



УДК 543.068.8

## Тест-определение амоксициллина в лекарственных препаратах

А. В. Маракаева, И. В. Косырева

Маракаева Анастасия Вячеславовна, аспирант кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, marakaeva\_anastasiya@mail.ru

Косырева Ирина Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, i\_kosyreva@mail.ru

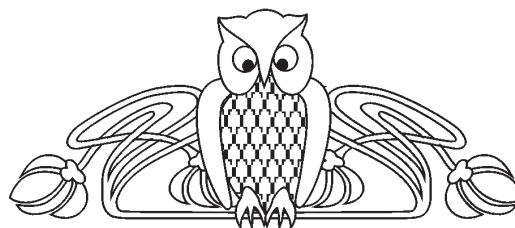
Амоксициллин – полусинтетический аминопенициллин  $\beta$ -лактамно ряда с широким спектром антибактериальной активности в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Входит в перечень важнейших лекарственных препаратов. Тест-системы для обнаружения и идентификации амоксициллина отсутствуют. Нами получены индикаторные бумаги с иммобилизованным нингидрином и п-диметиламинобензальдегидом для тест-определения амоксициллина. Подобраны условия проведения реакции в зависимости от температуры и времени. Построены цветовые шкалы для визуально-колориметрического и цветометрического определения. Определены значения цветовых параметров по цветовым моделям RGB, CMYK, HSB, выбраны оптимальные каналы по яркости, контрастности, чувствительности. Построены линейные зависимости выбранных цветовых параметров от концентрации антибиотика. Проведена математическая обработка тест-средств с построением лепестковых диаграмм в координатах цветовых моделей R, G, B, C, M, Y, K. Получены линейные зависимости параметров «площадь», «периметр лепестковых диаграмм» от концентрации антибиотика, позволяющие проводить количественную оценку содержания лекарственного препарата. На основании проведенных исследований разработана и апробирована простая экспрессная методика определения антибиотика в лекарственных препаратах. Методика апробирована на двух лекарственных препаратах отечественных производителей, выпускаемых в таблетках.

**Ключевые слова:** тест-определение, индикаторные бумаги, антибиотики, цветовые модели, лепестковая диаграмма.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-146-151>

### Введение

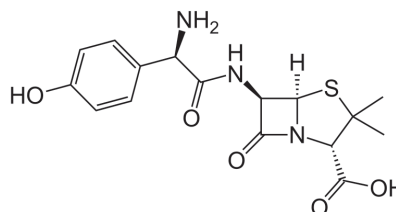
К антибиотикам относят продукты жизнедеятельности (или их синтетические аналоги) живых клеток, которые избирательно подавляют функционирование других клеток – микроорганизмов, опухолей и т. д. Термин «антибиоз» – «жизнь против жизни» впервые предложил Л. Пастер [1], впоследствии вещества, реализующие антибиоз, назвали антибиотиками.



По химической структуре выделяют основные классы антибиотиков:  $\beta$ -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монолактамы); макролиды и группа линкомицина, стероиды, тетрациклины, хлорамфеникол (левомицетин) и его препараты, аминогликозиды, пептидные антибиотики (полимиксины, ванкомицин), полиены и другие [2, 3].

Для определения антибиотиков в различных объектах (лекарственных препаратах, пищевых продуктах и биологических средах) в основном используются электрохимические, спектрофотометрические, хроматографические методы анализа [4]. Однако они не пригодны для быстрого и дешевого скринингового обследования лекарственных препаратов на предмет наличия фальсификатов, при оценке содержания основного вещества в препаратах и т. п. Для этих целей положительно себя зарекомендовали тест-методы анализа [5]. Для нашей страны такой скрининг актуален, так как имеется более 150 зарубежных и отечественных аналогов препарата, выпускаемых в виде таблеток, капсул, суспензий для приема внутрь и порошков для приготовления растворов.

