

## Metodă HPLC simplă și rapidă, pentru determinarea simultană a benzilpenicilinei de potasiu, sulfatului de streptomycină, a substanțelor înrudite chimic și a produsilor de degradare din Ascomicin, unguent pentru uz veterinar

### Simple and rapid method on High Performance Liquid Chromatography for simultaneous determination of benzylpenicillin potassium, streptomycin sulphate and related substances in Ascomicin – a veterinary use ointment

Neagu Maria, Soceanu Georgiana, Bucur Ana Caterina  
Departamentul Cercetare-Dezvoltare, SC Pasteur Filipești, București, România

Corespondenta: [maria.neagu@pasteur.ro](mailto:maria.neagu@pasteur.ro)

**Cuvinte cheie:** benzilpenicilina de potasiu, sulfat de streptomycină, HPLC, validare.

**Key words:** benzylpenicillin potassium, streptomycin sulphate, HPLC, validation.

#### Rezumat

Metoda cromatografică HPLC prezentată este o metodă nouă, puțin costisitoare și rapidă, pentru determinarea benzilpenicilinei de potasiu și a sulfatului de streptomycină, în unguentul pentru uz veterinar, Ascomicin. Metoda poate fi utilizată pentru identificarea substanțelor active și cuantificarea impurităților cunoscute și necunoscute și a produsilor de degradare, în timpul analizelor de rutină, dar și pe parcursul studiilor de stabilitate pentru produsul finit Ascomicin. Metoda a fost validată, și s-a demonstrat că este exactă, precisă, selectivă/specifică, robustă, și îndeplinește criteriile impuse de ghidul ICH pentru limita de detecție, și respectiv pentru limita de cuantificare. Determinările au fost efectuate utilizând aparatul HPLC Waters 2695. Condițiile cromatografice au fost următoarele: coloană C18 (5 μm dimensiunea particulelor, 250 mm x 4.6 mm i.d.). Fază mobilă constă într-un amestec de soluție de fosfat dibazic de sodiu 0.025 M și hexansulfonat de sodiu 0.02 M, ajustat la pH 6.0 cu o soluție de acid orto-fosforic, și acetonitril, cu eluție în gradient. Debitul a fost de 0.8 ml/min. Metoda prezintă linearitate în domeniul de concentrații de 5.00 μg/ml până la 5.00 mg/ml pentru sulfatul de streptomycină și 3.26 μg/ml până la 3.26 mg/ml pentru benzilpenicilină de potasiu. Evaluările statistice au dovedit că această metodă este precisă, reproductibilă, selectivă, specifică și exactă.

#### Abstract

A new simple, rapid, accurate and precise high – performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of benzylpenicillin potassium and streptomycin sulphate in Ascomicin ointment was developed and validated. The method can be used for the detection and quantification of known and unknown impurities and degradation products in this pharmaceutical product during routine analysis and also for stability studies in view of its capability to separate degradation products. The method was validated for accuracy, precision, specificity, robustness and quantification limits according to ICH Guidelines. The estimation of benzylpenicillin potassium and streptomycin sulphate was done by Waters HPLC 2695. The chromatographic conditions comprised a reverse-phased C18 column (5 μm particle size, 250 mm×4.6 mm i.d.) with a mobile phase consisting of a mixture of solution in water containing 0.025 M of sodium phosphate dibasic and 0.02 of sodium hexansulfonate adjusted to pH 6.0 with 22.5 g/l solution of phosphoric acid and acetonitrile in gradient elution. The flow rate was 0.8 ml/min. Standard curves were linear over the concentration range of 5.00 μg/ml to 5.00 mg/ml for streptomycin sulphate and 3.26 μg/ml to 3.26 mg/ml for benzylpenicillin potassium. Statistical analyses proved the method was precise, reproducible, selective, specific and accurate for analysis of benzylpenicillin potassium, streptomycin sulphate and related substances.

#### 1. Introducere

Benzilpenicilina de potasiu, K  
(2S,5R,6R)-3,3-dimetil-7-oxo-6-

**[[fenilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo-[3.2.0]-heptan-2-carboxilat** este indicata la începutul tratamentului infecțiilor severe induse de patogeni sensibili la penicilină.

Este un ingredient farmaceutic activ utilizat pentru tratamentul pneumoniei și al altor infecții induse de pneumococi (cu excepția enterococilor), în meningitele pneumococice (combinat cu sulfonamide), infecții induse de streptococi piogenici, stafilococul auriu, gonococi și meningococi dar și în antrax și difterie.

**Sulfatul de streptomicină, 5-(2,4-diguanidino-3,5,6-trihidroxi-ciclohexoxi)-4-[4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-metilamino-tetrahidropiran-2-yl]oxi-3-hidroxi-2-metil-tetrahidrofuran-3-carbaldehida** este un antibiotic, primul descoperit din clasă aminoglicozidelor, și primul tratament pentru tuberculoză.

Este un derivat din actinobacteria *Streptomyces griseus*, dar poate fi obținut și prin alte metode.

Streptomicină este un antibiotic, bactericid, dar este de asemenea folosit pentru a combate creșterea bacteriilor, fungilor și a algelor. Streptomicina controlează bolile bacteriene și fungice la fructe, culturile de legume și seminte.

Au fost publicate câteva lucrări care propun metode HPLC pentru identificarea, dozarea și controlul impurităților pentru sulfatul de streptomicină folosind detecție UV [1, 2], fluorescență [3, 4] și spectrometrie de masă [5, 6, 7].

