УДК 547.732:543.242.3:543.42.062:543.257
М. Є. БЛАЖЕЄВСЬКИЙ, д-р хім. наук, проф., Ю. Ю. ЛАБУЗОВА, аспірант
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

КІНЕТИЧНЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФАЗОЛІНУ ЗА ПРОДУКТОМ РЕАКЦІЙ ПЕРОКСОКИСЛОТНОГО ОКИСНЕННЯ ТА ПЕРГІДРОЛІЗУ

Ключові слова: калій гідрогенпероксомоносульфат, спектрофотометрія, цефазолін, кінетичний метод

Цефазоліну натрієва сіль *(Cefazolinum Natricum)* натрію (6R, 7R)-3-[(5-метил-1,3,4-тіадіазол-2-ил)тіометил]-8-оксо-7-[2-(1-Н-тетразол-1-ил)ацет-амідо] -5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксілат є похідним 7-амінодезацетоксицефалоспоранової кислоти (7-АДЦК). Він належить до напівсинтетичних цефалоспоринових β-лактамних антибіотиків широкого спектру дії І покоління. Застосовують цефазолін при інфекціях, що викликані чутливими до нього грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами. Його виробляють у вигляді натрієвої солі – білого ліофілізованого порошку у флаконах по 0,25, 0,5, 1, 2 та 4 г [2].

Вміст основної речовини в субстанції може бути визначений методом йодометрії, який засновано на попередньому лужному гідролізі з утворенням похідних 7-АДЦК. Продукти гідролізу окиснюють титрованим розчином йоду. Паралельно, за цих же умов, аналізують стандартний зразок препарату [3]. Описано різноманітні модифікації цього методу. Недоліком його є залежність величини титру від температури.

Для кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції та препаратах цефазоліну згідно з Державною Фармакопеєю України (ДФУ) та Європейською Фармакопеєю (ЄФ) використовують метод високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [1]. Порівняння точності та чутливості цих методів показало, що найкращі результати одержуються при використанні методу прямої УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ. Найменш надійним виявився метод йодометричного титрування [6]. Крім того, в науковій літературі для кількісного визначення цефазоліну описано застосування спектрофотометрії [9, 10], кінетичної спектрофотометрії [8], вольтамперометрії [5], флуориметрії [4] та високочутливого методу хемілюмінесценції [7, 11, 12].

Наше дослідження присвячено розробленню нової кінетичної спектрофотометричної методики кількісного визначення цефазоліну за продуктом двох спряжених реакцій пероксикислотного окиснення та пергідролізу в лужному середовищі. Як окисник використовували потрійну калієву сіль кислоти Каро, $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$ – «Оксон®», виробництва фірми DuPont. Активнодіючою речовиною її є калій гідрогенпероксомоносульфат, $KHSO_5$. Вибір реагента обумовлено його доступністю, задовільною розчинністю у воді, порівняно високою оксидаційною здатністю (E^0=1,8 В), а також достатньою стійкістю під час зберігання та застосування.

Об'єкти та методи дослідження

Як реагенти використовували 0,02 М розчин калій гідрогенпероксомоносульфату. Наважку близько 0,615 г потрійної калієвої солі кислоти Каро (Оксон® «extra pure», DuPont) розчиняли у 50 мл води *N* (згідно з ДФУ) в мірній колбі на 100 мл. Об'єм розчину доводили водою до позначки при 20 °С. Вміст $KHSO_5$ у виготовленому розчині визначали методом йодометричного титрування. Розчин гідроксиду натрію – 0,61 М.

Для дослідження використовували субстанцію цефазоліну натрію, яка відповідала вимогам ДФУ (вміст основної речовини 99,0 %; W_{H_2O}=4,89 %), та препарат цефазолін, порошок для приготування розчину для ін'єкцій по 1 000 мг у флаконах № 5,

© М. Є. Блажеєвський, Ю. Ю. Лабузова, 2012

виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я» (Харків, Україна), серійний номер 41008.

Електронні спектри знімали на спектрофотометрі SPECORD M-40, UV Vis (Цейс, Йєна, Німеччина). Кінетику реакцій вивчали спектрофотометрично на СФ-26 (ЛОМО, СРСР) за утворенням продукту реакції при 305 нм. Для вимірювання оптичної густини розчинів використовували кварцеву кювету з вбираючим шаром завтовшки l=1 см; розчини перед зливанням термостатували в термостаті UTU-2 (Zeamit, Horizont Krakow-Poland), час фіксували секундоміром, починаючи з моменту змішування розчинів.

