

АНАЛИЗ НА ГЕНТАМИЦИН СУЛФАТ В ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ СЛЕД ИЗТИЧАНЕ НА СРОКА НА ГОДНОСТ

Надежда Бъчварова¹, Надя Агова², Ивелин Илиев²

¹Катедра по фармакология, токсикология и фармакотерапия, Факултет по фармация, Медицински университет – Варна

²Катедра по фармацевтична химия, Факултет по фармация, Медицински университет – Варна

ANALYSIS OF GENTAMICIN SULFATE IN MEDICINAL PRODUCTS AFTER EXPIRY DATE

Nadezhda Bachvarova¹, Nadya Agova², Ivelin Iliev²

¹Department of Pharmacology, Toxicology, and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Гентамицинът е един от най-често предписваните антибиотици в класа на аминогликозидите. Това до голяма степен се дължи на неговия спектър на действие, ниска цена и достъпност. Ефективен е срещу грам-положителни и грам-отрицателни микроорганизми. Гентамицинът не се абсорбира през устата, така че няма орални лекарствени форми. На пазара има различни търговски продукти под формата на разтвори за мускулно и венозно приложение, лекарствени форми за очи, както и такива за външно приложение. В настоящото изследване ние определихме съдържанието на гентамицин в инжекционна лекарствена форма в концентрация 40 mg/ml с помощта на ампули със срок на годност 2016 и 2017 г., използвайки UV-VIS спектрофотометър.

Ключови думи: гентамицин, лекарствена стабилност, UV-VIS спектроскопия

ВЪВЕДЕНИЕ

Гентамицин сулфат е представител на аминогликозидните антибиотици. Всички аминогликозидни антибиотици са изградени от агликонов компонент и хексозаминови (аминогликозидни) остатъци, свързани с гликозидна връзка.

ABSTRACT

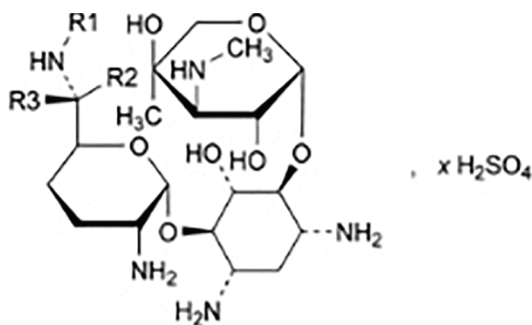
Gentamicin is one of the most commonly prescribed antibiotics in the aminoglycoside class of drugs. This is largely due to its spectrum of action, low cost, and affordability. It is both effective against gram-positive and gram-negative organisms. Gentamicin has no oral absorption, so there are no oral dosage forms. There are various commercial products on the market that contain gentamicin in the form of solutions for intramuscular and intravenous administration, eye dosage forms, as well as those for external applications. For the purposes of the present study, by using a UV-VIS spectrophotometer, we have determined the content of gentamicin in an injectable dosage form at a concentration of 40 mg/mL in ampoules with an expiration date of 2016 or 2017.

Keywords: gentamicin, drug stability, UV-VIS spectroscopy

Тъй като гентамицинът се извлича от вида *Micromonospora*, гръбнакът на този антибиотик е агликонът 2-деоксистрептамин. Този шест въглероден пръстен е заместен на въглеродните позиции 4 и 6 от аминоксахарните молекули цикличен пурпурозамин и съответно гарозамин.

Гентамицинът представлява смес от гентамицин C1 (25876-10-2), гентамицин C2 (25876-11-3) и гентамицин C1a (26098-04-4), изолиран от *Micromonospora purpurea* и сродни видове.

Основните компоненти на тази смес включват членове на комплекса гентамицин C: гентамицин C1, гентамицин C1a и гентамицин C2, които съставляват приблизително 80% от гентамицин и имат най-висока антибактериална активност. Структурата на гентамицин е представена на фиг. 1.