De asemenea, pentru benzilpenicilină de potasiu au fost publicate câteva lucrări pentru identificare, dozarea și controlul impurităților folosind detecție UV [8, 9].

Dar nu am găsit nici o metodă HPLC pentru determinarea lor simultană într-un unguent farmaceutic. Metoda a fost validată pentru: **exactitate, precizie, specificitate, robustețe și linearitate**, au fost determinate **limite de identificare și de cuantificare** conform ghidului ICH [10, 11].

**Scopul acestei lucrări** este de a dezvolta o metodă exactă, specifică, reproductibilă pentru determinarea sulfatului de streptomicină și a

benzilpenicilinei de potasiu, a impuritatilor inrudite chimic, al produsilor de degradare, din matricea unui unguent, Ascomicin, în aceleași condiții cromatografice, și simultan.

## 2. Materiale și Metode

### 2.1. Substanțe și reactivi

Sulfatul de streptomicină și benzilpenicilină de potasiu folosite provin de la EDQM. Acetonitrilul, hexansulfonatul de sodiu și fosfatul dibazic au fost achiziționate de la Merck.

### 2.2. Condițiile cromatografice

Echipamentul utilizat a fost HPLC Waters 2695 cu detector Waters 2696 PDA.

Coloana folosită a fost Thermo BSD Hypersil-C18, 250mm x 4.6mm cu dimensiunea particulelor de 5 μm.

Separarea cromatografică a fost realizată la 30 °C, folosind o fază mobilă formată din solvent (A) (fosfat dibazic de sodiu 0.025 M și hexan sulfonat de sodiu 0.02 M, ajustarea la pH 6.0 ±0.01 a fost făcută cu o soluție de acid o-fosforic 22.5g/L) și solvent (B) acetonitril.

Eluția în gradient a fost efectuată de la 0 la 27 minute 90% A; 27-35 minute 80% A; 35-40 minute 90% A; 40-45 minute 90% A.

Debitul a fost păstrat la 0.8 mL/min iar detecția s-a efectuat la 205 nm pentru sulfatul de streptomicină și impuritățile sale și 225 nm pentru benzilpenicilină de potasiu și impuritățile sale.

Volumul de injecție a fost 10 μL în toate testele.

### 2.3. Validarea metodei

Parametrii studiați pentru validarea metodei au fost: limita de detecție (LOD), limita de cuantificare (LOQ), linearitate, exactitate, precizie, repetabilitate, robustețe și specificitate/selectivitate.

Limita de cuantificare (LOQ) a fost definită ca cea mai joasă concentrație care se poate determina cu exactitate și precizie dorite. Limitele de cuantificare și detecție au fost stabilite prin răspunsul semnal zgomot.

Pentru trasarea curbei de calibrare au fost preparate cinci soluții standard de calibrare pentru dozare și cinci soluții standard de calibrare pentru puritate.

Precizia și repetabilitatea au fost demonstrate prin dozarea a șase probe replicate în ziua-1 și ziua-2.

Exactitatea a fost evaluată prin determinarea cantității de produs recuperate în urma prelucrării probei.

Specificitatea a fost evaluată prin degradarea probelor.

Probele au fost supuse degradării în mediu acid, bazic, oxidant și la temperatura.

## 2.4. Prepararea soluțiilor

### Prepararea standardului

A fost preparată o soluție standard pentru dozarea sulfatului de streptomycină și a benzilpenicilinei de potasiu prin transferarea exactă a 16.3 mg benzilpenicilină de potasiu și a 25.0 mg sulfat de streptomycină într-un balon cotat de 10 ml.

Soluția standard pentru puritate a fost obținută prin diluarea soluției standard pentru dozare pentru a ajunge la concentrația finală de 16.3 μg/mL pentru benzilpenicilină de potasiu și 25.0 μg/mL pentru sulfatul de streptomycină.

### Prepararea probei

Proba a fost preparată prin cântărirea exactă a produsului farmaceutic într-un flacon Erlenmayer și adăugarea a 25 mL cloroform.

Se vortexează până la dizolvarea completă a parafinei și se adaugă 5.0 mL de apă de cinci ori și de agită de fiecare dată.

Se separă fază apoasă și se filtrează folosind un filtru de membrană de 0.45 μm.

## 3. Rezultate și discuții

### 3.1. LOD și LOQ

Rezultatele au arătat că limita de detecție (LOD) a fost de 1.00 μg / mL pentru benzilpenicilina K de de 1.52 μg / mL pentru sulfat de streptomycină.

Limita de cuantificare (LOQ). Calculate, acestea au fost de 3.264 μg / mL pentru benzilpenicilină și de 5.004 μg / mL pentru sulfat de streptomycină.

### 3.2. Linearitate

S-a demonstrat ca metoda este lineară pe intervalul de concentrații testat. Tabel 1.

**Tabelul 1**

Linearitatea metodei

Sustanța activă	Coeficient de corelație (r <sup>2</sup> )	
	Soluția analizată	Puritatea soluției
Benzilpenicilin potasiu	0.999	0.999
Streptomycin sulphate	0.999	0.999

Coeficienții de corelare între concentrațiile soluțiilor și răspunsul detectorului a fost de 0.9998 pentru dozarea benzilpenicilinei de potasiu și 0.9996 pentru dozarea sulfatului de streptomycină și 0.9998 pentru puritatea benzilpenicilinei de potasiu și sulfatului de streptomycină.

