МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Бензатина бензилпенициллина тетрагидрат** |  | **ФС** |
| **Бензатина бензилпенициллин** |  |  |
| **Benzathini benzylpenicillinum tetrahydricum** |  | **Взамен ВФС 42-3256-98** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| *N*1,*N*2-Дибензилэтан-1,2-диамин—(2*S*,5*R*,6*R*)-3,3-диметил-7-оксо-6-(2-фенилацетамидо)-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота—вода (1/2/4) | |
|  | |
| C16H20N2·(C16H18N2O4S)24H2O | М.м. 981,2 |

Cодержит не менее 96,0 % и не более 102,0 % бензатина бензилпенициллина C16H20N2·(C16H18N2O4S)2 в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

Содержит не менее 24,0 % и не более 27,0 % бензатина C16H20N2 в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

*Примечание*. При определении активности биологическим методом общая активность субстанции (сумма пенициллинов) не менее 96 %. Теоретическая активность бензатина бензилпенициллина 1150 ЕД/мг. 0,8696 мкг химически чистой субстанции бензатина бензилпенициллина соответствует одной единице действия (ЕД) (ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар»).

Точность определения должна быть такой, чтобы доверительные пределы при P = 95 % отклонялись от среднего значения не более чем на 5 % (ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»).

Средняя величина найденной активности должна быть не менее 1100 ЕД/мг.

**Описание.** Белый или почти белый порошок.

**Растворимость**. Очень мало растворим в воде, очень легко растворим в диметилформамиде и формамиде, мало растворим в спирте 96 %.

**Подлинность**

*1. ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца бензатина бензилпенициллина.

*2. Тонкослойная хроматография* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка*. ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Аммония ацетата раствор 15 %, предварительно доведенный аммиака раствором до pH 7,0—ацетон 70:30.

*Испытуемый раствор*. Растворяют 25 мг субстанции в 5,0 мл метанола.

*Раствор стандартного образца бензатина бензилпенициллина*. Растворяют 25 мг стандартного образца бензатина бензилпенициллина в 5,0 мл метанола.

На линию старта пластинки наносят по 1 мкл испытуемого раствора (5 мкг) и раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (5 мкг). Пластинку с нанесёнными растворами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдёт около 80-90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, выдерживают над парами йода до проявления зон адсорбции и просматривают в видимом свете.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина должны наблюдаться две чётко разделенных зоны адсорбции.

*Результат.* Две основные зоны адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски и величине должны соответствовать двум основным зонам адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина.

*3. Качественная реакция*. В пробирку длиной около 150 мм и внутренним диаметром около 15 мм помещают 2 мг субстанции, смачивают одной каплей воды, прибавляют 2 мл формальдегида раствора в серной кислоте концентрированной и перемешивают; раствор должен быть практически бесцветным. После нагревания на водяной бане в течение 1 мин окраска должна смениться на красновато-коричневую.

*4. Качественная реакция*. Встряхивают 0,1 г субстанции в течение 2 мин с 1 мл натрия гидроксида раствора 1 М, прибавляют 2 мл эфира, встряхивают в течение 1 мин и дают слоям разделиться. Выпаривают 1 мл эфирного слоя досуха, остаток растворяют в 2 мл уксусной кислоты ледяной и прибавляют 1 мл калия дихромата раствора 10,6 %; должен образоваться осадок золотисто-жёлтого цвета.

**pH.** От 4,5 до 6,5 (40 % суспензия в воде, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

*Буферный раствор*. Растворяют 34 г калия дигидрофосфата в 900 мл воды и доводят рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до 3,30±0,05. Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Буферный раствор—метанол—вода 100:300:600.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. Буферный раствор—вода—метанол 50:250:700.

*Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 6,8 г калия дигидрофосфата, 1,3 г динатрия гидрофосфата додекагидрата, растворяют в воде, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 2 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 70 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в 25 мл метанола и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А)*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 40 мг (точная навеска) стандартного образца бензатина бензилпенициллина, растворяют в 50 мл метанола и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца бензатина бензилпенициллина (Б)*. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А) и доводят объём раствора смесью метанол—растворитель 1:1 до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. Растворяют 3 мг стандартного образца бензатина бензилпенициллина для идентификации примесей (содержит примеси A, В, С, D, Е, F, G, H, I, J и K) в 1 мл метанола и доводят объём раствора до 2 мл буферным раствором.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3,0 мл раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (Б) и доводят объём раствора смесью метанол—растворитель 1:1 до метки.

Примечание

Примесь А. *N*1-бензилэтан-1,2-диамин; CAS 4152-09-4.

Примесь B: фенилуксусная кислота; CAS 103-82-2.

Примесь С: (2*Ξ*,4*R*)-2-[(1*Ξ*)-2-{бензил[2-(бензиламино)этил]амино}-2-оксо-1-(2-фенилацетамидо)этил]-5,5-диметил-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота.