Gentamicin	Mol. Formula	R1	R2	R3
C1	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	CH ₃	CH ₃	H
C1a	C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇	H	H	H
C2	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	H	CH ₃	H
C2a	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	H	H	CH ₃
C2b	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	CH ₃	H	H

Фиг. 1. Обща структура на гентамицин

Като представител на аминогликозидите антибиотици гентамицин се свързва с 30s-субединицата на рибозомите и инхибират белтъчния синтез в бактериалната клетка. При вече образувани рибозоми и започнал белтъчен синтез аминогликозидите водят до грешки в четенето на кода от иРНК и образуване на т.нар. Non-sense белтъци (дефектни или безсмислени белтъци), на което се дължи бактерицидният им ефект. Следователно могат да бъдат активни както срещу делящи се, така и при неделящи се екстрацелуларни микроорганизми. Те не навлизат вътреклетъчно и следователно не проявяват ефект срещу вътреклетъчни микроорганизми. По-активни са към G-аероби, активни са и срещу стафилококи, но нямат активност срещу анаероби.

Гентамицинът е един от най-често предписваните представителни на класа на аминогликозидите антибиотици. До голяма степен това се обуславя от неговия спектър на действие, ниска цена и достъпност. Ефективен както срещу грам-положителни, така и срещу грам-отрицателни ор-

ганизми, но е особено полезен за лечение на тежки грам-отрицателни инфекции, включително тези, причинени от *Pseudomonas aeruginosa*. Има допълнителна полза от синергията, когато гентамицин се прилага едновременно с други антибактериални средства като бета-лактами. Тази синергична активност е важна не само за лечението на сложни инфекции, но също така може да допринесе за оптимизиране на дозата и намаляване на нежеланите ефекти.

Гентамицин няма перорална резорбция, затова не съществуват лекарствени форми за при-

Табл. 1. Разрешените за употреба в България лекарствени продукти, съдържащи гентамицин, и техните търговски наименования и концентрации

търговски наименования	концентрации
Gentamicin Actavis	1 mg/g ointment
Gentamicin Actavis	1 mg/g cream
Gentamicin DS	40 mg/ml solution for injection
Gentamicin H Actavis	1 mg/g + 10 mg/g cream
Gentamicin H Actavis	1 mg/g + 10 mg/g ointment
Gentamicin Medphano	0,3% eye drops, solution
Gentamicin Medphano	0.1% cream
Gentamicin Medphano	0,1% ointment
Gentamicin Medphano	0,3% eye ointment
Gentamicin Sandoz	80 mg/2 ml solution for injection
Gentamicin Sopharma	sol. inj. 20 mg/ml - 1 ml x 10; x 100
Gentamicin Sopharma	40 mg/ml solution for inject
Gentamicin Sopharma	10 mg/ml solution for injection
Gentamicin Vetprom	40 mg/ml solution for injection
Gentamicin Vision	oint. eye 3 mg/g - 5 g
Gentamicin Vision	3 mg/ml eye drops, solution
Gentamicin VP	40 mg/ml solution for injection
Gentazon	1 mg/ml + 3 mg/ml eye and ear drops, solution

ложение през устата. На пазара се срещат различни търговски продукти под формата на разтвор за интрамускулно и интравенозно приложение, лекарствени форми за очи, както и такива за външно приложение върху кожата. В табл. 1 са представени разрешените за употреба в България лекарствени продукти, съдържащи гентамицин, както и техните търговски наименования и концентрации.

Терминът стабилност на лекарството се отнася до степента, до която лекарственото вещество или продукт запазва, в определени граници и през целия период на съхранение и употреба, същите свойства и характеристики, които е притежавал по време на производството си.

Лекарствения продукт е със запазена стабилност, ако след съхранение в съответна оригинална опаковка и при посочени в спецификацията му условия на околната среда, за определен период от време наречен срок на годност, показва съдържание на активното ЛВ не по-малко от 95% от това, посочено от производителя върху етикета, а лекарствената форма не променя външен вид, фармацевтично-технологичните, микробиологични, токсикологични и биофармацевтични свойства.

В настоящото изследване ние определихме съдържанието на гентамицин в инжекционна лекарствена форма с концентрация 40 мг/мл, като използвахме ампули със срок на годност изтекъл през 2016 г. и 2017 г.

МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

За определяне на количественото съдържание на гентамицин в лекарствените форми с изтекъл срок на годност беше използван UV-VIS спектрофотометър T60 UV с UVWin Software 6.0.

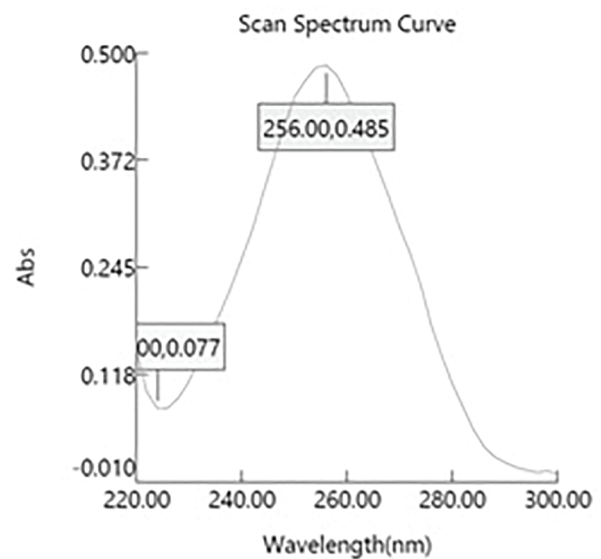
UV-VIS спектроскопски анализ бе проведен на ампули с концентрация 40 мг/мл от 2 мл. със срок на годност 06.16 и партиден номер:20612, както и на ампули със срок на годност 07.17 и партиден номер:40713.

Спектри бяха снети в диапазона 220-300 nm, а като контрола послужи ампула гентамицин със същото съдържание (40 мг/мл от 2 мл.) в срок на годност до 2024 г.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За количественото определяне на гентамицин сулфат е взет UV-VIS спектър на разтвор на гентамицин сулфат за определяне на абсорбционния максимум с обхват на сканиране от 220 до 300 nm през интервал от 2 nm, който е предста-

вен на фиг. 2. На спектъра се наблюдава максимална абсорбция при 256 nm.



Фиг. 2. UV-VIS спектър на гентамицин сулфат

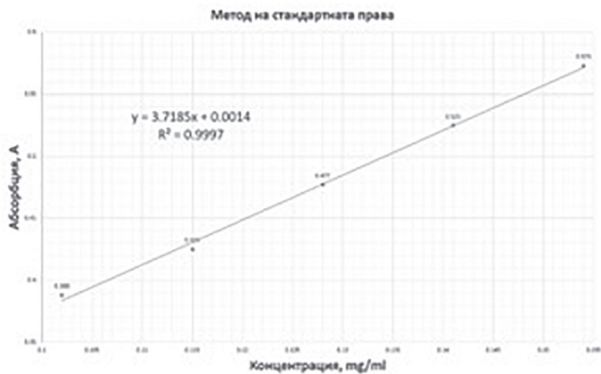
Количественото определяне на отделните партии гентамицин сулфат е направено посредством метода на външната (абсолютна) калибровка. Пригответе серия от стандартни разтвори, използвайки ампула от 2 мл с концентрация 40 мг/мл със срок на годност до 01.2024 г.

Прехвърлихме цялото количество на ампулата в мерителна колба от 25 мл, доляхме до марката с дестилирана вода и хомогенизирахме. От полученият разтвор пригответе пет разтвора. В мерителна колба от 25 мл поставихме съответно 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 и 1.2 мл от разтвора на гентамицин сулфат, който също доляхме до 25 мл с дестилирана вода и хомогенизирахме. Направихме три измервания на получените разтвори в кювета с $l=1$ cm при $\lambda_{max}=256$ nm, спрямо празна проба с дестилирана вода. След това изчислихме средноаритметичната стойност от получените резултати за построяване на калибровъчната графика. Резултатите от измерванията са представени на табл. 2.