### 3.3. Exactitatea

Exactitatea a fost evaluată prin determinarea cantității de substanță recuperate (randamentului de recuperare). Exactitatea metodei a fost determinată prin adăugarea de substanță de referință CRS (EDQM) de benzilpenicilină de potasiu și sulfatul de streptomycină în placebo pentru a obține soluții cu concentrații de: 80%, 100% și 120% din concentrația urmărită, pentru fiecare compus, atât în cazul soluțiilor utilizate pentru determinarea impurităților inerente chimic/ produși de degradare cât și în cazul soluțiilor pentru dozare.

Rezultatele au arătat că recuperarea a fost între 99.1-101.8 pentru benzilpenicilină de potasiu și 98.0-100.6 pentru sulfatul de streptomycină, în cazul probelor de dozare.

Pentru puritate, randamentul de recuperare a fost între 99.7-102.5 pentru benzilpenicilină de potasiu și 98.2-103.3 pentru sulfatul de streptomycină.

Recuperarea absolută a fost determinată în triplu prin compararea directă a ariilor picurilor standardelor versus probe. Rezultatele obținute au fost analizate statistic, prin calcularea deviației relative standard.

### 3.4. Precizia

Precizia a fost măsurată din punct de vedere al repetabilității. Pentru a evalua capacitatea metodei de a produce rezultate similare la teste repetitive pentru o concentrație dată, au fost testate separat șase probe individuale pentru sulfatul de streptomycină și benzilpenicilină de potasiu.

Metoda a dovedit ca permite obtinerea de rezultate care se reproduc, deviația relativă standard obtinuta fiind una foarte mică pentru cei doi compuși. Precizia intermediară a metodei a fost efectuată pentru șase probe diferite, preparate de un alt analist, într-o altă zi. Valoarea deviației standard relative a fost sub 2% pentru ambii compuși. S-a stabilit precizia intermediară a metodei. Principalele cromatograme sunt prezentate în **Figurile 1-11**.

**Tabelul 2**

Precizia metodei pentru benzilpenicilina de potasiu și sulfat de streptomycină

Matrice	Repetabilitate, % RSD	Precizie intermediară, % RSD
Benzilpenicilină de potasiu	1.1	0.4
Sulfat de streptomycină	0.2	0.5

### 3.5. Specificitate

Specificitatea metodei a fost demonstrata, prin analizarea probelor de produs reconstituit, supuse unor condiții de stres. Specificitatea a fost investigată pentru a demonstra că nu există interferențe între excipienți, substanțe active și produsii de degradare care pot apărea în probe. Probele în condiții de stres sunt evaluate prin comparatie cu o proba de control, în funcție de test, dozare respectiv puritate. Prezența altor ingrediente în

formulare nu a cauzat interferențe cu sulfatul de streptomycină și cu benzilpenicilină de potasiu și respectiv, impuritățile inrudite chimic ale acestora.

### 3.6. Robustețea

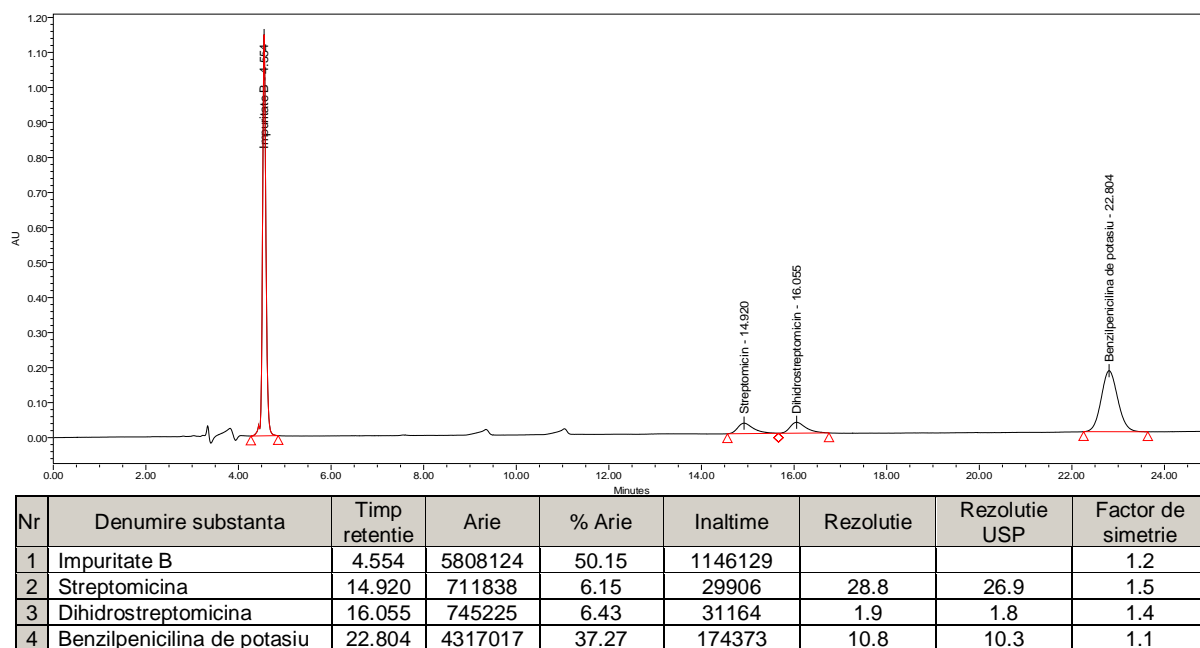
Robustețea metodei a fost determinată prin analizarea standardelor în condiții de operare normale dar și prin schimbarea unor condiții analitice cum ar fi, compoziția fazei mobile și debitul fazei mobile, alta coloana cromatografică, etc.