Амоксициллин – один из наиболее распространенных антибиотиков [6] с широким спектром антибактериальной активности в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Он входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов медицинского назначения [7]. В настоящее время тест-средства для обнаружения и идентификации амоксициллина отсутствуют.



В связи с этим цель настоящей работы состояла в создании тест-систем для определения амоксициллина и применении их к анализу фармацевтических форм и лекарственных препаратов.



### Материалы и методы

В работе использовали следующие реагенты и материалы:

– амоксициллин (в виде амоксициллина натрия) – порошок для приготовления раствора для внутривенного введения, фирма-производитель «Красфарма». Исходный раствор антибиотика с концентрацией 0,1 моль/л готовили растворением точной навески (0,9135 г) препарата в растворе 0,01М соляной кислоты объемом 25 мл. Рабочие растворы с концентрацией  $5 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ М (в 0,01М HCl) готовили в день проведения эксперимента путем последовательного разбавления исходного;

– спиртовой 0,1М раствор нингидрина ( $C_9H_6O_4$ , Mг 178,14 г/моль, «ч.д.а»). Навеску  $m = 0,3725$  г растворяли в мерной колбе на 25 мл;

– спиртовой 0,1М раствор п-диметиламинобензальдегида (п-ДМАБ) ( $(CH_3)_2NC_6H_4CHO$ , Mг 149,19 г/моль, «ч.д.а»). Навеску  $m = 0,4450$  г растворяли в мерной колбе на 25 мл;

– фильтры обеззолненные «Синяя лента», ТУ 2642-001-13927158-2003, масса золы 1 фильтра 0,00104 г;

– бокс для фотографирования размером 22х23х24 см с двумя полосками светодиодного освещения (5V, 1A);

– 20,1-Мегапиксельная цифровая камера Nikon Coolpix A100.

### Получение индикаторных бумаг

Для получения двух видов индикаторных бумаг (ИБ) фильтр размером 5×5 см погружали на 2 мин в свежеприготовленные спиртовые растворы либо нингидрина, либо п-ДМАБ, высушивали при комнатной температуре и разрезали на части размером 1×1 см.

### Результаты и их обсуждение

При проведении тест-определения каплю анализируемого раствора наносили на индикаторную бумагу с нингидрином либо п-ДМАБ, высушивали при 95° С в течение 5–35 мин и наблюдали появление фиолетового (с нингидрином) либо желтого (с п-ДМАБ) окрашивания. Аналитический сигнал регистрировали цифровой камерой Nikon Coolpix A100, для этого тест-форму помещали в бокс и фотографировали. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop CS5 и авторской онлайн-программы [8]. Для этого часть изображения усредняли с помощью фильтра «Average», определяли интенсивность цветовых параметров моделей RGB, CMYK, HSB. Среди существующих цветовых моделей, разработанных для описания цвета в цифровых технологиях, наиболее часто применяют модели RGB, CMYK, HSB, XYZ и CIELAB [9]. На рис. 1 представлены графики зависимости интенсивности цветных каналов моделей RGB, CMYK, HSB от времени нагревания индикаторных бумаг.