Табл. 2. Резултати от измерената абсорбция на пригответените стандартни разтвори

работни разтвори	C, мг/мл	A1	A2	A3	\bar{A}
0.8	0.102	0.392	0.390	0.382	0.388
0.9	0.115	0.426	0.423	0.426	0.425
1.0	0.128	0.480	0.474	0.477	0.477
1.1	0.141	0.526	0.524	0.526	0.525
1.2	0.154	0.575	0.571	0.572	0.573

От получените средноаритметични абсорбции и концентрации на получените разтвори на гентамицин сулфат построихме калибровъчна графика, която отразява зависимостта на аналитичния сигнал (абсорбцията) от концентрацията на стандартите. Графиката е представена на фиг. 3.



Фиг. 3. Калибровъчна графика на гентамицин сулфат

Калибровъчната графика се описва с уравнение на права линия:

$$y = mx + b,$$

където:

y – стойност на измерения сигнал;

x – концентрация на стандартите;

m – наклон на калибровъчната графика ($m = \Delta y / \Delta x$);

b – отрязък от ординатата.

Наклонът на калибровъчната графика (m) е мярка за чувствителността на метода. Отрязъкът от ординатата (b) е мярка за случайната грешка (шум). Когато случайните грешки са минимални, калибровъчната графика минава през координатното начало ($y = ax$), а наклонът ѝ е 45° . Критерий за линейност е корелационният коефициент (R^2), който трябва да бъде близо до 1 (≥ 0.999 , 0.998). корелационният коефициент се изчислява по следната формула:

$$R^2 = \frac{[\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}$$

където:

Табл. 4. Концентрации на ампулите гентамицин сулфат според изтичането на срока им на годност

Срок на годност	Измерена средна абсорбция	Изчислена концентрация, мг/2 мл	Разлика в концентрацията, %
2024 г.	0.477	79.94	- 0.08
2017 г.	0.497	83.30	+ 4.12
2016 г.	0.468	78.43	- 1.97

\bar{x} и \bar{y} – средни стойности от величините от p на брой измервания.

От получена графика се вижда, че има висока степен на линейност, висока чувствителност и малка случайна грешка ($R^2 = 0.9997$).

Направихме аналогично разреждане на ампули от 80 мг/2 мл с изтекъл срок на годност, а именно 07.2017 и 06.2016 г. Прехвърлихме съдържанието на ампулите в мерителни колби от 25 мл, разредохме ги с дестилирана вода до марката и ги хомогенизирахме. От тях взехме по 1 мл и прехвърлихме в други мерителни колби от 25 мл и отново доляхме с дестилирана вода до марката и хомогенизирахме. На така получените разтвори направихме три последователни измервания при дължина на вълната 256 nm. За целта на проучването използвахме резултатите на партидата със срок на годност до 01.2024 г., които бяха измерени за построяването на калибровъчната графика. Резултатите са представени на табл. 3.

От полученото уравнение на права линия, по получената абсорбция и от направените разреждания изчислихме концентрацията на ампулите гентамицин сулфат. Също така изчислихме разликите в концентрацията на различните партиди в проценти. Резултатите са представени на табл. 4.

Според Eur. Ph. 8.0 концентрацията на активното вещество във всяка дозова единица в партидата трябва да попада в тесен диапазон. Терминът „равномерност на дозовите единици“ се определя като степента на еднородност на количеството на активното вещество между дозовите единици”. Това изискване се прилага за всяко активно вещество, което се съдържа в дозови единици с едно или повече активни вещества.

Табл. 3. Резултати от измерената абсорбция на приготвените разтвори на гентамицин сулфат с различен срок на годност

Срок на годност	A1	A2	A3	\bar{A}
2024 г.	0.480	0.474	0.477	0.477
2017 г.	0.504	0.491	0.496	0.497
2016 г.	0.469	0.469	0.465	0.468

Равномерността на дозовите единици може да бъде демонстрирана по два метода: равномерност на съдържанието или вариация на масата.

Тестът за равномерност на съдържанието на препаратите, представени в дозирани единици, се основава на анализа на индивидуалното съдържание на активното(ите) вещество(а) на редица дозирани единици, за да се определи дали отделното съдържание е в рамките на определените граници. Методът за еднородност на съдържанието може да се приложи във всички случаи. Необходимо е обаче да бъде направен и тест за вариация на масата, тъй като изследваният от нас препарат е разтвор, затворен в единични контейнери.

