

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ

О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ

(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Ципрофлаксацин – особливості ідентифікації та кількісного визначення»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи ФЗА
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»

(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання

Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»

«Фармація»

(назва освітньої програми)

Лівончик Леся Леонідовна

(прізвище та ініціали)

Керівник: **проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: **доцент, к.фарм.н. Негода Т.С.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ФТОРХІНОЛОНІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови фторхінолонів.....	10
1.2. Біологічна активність фторхінолонів.....	14
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ.....	20
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості ципрофлосацину..	20
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	27
 ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

FQ – Фторхінолони

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

ВСТУП

Актуальність теми. Фторхінолони – це група лікарських засобів, які мають бактерицидну дію. Вони впливають на синтез ДНК в бактеріальних клітинах, блокують життєво важливі ферменти для бактерій — ДНК-гіразу та топоізомеразу. Лікарські засоби цієї групи діють на мікроорганізми в період їх росту, мають постантибіотичний ефект та імуномодуючу дію.

Фторхінолони (FQ) є одними з найуспішніших антибіотиків. Їх використовують в медичній практиці понад 30 років. FQ діють на бактеріальні ферменти ДНК-гіразу та ДНК-топоізомеразу IV. Вони стабілізують ковалентний комплекс фермент-ДНК. ДНК розщеплюється в обох ланцюгах. Це призводить до загибелі клітин. Лікарські засоби цієї групи є дуже ефективним способом знищення бактерій. Стійкість до FQ бактерій стає більш проблематичною в останні роки. Тому, необхідні альтернативні сполуки, які будуть оригінальними або створеними хімічною модифікацією вихідного фторхінолону [1-3].

Налідиксова кислота була отримана у 1962 році під час синтезу 7-хлор-1-етил-1,4-дигідро-4-оксо-3-хінолінкарбонової кислоти. Вона була виявлена як домішка в синтезі хлорохіну (протималарійного засобу). Налідиксова кислота має помірну антибактеріальну активність щодо грамнегативних бактерій (окрім, *Pseudomonas aeruginosa*). Пізніше налідиксову кислоту виробляли для клінічного застосування для лікування неускладнених ІСШ.

Це спонукало до синтезу додаткових модифікованих аналогів, які продемонстрували незначні покращення порівняно з налідиксовою кислотою щодо спектру активності.

До інших аналогів увійшла оксолінова кислота, яка знайшла широке використання у медичній практиці. Ці сполуки – оксолінова кислота та

налідиксова кислота (налідиксова кислота – це 1,8-нафтиридон, а не справжній хінолон), вважаються хінолонами першого покоління.

Хінолони класифікують за їхньою структурою, механізмом і шляхом деградації, а також – за структурою, активністю *in vitro* та клінічним використанням. Постійна хімічна оптимізація та модифікація хінолонів призвела до заміни атома фтору на карбон (C-6) у каркасі молекули хінолонів, утворюючи фторхінолон (FQ). Першим фторхінолоном був флумеквін, який продемонстрував не тільки фармакологічну активність, а й токсичність [4-10].

Хінолонові антибіотики є успішнішим класом інгібіторів топоізомерази. Вони є синтетичними протимікробними препаратами. Вихідною сполукою цих антибіотиків є налідиксова кислота.

Використовуються для лікування бактеріальних інфекцій, викликаних під впливом дії грампозитивних та грамнегативних бактерій, при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів (ІМП), пієлонефриту, гастроентериту; захворювань, що передаються статевим шляхом (гонорея, туберкульоз), простатиту, пневмонії, інфекцій шкіри та м'яких тканин. Через підвищення резистентності та токсичність, їх використання для лікування легких інфекцій було протипоказано.

Глобальне зростання резистентності до антибіотиків стимулювало дослідження нових антибіотиків. Це також спонукало до подальших досліджень антибіотиків – похідних хінолонів [11-17].

Після успіху медичного застосування ципрофлоксацину ретельно досліджували для цієї молекули зв'язки структура-активність (SAR). Зусилля медичної хімії створили широкий спектр FQ нового покоління антибіотиків (3-го та 4-го покоління). Нові антибіотики мають ще більший спектр активності, ефективності та меншу поширеність резистентності.

Спарфлоксацин та моксифлоксацин є більш відомими сполуками 3-го та 4-го поколінь. Вони стали першими хінолонами, які показали значну ефективність проти грампозитивних бактерій. *Mycobacterium tuberculosis* - бактерія, що викликає туберкульоз (найсмертоносніше бактеріальне інфекційне захворювання), є сприйнятливою до FQ. Моксифлоксацин та левофлоксацин (хінолон 2-го покоління) використовувалися для лікування мультирезистентні (МЛР) інфекції.

Незважаючи на успіх, деякі FQ – тровафлоксацин та грепафлоксацин довелося вилучити з клініки через токсичність. Ципрофлоксацин продовжує залишатися одним із найбільш клінічно важливих антибіотиків.

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) класифікувала ципрофлоксацин (серед FQ) як критично важливий антибіотик [18-20].