Rezultatele obținute au arătat că metoda este robustă.

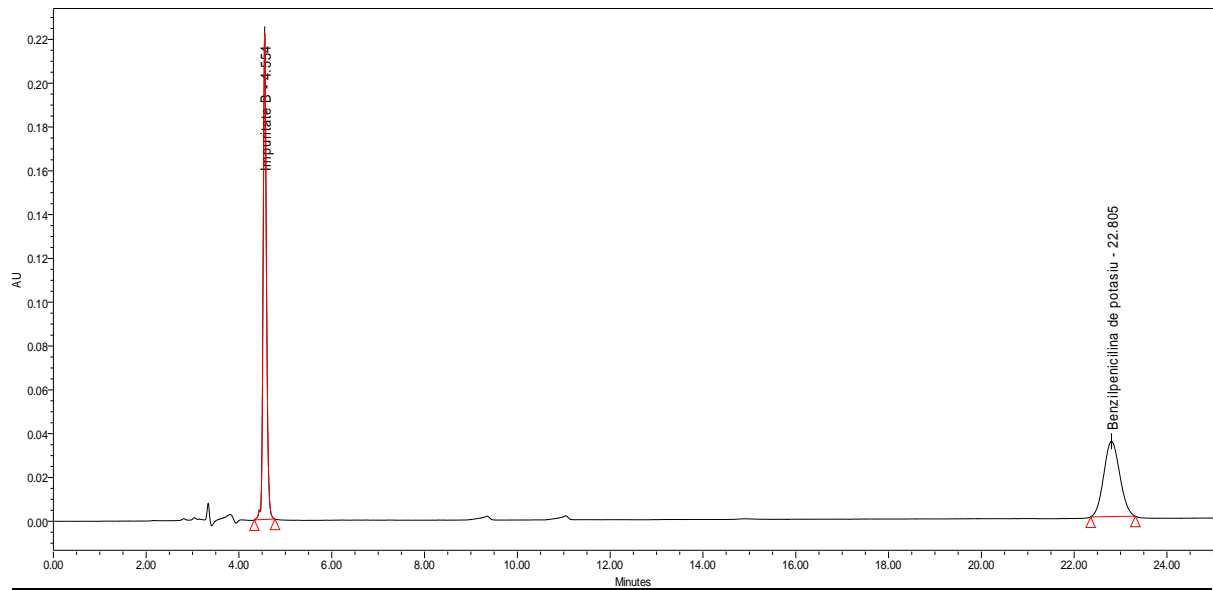
### Concluzie

Scopul acestui studiu a fost de a dezvolta o metodă HPLC selectivă și sensibilă pentru determinarea rapidă a sulfatului de streptomycină și a benzilpenicilinei de potasiu în aceleași condiții cromatografice, simultan, o metoda rapida si puțin costisitoare de analiza a produsului finit Ascomicin-unguent pentru uz veterinar. Metoda propusă este rapidă, exactă, reproductibilă, specifică și robustă.

Această metodă a fost aplicată pentru analiza produsului medicamentos Ascomicin în formularea farmaceutică pusă pe piață și poate fi folosită pentru analiza acestui produs în momentul punerii pe piață dar se pe perioada de valabilitate a acestuia.

