

## DETERMINACION DE AMPICILINA EN MEZCLAS DE PENICILINAS

Por F. Salto Maldonado

HAMILTON y col.,<sup>1</sup> en su detallada revisión de los métodos de análisis de penicilinas, recomiendan para concentraciones bajas, los métodos iodometrónico<sup>2</sup> y microbiológico;<sup>3</sup> mientras que a concentraciones superiores a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  indican que el método de la hidroxilamina muestra considerables ventajas. W. G. SMITH y col.,<sup>5</sup> basándose en los trabajos de HERRIOT,<sup>6</sup> describen un método de determinación de Ampicilina fundado en su descomposición controlada, en presencia de iones cobre, a ácido penicilénico y posterior determinación espectrofotométrica de éste, a 320  $\text{m}\mu$ . Todos los métodos indicados son válidos para cualquier tipo de penicilinas, por lo que no se pueden utilizar para valorar Ampicilina en presencia de otras penicilinas.

Cada día son más frecuentes los preparados farmacéuticos que contienen mezclas de penicilinas. Especialmente tienen interés las mezclas de ampicilinas con otras penicilinas resistentes a la penicilinasa (Dimetoxibencilpenicilina, Dicloxacilina, Metampicilina, etc.). Sin embargo, no hemos encontrado en la bibliografía métodos analíticos que permitan valorar la Ampicilina en dichas mezclas, por lo que hemos considerado de interés el poner a punto una técnica que permita tal valoración.

### METODO EXPERIMENTAL

#### *Reactivos.*

*Disolución de 1-Fluor-2,4-dinitrobenceno (FDNB).*—Se prepara disolviendo 930 mg (50  $\mu\text{moles}$ ) de FDNB en etanol, completando hasta 25 ml de disolución.

*Disolución de bicarbonato.*—Bicarbonato sódico a la concentración de 10 g/litro.

*Ampicilina sódica.*—Suministrada por Antibióticos S. A.

#### APARATOS:

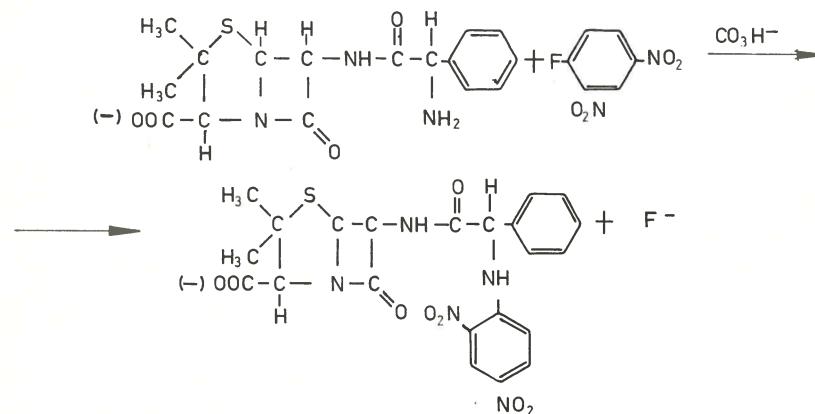
Espectrofotómetro Beckman DK-2.

#### PROCEDIMIENTO.

Disolver la muestra de Ampicilina en cantidad suficiente de disolución de bicarbonato para obtener una concentración de alrededor de 1 micromol por ml. Tomar 30 ml de esta disolución y pasarlos a un erlenmeyer de 100 ml de capacidad. Seguidamente se añaden, con ligera agitación, 3 ml de reactivo (disolución de FDNB). A continuación se cubre el erlenmeyer con papel de aluminio, para preservarlo de la luz y se agita, a temperatura ambiente, durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se extrae dos veces con éter etílico, usando 30 ml cada vez. Finalmente, se determina la densidad óptica a 350 m $\mu$ . en célula de 1 cm., con disolución de bicarbonato en la célula de referencia. La lectura se corrige restándole la densidad óptica de un blanco formado por 30 ml de la disolución de bicarbonato más 3 ml de reactivo de FDNB y tratado de forma semejante a la muestra. La concentración de Ampicilina en la muestra original se determina mediante el gráfico densidad óptica-concentración, obtenido a partir de disoluciones de Ampicilina de concentración conocida y tratadas según el procedimiento descrito.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método propuesto se basa en la reacción de la Ampicilina con el reactivo de Sanger<sup>7</sup> flúor, 2-4 dinitrobenceno, según el esquema