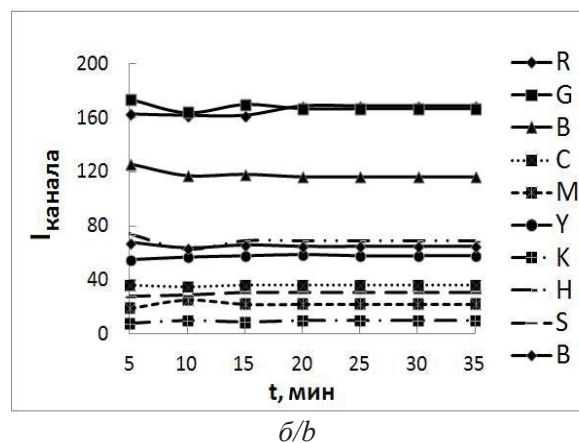
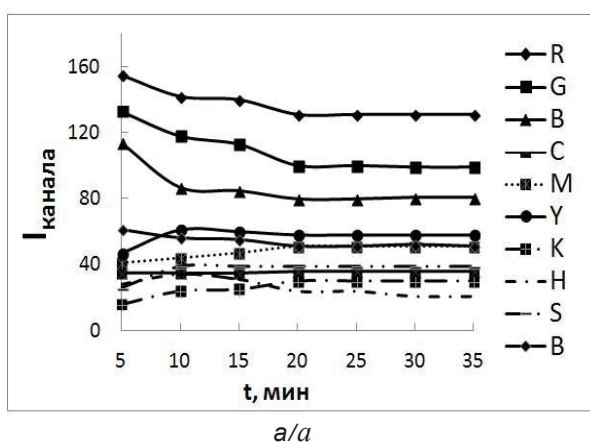


Рис. 1. Зависимость интенсивности ( $I$ ) цветных каналов от времени нагревания: а – ИБ с нингидрином, б – ИБ с п-ДМАБ

Fig. 1. Dependence of intensity ( $I$ ) of color channels on heating time: а – indicator papers with ninhydrin, б – indicator papers with p-Dimethylaminobenzaldehyde

Общим для всех моделей является фиксирование состояния равновесия, наступающего в течение 15–20 мин, независимо от выбранной модели (см. рис. 1).

Построены зависимости выбранных цветовых параметров по цветовым моделям RGB, CMYK, HSB от концентрации антибиотика (рис. 2).

