



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86515** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 31/00**  
**G01N 27/00**  
**G01N 33/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 12863</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Блажеєвський Микола Євстахійович (UA),</b> <b>Лабузова Юлія Юріївна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>12.11.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,</b> <b>вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2014, Бюл.№ 1</b>	

**(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ**

**(57) Реферат:**

Спосіб кількісного визначення цефалоспоринів включає дериватизацію випробуваного цефалоспорину шляхом обробки реагентом з подальшою реєстрацією полярограм одержаного розчину. Як реагент використовують розчин  $\text{KHSO}_5$  калій гідрогенпероксомоносульфат.

**UA 86515 U**



Корисна модель належить до аналітичної та фармацевтичної хімії, а саме - до способів визначення цефалоспоринів, та може знайти застосування для кількісного визначення зазначеної речовини у практиці центральних заводських лабораторій, хімічних і фармацевтичних підприємств, контрольно-аналітичних лабораторій та аптечних установ.

Цефалоспори́ни належать до групи напівсинтетичних беталактамних антибіотиків, широко використовується при лікуванні інфекційних захворювань, викликаних чутливими до нього мікроорганізмами. Завдяки високій ефективності та низькій токсичності, вони посідають одне з перших місць по частоті клінічного використання серед усіх антимікробних препаратів.

Відомий спосіб кількісного визначення цефалексину, який полягає у визначенні методом полярографії одного з продуктів гідролітичного препарату розщеплення у буферному розчині з рН 7,4 при 100 °С упродовж 1 години [Fogg A.G./ Differential pulse polarographic determination of cephalixin after hydrolysis in neutral phosphate buffer / A.G. Fogg, N.M. Fayad and R.N. Goyal //J. Pharm. Pharmacol. - 1980 - V. 32. - P. 302-303].

До недоліків даного способу можна віднести його складність та довготривалість, обумовлені необхідністю нагрівання до 100 °С впродовж однієї години.

Найбільш близьким за технічною суттю та досягнутому результату до способу, що заявляється, є спосіб кількісного визначення цефалексину методом адсорбційної вольтамперометрії у вигляді продукту його гідролізу на ртутному крапельному електроді [Li Q.L./ Studies on electrochemical behaviour of cephalixin / Q.L. Li, S.A. Chen // Anal. Chim. Acta. - 1993. - V. 282. - P. 145-152]. Гідроліз цефалексину проводили у 0,1 моль/л NaOH при 100 °С протягом 20 хв. Помітний пік відновлювання цефалексину був отриманий методом адсорбційної вольтамперометрії на фоні 0,1 моль/л NaOH з часом накопичення 60 с. Потенціал піку при - 0,80 В (щодо хлор срібного електроду Ag/AgCl). Сила струму піку лінійно залежить від концентрації цефалексину з межею виявлення від  $5,0 \times 10^{-10}$  М.

Недоліком даного способу є довготривалість та необхідність здійснення нагрівання.

Задача корисної моделі полягає у створенні способу кількісного визначення цефалоспоринів у вигляді їх похідних шляхом використання нового реагента за кімнатної температури.

Нами запропонований простий, швидкий, а також економічно вигідний спосіб здійснення кількісного визначення цефалексину та цефазоліну у субстанціях, який ґрунтується на попередньому окисненні препаратів у слабкокислому середовищі за допомогою калій гідрогенпероксомоносульфату у S-оксид (сульфоксид) та S,S'-діоксид (дисульфоксид) відповідно з подальшим визначенням їх методом осцилополярографії. Утворення сульфоксиду та дисульфоксиду у досліджуваних реакціях відбувається за рахунок електрофільної атаки β-атому кисню пероксидного угруповання пероксокислоти на атом сульфуру дигідротіазинового кільця, а також тіометильного сульфуру додатково у випадку цефазоліну.

Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою з джерел інформації.

Корисна модель дозволяє спростити процедуру виконання аналізу та скоротити час її здійснення.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Як робочий стандартний зразок (PC3) цефалексину використовували субстанцію цефалексину - Пурилекс), яка відповідала вимогам АНД (виробництва DMS Anti-infectives Chemferm S.A., Іспанія: сер. B425055; вміст основної речовини 100,9 %;  $w_{H_2O} = 6,2\%$ ).

Виготовлення розчину PC3 цефалексину,  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Точно взяту наважку 0,3654 г субстанції цефалексину з відомим вмістом основної речовини розчиняли у 100,00 мл дистильованої води. Розчин PC3 містить 3,474 мг цефалексину у перерахунку на безводну форму до 1 мл.