Таким чином, ципрофлоксацин відноситься до небезпечних та токсичних лікарських речовин. Контроль якості цього препарату повинен проводитися ретельно, з використанням інструментальних методів, оскільки висока якість цього лікарського засобу є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Ципрофлоксацин є поліфункціональною органічною сполукою. Молекула містить фармакофорні угруповання, функціональні групи – галоген (Флуор), аміно групу вторинну, ароматичний цикл, карбоксильну групу, кето групу, гетероциклічний та циклопропановий фрагменти. Субстанцію ципрофлоксацину можна досліджувати хімічними методами та інструментальними методами. Можна передбачити формування у субстанції внутрішньомолекулярних зв'язків за рахунок вільних функціональних груп, особливо – карбокси групи, реакцій деградації молекули, елімінування атомів Флуору. Можливе утворення побічних продуктів під час синтезу субстанції ципрофлоксацину, утворення супровідних речовин та неприпустимих домішок, які будуть впливати на якість субстанції.

Важливим завданням фармацевтичного аналізу ципрофлоксацину є введення у фармацевтичну практику сучасних інструментальних методів, окрім тих методів, які рекомендовано Фармакопеями, для підвищення якості аналізу.

Актуальним завданням є розробка хроматографічних умов при дослідженні субстанції ципрофлоксацину методом ВЕРХ, методик пробопідготовки зразків при виконанні досліджень методом ВЕРХ та спектральними методами, які дозволять зробити коректні висновки щодо якості досліджуваного зразку.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування та методик дослідження методом ВЕРХ та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області зразку субстанції ципрофлоксацину, які дозволять зробити висновок щодо її якості.

Завдання експериментального дослідження:

- розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції ципрофлоксацину з метою визначення її чистоти;
- розробити методики хроматографування методом ВЕРХ та спектрального дослідження методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області субстанції ципрофлоксацину;
- провести інструментальні дослідження зразків субстанції ципрофлоксацину у порівнянні зі стандартними зразками та інтерпретувати результати досліджень.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у розробці умов та методик досліджень методом ВЕРХ та спектрофотометрично субстанції ципрофлоксацину з метою підтвердження її якості.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на конференції «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р.

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 22.

SUMMARY

Livonchyk Lesya

CIPROFLOXACIN – FEATURES OF IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharm.sciences Welchinska Olena.

Keywords: ciprofloxacin, fluoroquinolones (FQ), HPLC, admixture.

Introduction. Fluoroquinolones (FQ) are among the most successful antibiotics. They have been used in medical practice for over 30 years. FQs act on the bacterial enzymes DNA gyrase and DNA topoisomerase IV. They stabilize the enzyme-DNA covalent complex. DNA is cleaved in both strands. This leads to cell death. Medicines of this group are a very effective way of killing bacteria. Bacterial FQ resistance has become more problematic in recent years. Therefore, alternative compounds that are original or created by chemical modification of the original fluoroquinolone are needed. An important task of the pharmaceutical analysis of ciprofloxacin is the introduction into pharmaceutical practice of modern instrumental methods, in addition to those methods recommended by the Pharmacopoeia, to improve the quality of the analysis. An urgent task is the development of chromatographic conditions for the study of the ciprofloxacin substance by the HPLC method, methods of sample preparation when performing studies by the HPLC method and spectral methods that will allow us to draw correct conclusions about the quality of the sample being studied.

Materials and methods. Research object are ciprofloxacin, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of ciprofloxacin. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; spectral method –IR-absorbption spectrophotometry (Specord M-80); computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. It was found that the chromatographic conditions and research methods by the HPLC method were developed correctly and the following results were obtained: ciprofloxacin ($R_t=1.546$ min) compared with $R_t=2.138-2.145$ min of the standard; in the IR spectrum, one can observe the displacement of the valence vibrations of the functional groups δOH , NH , $C=O$, $-CH_2-\nu OH$, NH , $C=O$, $-CH_2-$: yes, the deformation vibrations of σNH give uncharacteristic bands of moderate intensity in the region of $1580-1625\text{ cm}^{-1}$ (in the sample, the deformation fluctuations of σNH are located in the region of 740 cm^{-1}).

Conclusions. Using the HPLC method, specified impurities were found in the sample: impurity C ($R_t=5.517$ min), impurity E ($R_t=2.797$ min), impurity D ($R_t=9.690$ min); unspecified impurity 3 ($R_t=4.872$ min); unacceptable unidentified impurities ($R_t=1.324; 1.682$ min).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

<p>Вельчинська О.В., Мелешко Р.А., Лівончик Л.Л. ОСОБЛИВОСТІ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ПОХІДНИХ КАРБАЗОЛУ. Тези доповіді на конференції «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р., стор. 438.</p>	
<p>FIP Symposium, Digital Event «Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-oriented model of practice», 12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.</p>	
<p>FIP Symposium, Digital Event «The role of the pharmacist in CORD», 15.11.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.</p>	
<p>FIP Symposium, Digital Event «Antimicrobial resistance and stewardship education: Supporting development of the pharmaceutical workforce», 20.11.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.</p>	