеристики	ОТЦ+ДНСА
λ_{max} , нм	470
Межі лінійності, мкг/мл	12,4 – 198,6
C_{H} , мкг/мл	15,37
C_{min} , мкг/мл	5,12
Молярний коефіцієнт світлопоглинання, $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} \times 10^{-3}$, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	3,00
Рівняння лінійної залежності	$\Delta A = 0,0105 + 0,00615 \cdot C$
С _{ОТЦ} , мкг/мл	
Коефіцієнт кореляції (R)	0,9994

Як бачимо з табл. 3, під час визначення окситетрацикліну з ДНСА лінійність сигналу світлопоглинання продукту зберігається в межах одного порядку його концентрацій. Чутливість реакції взаємодії ОТЦ із ДНСА є достатньою для контролю вмістів цього антибіотику у ветеринарних та лікарських препаратах.

Правильність спектрофотометричної методики визначення окситетрацикліну з ДНСА перевірено методом “введено – знайдено” на модельному розчині різного складу методом градуйованого графіка (табл. 4). Отримані результати свідчать про те, що похибка визначення ОТЦ за розробленими методиками не перевищує похибки спектрофотометричного методу і може бути застосована для аналізу реальних об’єктів.

Лікарські та ветеринарні препарати на основі окситетрацикліну випускають у формі таблеток, порошків, розчинів для ін’єкцій та мазі. Для отримання зазначених лікарських форм використовують допоміжні речовини: наповнювачі, консерванти та стабілізатори, які, зазвичай, не впливають на діючі речовини, проте можуть заважати їх визначенню за допомогою окремих реакцій, тому під час розроблення нової методики визначення діючих речовин необхідним етапом є дослідження впливу усіх

компонентів лікарських форм на вибірковість взаємодії діючої речовини з реагентом. Крім того, досить значну частину серед усіх лікарських препаратів окситетрацикліну займають комбіновані лікарські та ветеринарні препарати, які у своєму складі містять, крім ОТЦ, ще одну або декілька діючих речовин, тому ми дослідили вплив цих біологічно-активних речовин на визначення ОТЦ з ДНСК. Критерієм селективності визначення обрано незмінність величини світлопоглинання розчинів отриманих продуктів реакції у межах 5 %. Результати досліджень наведено у табл. 5.

Таблиця 4

Результати спектрофотометричного визначення ОТЦ у модельних розчинах. $C_{\text{ДНСК}} = 7,5 \times 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{ОТЦ}} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ М}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$; $l = 1 \text{ см}$; $n = 5$; $P = 0,95$

Table 4

The results of spectrophotometric determination of OXT in model solutions.

$C_{\text{DNSA}} = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{OXT}} = 2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$; $n = 5$; $P = 0.95$

Реагент	Внесено, мкг/мл	Знайдено, $\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$, мкг/мл	S_r
ДНСК	99,30	99,37 ± 0,961	0,008

Таблиця 5

Результати визначення ОТЦ з ДНСК за наявності у досліджуваній пробі різних кількостей діючих речовин, наповнювачів та консервантів. $C_{\text{ДНСК}} = 2,63 \times 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{ОТЦ}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ М}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ М}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}$; $l = 1 \text{ см}$; $n = 5$; $P = 0,95$

Table 5

Effect of Excipients on the OXT assays by DNSA. $C_{\text{DNSA}} = 2,63 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{OXT}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ M}$; $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$; $n = 5$; $P = 0,95$

Діючі речовини, наповнювачі та консерванти	$v(\text{ОТЦ}) : v(\text{P})^1$	$v(\text{ОТЦ}) : v(\text{P})^2$	Знайдений вміст ОТЦ ² , % $\bar{x} \pm S \cdot t_{\alpha} / \sqrt{n}$
Норсульфазол	1:3,5	1:10*	100,0±5,4
Триметоприм	1:1,1	1:5*	99,4±5,9
MgCl ₂	1:4,9	–	–
Поліетиленгліколь-400	1:0,24	1:0,5	100,9±4,1
Бензиловий спирт	1:0,046	1:0,065	100,9±5,9

¹Мольні співвідношення ОТЦ та діючих і допоміжних речовин у ліках.

²Максимальні мольні співвідношення ОТЦ та досліджуваних діючих і допоміжних речовин.

*Вищі концентрації не досліджувались; – заважають визначенню.

Як бачимо з даних табл. 5, взаємодії ОТЦ з реагентом 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. Тому розроблену методику можна використати для аналізу готових препаратів.

На основі розробленої методики визначення ОТЦ з ДНСК визначено вміст окситетрацикліну в одно- та багатокомпонентних лікарських препаратах, які випускають у формі порошків та розчинів для ін'єкцій. Результати визначення окситетрацикліну з ДНСК у досліджуваних препаратах подано у табл. 6.