Виготовлення розчину калій гідрогенпероксомоносульфату, $2\cdot10^{-2}$ М. 0,614 г «оксону» розчиняли у двічі дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл при 20 °С. Вміст калій гідрогенпероксомоносульфату в розчині контролювали методом йодометричного титрування. Як титрант використовували виготовлений із фіксаналу стандарт-титру 0,02 М розчин натрій тіосульфату. Для чого 10,00 мл досліджуваного розчину калій кароату переносили в мірну колбу на 100 мл, доводили об'єм двічі дистильованою водою до позначки при 20 °С і ретельно перемішували. За допомогою піпетки відбирали 10 мл одержаного розчину і переносили у конічну колбу для титрування, підкислювали 1 мл 0,05 М розчином сульфатної кислоти, додавали 1 мл 5 % розчину калій йодиду. Вивільнений йод відтитровували 0,02 М розчином натрій тіосульфату до зникнення жовтого забарвлення.

Методика вивчення кінетики реакції S-оксидування. За допомогою піпетки відбирали 10 мл 0,02 М розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і переносили в мірну колбу на 100 мл, додавали 5,0 мл 0,01 М розчину цефазоліну, вмикали секундомір, доводили об'єм колби дистильованою водою до 100,0 мл і ретельно перемішували. Через певні проміжки часу, які відраховували за секундоміром, за допомогою піпетки відбирали 10 мл одержаної суміші і переносили у конічну колбу для титрування, підкислювали 1 мл 0,1 М розчином сульфатної кислоти, додавали 1 мл 5 % розчину калій йодиду. Вивільнений йод відтитровували 0,02 М титрованим розчином натрій тіосульфату в присутності крохмалю. Як титрант використовували виготовлений із фіксаналу стандарт-титру 0,02 М розчин натрій тіосульфату.

Результати дослідження та обговорення

Встановлено, що окисно-відновна взаємодія відбувається кількісно та стехіометрично – на 1 моль кожного препарату витрачається 2 моль $KHSO_5$. Методом полярографії розчинів продуктів взаємодії цефазоліну з $KHSO_5$, взятих у молярному співвідношенні 1:1 та 1:2, було доведено послідовне утворення моносульфоксидів цефазоліну – за сульфуром дигідротіазинового (E_1=-0,935 В), а відтак тіометильного циклу (E_2=-0,470 В стосовно НКЕ). Сульфур тіадіазольного циклу виявився стійким до окиснення.

У лужному середовищі цефазоліну S-оксид піддається гідролітичному розщепленню з утворенням продукту, який поглинає на ділянці спектру

300–308 нм. На рис. 1. наведено кінетичну криву залежності світопоглинання за 305 нм лужного розчину цефазоліну S-оксиду від часу. На підставі одержаних результатів опрацьовано методики кількісного визначення цефазоліну в субстанції та його лікарській формі спектрофотометричним кінетичним методом (метод фіксованого часу).

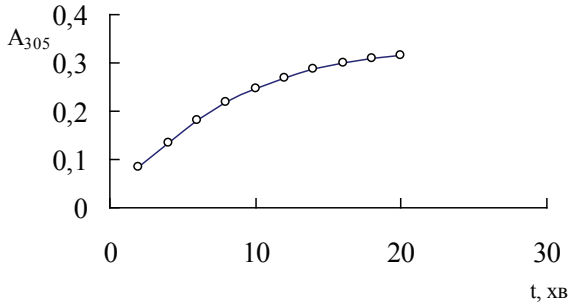

Рис. 1. *Кінетична крива залежності світопоглинання субстанції натрій цефазоліну від часу:* C (ЦФNa) = $1{,}2\cdot10^{-4}$ М, C ($KHSO_5$) = $4\cdot10^{-4}$ М, C (NaOH) = $2{,}4\cdot10^{-2}$ М

Побудова градуювального графіку. У мірні колби на 50 мл за допомогою мікробюретки послідовно відміряють 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 7,00; 8,00 мл розчину РСЗ цефазоліну натрію, додають в кожну при перемішуванні по 2,00 мл 0,02 М калій гідрогенпероксомоносульфату, 2,00 мл 0,61 М розчину натрій гідроксиду і доводять об'єм до позначки. Після приливання розчину лугу вмикають секундомір. Одержаний розчин фотометрують за 305 нм через 20 хв, використовуючи як компенсаційний розчин воду. Будують градуювальний графік залежності оптичної густини за 20 хв A_{20} від C у мкг/мл. В межах від 1,6 до 26,0 мкг/мл, A_{20} зберігає лінійний характер залежно від концентрації цефазоліну. Рівняння мало вигляд: A_{20}=0,016·C+0,01. Аналіз виконували кінетичним методом фіксованого часу (методом стандарту).