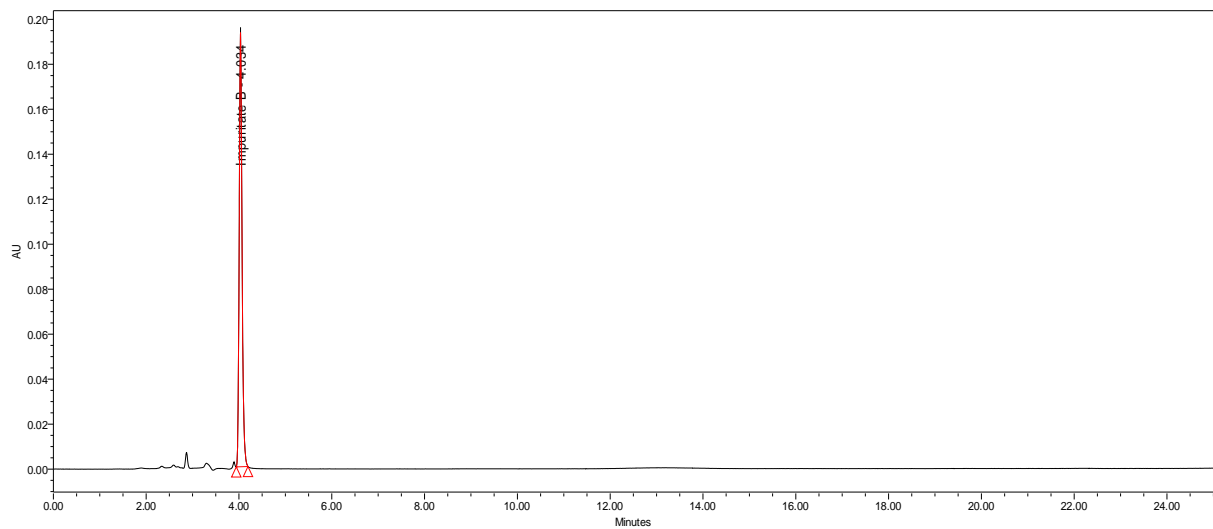


**Fig. 1.** Cromatograma reprezentativa pentru Solutia de testare a sistemului cromatografic la 205 nm

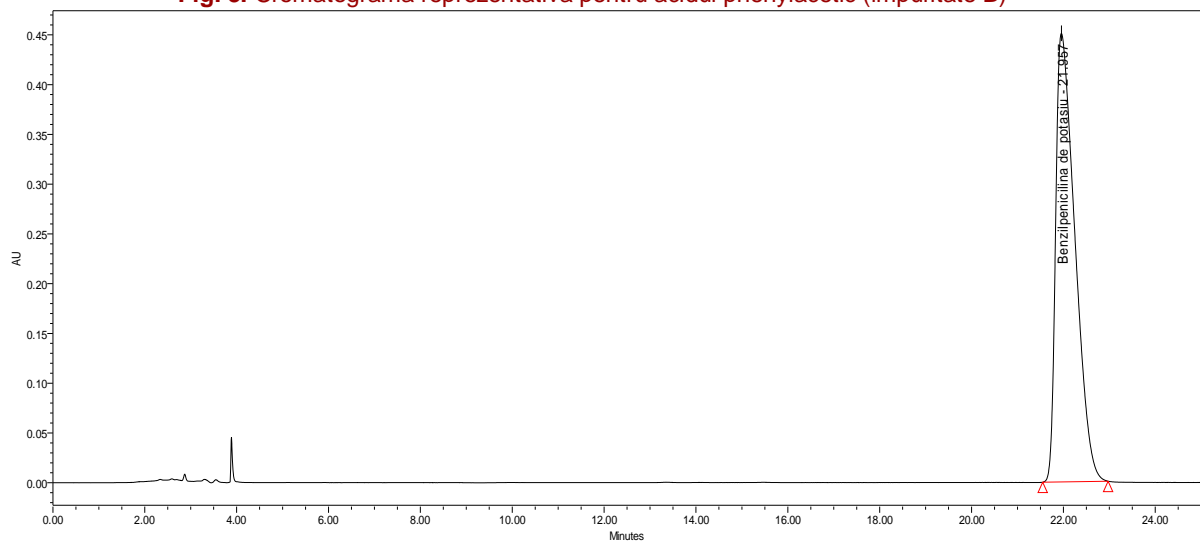


	Name	Migration Time	Area	% Area	Height	Resolution	USP Resolution	Symmetry Factor
1	Impuritate B	4.554	1109979	57.42	222047			1.2
2	Benzilpenicilina de potasiu	22.805	823001	42.58	34421	47.9	46.5	1.1

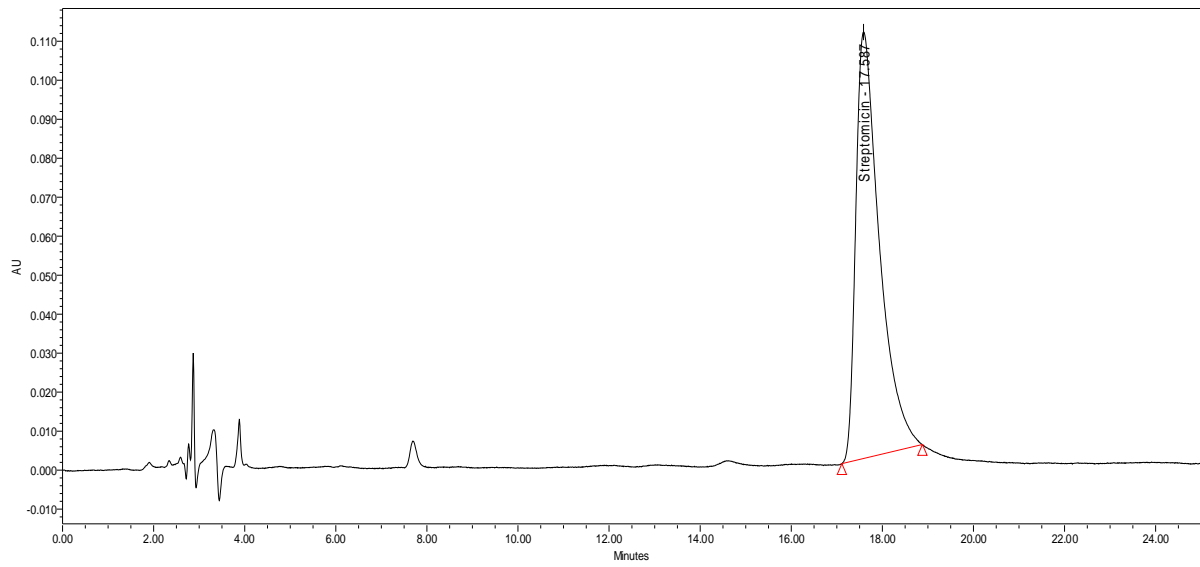
**Fig. 2.** Cromatograma reprezentativa pentru Testarea Sistemului cromatografic la 225 nm



