

Національний фармацевтичний університет України

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ У ПОРОШКУ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

Ключові слова: спектрофотометрія, бензилпеніцилін, калій пероксомоносульфат, кінетичний метод

Одним з актуальних завдань сучасної фармакології антибіотиків є боротьба зі збудниками інфекцій, стійкість яких до протимікробних засобів зумовлена виробленням бета-лактамаз. До препаратів цієї групи належить бензилпеніциліну натрієва сіль – природний антибіотик, який виробляється різноманітними видами цвілевого грибка. За хімічною будовою – це сульфурвмісна гетероциклічна сполука з бета-лактамним кільцем, активна стосовно грампозитивних коків і паличок.

Для кількісного визначення антибіотиків використовують низку різних методів: біологічні, хімічні, фізико-хімічні. Недоліками біологічних методів контролю є витрати великої кількості часу на аналіз, а також залежність точності результатів аналізу від багатьох зовнішніх факторів. Останнім часом для кількісного визначення антибіотиків набули поширення хімічні і фізико-хімічні методи, серед яких найбільше застосування мають хроматографічний і спектрофотометричний методи.

У науковій літературі описано інші методики кількісного визначення пеніцилінів методами ВЕРХ [4, 7, 12, 16], спектрофотометрії [5, 10, 15], потенціометричного титрування [3], йодометрії [6]; амперометрії [9], полярографічного аналізу [1], кінетики [2, 18] та ін. [8, 11, 13, 14, 17, 19, 20].

Незважаючи на те, що в практиці аналізу використовують велику кількість методів, завдання удосконалення відомих та опрацювання нових методик кількісного визначення пеніцилінів залишається актуальним і надалі. Існуючі фармакопейні методики визначення препаратів цього ряду достатньо складні, займають багато часу на підготовку та вимагають використання складної висококоштовної апаратури. Більшість відомих методик спектрофотометричного визначення пеніцилінів, які зводяться до визначення кінцевих продуктів їх гідролітичного розщеплення – довготривалі і вимагають нагрівання.

Розроблена нами методика кількісного визначення бензилпеніциліну має ряд переваг перед уже відомими: дає змогу визначати їх у значно менших кількостях, ніж рекомендованим методом йодометрії; придатна для такого самого інтервалу визначуваних концентрацій, що і в методі спектрофотометрії продуктів гідролізу, але при цьому не вимагає довготривалого нагрівання реакційної суміші, простіша за методики хроматографічного методу аналізу та швидша. Запропонована методика полягає в попередньому окисненні бензилпеніциліну надлишком калію пероксомоносульфату до відповідного S-оксиду з подальшим визначенням продукту гідролітичного перетворення його в лужному середовищі диференціальним кінетико-спектрофотометричним методом при 275 нм. Схему перетворень, які, ймовірно, ведуть до утворення продукту реакції, наведено на рис. 1.

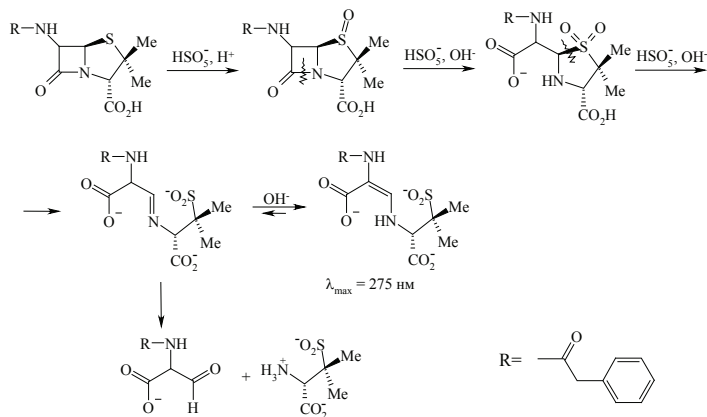


Рис. 1. Схеми спряжених реакцій пероксикислотного окиснення та пергідролізу натрію бензилпеніциліну з утворенням заміщеного похідного N-акрил-β-пеніциламіну сульфінату (IV)