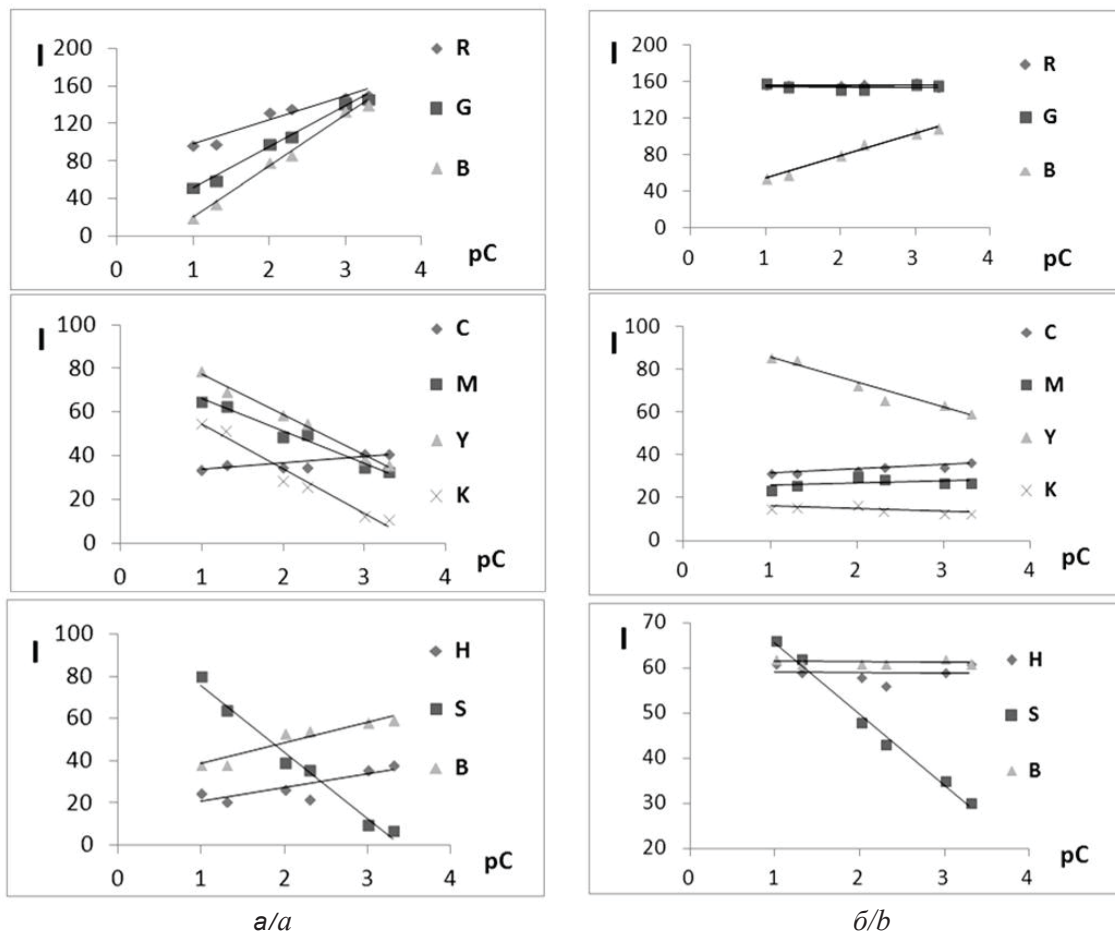


Рис. 2. Зависимость интенсивности ( $I$ ) цветных каналов от концентрации антибиотика:  $a$  – ИБ с нингидрином,  $б$  – ИБ с п-ДМАБ;  $t = 95^\circ \text{C}$ , 20 мин

Fig. 2. Dependence of intensity ( $I$ ) of color channels on the concentration of the antibiotic:  $a$  – indicator papers with ninhydrin,  $b$  – indicator papers with p-Dimethylaminobenzaldehyde;  $t = 95^\circ \text{C}$ , 20 min

Уравнения регрессии зависимостей  $I_{\text{канала}} - pC$  при тест-определении амоксициллина с нингидрином и п-ДМАБ

Regression equations of  $I_{\text{channel}} - pC$  dependencies in the test-determination for amoxicillin with ninhydrin and p-DMAAB

ИБ с нингидрином			ИБ с п-ДМАБ		
Канал	Уравнение	$r^2$	Канал	Уравнение	$r^2$
Модель RGB					
R	$y = 25,1x + 73,9$	0,923	R	$y = -0,85x + 157$	0,318
G	$y = 43,5x + 8,23$	0,989	G	$y = -0,085x + 154$	0,002
<b>B</b>	<b><math>y = 54,0x - 33,4</math></b>	<b>0,992</b>	<b>B</b>	<b><math>y = 22,2x + 33,9</math></b>	<b>0,967</b>
Модель CMYK					
C	$y = 2,97x + 30,6$	0,732	C	$y = 2,08x + 29,5$	0,894
M	$y = -14,6x + 80,6$	0,977	M	$y = 1,00x + 25,0$	0,182
<b>Y</b>	<b><math>y = -18,5x + 96,1</math></b>	<b>0,992</b>	<b>Y</b>	<b><math>y = -11,8x + 97,7</math></b>	<b>0,945</b>
K	$y = -20,4x + 74,8$	0,969	K	$y = -1,29x + 17,4$	0,510
Модель HSB					
H	$y = 6,52x + 14,2$	0,679	H	$y = -0,073x + 61,5$	0,016
<b>S</b>	<b><math>y = -31,5x + 107</math></b>	<b>0,982</b>	<b>S</b>	<b><math>y = -15,7x + 81,2</math></b>	<b>0,990</b>
B	$y = 9,99x + 28,5$	0,901	B	$y = -0,07x + 59,2$	0,001



Как видно из таблицы и рис. 2, для ИБ с нингидрином и ИБ с п-ДМАБ в модели RGB оптимальным каналом является канал В ( $y = 54,0x - 33,4$ ;  $r^2 = 0,992$  и  $y = 22,2x - 33,9$ ;  $r^2 = 0,967$  соответственно). В модели СМΥК оптимальный канал Υ ( $y = -18,5x + 96,1$ ;  $r^2 = 0,992$  и  $y = -11,8x + 97,7$ ;  $r^2 = 0,945$ ). В модели HSB – S ( $y = -31,5x + 107$ ;  $r^2 = 0,982$  и  $y = -15,7x + 81,2$ ;  $r^2 = 0,990$ ). Однако наибольшая чувствительность ( $tg\alpha$ ) и значения коэффициента регрессии  $r^2$  характерны для ИБ с нингидрином.