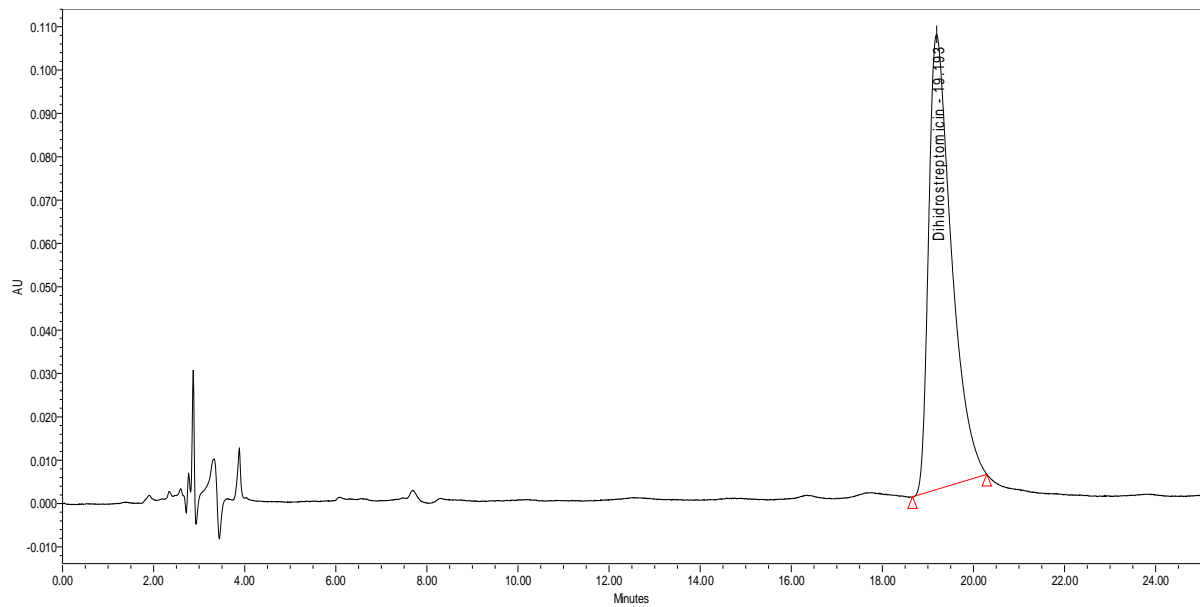
**Fig. 3.** Cromatograma reprezentativa pentru acidul phenylacetic (impuritate B)



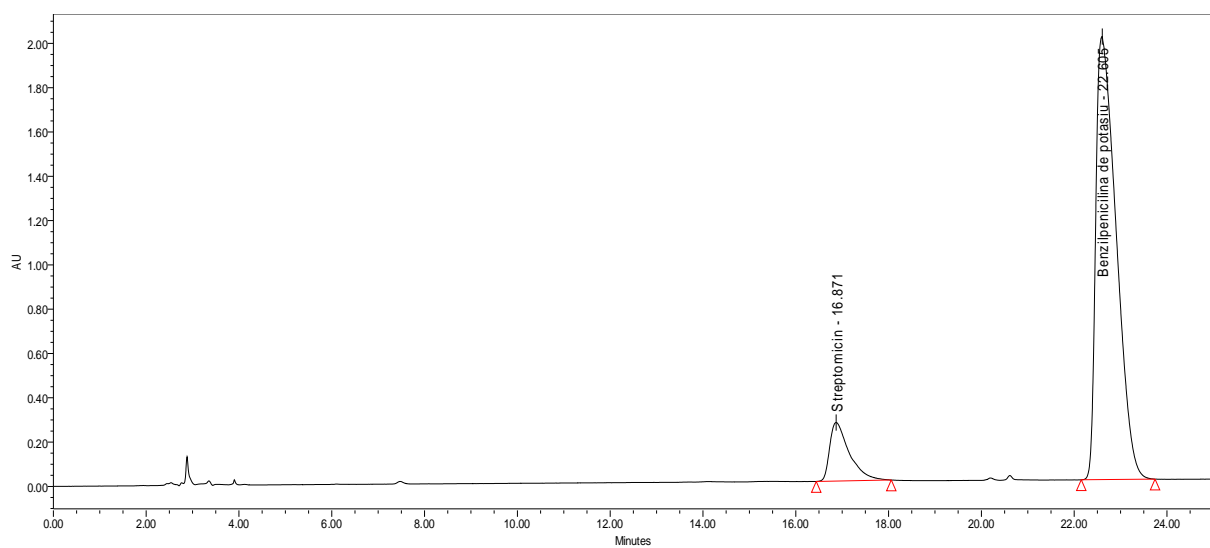
**Fig. 4.** Cromatograma reprezentativa pentru benzilpenicilina potasica