© М.С.Блажевський, С.П.Карпова, 2011

Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використовували препарат натрію бензилпеніцилін фармакопейної чистоти (натрію (2S,5R,6R)-3,3-диметил-7-оксо-6-[(фенілацетил)аміно]-4-тіа-1-азабіцикло ацетил [3.2.0]гептан-2-карбоксилату), сухий стерильний порошок у флаконах “БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІН”. 1 флакон містить: бензилпеніциліну натрієвої солі у перерахунку на бензилпеніцилін 1 000 000 ОД, серії 630810, виробництва ВАТ “КИЇВМЕДПРЕПАРАТ” UA/3791/01/02, Київ, Україна, корпорація «Артеріум». Як окисник використовували пероксомоносульфатну кислоту у вигляді потрійної калійної солі $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ “extra pure” кваліфікації «Оксон» з вмістом активного кисню $\leq 4,5\%$. Вибір реагента зумовлений його доступністю, хорошою розчинністю і стійкістю у воді та відносно високою оксидативною здатністю.

Розчин робочого стандартного зразка (РСЗ) натрієвої солі бензилпеніциліну $1,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Наважку 0,0503 г РСЗ натрієвої солі бензилпеніциліну розчиняли у 100,00 мл дистильованої води при температурі 20 °С.

Виготовлення робочого розчину калій пероксомоносульфату, $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Наважку 0,615 г солі розчиняли у 100,0 мл двічі дистильованої води при температурі 20 °С. Концентрацію розчину контролювали методом йодометричного титрування.

Як РСЗ натрію бензилпеніциліну використовували субстанцію натрієвої солі бензилпеніциліну фармакопейної чистоти з точно відомим вмістом основної речовини.

Електронні спектри реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, ССРСР); кінетику вивчали за світлопоглинанням утвореного продукту реакції при 275 нм. Для вимірювання оптичної густини розчинів використовували кювету з товщиною вбіраючого шару $l=1$ см; розчини перед зливанням термостатували у термостаті УТУ-2 (Zeamit, Horizont Krakow-Poland), час фіксували секундоміром з моменту змішування розчинів. Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 моль/л розчин натрію гідроксиду, який не містив карбонатів. Обробку результатів здійснювали методом “тангенсів” (диференціальний варіант). Швидкість оцінювали за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої $A - \text{час}$ ($\text{tga}_{\text{амп}} - \text{у хв}^{-1}$).

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті дослідження з'ясовано, що порядок змішування розчинів суттєво чинить вплив на кінетику та вихід продукту реакції. Найвища швидкість накопичення продукту спостерігається лише після попереднього змішування розчину зразка досліджуваного бензилпеніциліну з калію пероксомоносульфатом, а відтак – розчином лугу. Максимальна активність калію пероксомоносульфату в реакції спостерігалася при концентрації $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Встановлено, що оптимальна концентрація лугу, при якій спостерігалась найбільша швидкість утворення продукту реакції, – $6 \cdot 10^{-2}$ моль/л. За відсутності пероксомоносульфату в зазначених вище умовах упродовж перших 30 хв (час спостереження) утворення продукту реакції не відбувалось. Такий необхідний надлишок калію пероксомоносульфату може бути пояснено його участю в процесі подальшого гідролітичного розщеплення, утвореного на першій стадії реакції відповідного S-оксиду ампіциліну, в лужному середовищі (нуклеофільний каталіз гідролізу β -лактамного та тiazолідинового циклів). На рис. 2 наведено електронний спектр продуктів взаємодії досліджуваного бензилпеніциліну, який реєстрували через 30 хв перебігу реакції (час досягнення рівноваги).