Според Eur. Ph. 8.0 концентрацията на разтвори, затворени в едnodозни опаковки, не трябва да се различава с повече от 2% от концентрацията обозначена на опаковката.

Тънкослойната хроматография (ТСХ) е широко използвана в аналитичната практика за качествено доказване (идентифициране) на вещества, при провеждане тестове за чистота, както и за проследяване хода на химичните реакции. Този хроматографски метод притежава редица предимства: висока чувствителност, възможност за определяне на малки количества компоненти в сложни смеси, експресност, непосредствена визуална представа за разделяните вещества и най-вече простота на изпълнението.

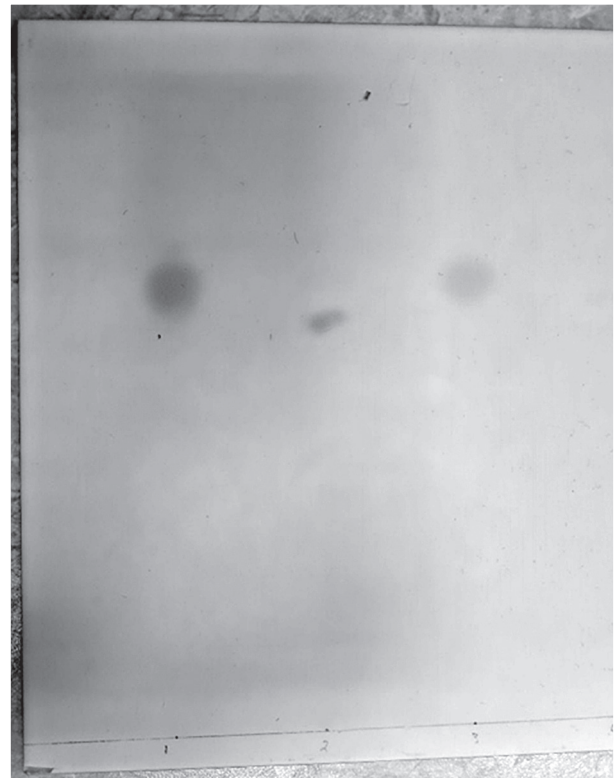
За провеждане на анализа са използвани:

- сорбент SIL G-25 силикагел
- ПФ -смес от 30.0 ml концентриран амоняк, 30.0 ml. метанол и 30.0 ml. метилен хлорид

Тестови разтвори:

- **Стандартен разтвор:** ампула гентамицин с концентрация 40мг/мл и срок на годност 2024 г.
- **Тестов разтвор А:** ампула гентамицин с концентрация 40мг/мл 2 мл. и срок на годност 2016 г.
- **Тестов разтвор В:** ампула гентамицин с концентрация 40мг/мл 2 мл и срок на годност 2017 г.

Получените резултати са представени на фиг. 4.



Фиг. 4. Тънкослойна хроматография на гентамицин сулфат в ампули с изтекъл срок на годност

Получените петна не съответстват по форма и големина на петното, получено от стандартния разтвор: ампула гентамицин с концентрация 40мг/мл и срок на годност 2024 г.

За по-добро визуализиране получените резултати са представени в табл. 5.

ИЗВОДИ

Чистотата на фармакологично активните вещества и идентичността на примесите са основни фактори за осигуряване на безопасност и качество на лекарствата. Примесите на лекарства над 0,10% трябва да бъдат идентифицирани и количествено определени чрез селективни методи, което е трудно да се спазва за биосинтетични продукти като гентамицин.

Табл. 5. Rf стойности, получени при тънкослойна хроматография на гентамицин сулфат в ампули с изтекъл срок на годност

Срок на годност	Разстояние от старта до центъра на петното на анализа, см	Разстояние от старта до фронта на елуента, см	Rf
2024	11.7	17	0.69
2017	11.5	17	0.68
2016	10.8	17	0.64

Препоръките към пациентите са да избягват употребата на лекарства с изтекъл срок, и то най-вече на антибиотици. При тях съществува риск да изгубят ефективността си, а също и да доведат до развитие на резистентност на микроорганизмите.