**Fig. 5.** Cromatograma reprezentativa pentru streptomycina sulphat



**Fig. 6.** Cromatograma reprezentativa pentru dihydrostreptomycina sulphat



**Fig. 7.** Cromatograma reprezentativa pentru Solutia standard dozare la 205 nm

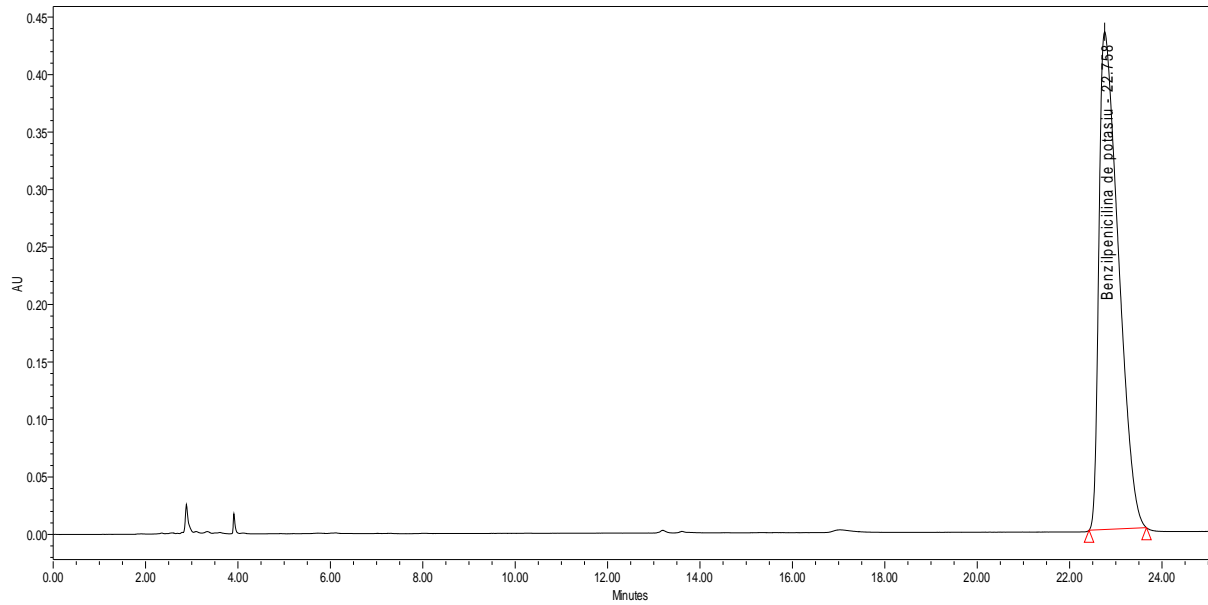


Fig. 8. Cromatograma reprezentativa pentru Solutia standard dozare la 225 nm

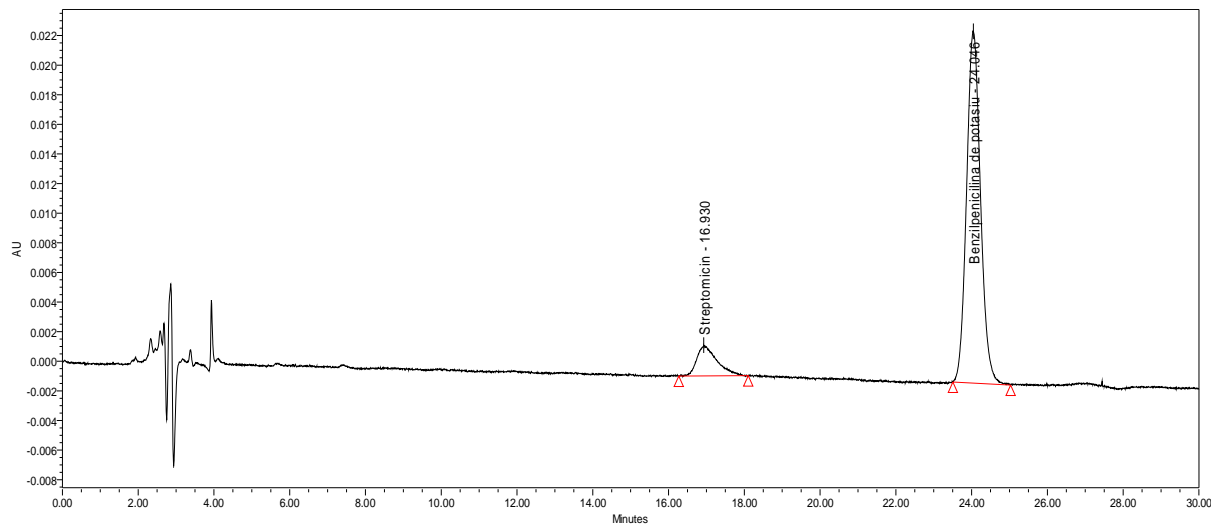


Fig. 9. Cromatograma reprezentativa pentru Solutia standard impuritati inrudite chimic la 205 nm