Вольтамперометричні дослідження проводили на осцилографічному полярографі ЦПА модель 03 у триелектродній термостатованій чарунці: індикаторний електрод, катод - ртутний крапельний електрод (PKE), електрод порівняння, анод - ртутний хлоридний (насичений каломельний) електрод (нас.к.е.), допоміжний електрод - платиновий. Значення потенціалів піків безпосередньо у максимумі вимірювали за допомогою іоніміру універсального ЭВ-74 з точністю  $\pm 5$  мВ. На електроди чарунки накладалась поляризуюча напруга з трикутною формою розгортки. Розчинений кисень усувався із досліджуваних розчинів пропусканням через них очищеного аргону протягом 15 хвилин. Швидкість розгортки поляризуючої напруги  $V=0,5$  В/с,  $E^{поч} = -0,2$  В,  $E^{кін} = -1,4$  В.

Як реагент-окисник використовували "Оксон®" - потрійну калійну сіль кислоти Каро ( $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$ ). Активніючою речовиною її кисла калійна сіль пероксомоносульфатної кислоти,  $KHSO_5$ , акт. кисень 4,5 %. Вибір реагенту обумовлений його високою окисдаційною здатністю ( $E^0=1,81$  В), доступністю і задовільною розчинністю у воді, а також достатньою стійкістю під час застосування та зберігання.

Виготовлення розчину калій гідрогенпероксомоносульфату,  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л. 0,683 г солі  $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$  розчиняли у двічі дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл. Вміст калій гідрогенпероксомоносульфату в розчині контролювали методом йодометричного титрування.

5 Робочі розчини цефалексину та калій гідрогенпероксомоносульфату отримували відповідним розбавленням вихідних двічі дистильованою водою.

Як титрант використовували виготовлений із фіксаналу стандарт-титру 0,02 моль/л розчин натрій тіосульфату. Для чого 10,00 мл досліджуваного розчину калій гідрогенпероксомоносульфату переносили в мірну колбу на 100 мл, доводили об'єм двічі  
10 дистильованою водою до позначки при  $+20^\circ\text{C}$  і ретельно перемішували. За допомогою піпетки відбирали 10 мл одержаного розчину і переносили у конічну колбу для титрування, підкислювали 1 мл 0,05 моль/л розчином сульфатної кислоти, додавали 1 мл 5 % розчину калій йодиду. Вивільнений йод відтитровували 0,02 моль/л розчином натрій тіосульфату до зникнення жовтого забарвлення.

15 Як фон використовували 0,1 моль/л ацетатний буферний розчин з pH 4,5.

Виготовлення 0,2 моль/л ацетатного буферного розчину з pH 4,5. 27,2 натрій ацетату тригідрату х.ч. розчиняли у 50 мл двічі дистильованої води і за допомогою 0,1 моль/л розчин хлоридної кислоти доводили pH до 4,5. Об'єм до 1000 мл доводили двічі дистильованою водою і ретельно перемішували.

20 Корисну модель здійснюють наступною послідовністю дій.

До водного розчину випробуваного цефалоспорину додають розчин калій гідрогенпероксомоносульфату і ретельно перемішують, потім додають ацетатний буферний розчин з відомим значенням pH, перемішують і реєструють полярограму на ртутному крапельному електроді на ділянці від -0,2 до 1,4 В (стосовно нас. каломельного електроду).  
25 Аналогічно виконують дослід з розчином робочого стандартного зразка. Вміст препарату розраховують методом стандарту (порівняння).

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. Методика кількісного визначення цефалексину у субстанції "Пурилекс" методом полярографії у вигляді S-оксиду цефалексину. Наважку 0,3654 г субстанції цефалексину "Пурилекс" розчиняють у 100,00 мл дистильованої води. До 10,00 мл одержаного розчину додають 10,1 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ретельно перемішують. У мірну колбу на 25 мл переносять 2,50 мл одержаної суміші, додають 12,5 мл 0,2 моль/л ацетатного буферного розчину, доводять об'єм дистильованою водою при  $20^\circ\text{C}$  до позначки і ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають 5,0 мл одержаного розчину і переносять у мірну колбу на 50 мл, додають 25 мл 0,2 моль/л ацетатного буферного розчину з pH 4,5, доводять об'єм до позначки дистильованою водою при  $20^\circ\text{C}$  і ретельно перемішують. Розчин переносять у електролізер і реєструють вольтамперограму в інтервалі від -0,2 до -1,4 В (нас. к.е.). Аналогічно виконують визначення з розчином РС3 цефалексину (3,654 мг у перерахунку на безводну форму  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ /мл). Вимірюють висоти піків полярограм у мм  
40 ( $E_{\text{н}} = -0,80$  В) і перераховують на силу струму, у мкА.