Dicha reacción se especifica en la Ampicilina, ya que es la única penicilina que posee grupos aminos libres. Evidentemente, interfieren el ácido 6-aminopenicilánico, así como las sustancias que poseen grupos aminos libres y acompañan a la Ampicilina. El método es suficientemente sensible, permitiendo valorar concentraciones de hasta 30  $\mu$ g/ml. La desviación standard observada es de menos del 5 %.

*Espectro de absorción.*—En las condiciones indicadas, el espectro de absorción del dinitrobencil derivado de la Ampicilina obtenido se halla representado en la fig. 1, observándose un máximo bien definido a 350 mu.

*Influencia de la cantidad de reactivo.*—La fig. 2 muestra la variación de la densidad óptica en función de la cantidad de FDNB añadido. Se ha elegido una cantidad de reactivo correspondiente a 13 moles de reactivo por mol de Ampicilina.

*Influencia del tiempo de reacción.*—En las condiciones indicadas en «Procedimiento», la densidad óptica es proporcional al tiempo de reacción, no cesando el aumento de la densidad óptica hasta la quinta hora de reacción (fig. 3). Sin embargo, nosotros hemos encontrado que se obtienen resultados reproducibles dejándoles 2 horas de reacción, por lo que para no alargar mucho el tiempo de análisis, pueden tomarse estas dos horas como tiempo de reacción adecuado.

*Influencia del pH sobre la absorción a 350 m $\mu$ .*—La influencia del pH sobre la densidad óptica a 350 m $\mu$  se estudió en las disoluciones acuosas, una vez extraído el exceso de reactivo con éter. Los resultados están representados en la fig. 4. Como puede observarse, por encima de pH 6, éste no ejerce, prácticamente, influencia alguna sobre la densidad óptica.

*Influencia de la temperatura.*—La escasa estabilidad de las penicilinas en disolución acuosa nos aconseja no utilizar temperaturas elevadas en el proceso de obtención del dinitrofenil derivado. Como puede verse en la fig. 3 la velocidad de reacción a 35°C es, prácticamente, doble que a 25°C; sin embargo, las desviaciones son menores a 25°C que a 35°C.

*Ley de Beer.*—Disoluciones patrón de Ampicilina, de concentraciones conocidas, se trataron por el procedimiento descrito anteriormente, encontrándose que la Ley de Beer se cumple en un intervalo de concentraciones suficientemente amplio, tal como puede comprobarse en la fig. 5.

#### RESUMEN

Se describe un método para la determinación de Ampicilina (D(-)- $\alpha$ -aminobencilpenicilina), en presencia de otras penicilinas, basado en la medida espectrofotométrica a 350 m $\mu$  del dinitrofenil derivado de la Ampicilina, formado por reacción del reactivo de Sanger con la Ampicilina en medio ligeramente alcalino.

Asimismo se estudia la influencia de la cantidad de FDNB, tiempo de reacción y temperatura en la formación del dinitrofenil derivado de la Ampicilina.

### RESUME

On décrit une méthode pour la détermination de l'Ampicilline ( $D(-)$ - $\alpha$ -aminobenzylpénicilline), en présence d'autres pénicillines, basée sur la détermination spectrophotométrique à 350 m $\mu$  du dinitrophénol dérivé de l'Ampicilline, formé par la réaction du réactif de Sanger avec l'Ampicilline dans un milieu légèrement alcalin.

On a étudié aussi l'influence de la quantité de FDNB, temps de réaction et température, dans la formation du dinitrophénol dérivé de l'Ampicilline.