Методика кількісного визначення цефазоліну в субстанції. Близько 0,48 г (точна наважка) препарату переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 50 мл двічі дистильованої води, доводять об'єм розчину до позначки та перемішують. 10,00 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять двічі дистильованою водою до позначки при 20 °С і ретельно перемішують. У мірну колбу на 100 мл за допомогою піпетки вміщують 4,00 мл одержаного розчину, а далі виконують аналіз, як при одержанні даних для побудови градуювального графіку, починаючи зі слів: «…додають при перемішуванні 2,00 мл 0,02 М калій гідрогенпероксомносульфату…».

Вміст $C_{14}H_{13}N_8O_4S_3$, w, у % розраховують за формулою:

$$w = \frac{(A_{20} - a) \cdot M \cdot 10 \cdot V_0 \cdot 100}{b \cdot m_н (100 - w_{H_2O}) \cdot 1000 \cdot V_1} 100\%,$$

де A – оптична густина за 305 нм у робочому розчині;

a, b – сталі величини: вільний член (a) та кутовий коефіцієнт рівняння (b) градуювальної залежності $A = b \cdot C + a$ відповідно (де C – концентрація цефалексину, у мкг/мл); коефіцієнти рівняння лінії регресії: a=0,01, b=2570;

M – молярна маса цефазоліну натрію (476,5 г/моль); V_0 – об'єм мірної колби, мл; V_1 – узятий для аналізу об'єм розчину лікарської форми, мл; $m_н$ – маса наважки, г; 1 000 – перерахунок на мг.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення цефазоліну субстанції кінетичним методом фіксованого часу (n=5, P=0,95)

Взято, г	Знайдено цефазолін (субстанція)		Метрологічні характеристики
	г	%	
0,50035 (99,0%*)	0,5174 0,5051 0,4928 0,5051 0,4928	102,38 99,94 97,50 99,94 97,50	$\bar{x}$ = 0,5026(99,45%) S = 2,04 $S_{\bar{x}}$ = 0,91 $\Delta\bar{x}$ = 2,53 RSD = 2,05% ε = 2,55% δ == 0,46%

Примітка. *Вміст цефазоліну кислоти в субстанції у перерахунку на безводну речовину $C_{14}H_{13}N_8O_4S_3$ згідно з АНД 95,0 ≤ X ≥ 102,0%.

Виготовлення розчину РСЗ цефазоліну. Точну наважку 0,5004 г РСЗ цефазоліну переносили в хімічний стакан на 100 мл, розчиняли в 50 мл дистильованої води, фільтрували у мірну колбу місткістю 100 мл, об'єм розчину доводили до позначки та ретельно перемішували. 10,00 мл одержаного розчину переносили у мірну колбу

на 100 мл і доводили двічі дистильованою водою до позначки при 20 °С і ретельно перемішували.

Методика кількісного визначення цефазоліну в порошку для приготування ін'єкцій. Близько 0,6 г препарату переносили в хімічний стакан на 100 мл, розчиняли в 50 мл дистильованої води, фільтрували у мірну колбу місткістю 100 мл, об'єм розчину доводили до позначки та ретельно перемішували. У мірну колбу на 100 мл за допомогою піпетки вміщували 10,00 мл одержаного розчину (або розчину РСЗ цефазоліну), а далі виконували аналіз, як при одержанні даних для побудови градуювального графіку, починаючи зі слів: «…додають при перемішуванні 2,00 мл 0,02 М калій гідрогенпероксомносульфату…», з тією різницею, що як компенсаційний розчин використовували розчин сліпого досліду (усі компоненти за відсутності окисника).

Вміст цефазоліну у порошку для приготування ін'єкцій розраховували за формулою:

$$X_{мг/фл} = \frac{m_{ст} \cdot 0{,}897 \cdot A_п \cdot \overline{m}}{m_н \cdot A_{ст}},$$

де $m_{ст}$ – маса наважки стандарту, г;

$A_п$ – оптична густина визначуваного розчину препарату;

$\overline{m}$ – маса середня флакону, г;

$m_н$ – маса наважки визначуваного розчину препарату, г;

$A_{ст}$ – оптична густина стандартного розчину;

0,897 = 0,99·0,95·0,954; 0,99 – кількісний вміст цефазоліну натрію у субстанції, мас. частки; 0,95 – коефіцієнт перерахунку на безводну речовину; 0,954 – коефіцієнт перерахунку на цефазолін кислоту ($М_{(ЦФ\ к\text{-}та)}/М_{(ЦФ\ Na)}$).

Таблиця 2

Результати кількісного визначення цефазоліну в порошку для приготування розчину для ін'єкцій кінетичним методом фіксованого часу (n=5, P=0,95)

Взято, г	Знайдено цефазолін (препарат)		Метрологічні характеристики
	г	%	
0,50035 (99,0%*)	989,4 989,4 944,4 966,9 989,4	98,94 98,94 94,44 96,69 98,94	$\bar{x} = 975{,}9\ (97{,}59\%)$ $S = 20{,}13$ $S_{\bar{x}} = 9{,}00$ $\Delta\bar{x} = 24{,}98$ $RSD = 2{,}06\%$ $\varepsilon = 2{,}59\%$ $\delta == -1{,}42\%$

Примітка. *Вміст цефазоліну, вказаний у сертифікаті якості.

