

AMPİSİLİN SODYUM POLİMERLERİNİN YBSK İLE SAPTANMASI

Mekin TANKER (*)

Nazire ÜZKAL (*)

ÖZET:

Bu çalışmada, ampisilin Na polimerlerinin μ -Bondapak C₁₈ kolonu ve % 13 fosfat tamponu içeren asetonitril mobil fazı ile ayrılabilceği gösterilmiştir.

DETERMINATION OF AMPICILLIN SODIUM POLYMERS BY HPLC

SUMMARY:

In this study, separation of the polymerization products of ampicillin Na by using μ -Bondapak C₁₈ column and phosphate buffer containing 13 % acetonitril as mobil phase has been described.

GİRİŞ:

Ampisilin, aside dayanıklı, kolaylıkla absorbe olan semisentetik bir penisilindir. Penisillinaz ile inaktive olur fakat penisilinden daha geniş spektrumludur. Oral olarak, kapsül ile süspansiyon şeklinde ve Na⁺ tuzu halinde de parenteral yoldan çok kullanılan bu geniş spektrumlu antibiyotığın allerjik reaksiyonlara neden olması gibi istenmeyen yan etkisi de vardır.

Birçok araştırmacı ampisilin sodyumun sulu çözeltilerinde, bu çözeltilerin oda ısısında birkaç gün bekletilmesiyle yüksek molekül ağırlıklı maddelerin oluştuğunu göstermişlerdir. İşte bu maddelere de AMPİSİLİN POLİMERLERİ adı verilmiştir(1-5).

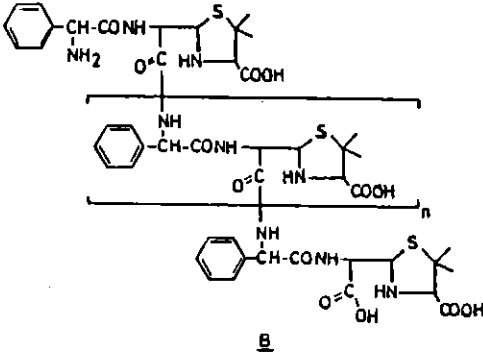
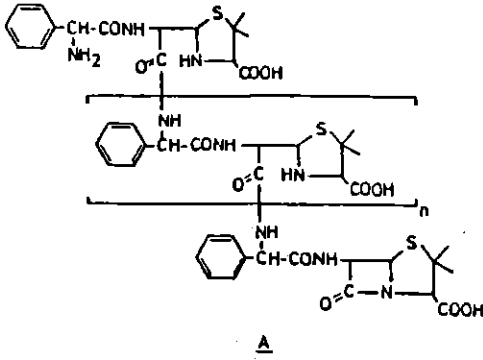
Ampisilin polimerizasyon ürünlerinin kuvvetli antijenik özelliklere sa-

hip olduğu yapılan hayvan deneyleriyle saptanmıştır. Bu da ampisilin alerjik reaksiyonlarını biraz olsun aydınlatmıştır. Yine "polimersiz ampisilin" in kullanılmasıyla ampisilin preparatlarına karşı oluşan reaksiyonlarda azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu polimerler antitibi teşekkülüne veya lenfositlerin hassaslaşmasına neden olabilmektedirler.

Ampisilin polimerlerinin bu immünojenik etkilerinden dolayı, bu polimerlerin kullanılan ampisilin preparatlarında en düşük seviyede tutulması ve kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu polimerlerin (dimer-oktamer) ayrılabilmesi ve kantitatif olarak saptanabilmesi için de YBSK sinden yararlanılmaktadır(1).

Ampisilin Na preparatlarında yapı yönünden 2 tip polimere rastlanmıştır (Şekil 1) (1,2,5):

(*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, ANKARA



Şekil 1. Ampisilin Na polimerlerinin yapısı.

A- Son üitedeki ampicilin molekülünün β -laktam halkası parçalanmamış olan polimerler.

B- β -laktam halkası açılmış olan polimerik maddeler.

Her iki durumda da polimerler, bir ampicilin molekülünün β -laktam halkasındaki karbonil grubunun ikinci bir ampicilin molekülünün yan zincirindeki amino grubu arasındaki reaksiyon sonucu oluşmaktadır.