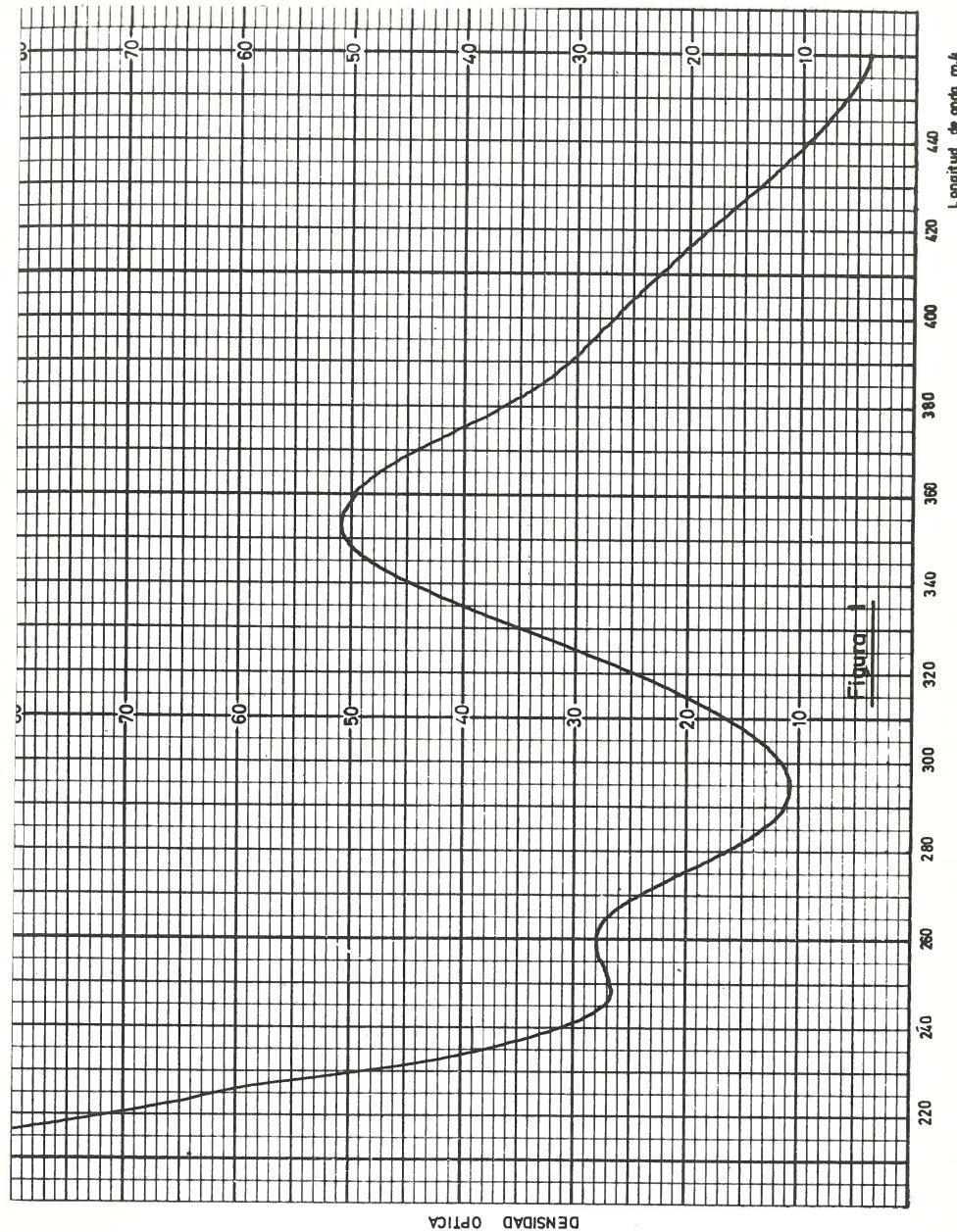
### SUMMARY

A method for the determination of Ampicillin ( $D(-)$ - $\alpha$ -aminobenzylpenicillin) in the presence of other penicillins, based on the spectrophotometric determination at 350 m $\mu$  of Dinitrophenyl derivative of Ampicillin, formed by the reaction of reagent of Sanger with Ampicillin in a slightly alkaline medium is described.