Методика отримання результатів для побудови градувального графіка. До 10,00 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  розчину РС3 цефалексину додають 10,00 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ретельно перемішують. У мірну колбу на 25 мл послідовно вносять відповідні аліквоти: 0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00 мл одержаного розчину, додають 12,5 мл 0,2 моль/л ацетатного буферного  
45 розчину, доводять до позначки двічі дистильованою водою і ретельно перемішують. Розчини переносять почергово у електролізер, видаляють розчинений кисень і реєструють вольтамперограми, починаючи з  $E^{\text{поч}} = -0,20$  В до  $E^{\text{кін}} = -1,40$  В (відн. нас.к.е.).

За даними висот піків при -0,80 В на полярограмах будують залежність сили струму I, у мкА, від концентрації цефалексину C, у моль/л (графік 1 - Градувальний графік кількісного визначення цефалексину у вигляді S-оксиду. pH=4.5 (0.1 моль/л  $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ );  $E = -0,80$  В (нас.к.е.)).

Концентраційна залежність сили струму піків на полярограмах при -0,80 В зберігає лінійну функцію від концентрацій аналізу в межах  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Вміст цефалексину X, у %, розраховують за формулою:

$$55 \quad X = \frac{m_{\text{см}} \cdot I \cdot 100}{m_{\text{н}} \cdot I_{\text{см}}}$$

де  $m_{\text{см}}$  - вміст основної речовини у перерахунку на безводну форму цефалексину у РС3, г;

I - сила струму (або висота піку, у мм) у робочому досліді, мкА;

$I_{\text{см}}$  - сила струму (або висота піку, у мм) у досліді з розчином РС3, мкА;

$m_n$  - наважка порошку випробуваної субстанції, г;

Результати кількісного визначення цефалексину моногідрату у субстанції наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення цефалексину у субстанції "Пурилекс" у вигляді S-оксиду цефалексину

Взято субстанції "Пурилекс", г	Знайдено цефалексину, $C_{16}H_{17}N_3O_4S$		Метрологічні характеристики ( $P=0,95$ ; $n=5$ )
	г	%	
0,3654 ( $100,9^{+2,0}_{-3,0} \%$ )*	0,3551 0,3474 0,3358 0,3474 0,3281	102,22 100,00 96,66 100,00 94,44	$\bar{X} = 0,3428 (98,7\%)*$ $S = \pm 1,07 \cdot 10^{-2}$ $S\bar{X} = \pm 4,79 \cdot 10^{-3}$ $\Delta\bar{X} = \pm 1,33 \cdot 10^{-2}$ $RSD = 3,12 \%$ $\varepsilon = \pm 3,88 \%$ $\delta = -0,46 \%$

Примітка: \* Розрахунок здійснений за даними середнього вмісту, знайденого за допомогою референтного методу (ДФ України, Доповнення 2, 2008)

5 Як видно з отриманих результатів аналізу наведених у табл. 1, під час визначення  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л цефалексину у субстанції граничне значення довірчого інтервалу середнього результату становить  $0,3428 \pm 1,33$ , відносне стандартне відхилення  $RSD \leq 3,12 \%$  при правильності  $\delta = -0,46 \%$ . Отже, заявлений спосіб за метрологічними характеристиками відповідає вимогам

10 Державної Фармакопеї України щодо валідаційних показників.  
Приклад 2. Для дослідження використовували субстанцію цефазоліну натрію, яка відповідала вимогам ДФУ (вміст основної речовини 99,0 %;  $w_{H_2O} = 4,89 \%$ ), та препарат

15 цефазолін (порошок для приготування розчину для ін'єкцій по 1000 мг у флаконах № 5, виробництва ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я" (Харків, Україна), серійний номер 41008).  
Виготовлення розчину РСЗ цефазоліну,  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Точну наважку 0,5004 г РСЗ

20 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 переносять у мірну колбу на 100 мл і додавають двічі дистильованою водою до позначки при 20 °C і ретельно перемішують.  
Встановлено, що окисно-відновна взаємодія відбувається кількісно та стехіометрично: на 1

25 моль цефалексину та цефазоліну витрачається відповідно 1 та 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 (лактамового) циклу ( $E_1 = -0,935$  В), а відтак тіометильного замісника ( $E_2 = -0,470$  В стосовно НКЕ). Сульфур тіадіазольного циклу виявився стійким до окиснення.