Таблиця 6

Результати спектрофотометричного визначення ОТЦ з ДНСК у лікарських препаратах.
 $C_{\text{ДНСК}} = 7,5 \times 10^{-4} \text{ М}; C_{\text{NaOH}} = 10,0 \text{ М}; \lambda_{\text{max}} = 470 \text{ нм}; l = 1 \text{ см}; n = 5; P = 0,95$

Table 6

Determination of OXT in pharmaceuticals. $C_{\text{DNSA}} = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M};$
 $C_{\text{NaOH}} = 10.0 \text{ M}; \lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}; l = 1 \text{ cm}; n = 5; P = 0.95$

Окситетрациклін гідрохлорид (регламентований вміст у препараті)	Знайдений вміст			
	Спектрофотометрично при $\lambda = 355 \text{ нм}$ згідно з ТУ		Спектрофотометрично з ДНСК	
	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r	$\bar{x} \pm \frac{S \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$	S_r
“Окситетрациклін НСІ” порошок НУ НВФ Бровафарма, м. Бровари (субстанція)				
Окситетрациклін гідрохлорид (20,0±2,0 г/флакон)	18,9 ± 0,2	0,006	19,2 ± 0,2	0,009
“Бровасептол” порошок НУ НВФ Бровафарма, м. Бровари (норсульфазол (80 мг/г), сульгін (70 мг/г), триметоприм (30 мг/г), тилозину тартрат (25 мг/г), допоміжні речовини – крохмаль, тальк)				
Окситетрациклін гідрохлорид (45±4,5 мг/г)	–	–	48,3 ± 0,99	0,016
“Окси-100” розчин для ін'єкцій Інтерхеміверкен “Де Аделаар” Естгі АС, Естонія (допоміжні речовини – спирт бензиловий, магній хлорид, натрійформальдегідсульфоксилат, моноетаноламін, поліетиленгліколь-400, вода для ін'єкцій.)				
Окситетрациклін гідрохлорид (100±10 мг/мл)	–	–	137,0 ± 1,51	0,009

– Визначення не проводили.

Як бачимо з даних таблиці, результати, одержані за розробленою методикою визначення ОТЦ з ДНСК у порошку “Окситетрациклін НСІ”, узгоджуються з результатами, отриманими спектрофотометричним методом за власним поглинанням при $\lambda = 355 \text{ нм}$ згідно з технічними умовами фірми виробника. В інших комбінованих препаратах, згідно з ТУ, проводять хроматографічне визначення окситетрацикліну, однак розроблена нами методика дала можливість успішно визначити ОТЦ лише у препараті “Бровасептол”. Така методика є значно простішою, ніж хроматографічна, і не потребує екстракції під час аналізу комбінованих лікарських засобів на відміну від фармакопейної методики.

4. Висновки

У роботі описано умови отримання азосполуки на основі 1-діазо-2-нафтол-4-сульфокислоти з антибіотиком окситетрацикліном. Розроблено методику спектрофотометричного визначення окситетрацикліну, яка має достатньо високу чутливість та дає змогу визначати антибіотик у складі готових лікарських та ветеринарних препаратів. Вона має чимало переваг: є простою у виконанні, чутливою, відтворюваною та селективною.