Проведения UV-Vis спектроскопски анализ на гентамицин ампули с различен срок на годност не показва значими различия на измерената средна абсорбция, респективно концентрация на гентамицин при стайна температура, където изчислената концентрация варира в диапазона от 0.08-4,12%.

Вероятна причина за минималните изменения в абсорбцията на ампулните форми са структурните особености на самата молекула на гентамицин и липсата на хромофорни групи и двойни връзки. Поради това дори да протича процес на разпад или количествена промяна в съдържанието на гентамицин при различните ампули, то той не може да бъде отчетен посредством използването на UV-Vis спектрален анализ.

Освен това под внимание следва да се вземе и стабилността на инжекционната лекарствена форма, както и съдържащите се в ампулите гентамицин помощни вещества: метил парахидроксибензоат, пропил парахидроксибензоат, дина-трнев едетат; натриев сулфит, безводен, разтвор на сярна киселина (1 mol/l).

За по-подробно изследване на гентамицин в ампули след изтичане на срока на годност следва да се проведе ВЕТХ, която за разлика от UV-Vis се отличава като метод за бърз и точен количествен анализ с висока чувствителност на детектиране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Finland M. Gentamicin: antibacterial activity, clinical pharmacology and clinical applications. *Med Times*. 1969 Dec;97(12):161-74. PMID: 4904180.
2. Fisk KL. A review of gentamicin use in neonates. *Neonatal Netw*. 1993 Oct;12(7):19-23; quiz 24-8. PMID: 8413146.
3. Graham AE, Speicher E, Williamson B. Analysis of gentamicin sulfate and a study of its degradation in dextrose solution. *J Pharm Biomed Anal*. 1997 Jan;15(4):537-43. doi: 10.1016/S0731-7085(96)01852-3. PMID: 8953497.
4. Halmagyi GM, Fattore CM, Curthoys IS, Wade S. Gentamicin vestibulotoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994 Nov;111(5):571-4. doi: 10.1177/019459989411100506. PMID: 7970794.
5. Jian X, Deng Z, Sun Y. [Aminoglycoside gentamicin research: fundamental progress and new application prospects]. *Sheng Wu Gong*

Cheng Xue Bao. 2015 Jun;31(6):829-44. Chinese. PMID: 26672360.

6. Mayon-White RT, Perks EM. Gentamicin dosage schedules. *Arch Dis Child*. 1978 Nov;53(11):917-8. doi: 10.1136/ad.53.11.917. PMID: 727819; PMCID: PMC1545282.
7. Miron D. Once daily dosing of gentamicin in infants and children. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Dec;20(12):1169-73. doi: 10.1097/00006454-200112000-00016. PMID: 11740327.
8. Peromet M, Schoutens E, Vanderlinden MP, Yourassowsky E. Specific assay of gentamicin in the presence of penicillins and cephalosporins. Use of commercially manufactured beta-lactamases. *Chemotherapy*. 1974;20(1):1-5. doi: 10.1159/000221785. PMID: 4210890.
9. Prout G. Gentamicin assays. *J Antimicrob Chemother*. 1977 Jul;3(4):371. doi: 10.1093/jac/3.4.371. PMID: 893244.
10. Records RE. Gentamicin in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 1976 Jul-Aug;21(1):49-58. doi: 10.1016/0039-6257(76)90048-5. PMID: 785654.
11. Santucci RA, Krieger JN. Gentamicin for the practicing urologist: review of efficacy, single daily dosing and „switch“ therapy. *J Urol*. 2000 Apr;163(4):1076-84. doi: 10.1016/S0022-5347(05)67697-5. PMID: 10737470.
12. Wagman GH, Oden EM, Weinstein MJ. Differential chromatographic bioassay for the gentamicin complex. *Appl Microbiol*. 1968 Apr;16(4):624-7. doi: 10.1128/am.16.4.624-627.1968. PMID: 5647523; PMCID: PMC547482.

Адрес за кореспонденция:

Надя Агова

Факултет по фармация

бул. „Цар Освободител“ 84

Варна, 9002

e-mail: Nadya.Agova@tu-varna.bg