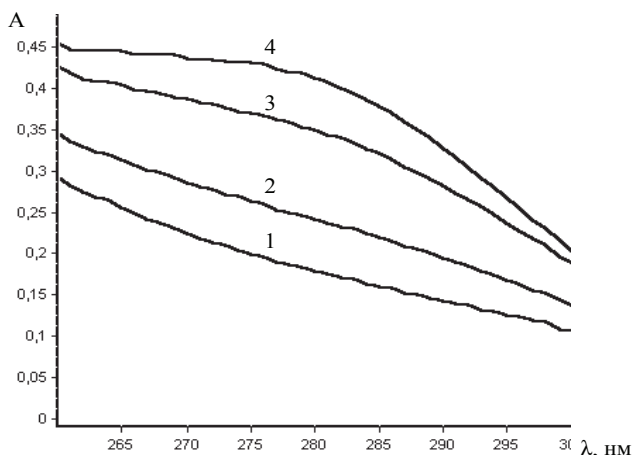


Рис. 2. Електронні спектри світлопоглинання продукту реакції лужного гідролізу(1) та пергідролізу натрієвої солі бензилпеніциліну (2–4) в часі : 1–20 хв, 2–5 хв, 3–10 хв, 4–20 хв. $c(\text{NaOH}) = 6,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $c(\text{KHSO}_5) = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $c(\text{Na-БП}) = 30$ мкг/мл

На рис. 3 зображено градувальний графік кількісного визначення бензилпеніциліну. Він свідчить, що в межах від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл умовна швидкість реакції зберігає лінійний характер залежно від концентрації бензилпеніциліну. Цей факт дає змогу здійснювати визначення бензилпеніциліну в зазначеному інтервалі його концентрацій в розчині. Результати дослідів (таблиця) свідчать, що визначення натрієвої солі бензилпеніциліну у порошку для приготування розчину для ін'єкцій можливе із задовільною точністю ($RSD \leq 2,0\%$).

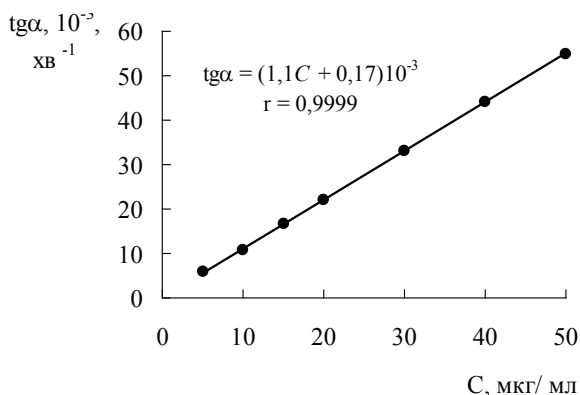


Рис.3. Градувальний графік кількісного визначення натрію бензилпеніциліну кінетичним методом за індикаторною реакцією пергідролізу з калію пероксомonosульфатом. $c(\text{NaOH})=6,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $c(\text{KHSO}_5)=2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л

Побудова градувального графіка. У мірні колби на 50 мл послідовно відміряють 0,50; 2,50; 3,00; 4,00; 5,00; 7,50; 10,00 мл стандартного розчину бензилпеніциліну, додають в кожен по 5 мл $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину калію пероксомonosульфату і ретельно збовтують. У кожен колбу послідовно приливають 5,0 мл 0,06 моль/л розчину натрію гідроксиду, доводять об'єм до позначки дистильованою водою і ретельно перемішують. Після додавання розчину лугу починають відлік часу, вмикають секундомір. Одержані розчини фотометрують у кварцовій кюветі завтовшки 1 см при 275 нм проти дистильованої води (компенсаційний розчин) упродовж 10 хв через кожну хвилину при температурі 20 °C і будують кінетичні криві оптичної густини залежно від часу. За даними нахилу лінійних ділянок кінетичних кривих будують градувальну залежність тангенса кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої $tg\alpha$ від концентрації бензилпеніциліну (C, мкг/мл).