Диаграмма – способ визуализации данных [10, 11], делающий их более понятными и на-

глядными. Один из типов – лепестковая диаграмма, в которой для каждой категории сведений определена своя ось. Значение каждой точки отмечается на соответствующей оси. Обработка аналитического сигнала с помощью различных преобразований играет важную роль в химическом анализе [12]; применима для проведения многовариантного анализа и поиска решений в многокритериальной оптимизации. В настоящей работе по результатам определения цветowych параметров в программе MS Excel строили лепестковые диаграммы с 7 осями в координатах R, G, B, C, M, Y, K (рис. 3).

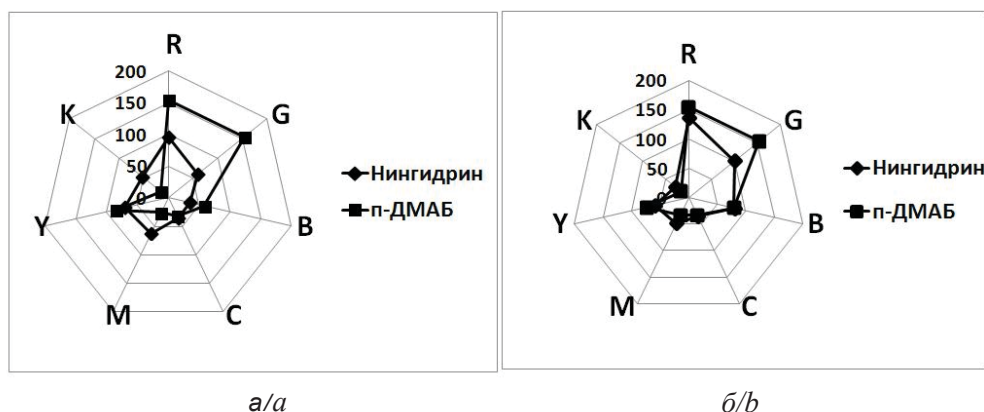


Рис. 3. Профили лепестковых диаграмм тест-средств с иммобилизованным нингидрином и п-ДМАБ при определении амоксициллина: а –  $C_{\text{амоксициллин}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; б –  $C_{\text{амоксициллин}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ;  $t = 95^\circ\text{C}$ , 20 мин

Fig. 3. Profiles of radar charts for test agents with immobilized ninhydrin and p-DMAAB in determining amoxicillin: а –  $S_{\text{amoxicillin}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ; б –  $S_{\text{amoxitsillin}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ;  $t = 95^\circ\text{C}$ , 20 min

Как видно из рис. 3, каждому тест-средству соответствует свой индивидуальный «отпечаток». С уменьшением концентрации амоксициллина увеличивается профиль диаграммы реакции с п-ДМАБ (значения параметров R, G, B возрастают). При уменьшении концентрации антибиотика профили лепестковых диаграмм реакции с нингидрином и п-ДМАБ становятся сходными.

Рассчитывали параметры «площадь» ( $S$ ) и «периметр» ( $P$ ) полученных лепестковых диаграмм в MS Excel по формулам:

$$P = \sqrt{a^2 + b^2 - 2ab \cdot \cos(ab)},$$

$$S = a + b \cdot \sin(ab),$$

где  $a, b$  – стороны треугольника;  $\cos(ab)$  – косинус угла между сторонами  $a, b$ ;  $\sin(ab)$  – синус угла между сторонами  $a, b$ .

