

IMPUREZZE ALLERGOGENE IN SPECIALITÀ MEDICINALI CONTENENTI AMINO-PENICILLINE. I. AMPICILLINA SODICA

P. BETTO, L. TURCHETTO e L. LONGINOTTI

Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - *La quantità di impurezze da degradazione presenti nelle specialità medicinali contenenti ampicillina sodica è stata misurata mediante high-performance liquid chromatography (HPLC) con eluizione a gradiente. In tutte le specialità analizzate preparate con ampicillina sodica ottenuta per liofilizzazione la quantità trovata di impurezze da degradazione (costituite quasi esclusivamente da prodotti di condensazione e cioè oligomeri considerati allergogeni) è risultata superiore al 10% contro il 2% ritrovato nella specialità medicinale preparata con ampicillina sodica ottenuta per precipitazione da solventi non acquosi.*

Summary (Allergenic impurities in pharmaceutical preparations containing aminopenicillins. I. Sodium ampicillin). - *High-performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution has been used for the determination of degradation products in pharmaceutical preparations containing sodium ampicillin. In all preparations resulting by liofilization process, the degradation products amount, almost exclusively constituted of allergenic polymeric substances deriving from condensation reactions, is more than 10%. On the contrary, the sodium ampicillin prepared by precipitation in non aqueous solvents, only contains the 2% of polymeric impurities.*

Introduzione

Anche se in generale le penicilline sono considerate tra i farmaci meno tossici [1, 2] le reazioni allergiche a questi antibiotici rappresentano già da lungo tempo un problema clinico considerevole [3]; si è calcolato infatti che durante la terapia penicillinica, dall'1 al 10% dei pazienti trattati sviluppano reazioni allergiche varianti da severe reazioni di tipo anafilattico a più inoffensivi esantemi [4] ed è generalmente stimato che nei paesi industrializzati, dal 3 al 5% degli individui sono allergici alle penicilline [5].

D'altra parte è anche da lungo tempo noto che la principale, se non l'unica causa responsabile delle proprietà allergiche di queste sostanze è la presenza di prodotti

di polimerizzazione formati da processi coinvolgenti, nel caso di penicilline con un gruppo aminico laterale quali l'ampicillina, un attacco nucleofilo del gruppo aminico di una molecola sul legame β -lattamico di un'altra molecola [6].

Per i prodotti di polimerizzazione dell'ampicillina in particolare, forti proprietà antigeniche sono state accertate in esperimenti su animali [2, 7, 8] e secondo Ahlstedt *et al.* [9] nelle preparazioni di ampicillina si può evidenziare un'attività "scatenante" già ad una concentrazione dei polimeri dello 0,1%, mentre secondo altri autori [10] l'uso di ampicillina "esente da polimeri" può ridurre l'incidenza di reazioni esantematiche.

E' ovvio quindi che a causa di questi effetti immunologici dei polimeri dell'ampicillina la loro presenza nelle preparazioni dell'antibiotico dovrebbe essere controllata e mantenuta al livello più basso possibile. Nonostante ciò, sostanziali quantità di sostanze polimeriche sono state a suo tempo ritrovate in preparazioni farmaceutiche di ampicillina di sodio [11, 12].

La loro formazione può avvenire sia durante la produzione del principio attivo e delle preparazioni farmaceutiche [3] sia durante la loro conservazione; il sale di sodio dell'ampicillina è considerato una delle poche sostanze solide che degradano nel tempo a temperatura ambiente e per la sua conservazione si ritiene necessario, oltre alla protezione dall'umidità, anche un ambiente refrigerato a circa 5 °C [13].

E' sembrato quindi opportuno misurare le quantità di impurezze da degradazione, in pratica costituite quasi esclusivamente da oligomeri [11], in preparazioni farmaceutiche contenenti ampicillina sodica ottenuta sia mediante liofilizzazione sia per precipitazione da solventi non acquosi.

Materiali e metodi

Le analisi mediante *high-performance liquid chromatography* (HPLC) sono state effettuate utilizzando una colonna Lichrosorb RP-18 da μm 10 e mm 4,6 x 250 (Merck).

E' stato usato un apparecchio per HPLC Perkin-Elmer costituito da un sistema di pompaggio serie 3 collegato ad un rivelatore spettrofotometrico LC-75; l'andamento cromatografico è stato seguito misurando l'assorbimento a 215 nm.

Il calcolo delle aree dei picchi è stato effettuato con un integratore Perkin-Elmer Sigma 10B.