Polimerik maddeler molekül ağırlıklarındaki farklılıktan başka bir de belli pH değerlerindeki yükleriyle de farklılık gösterirler. Hepside serbest olarak bir molekül primer amino grubu taşır. Polimerizasyona orantılı olarak karboksil grupları da artar. Asit gruplarının iyonize olmasıyla ve yan zincirin uza-

masıyla negatif yükte de bir artma olacaktır. Bu da dimer ve polimerlerin anyon değiştirici kromatografisi ile fraksiyonlanabileceği fikrini geliştirmiştir. Bu teknikte, polimerler Sephadex A-25 kolonundan NaCl ile ayırmak mümkün olmuştur(5).

Son zamanlarda ise ampisilin Na ayırımı için YBSK uygulanmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM:

1. Piyasada kullanılmak üzere hazırlanmış liyofilize ampisilin Na'dan pH 8.5 da hazırlanan numune çözeltisi tamponlanmış asetonitril çözeltisi ile isokratik sistemle YBSK de incelenmiştir.

2. Yüksek basınç sıvı kromatografisinde Waters Associated Inc. pompa Model 6000 A, UV detektör Model 440 kullanılmıştır.

BULGULAR:

Ampisilin Na'dan hazırlanan % 10 luk sulu çözelti 30 dakika içerisinde kolona enjekte edildiğinde tek bir pik elde edildiği (Krom 1) halde çözeltinin bekletilmesiyle bu pikte zamana bağlı olarak bir düşüş görülmüştür.

Hazırlanan sulu çözelti pH 8.5 da oda ısısında 3 gün bekletildikten sonra kolona verildiğinde ise polimerlerin oluştuğu gözlenmiştir (Krom 2).

Polimerlerin ayırımı için en uygun mobil fazın da % 13 fosfat tamponlu asetonitril olduğu saptanmıştır.

DENEYSEL KISIM:

1. Numune çözeltisi:

1.1. Liyofilize ampisilin Na'dan hazırlanan % 10 luk sulu çözeltiden 2.5 μ l enjekte edilmiştir.

1.2. Hazırlanan bu sulu çözeltiyeye 2M HCl ilave edilerek pH 8.5'a ayarlandı ve oda ısısında 3 gün bekletildikten sonra 2.5 μ l uygulandı(1,5).

2. Elüsyon çözeltisi:

Değişik oranlarda 0.01 M fosfat

tampon çözeltisi katılmış asetonitril kullanılmıştır.

2.1. 0.01 Fosfat tampon çözeltisi (pH 7): USP XVII göre hazırlanmış ve 50 ml 0.01 M monobazik potasyum fosfat, 29.1 ml 0.01 M NaOH çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra su ile 200 ml ye tamamlanmıştır.

2.1.1. 0.01 M Monobazik potasyum fosfat çözeltisi: 0.34 g KH_2PO_4 yeni kaynatılıp soğutulmuş suyla eritilip 250 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

2.1.2. 0.01 M NaOH çözeltisi: 0.02 g NaOH suda eritilip 500 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3. Kromatografik analiz:

Hazırlanan numune çözeltileri μ -Bondapak C_{18} kolonuna verildikten sonra fosfat tampon çözeltisinin asetonitrile % 10-20 arasında değişik oranlarda katılmasıyla elde edilen farklı solvan sistemleri ile elüe edilmiştir. Elüsyon sırasında şartlar (akış hızı, kağıt yürüme hızı, hassasiyet vb.) sürekli değiştirilerek ayırımın en iyi bir biçimde ger-

çekleştiği şartlar gözlemlendi. Yapılan değişik uygulamalar sonucunda da polimerlerin ayrılmasında en iyi elüsyonun aşağıda belirtilen şartlarda olduğu saptandı:

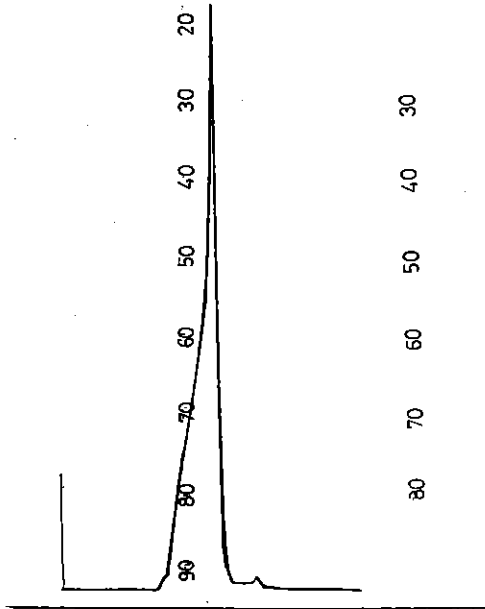
Kolon : μ -Bondapak C_{18}
Mobil Faz : a) % 13 fosfat tamponlu asetonitril (Krom 2a).
b) % 15 fosfat tamponlu asetonitril (Krom 2b).

Akış hızı : 0.6 ml/dakika
Kağıt hızı : 0.4 inc/dakika
Att. : 1

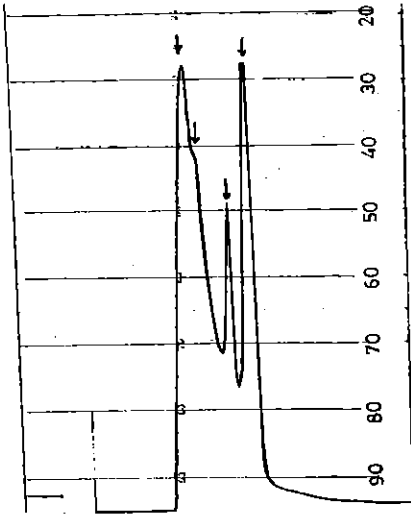
Detektör : UV-254 nm

TARTIŞMA ve SONUÇ:

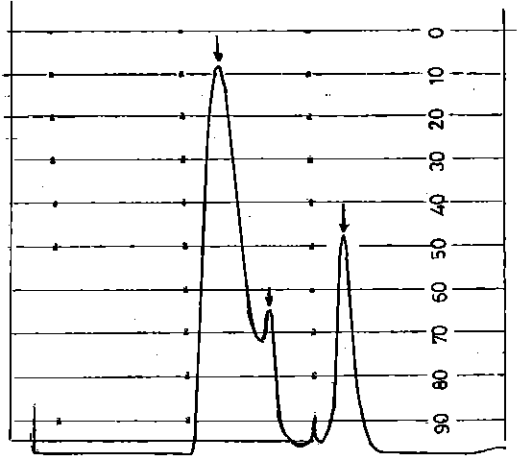
Literatürlere göre ampisilin Na polimerlerinin YBSK de ayırımı için her ne kadar gradient sistem önerilmekteyse de tek pompalı kromatograf kullanımı zorunlu olduğu hallerde bu polimerlerin teşhisinde isokratik sistemle de ayırımın yapılabileceği anlaşılmıştır. Bu amaçla da % 13 fosfat tamponlu asetonitril (proanaliz) solvan sisteminin kullanımının yararlı olabileceği de saptanmıştır.



Krom 1: Ampisilin Na mobil faz % 13 fosfat tamponlu asetonitril.



a) Mobil faz % 13 fosfat
tamponlu asetonitril



b) Mobil faz % 15 fosfat
tamponlu asetonitril

Krom 2: Ampisin Na polimerleri.

Şekil.2

KAYNAKLAR:

1. Larsen, C., Bundgaard, H., "Polymerization of penicillins. V. Separation, identification and quantitative determination of antigenic polymerization products in ampicillin sodium preparations by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 147, 143-150 (1978).
2. Smith, H., Marshall, A.C., "Polymers formed by some β -lactam antibiotics" *Nature* 232, 45-46 (1971).
3. Kuchinskas, E.J., Levy, G.N., "Comparative stabilities of ampicillin and hetacillin in aqueous solution", *J. Pharm. Sci.* 61(5), 728-729 (1972).

4. Bundgaard, H., "Spectrophotometric determination of ampicillin sodium in the presence of its degradation and polymerization products", *J. Pharm. Pharmacol.* 26, 385-392 (1974).
5. Bundgaard, H., Larsen, C., "Polymerization of penicillins. IV. Separation isolation, and characterization of ampicillin polymers formed in aqueous solution" *J. Chromatogr.* 133, 51-59 (1977).