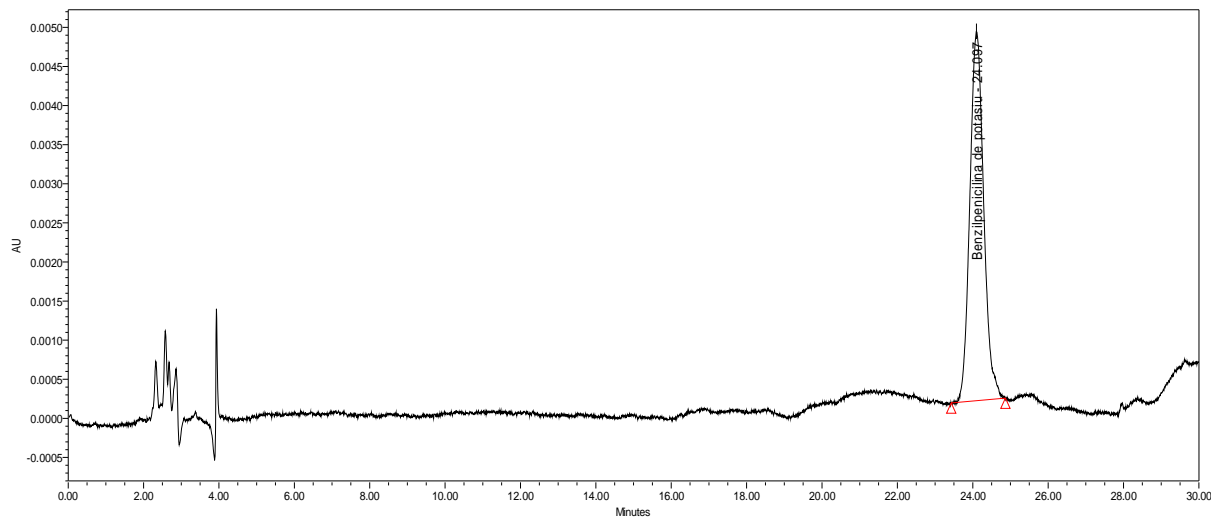
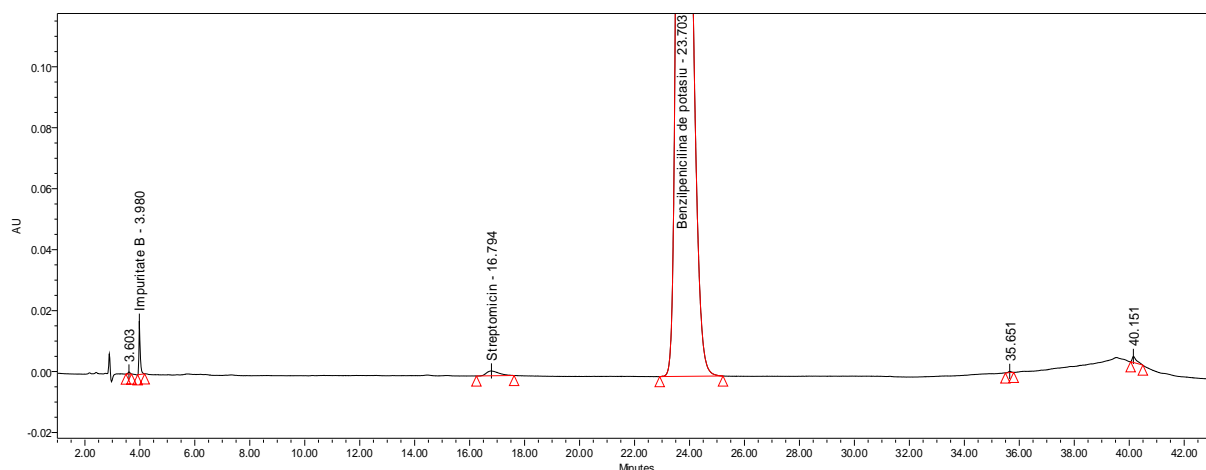


Fig. 10. Cromatograma reprezentativa pentru Solutia standard impuritati inrudite chimic la 225 nm



	Denumire substanță	Timp migrație	Aria	% Aria	Înălțime	Rezoluție	Factor Simetrie
1		3.603	3235	0.03	688		1.0
2	Impuritate B	3.980	56264	0.46	17525	3.7	2.0
3	Streptomycin	16.794	50249	0.41	1583	28.3	1.5
4	Dihidrostreptomycin	18.000					
5	Benzilpenicilina de potasiu	23.703	12037809	98.89	369664	8.2	1.5
6		35.651	3126	0.03	407	22.5	0.9
7		40.151	22462	0.18	2015	18.3	2.3

Fig. 11. Cromatograma reprezentativa pentru proba de Dozare / Identificare / substante inrudite chimic / produși de degradare la 225 nm

## Bibliografie

1. Adams E, Rafiee M, Roets E, Hoogmartens J. Liquid chromatographic analysis of streptomycin sulfate
2. Whall T.J. Determination of streptomycin sulphate and dihydrostreptomycin sulphate by high-liquid chromatography, J. Chromatography, 198, 219: 89-100
3. Hiroaki K, Yoshie K, Toshio K. Fluorescence determination of streptomycin in serum by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography, Anal. Chem., 1986, 58 (13): 2653–2655
4. Chang-Won P, Abd AM, El-Aty, MMM, Hashim JH, Shim, Si-Kyung L, Kang-Duk C, Kwan-Ha P, Ho-Chul S, ChiHo L. Monitoring of streptomycin and dihydrostreptomycin residual levels in porcine meat press juice and muscle via solid-phase fluorescence immunoassay and confirmatory analysis by liquid chromatography after post-column derivatization
5. Michel van Bruijnsvoort, JM Ottink, KM. Jonker, E de Boer. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2004, 1058 (1-2):137–142.
6. Masakazu H, Hiromi S, Toshiaki N, Junko N, Hiroyuki N. Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Honey by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005, 27 (5):863-874
7. Isoherranen N, Soback S. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics, Journal of AOAC International, 1999, 82(5)
8. Samanidou VF, Nisyriou SA, Papadoyannis IN. Development and validation an HPLC method for the determination of penicillin antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Decision 2002/657/EC
9. Vadino WA, Sugita ET, Schnaer RL, Ando HY, Ntebergall PJ. Separation of penicillin G potassium and its degradation products using high-pressure liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1979, 68(10):1316–1318
10. ICH, Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products, International Conference on Harmonization. Geneva, October 1993
11. ICH, Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology, International Conference on Harmonization. Geneva, November 1996.