Come sarà descritto altrove più in dettaglio, per l'eluizione sono state usate le seguenti fasi mobili: A: soluzione acquosa di fosfato monopotassico 0,02 M a pH 4,2; B: miscela di acetonitrile: acqua nel rapporto 80:20 (v:v). Il gradiente di eluizione, ad andamento lineare, è stato ottenuto con un eluente costituito da 95% di A e 5% di B all'inizio e da 30% di A e 70% di B alla fine della cromatografia dopo 15 minuti ad un flusso di ml 1,5 al minuto.

Le quantità di ampicillina sodica sono state determinate per confronto con uno standard *United States Pharmacopeia* (USP) di ampicillina anidra. La misura delle impurezze da degradazione, in accordo con quanto effettuato da Larsen e Bundgaard [11] con un analogo metodo cromatografico, è stata ottenuta dalla somma degli assorbimenti a 215 nm dei singoli picchi con un tempo di ritenzione maggiore di quello dell'ampicillina.

Lo stato cristallino è stato rilevato al microscopio ottico a luce polarizzata con le modalità previste dal *Code of Federal Regulations* [13].

Risultati

Nella Tab. 1 sono riportati per ogni specialità medicinale analizzata contenente ampicillina sodica allo stato amorfo (A) o cristallino (C) la quantità di principio attivo ritrovata rispetto a quella dichiarata e la quantità di impurezze da degradazione calcolata come percentuale della somma del loro assorbimento a 215 nm rispetto all'assorbimento totale alla stessa lunghezza d'onda.

Nella Fig. 1 sono riportati due caratteristici cromatogrammi relativi ad ampicillina sodica cristallina con un basso contenuto di impurezze e ad ampicillina sodica allo stato amorfo con un contenuto di impurezze molto superiore.

Discussione

Dai dati riportati nella Tab. 1 è evidente la modesta quantità di impurezze da degradazione presente nella specialità contenente ampicillina sodica allo stato cristallino e quindi presumibilmente ottenuta per precipitazione da solventi organici rispetto al notevole contenuto di impurezze presente nei campioni con ampicillina sodica non cristallina, e quindi ottenuta per liofilizzazione.

Per quanto riguarda poi la determinazione analitica dei prodotti da degradazione è stato già da tempo riportato [14] che la selettività dei metodi chimici descritti nelle varie farmacopee per le analisi di alcune penicilline, fra le quali l'ampicillina, è da ritenersi in generale non sod-

Tabella 1. - *Quantità di ampicillina e di impurezze da degradazione ritrovate in specialità medicinali contenenti ampicillina sodica*

Campione	Ampicillina di sodio		Impurezze da degradazione
	stato fisico	%	%
A	A	106	15
B	A	99	13
C	A	96	11
D	A	108	10
E	C	104	2

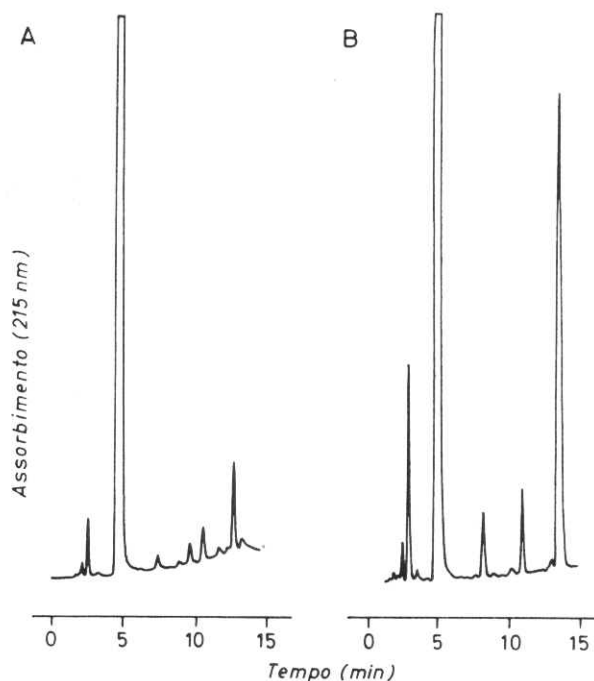


Fig. 1. - Cromatogrammi di specialità medicinali contenenti ampicillina sodica con basse (A) ed alte (B) quantità di impurezze da degradazione. Ampicillina sodica - tempo di ritenzione ca. min 5 - iniettata μg 50.

disfacente e soltanto una combinazione dei metodi ufficiali può garantire, e non sempre, la loro qualità; l'HPLC è considerata la tecnica superiore in quanto altamente selettiva, veloce e precisa.

Con questa tecnica però è necessario adottare un'eluizione a gradiente in quanto sistemi isocratici con miscele di soluzioni acquose tamponate ed acetonitrile o metanolo hanno dato risoluzioni incomplete o hanno richiesto tempi non accettabilmente lunghi [11].