30 Розчин РСЗ цефазоліну натрієвої солі,  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Наважку 0,5061 г субстанції цефазоліну розчиняли у мірній колбі на 100 мл у 80 мл двічі дистильованої води і доводили об'єм до позначки при 20 °C.  
Розчин калій гідрогенпероксомоносульфату,  $1,8 \cdot 10^{-2}$  моль/л. 0,615 г солі

35  $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$  розчиняли у двічі дистильованій воді в мірній колбі місткістю 100 мл. Вміст калій гідрогенпероксомоносульфату в розчині контролювали методом йодометричного титрування.  
Побудова градувального графіка. До 10,00 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчину РСЗ цефазоліну додавали 11,2 мл  $1,8 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ретельно перемішували. У мірну колбу на 50 мл вносили 5,00 мл отриманої суміші і доводили об'єм розчину до позначки двічі дистильованою водою і ретельно перемішували. У п'ять мірних колби на 25 мл послідовно вносили по 2,00 мл 0,2 М  $CH_3COONa$ , потім відповідні аліквоти 0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00 мл отриманого розчину S,S' - діоксиду цефазоліну  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, додавали 12,5

40 мл ацетатного буферного розчину з  $pH=4,5$  та доводили об'єм до позначки двічі дистильованою

водою. Далі розчини переносили почергово у електролізер, видаляли розчинений кисень і реєстрували вольтамперограми, починаючи з  $E^{поч} = -0,20$  В до  $E^{кін} = -1,40$  В (НКЕ).

За даними висот піків при  $-0,935$  В на полярограмах будували залежність сили струму  $I$ , у мкА, від концентрації цефазоліну  $C$ , у моль/л (графік 2 - Градуювальний графік кількісного визначення цефазоліну у вигляді  $S, S'$ -діоксиду.  $0,2$  моль/л  $CH_3COONa$ ,  $pH=4,5$  ( $E=-0,92В$ )).

На графік 2 наведена концентраційна залежність сили струму піків на полярограмах. Як видно вона є лінійною функцією від концентрації аналіту в межах  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  моль/л, це дозволяє виконувати подальші визначення методом стандарту.

Методика кількісного визначення цефазоліну у субстанції методом полярографії у вигляді  $S, S'$ -діоксиду цефазоліну. Наважку  $0,5000$  г субстанції цефазоліну розчиняють у  $100,00$  мл дистильованої води. До  $10,00$  мл одержаного розчину додають  $5,5$  мл  $1,8 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і ретельно перемішують. У мірну колбу на  $25$  мл переносять  $2,50$  мл одержаної суміші, додають  $2,0$  мл  $0,4$  моль/л ацетатного буферного розчину, доводять об'єм дистильованою водою при  $20^\circ C$  до позначки і ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають  $5,0$  мл одержаного розчину і переносять у мірну колбу на  $50$  мл, додають  $25$  мл  $0,2$  моль/л ацетатного буферного розчину з  $pH 4,50$ , доводять об'єм до позначки дистильованою водою при  $20^\circ C$  і ретельно перемішують. Розчин переносять у електролізер і реєструють вольтамперограму в інтервалі від  $-0,2$  до  $-1,4$  В (нас. к.е.). Розчин переносять у електролізер і реєструють вольтамперограму ( $E_n = -0,935$  В). Аналогічно виконують визначення з розчином РСЗ цефазоліну. Вимірюють висоти піків полярограм у мм і перераховують на силу струму, у мкА.

Вміст цефазоліну  $X$ , у %, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_{cm} \cdot W \cdot I \cdot 100 \%}{m_n \cdot I_{cm} \cdot 100 \%}$$

де  $m_{cm}$  - маса наважки РСЗ цефазоліну, г;

$W$  - вміст основної речовини у РСЗ цефазоліну натрієвої солі, %

$I$  - сила струму у робочому досліді, мкА;

$I_{cm}$  - сила струму у досліді з розчином РСЗ, мкА;

$m_n$  - наважка порошку випробуваної субстанції, г;

Результати кількісного визначення цефазоліну у субстанції наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення цефазоліну у субстанції

Взято субстанції, %	Знайдено цефазоліну субстанції, %	Метрологічні характеристики ( $P=0,95$ ; $n=5$ )
99,00	96,26	$\bar{X} = 96,66 \%$
	92,25	$S = \pm 2,98$
	96,26	$S\bar{x} = \pm 1,33$
	98,27	$\Delta \bar{X} = \pm 3,7$
	100,28	$RSD = 3,08 \%$
		$\epsilon = \pm 3,83 \%$
		$\delta = -2,36 \%$

Вміст основної речовини встановлено за фармакопейною методикою Великобританії, 2009.