1. *Bilousov Yu. B., Gurevich K. G.* Interaction of drugs with food // *Pharmaceutical Journal*. 2002. No. 6. P. 42–45.
2. *Chekman I. S.* Clinical and pharmacological properties of antibiotics // *Modern infections*. 2001. No. 2. P. 76–89.
3. *Pharmaceutical chemistry / Under. ed. A. P. Arzamastseva*. 2nd ed., rev. – Moscow GEOTAR–Media, 2005, 640 p. (in Russian).
4. *Liniychuk N. V.* Determination of residual amounts of tetracyclines in products of animal origin // *Biology of animals*. 2012. Vol. 14, No. 2. P. 668–672.
5. *Patyra E., Kwiatek K., Nebot C., Gavilán R. 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 // *Molecules*. 2020. Vol. 25, No. 14. P. 225–236. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25143265>
6. *Sebaiy M., Hassan W., Elhennawy M.* Developing a high-performance liquid chromatography (hplc) method for simultaneous determination of oxytetracycline, tinidazole and esomeprazole in human plasma // *J. Chromatogr. Sci.* 2019. Vol. 57, No. 8. P. 724–729. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz046>
7. *Wang M., Hou F., Jiang C.* Ethyl substituted fluorimetric method for the determination of trace amounts of oxytetracycline in rine, sermm, feed of chook and milk // *J. Luminescence*. 2005. Vol. 113, No. 1–2. P. 94–99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2004.09.126>
8. *Chen G., Schneider M. J., Darwish A. M.* Europium-sensitized luminescence determination of oxytetracycline in catfish muscle // *Talanta*. 2004. Vol. 64, No. 1. P. 252–257. DOI: [10.1016/j.talanta.2004.02.014](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.014)
9. *Derzhavna Farmakopeya Ukrayiny // Derzhavne pidpryyemstvo «Naukovo-ekspertnyy farmakopeyny tsestr»*. 1-e vyd., Dop. 1. Kharkiv: RIHER, 2008.– 495 p. (in Ukrainian).
10. *Lopez Paz J. L., Martinez Calatayud J.* Copper carbonate as a solid-bed reactor for spectrophotometric determination of doxycycline and oxytetracycline in an unsegmented continuous flow assembly // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993. Vol. 11, No. 11/12.– P. 1093–1098. DOI: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(93\)80087-H](https://doi.org/10.1016/0731-7085(93)80087-H)
11. *Ayad M., El-sadik M., Mostaffa S.* 4-amino antipyrine as an analytical reagent for the colorimetric determination of oxytetracycline and tetracycline // *Anal. Lett.* 1986. Vol. 19, No. 21–22. P. 2169–2181. DOI: <https://doi.org/10.1080/00032718608080875>
12. *Othman N. S., Al-Ashow R. J.* Spectrophotometric determination of tetracycline by coupling with diazotised 4-aminoantipyrine in presence of cetylpyridinium chloride // *Raf. J. Sci.* 2012. Vol. 23, No. 2. P. 72–84. DOI: [10.33899/rjs.2012.44397](https://doi.org/10.33899/rjs.2012.44397)
13. *Pat. 4777246 CIIA, C 07 C 113/00*. 1-Diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid by iron-catalyzed diazotization: Пат. 4777246 CIIA, C 07 C 113/04 / Bruno Fiirtsch, Ramlinsburg, Switzerland; Ciba-Geigy Corporation, Ardsley, NY. No. 847395; stated. 19.03.1986; published. 11.11.1988. 4 s.
14. *Turcas C. V., Sebe I.* Azo dyes complexes synthesis and tinctorial properties // *U. P. B. Sci. Bull., Series B*. 2012. Vol. 74, No. 1. P. 109–118.
15. *Stepanov B. I.* Introduction to chemistry and technology of organic dyes / *M. Chemistry*, 1977. 365 p. (in Russian).
16. *Agronomov A. E.* Selected Chapters of Organic Chemistry: Textbook. Manual for universities / *M. Chemistry*, 1990. 560 p. (in Russian).

УДК 543.552:[547.541.521+547.556.33]

APPLICATION OF AZO COMPOUNDS OF OXYTETRACYCLINE WITH 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULPHONIC ACID FOR SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF VETERINARY MEDICINES

O. Kostiv^{1*}, O. Korkuna¹, L. Yanchuk¹, M. Smolinska²

*¹Ivan Franko National University of Lviv, Chemistry Faculty,
Kyrylo & Mefodiy Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine*

*²State Scientific Research Control Institute of Veterinary Preparations and
Fodder Additives Donetska Str., 11, 79019 Lviv, Ukraine
e-mail: oksana.kostiw@lnu.edu.ua*

The work is devoted to the investigation of the oxytetracycline (OXT) interaction with the 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid (DNSA) for the elaboration of new spectrophotometric methods determination of oxytetracycline in drugs. The method of OXT determination is based on the interaction with 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid with formation of orange azocompound. Absorbance spectrum of aqueous solution of the obtained product has a wide shoulder at 450–550 nm, ΔA_{\max} at 470 nm. The azocoupling of 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid with OXT should be carried out in a medium of 10.0 M sodium hydroxide under the action of 2.5-fold excess DNSA to oxytetracycline. The effective molar absorptivity of the azocoupling products of DNSA with oxytetracycline is $3.00 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Stoichiometric ratios of the azo compounds components were determined using continuous variations methods and it is 1:1. On the basis of the optimum reaction conditions there were developed a new methods that allows to determine 12.5–198.5 $\mu\text{g/ml}$ oxytetracycline with 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid at relative method error less 2–3 %.

The selectivity of OTC spectrophotometric determination in the presence of auxiliary substances (excipients and preservatives) and bioactive substances has been investigated. It was found that the interfering effect of norsulfazol, trimethoprim, polyethylene glycol 400 and benzyl alcohol are observed at higher concentrations than those contained in drugs, with the exception of magnesium chloride, which interferes in any ratio.

The elaborated method have been approved during the analyses of model solutions, the single component (“Oxytetracycline HCl” powder NU NVF Brovapharma, Brovary) and multicomponent (“Brovaseptol” powder NU NVF Brovapharma, Brovary; “Oxy – 100” solution for injection, Interchem Werken De Adelaar Eesti AS, Estonia) veterinary preparations.

Keywords: oxytetracycline, 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid, azocoupling, spectrophotometry, drugs.

Стаття надійшла до редколегії 31.10.2020

Прийнята до друку 18.05.2021