Строили соответствующие зависимости  $S$  или  $P$  от концентрации ( $pC$ ) антибиотика (рис. 4).

Как видно из рис. 4, получены линейные зависимости  $S$  и  $P$  от  $pC$ , с коэффициентом регрессии 0,98 и 0,99 соответственно, что позволяет проводить количественную оценку содержания амоксициллина в исследуемом объекте.

#### Определение амоксициллина в лекарственных препаратах

Навеску препарата растворяли в 0,01M соляной кислоте, отбирали каплю надосадочной жидкости и наносили на индикаторную бумагу с нингидрином или п-ДМАБ, нагревали при  $95^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. После ИБ помещали в бокс и фотографировали. В программе Adobe Photoshop CS5 определяли интенсивность цветowych параметров и по графику зависимости  $I_{\text{канала}} - pC$  определяли содержание антибиотика.

С помощью разработанных тест-средств определено содержание амоксициллина в двух лекарственных препаратах отечественных про-

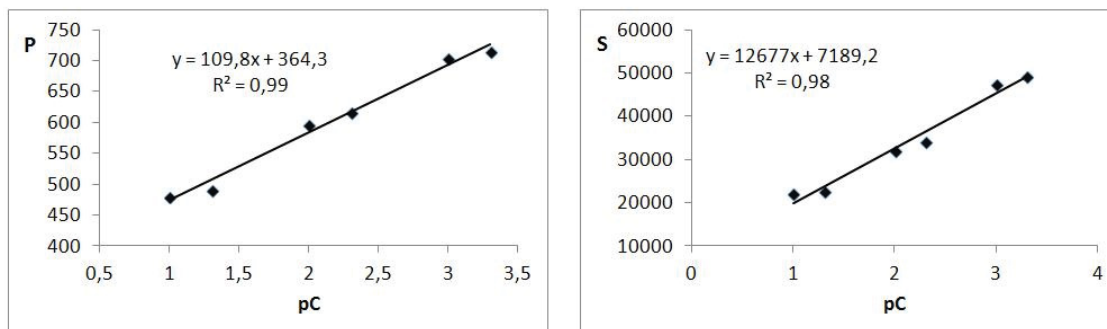


Рис. 4. Зависимость площади ( $S$ ), периметра ( $P$ ) лепестковых диаграмм от концентрации амоксициллина: ИБ с нингидрином;  $t = 95^\circ \text{C}$ , 20 мин

Fig. 4. Dependence of the area ( $S$ ), perimeter ( $P$ ) of the radar charts on the concentration of amoxicillin: indicator papers with ninhydrin;  $t = 95^\circ \text{C}$ , 20 min

изготовителей (ПАО «Биохимик» и ПАО «АВВА Рус»), форма выпуска – таблетки по 250 мг. Найденное количество соответствует заявленному производителями и составляет  $250 \pm 25$  мг.

Таким образом, полученные индикаторные бумаги с нингидрином и п-диметиламинобензальдегидом могут быть применены для экспресс-определения, а также оценки подлинности амоксициллина в фармацевтических формах и лекарственных препаратах.

#### Список литературы

1. Крылов Ю. Ф., Бобырев В. М. Фармакология. М. : ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. 352 с.
2. Арзамасцев А. П. Фармацевтическая химия. М. : Гэотар ; Медицина, 2004. 640 с.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. 6-е изд. М. : Изд-во МГУ ; Наука, 2004. 524 с.
4. Кулапина О. И., Кулапина Е. Г. Антибактериальная терапия. Современные методы определения антибиотиков в лекарственных и биологических средах. Саратов : Саратовский источник, 2013. 91 с.
5. Золотов Ю. А., Иванов В. М., Амелин В. Г. Химические тест-методы анализа. М. : Эдиториал УРСС, 2002. 304 с.
6. Щетинин Е. В., Сирак С. В., Батулин В. А., Сирак А. Г., Игнатиади О. Н., Вафиади М. Ю., Петросян Г. Г., Паразян Л. А., Дыгов Э. А., Арутюнов А. В., Цховре-