Результати кількісного визначення натрієвої солі бензилпеніциліну у порошку для приготування розчину для ін'єкцій за реакцією з калію пероксомonosульфатом (n=5, P=0,95):

Узято бензилпеніциліну, мг	Знайдено		Метрологічні характеристики
	мг	%	
“БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІН”, 1 флакон містить бензилпеніциліну натрієвої солі у перерахунку на бензилпеніцилін – 1 000 000 ОД, серії 630810, виробництва ВАТ “КІЇВМЕДПРЕПАРАТ” UA/3791/01/02, Київ, Україна.			
603,0*	543,9 568,7 556,8 571,8 557,1	90,2 94,3 92,3 94,8 92,4	$\bar{x} = 559,7$ (92,8 %) $S = \pm 11,09$ $S_x = \pm 4,96$ $\Delta \bar{x} = \pm 13,79$ $RSD = \pm 1,98\%$ $\varepsilon = 2,46\%$ $\delta = +0,17\%$

Примітка. * Середній вміст бензилпеніциліну вказано у сертифікаті якості, який був перерахований у мг.

Методика кількісного визначення бензилпеніциліну. Близько 0,05 г (точна наважка) препарату переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл дистильованої води, доводять об'єм розчину до позначки і перемішують. 3,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу на 50 мл і далі виконують аналіз аналогічно, як при побудові градувального

графіка. Отриманий розчин фотометрують у кварцовій кюветі завтовшки 1 см при 275 нм, використовуючи дистильовану воду як компенсаційний розчин, щохвилини протягом 10 хв та будують кінетичну криву залежності світопоглинання розчину (A) від часу. За допомогою графіка знаходять тангенс кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої.

Вміст $C_{16}H_{17}N_2O_5S$, у г, в одному флаконі ($X_{\text{БП}}$) розраховують за формулою:

$$X_{\text{БП}} = \frac{a_{\text{ст}} \cdot \text{tg} \alpha \cdot 0,9383 \cdot \bar{a} \cdot 100}{a \cdot \text{tg} \alpha_{\text{ст}} \cdot (100 - w)},$$

де: $a_{\text{ст}}$ – маса наважки РСЗ натрієвої солі бензилпеніциліну, г;

$\text{tg} \alpha_{\text{ст}}$ – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з РСЗ натрієвої солі бензилпеніциліну, хв^{-1} ;

a – маса наважки досліджуваного порошку натрієвої солі бензилпеніциліну, г;

\bar{a} – середня маса флакона, г;

w – втрата маси при висушуванні, %;

$\text{tg} \alpha$ – тангенс кута нахилу кінетичної кривої у досліді з досліджуваним розчином натрієвої солі бензилпеніциліну, хв^{-1} ;

0,9383 – коефіцієнт перерахунку натрієвої солі бензилпеніциліну в кислоту.

В и с н о в к и

1. Вивчено кінетику спряжених реакцій S-окиснення та пергідролізу за наявності калію пероксомоносульфату бензилпеніциліну в лужному середовищі.

2. Як аналітичний реагент для кінетико-спектрофотометричного визначення бензилпеніциліну запропоновано потрійну калійну сіль кислоти Каро («Оксон»).

3. Опрацьовано методику кількісного визначення натрію бензилпеніциліну у порошку для приготування розчину для ін'єкцій. $RSD \leq 2,0$ %. Результати аналізу препарату, одержані за новоопрацьованою та стандартною фармакопейною методиками, добре узгоджуються між собою ($\delta = +0,17\%$).

1. Блажеєвський М.Є. // Укр. хім. журн. – 2005. – Т. 71. – № 10. – С. 90–93.

2. Блажеєвський М.Є. // Фармац. журн. – 2003. – № 5. – С. 66–78.

3. Демская Е.В., Алексеев В.Г. // Вестник ТвГУ. – 2005. – № 2. Сер. хім. Вып. 8. – С. 177–179.

4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 3-тє вид. – Х.: РІРЕГ, 2008. – С. 285–289.

5. Зайцева К.В., Алексеев В.Г. // Вестник ТвГУ. – 2007. – № 2. Сер. хім. Вып. 3. – С. 112–115.