Нижня межа визначуваних концентрацій цефазоліну згідно розрахунків – 1,6 мкг/мл. Як видно з одержаних результатів, вміст цефазоліну у субстанції становить 99,45 % (RSD 2,05 % ; δ=0,46 %). У порошку для приготування ін'єкції вміст лікарської речовини знайдено 975,9 мг/фл (RSD= 2,06 % ; δ=–1,42 %).

Висновки

1. Вивчена кінетика та оптимізовані умови спряжених реакцій S-окиснення та пергідролізу цефазоліну за участю калій гідрогенпероксомоносульфату як аналітичного реагента.

2. Розроблені методики кількісного визначення цефазоліну в субстанції та порошку для приготування ін'єкції кінетичним спектрофотометричним методом фіксованого часу. Градуювальний графік зберігає лінійний характер в межах концентрацій 1,6–26 мкг/мл. Нижня межа концентрацій ($C_н$), що визначали, становить 1,6 мкг/мл. Відносне стандартне відхилення під час визначення цефазоліну у субстанції за градуювальним графіком – 2,05 % (правильность, δ=0,46 %), у порошку для приготування розчину для ін'єкцій методом стандарту – 2,06 % (δ=1,42 %).

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Державна фармакопея України/Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.

2. Компендиум 2009 – лекарственные препараты. В двух томах. / Под. ред. *В. Н. Коваленко, А. П. Вікторова. – К.:МОРИОН, 2009. – 2224 с.*

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

4. *Bedawy I. Lories, Kelani K. El, Fattah L. A. //* J. Pharm. and Biomed. Anal. – 2003. – V. 32. – № 6. – P. 1219–1225.

5. *El-Desoky H.S., Ghoneim M.M. //* J. Pharm. and Biomed. Anal. – 2005. – V. 39, № 5. – P. 1051–1056.

6. European Pharmacopoeia.- 6th ed. - Strasbourg: EDQM, 2007. – V. 1. – 1084 p.

7. *He Yun-Hua, Le Jiu-Ru, Zhu Xing-Hua, Du Jian-Xiu //* Huaxue xuebao. – Acta chim.sin. – 2005. – V. 63, № 8. – P. 729–733.

8. *Saleh Gamal A., El-Shaboury Salwa R., Mohamed Fardous A., and Rageh Azza H. //* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – № 73. – P. 946–954.

9. *Saleh G. A., Askal H. F., Darwish I. A., El-Shorbagi A.-N. A. //* Anal. Sci. – 2003. – V. 19, № 2. – P. 281–287.

10. *Saleh G. A., Askal H. F., Radwan M. F., Omar M. A. //* Talanta. – 2001. – V. 54, № 6. – P. 1205–1215.

11. *Sun Y. Y., Tang Y. H., Yao H., Zheng X. H. //* Talanta. – 2004. – V. 64. № 1. – P. 156–159.

12. *Yao H., Tang Ý., Li Y.,. Sun Y //* Anal. Lett. – 2003. – V. 36, № 14. – P. 2975–2983.

Надійшла до редакції 05.03.2012.

Н. Е. Блажеевский, Ю. Ю. Лабузова

КИНЕТИЧЕСКОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕФАЗОЛИНА ПО ПРОДУКТУ РЕАКЦИИ ПЕРОКСОКИСЛОТНОГО ОКИСЛЕНИЯ И ПЕРГИДРОЛИЗУ

Ключевые слова: калий гидрогенпероксомоносульфат, спектрофотометрия, цефазолин, кинетический метод

Р Е З Ю М Е

Изучена кинетика S-окисления цефазолина натрия в субстанции и порошке для приготовления инъекций с помощью калий гидрогенперксомоносульфата. Оптимизированы условия и разработана методика количественного определения цефазолина натрия в субстанции и препарате кинетическим спектрофотометрическим методом ($C_н$=1,6 мкг/мл, RSD=2,06 %).

M. Ye. Blazheevskiy, Yu. Yu. Labuzova

KINETIC SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CEFAZOLINE BY PEROXIDATION AND PERHYDROLYSIS REACTIONS PRODUCT

Key words: spectrophometry, cefazoline, potassium hydrogenperoxomonosulphate, kinetic method

S U M M A R Y

The kinetic of conjugated tractions of S-oxidation and perhydrolysis of cefazoline sodium in pure powder and powder for injection preparation in acidic medium was studied. Conditions were optimal and kinetic spectrophotometric method of quantitative analysis of cefazoline sodium pure powder and drug was developed ($C_н$=1.6 mcg/ml, RSD=2.06 %).