тов А. И. Результаты мониторинга потребления противомикробных препаратов в амбулаторной практике // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015. Т. 10, № 1. С. 80–84. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10013

7. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2018 г. Распоряжение Правительства РФ от 23 октября 2017 г. № 2323-р. М., 2017.
8. Габидулина М. К., Говорухин В. А., Доронин С. Ю., Косырева И. В., Ли Е. П., Маракаева А. В., Такиаитова Э. И. Программа для обработки цветометрических параметров тест-средств в химическом анализе // Компьютерные науки и информационные технологии : материалы междунар. науч. конф. Саратов : ИЦ «Наука», 2018. С. 93–95.
9. Рудакова Л. В., Рудаков О. Б. Информационные технологии в аналитическом контроле биологически активных веществ. СПб. : Лань, 2015. 361 с.
10. Романова И. К. Современные методы визуализации многомерных данных : анализ, классификация, реализация, приложения в технических системах // Наука и образование. МГТУ им. Н. Э. Баумана. Электрон. журн. 2016. № 3. С. 133–167. DOI: 10.7463/0316.0834876
11. Scott D. W. Multivariate density estimation: theory, practice, and visualization. N.Y. : John Wiley & Sons, 2015. 365 p.
12. Hansen P. W. Pre-processing method minimizing the need for reference analyses // Journal of Chemometrics : A Journal of the Chemometrics Society. 2001. Vol. 15, № 2. P. 123–131. DOI: 10.1002/1099-128X

#### Образец для цитирования:

Маракаева А. В., Косырева И. В. Тест-определение амоксициллина в лекарственных препаратах // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 2. С. 146–151. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-146-151>

#### Test-Determination of Amoxicillin in Medications

A. V. Marakaeva, I. V. Kosyрева

Anastasia V. Marakaeva, <https://orcid.org/0000-0002-1378-6861>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, marakaeva\_anastasiya@mail.ru

Irina V. Kosyрева, <https://orcid.org/0000-0002-7607-2292>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, i\_kosyрева@mail.ru

Amoxicillin is a semi-synthetic aminopenicillin  $\beta$ -lactam series with a wide spectrum of antibacterial activity against many gram-positive and gram-negative microorganisms. It is included in the list of



essential drugs. Test systems for the detection and identification of amoxicillin are missing. We have obtained indicator papers with immobilized ninhydrin and p-dimethylaminobenzaldehyde for the test determination of amoxicillin. The reaction conditions were selected, depending on the temperature and time. Color scales for visual colorimetric and colorimetric determination were constructed. The values of color parameters were determined by RGB, CMYK, HSB color models, the optimal channels were selected for brightness, contrast and sensitivity. The linear dependencies of the chosen color parameters on the concentration of the antibiotic were constructed. Mathematical processing of test tools with the construction of radar charts in the coordinates of the color models R, G, B, C, M, Y, K was carried out. Linear dependencies of the parameters of the area, the perimeter of radar charts on the antibiotic concentration were obtained, allowing a quantitative assessment of the drug content. Based on the studies conducted, a simple, express method for determining the antibiotic in medicinal preparations was developed and tested. The technique was tested on two drugs in tablet form produced by Russian pharmaceutical companies.