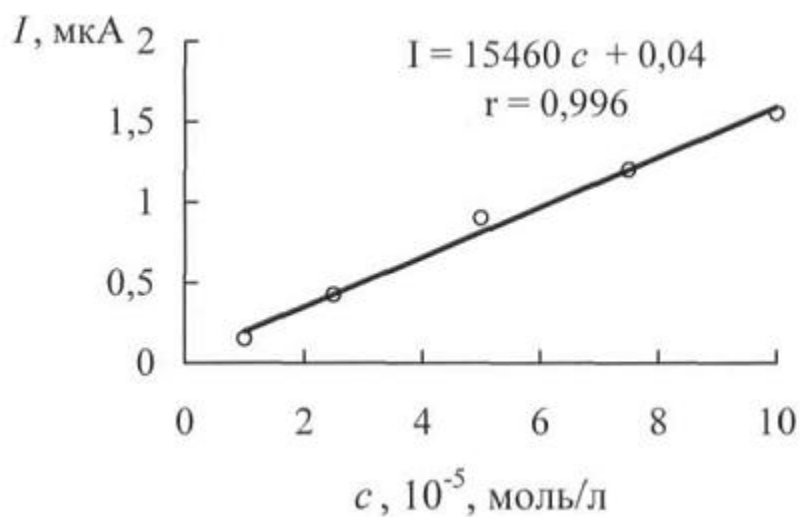
Як видно з отриманих результатів аналізу наведених у табл. 2, під час визначення  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л цефазоліну у субстанції граничне значення довірчого інтервалу середнього результату становить  $96,66 \pm 3,7$ , відносне стандартне відхилення  $RSD \leq 3,08 \%$  при правильності  $\delta = -2,36 \%$ . Отже, заявлений спосіб за метрологічними характеристиками відповідає вимогам Державної фармакопеї України щодо валідаційних показників.

Загальні висновки:

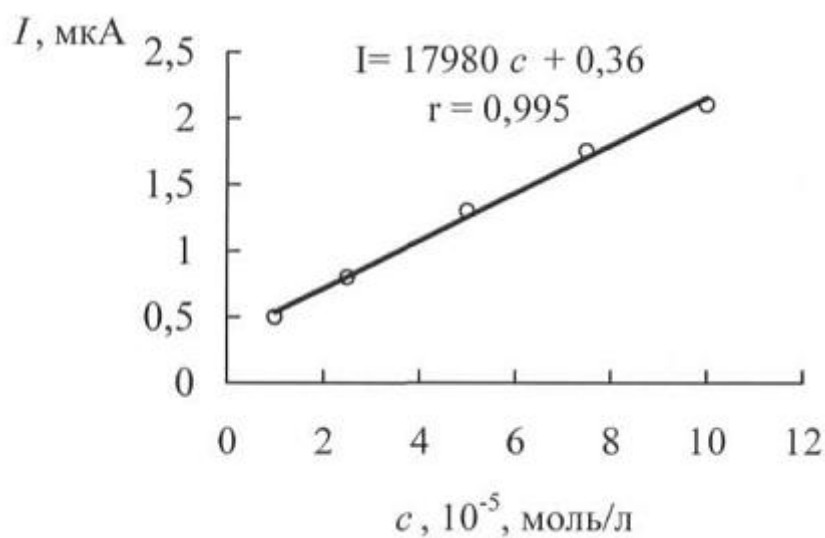
Таким чином, заявлено новий спосіб кількісного визначення цефалоспоринов, який дозволяє спростити процедуру виконання аналізу, а також значно скоротити час його здійснення. Спосіб може бути застосований у роботі контрольно-аналітичних та хіміко-токсикологічних лабораторій.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб кількісного визначення цефалоспоринів, що включає дериватизацію випробуваного цефалоспориноу шляхом обробки реагентом з подальшою реєстрацією полярограм одержаного розчину, який **відрізняється** тим, що як реагент використовують розчин  $\text{KHSO}_5$  калій гідрогенпероксомоносульфат.



Графік 1



Графік 2

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601