Al riguardo sembra utile far rilevare che i metodi con i quali le ditte produttrici di specialità medicinali dichiarano di controllare l'ampicillina sodica - sia come mate-

ria prima che nel prodotto finito - sono in generale quelli descritti nell'attuale IX Ed. della *Farmacopea Ufficiale* (FU); nei rari casi nei quali vengono descritti anche metodi di HPLC, l'eluizione è isocratica e non a gradiente.

L'attuale IX Ed. della FU, così come in generale le altre farmacopee, prevede per il dosaggio dell'ampicillina sodica, oltre ad un metodo microbiologico, un metodo chimico mercurimetrico con caratteristiche sostanzialmente analoghe a quelle del metodo iodometrico della USP, XXI Ed. Mentre però per questa ultima l'ampicillina sodica deve essere necessariamente cristallina - con le relative conseguenze in particolare sui prodotti da degradazione - una tale caratteristica, prevista anche nella precedente VIII Ed. della FU, non è più considerata necessaria nella attuale IX Ed. nella quale viene invece richiesta la misura delle impurezze da effettuarsi però anch'esse con un metodo mercurimetrico considerato, come già detto, non sufficientemente selettivo [14].

Alla luce di quanto esposto ed in considerazione del fatto che le vendite in Italia di specialità medicinali contenenti ampicillina - sia da sola che associata - dovrebbero aggirarsi annualmente sui 25-30 milioni di pezzi per un valore a ricavo industria intorno ai 35-40 miliardi, sembrerebbe indispensabile che il più rapidamente possibile anche in Italia l'utilizzazione farmaceutica dell'ampicillina sodica venga limitata al solo tipo cristallino, detto anche precipitato, eliminando così il tipo liofilizzato che ancora è quotato insieme al tipo precipitato ma ad un prezzo inferiore di circa un terzo, tra i prodotti ad uso farmaceutico nell'attuale listino della Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Milano.

Ricevuto il 7 luglio 1988.

Accettato il 20 luglio 1988.

BIBLIOGRAFIA

- SMITH, H. & MARSHALL, A.C. 1971. Polymers formed by some β -lactam antibiotics. *Nature* 232: 45-46.
- MUNRO, A.C., DEWDNEY, J.M., SMITH, H. & WHEELER, A.W. 1976. Antigenic properties of polymers formed by β -lactam antibiotics. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50: 192-205.
- BUNDGAARD, H. 1980. Pharmaceutical aspects of penicillin allergy: polymerization of penicillins and reactions with carbohydrates. *J. Clin. Hosp. Pharmacol.* 5: 73-96.
- IDSOE, O., GUTHE, T., WILLCOX, R.R. & DE WECK, A.L. 1968. Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular references to fatalities from anaphylactic shock. *Bull. WHO* 38: 159-188.
- DE WECK, A.L. & SCHNEIDER, C.H. 1980. Allergic and immunological aspects of therapy with cefotaxime and other cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 6(Suppl. A): 161-168.
- BUNDGAARD, H. & LARSEN, C. 1977. Polymerization of penicillins. IV. Separation, isolation and characterization of ampicillin polymers formed in aqueous solution. *J. Chromatogr.* 132: 51-59.
- DEWDNEY, J.M., SMITH, H. & WHEELER, A.W. 1971. The formation of antigenic polymers in aqueous solution of β -lactam antibiotics. *Immunology* 21: 517-525.
- SMITH, H., DEWDNEY, J.M. & WHEELER, A.W. 1971. A comparison of the amounts and the antigenicity of polymeric materials formed in aqueous solution by some β -lactam antibiotics. *Immunology* 21: 527-533.
- AHLSTEDT, S., KRISTOFFERSSON, A., SVÄRD, P.-O., THOR, L. & ORTENGREN, B. 1976. Ampicillin polymers as elicitors of passive cutaneous anaphylaxis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51: 131-139.
- PARKER, A.C. & RICHMOND, J. 1976. Reduction in incident of rash using polymer-free ampicillin. *Br. Med. J.* 1: 998.
- LARSEN, C. & BUNDGAARD, H. 1978. 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.
- LARSEN, C. & JOHANSEN, M. 1982. Separation and semi-quantitative determination of ampicillin polymers in ampicillin bulk preparations by means of thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 246: 360-362.
- UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS. 1984. Title 21, Part. 436.203. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- NACHTMANN, F. & GSTREIN, K. 1980. Comparison of HPLC and some official test methods for different penicillins. *Int. J. Pharmacol.* 7: 55-62.