Примесь D: (3*S*,7*R*,7a*R*)-6-бензил-2,2-диметил-2,3,7,7a-тетрагидроимидазо[5,1-*b*][1,3]тиазол-3,7-дикарбоновая кислота; CAS 13093-87-3.

Примесь Е: (2*Ξ*,4*R*)-2-[(*Ξ*)-карбокси(2-фенилацетамидо)метил]-5,5-диметил-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота; CAS 13057-98-2.

Примесь F: (2*RS*,4*S*)-5,5-диметил-2-[(2-фенилацетамидо)метил]-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота; CAS 501-34-8.

Примесь G: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(4-гидроксифенил)ацетиламидо]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота; CAS 525-91-7.

Примесь Н: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(3*Z*)-гекс-3-енамидо]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота.

Примесь I: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-гексанамидо-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота; CAS 4493-18-9.

Примесь J: неизвестная структура.

Примесь K: (2*R*,2'*R*,4*S*,4'*S*)-2,2'-[(4*R*,11*R*)-6,9-дибензил-2,5,10,13-тетраоксо-1,14-дифенил-3,6,9,12-тетраазатетрадекан-4,11-диил]бис(5,5-диметил-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки | 50 °C; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 220 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФ А, % | ПФ Б, % |
| 0–2 | 85 | 15 |
| 2–16 | 85 → 0 | 15 → 100 |
| 16–26 | 0 | 100 |
| 26–30 | 0 → 85 | 100 → 15 |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца бензатина бензилпенициллина (Б) и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений*. Бензилпенициллин – 1 (около 7 мин); примесь A – около 0,18; бензатин – около 0,30; примесь D – около 0,36; примесь G – около 0,38; примесь J – около 0,44; примесь E – около 0,51 и 0,60; примесь B – около 0,69; примесь F – около 0,84 и 0,88; примесь Н – около 1,22; примесь I – около 1,42; примесь C – около 1,75; примесь K – около 2,90.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей используют хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы и хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу бензатина бензилпенициллина для идентификации примесей.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика бензилпенициллина должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

*- разрешение (RS)* между пиками эпимеров примеси F должно быть не менее 1,0;

*- разрешение (RS)* между пиками примеси D и примеси G должно быть не менее 1,5.

*Поправочные коэффициенты*. Для расчёта содержания примесей площади пиков следующих примесей умножают на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь E – 1,9; примесь F – 1,5.

Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика каждой из примесей на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика бензилпенициллина на хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (Б); |
|  | *a*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца бензатина бензилпенициллнина, мг; |
|  | *P* | − | содержание бензатина бензилпенициллина в стандартном образце бензатина бензилпенициллина, %. |

*Допустимое содержание примесей*:

- примесь C – не более 2,0 %;

- примесь K – не более 1,0 %;

- примесь J – не более 0,5 %;

- примесь E (сумма изомеров) – не более 0,3 %;

- примесь F (сумма эпимеров) – не более 0,3 %;

- примеси A, В, D, G, H и I – для каждой примеси не более 0,2 %;

- любая другая примесь – не более 0,2 %;

- сумма примесей – не более 3,5 %.

Не учитывают пик бензатина и примеси, содержание каждой из которых менее 0,05 %.

**Вода.** От 5,0 % до 8,0 %. (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,2 г (точная навеска) субстанции.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**\*Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 1 мг бензатина бензилпенициллина в 0,5 мл воды для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

**\*Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,13 ЕЭ на 1 мг бензатина бензилпенициллина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Около 20 мг субстанции встряхивают с 20 мл натрия гидроксида раствора 0,001 М и центрифугируют. Для анализа используют супернатант.

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**\*Стерильность.** Субстанция должна быть стерильной (ОФС «Стерильность»).

**Количественное определение.** Испытание проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 40 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в метаноле и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* ПФБ—ПФА 150:850.

Хроматографируют раствор стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А) и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А) *фактор асимметрии пика (AS)* бензилпенициллина должен быть не более 1,8.

Содержание бензатина бензилпенициллина C16H20N2·(C16H18N2O4S)2 в субстанции в процентах в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика бензилпенициллина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика бензилпенициллина на хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А); |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца бензатина бензилпенициллина, мг; |
|  | *W* | − | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей, %; |
|  | *P* | − | содержание бензатина бензилпенициллина в стандартном образце бензатина бензилпенициллина, %. |

Содержание бензатина C16H20N2 в субстанции в процентах в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика бензатина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика бензатина на хроматограмме раствора стандартного образца бензатина бензилпенициллина (А); |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца бензатина бензилпенициллина, мг; |
|  | *W* | − | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей, %; |
|  | *P* | − | содержание бензатина в стандартном образце бензатина бензилпенициллина, %. |

**Хранение.** В плотно закрытой упаковке.

\*Проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.