**Keywords:** test definition, indicator papers, antibiotics, color models, radar charts.

## References

1. Krylov Yu. F., Bobyrev V. M. *Farmakologiya* [Pharmacology]. Moscow, VUNMTs MZ RF, 1999. 352 p. (in Russian).
2. Arzamashev A. P. *Farmaceuticheskaya himiya* [Pharmaceutical Chemistry]. Moscow, Geotar, Medicina Publ., 2004. 640 p. (in Russian).
3. Egorov N. S. *Osnovy ucheniya ob antibiotikah* [Fundamentals of antibiotic theory]. Moscow, Izd-vo MGU, Nauka Publ., 2004. 524 p. (in Russian).
4. Kulapina O. I., Kulapina E. G. *Antibakterial'naya terapiya. Sovremennyye metody opredeleniya antibiotikov v lekarstvennykh i biologicheskikh sredakh* [Antibacterial therapy. Modern methods for the determination of antibiotics in medicinal and biological media]. Saratov, Saratovskiy istochnik Publ., 2015. 91 p. (in Russian).
5. Zolotov Yu. A., Ivanov V. M., Amelin V. G. *Himicheskie test-metody analiza* [Chemical test-methods of analysis]. Moscow, Editorial URSS, 2002. 304 p. (in Russian).
6. Shchetin E. V., Sirak S. V., Baturin V. A., Sirak A. G., Ignatiadi O. N., Vafiadi M. Yu., Petrosyan G. G., Parazyan L. A., Dydov E. A., Arutyunov A. V., Tshovrebov A. Ch. Rezul'taty monitoringa potrebleniya protivomikrobnyykh preparatov v ambulatornoy praktike [The results of monitoring the consumption of antimicrobial drugs in outpatient practice]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical Journal of the North Caucasus], 2015, vol. 10, no. 1. P. 37. (in Russian). DOI: 10.14300/mnnc.2015.10013
7. *Ob utverzhdenii perechnyya zhiznenno neobkhodimyyh i vazhneyshih lekarstvennykh preparatov na 2018 g. Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 23 oktyabrya 2017 g. No. 2323-r.* [On Approval of the List of Essential and Essential Drugs for 2018. Decree of the Government of the Russian Federation of October 23, 2017. No. 2323-r.]. Moscow, 2017 (in Russian).
8. Gabidulina M. K., Govoruhin V. A., Doronin S. Yu., Kosyreva I. V., Li E. P., Marakaeva A. V., Takshaitova E. I. Programma dlya obrabotki cvetometricheskikh parametrov test-sredstv v himicheskoy analize [Program for processing colorimetric parameters of test-means in chemical analysis]. In: *Komp'yuternyye nauki i informatsionnyye tekhnologii. Materialy mezhdunar. nauch. konf.* [Computer science and information technology. Materials of Intern. scientific conf.]. Saratov, ITs Nauka Publ., 2018, pp. 93–95 (in Russian).
9. Rudakova L. V., Rudakov O. B. *Informatsionnyye tekhnologii v analiticheskoy kontroly biologicheskikh aktivnykh veshchestv* [Information technologies in the analytical control of biologically active substances]. St. Petersburg, Lan' Publ., 2015. 361 p. (in Russian).
10. Romanova I. K. Sovremennyye metody vizualizatsii mnogomernyykh dannykh analiz, klassifikatsiya, realizatsiya, prilozheniya v tekhnicheskikh sistemakh [Modern methods of visualization of multidimensional data analysis, classification, implementation, applications in technical systems]. *Nauka i obrazovanie. MGTU im. N. E. Bauman. Elektron. zhurn.* [Science and Education. MGTU them. N. E. Bauman. Electron. Journals], 2016, no. 3, pp. 133–167 (in Russian). DOI: 10.7463/0316.0834876
11. Scott D. W. *Multivariate Density Estimation: Theory, Practice, and Visualization*. New York, John Wiley & Sons, 2015. 365 p.
12. Hansen P. W. Pre-processing method minimizing the need for reference analyses. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 2001, vol. 15, no. 2, pp. 123–131. DOI: 10.1002/1099-128X

## Cite this article as:

Marakaeva A. V., Kosyreva I. V. Test-Determination of Amoxicillin in Medications. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 2, pp. 146–151 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-146-151>