The influence of the amount of FDNB, reaction time and temperature, on the formation of Dinitrophenyl derivative of Ampicillin has also been studied.

### BIBLIOGRAFIA

1. J. M. T. HAMILTON-MILLER, J. T. SMITH and R. KNOX, (1963). *J. Pharm. Pharmac.* **81**.
2. J. F. ALICINO, (1946). *Industr. Engng. Chem. (Anal. Ed.)* **18**, 619.
3. E. P. ABRAHAM, E. CHAIN, C. M. FLETCHER, H. W. FLOREY, A. D. GARDNER, N. G. HEATLEY and M. A. JENNINGS, (1941). *Lancet*, **2**, 177.
4. G. E. BOXER and P. M. EVERETT, (1949). *Analyt. Chem.*, **21**, 670.
5. J. W. G. SMITH, G. E. GREY and U. J. PATEL, (1967). *Analyst*, **92**, 247.
6. R. M. HERRIOT, (1946). *J. Biol. Chem.*, **164**, 725.
7. F. SANGER, (1945). *Biochen. J.*, **39**, 507.



Influencia de la cantidad de FDNB

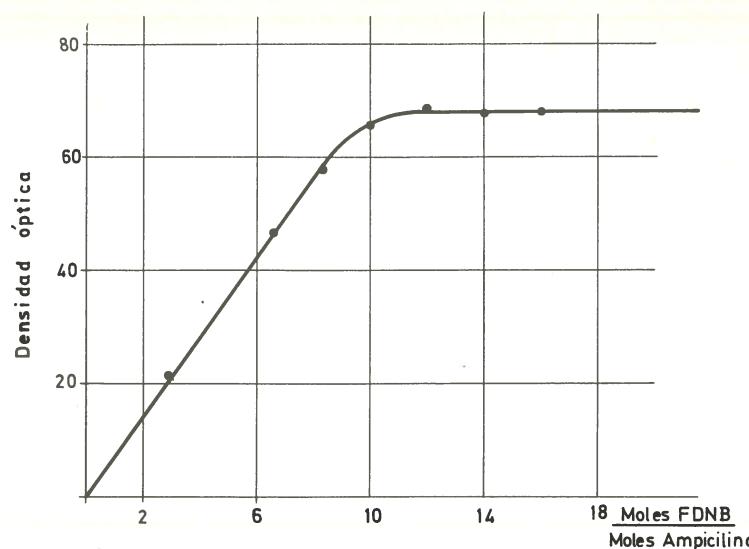


Figura 2

Influencia del tiempo y temperatura

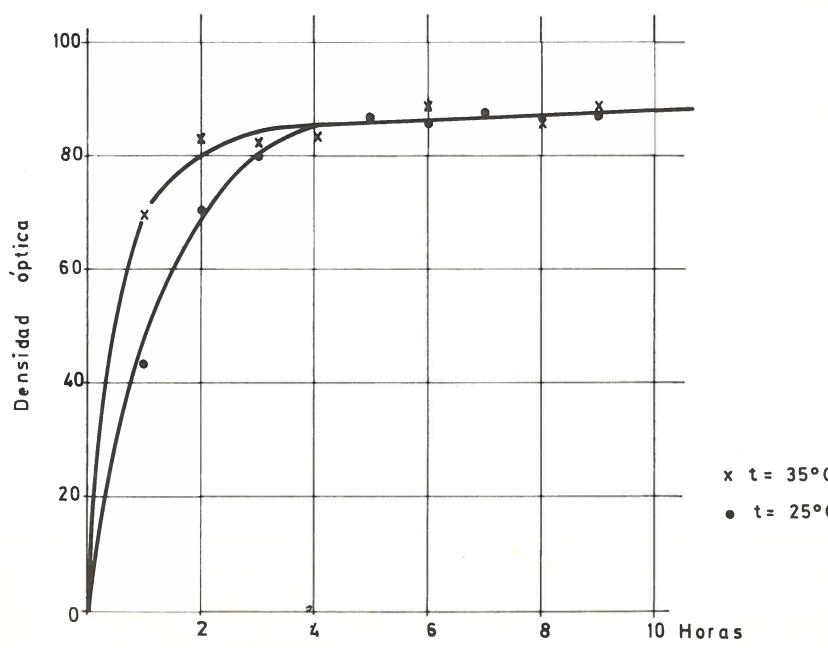


Figura 3

Influencia del pH

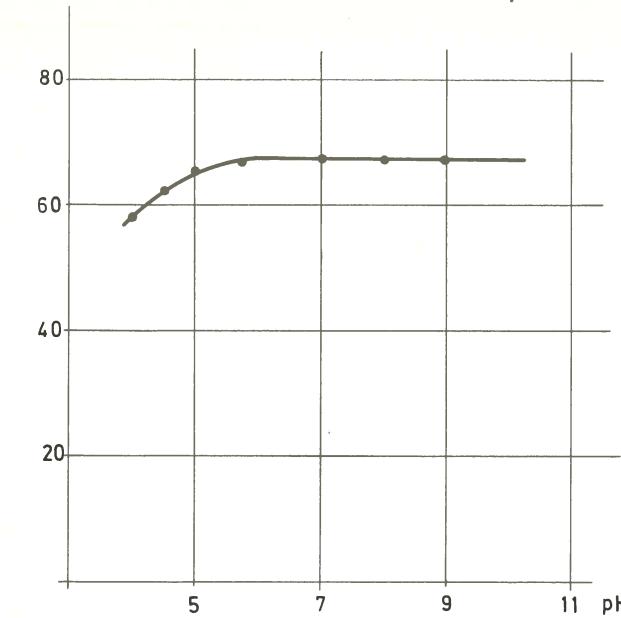


Figura 4

Ley de Beer

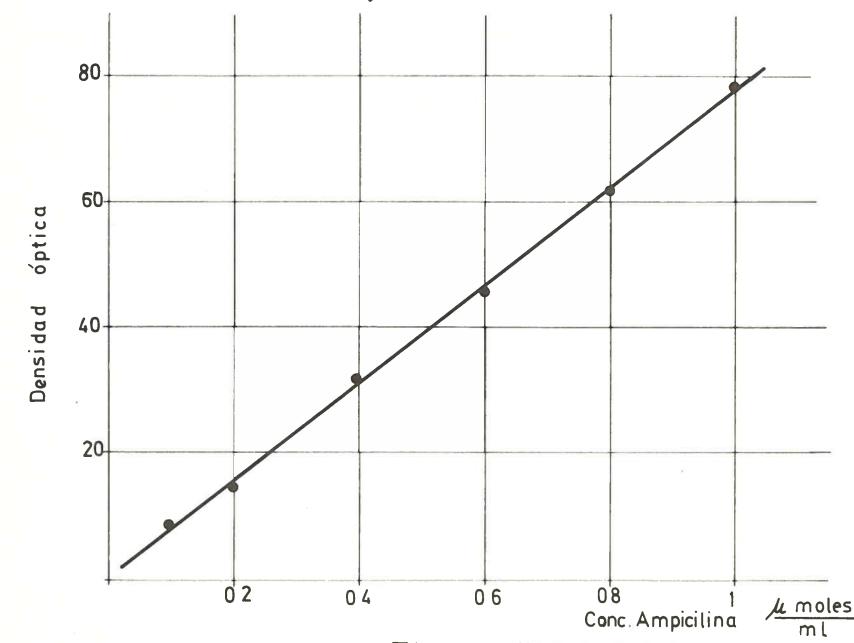


Figura 5