6. Туркевич М., Владзімірська О., Лесик Р. Фармацевтична хімія (стероїдні гормони, їх синтетичні замінники і гетероциклічні сполуки як лікарські засоби): Підручник. – 2003. – Вінниця: Нова книга, 2003. – 464 с.

7. Bruno F., Curini R., Corcia A. et al // J. Agric. Food. Chem. – 2001. – Vol. 49, №7. – P. 3463–3470.

8. Chico J., Rubies A., Centrich F. et al // J. Chromatogr. – 2008. – Vol. 1213, № 2. – P. 189–199.

9. European Pharmacopoeia. – 4th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2001. – P. 32.

10. Fernández-González A., Badía R., Díaz-García M. E. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 29, № 4. – P. 669–679.

11. Ferreira J., Straathof A., Li X. et al // Ind. and Eng. Chem. Res. – 2006. – Vol. 45, № 20. – P. 6740–6744.

12. Gremaud E., Mohamed R., Hammel Y. // J. Chromatogr. – 2008. – Vol. 1177, № 1. – P. 58–76.

13. Horimoto S., Mayumi T., Aoe K. et al // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 1093–1102.

14. Huang Cheng Zhi, Feng Ping, Li Yuan Fang // Anal. and Bioanal. Chem. – 2005. – Vol. 382, № 1. – P. 85–90.

15. Kaufmann A.I., Butcher P., Maden K. et al // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 1042, № 1. – P. 107–111.

16. Mendez-Alvarez E., Soto-Otero R., Sierra-Paredes G. et al // Biomed. Chromat. – 2009. – Vol. 5, № 2. – P. 78–82.

17. Nozal L., Arce L., Rhos A. // Anal. Chim. Acta. – 2004. – Vol. 523, № 1. – P. 21–28.

18. Rodante F., Vecchio S., Tomassetti M. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 29, № 8. – P. 613–614.

19. Wibawa J., Fowkes D., Shaw P. et al // J. Chromatogr. – 2002. – Vol. 774, №2. – P. 141–148.

20. Yoon K., Lee S., Kim W. et al // J. Chromatogr. – 2004. – Vol. 813, №1-2. – P. 121–127.

Надійшла до редакції 12.01.2011.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТРИЯ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА
В ПОРОШКЕ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

Ключевые слова: спектрофотометрия, бензилпенициллин, пероксомоносульфатная кислота, кинетический метод

Изучена кинетика сопряженных реакций S-окисирования и пергидролиза бензилпенициллина с пероксомоносульфатом калия в щелочной среде по светопоглощению образующегося продукта при 275 нм. Оптимизированы условия и разработана методика количественного определения бензилпенициллина натриевой соли в порошке для приготовления раствора для инъекций фотометрически-кинетическим методом с использованием в качестве реагента раствора тройной калиевой соли кислоты Каро («Оксон»). $RSD \leq 2,0 \%$. Результаты анализа препарата, полученные с помощью разработанной и стандартной фармакопейной методик, хорошо согласуются между собой ($\delta = +0,17\%$).

M.Ye.Blazheevskiy, S.P.Karpova

QUANTITATIVE ANALYSIS OF SODIUM BENZYL PENICILLINE SALT FOR PREPARATION
OF SOLUTIONS FOR INJECTIONS

Key words: spectrophotometry, benzylpenicilline, potassium peroxomonosulfate

S U M M A R Y

The kinetic of coupled reactions of S-oxidation and perhydrolysis of benzylpenicilline with potassium peroxomonosulfate in alkaline medium is studied by light absorbance increase of a forming product at 275 nm. The procedure of the quantitative analysis of sodium benzylpenicilline salt in powder by photometric-kinetic method is elaborated with using triple potassium Caro salt solution («Oxon») as a reagent. $RSD \leq 2,0 \%$. The results of analysis by the method developed and standard pharmacopoeic techniques have been conformed well ($\delta = +0,17\%$).