

**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 «Ципрофлаксацін – 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 ципрофлоксацину..	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 – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см<sup>-1</sup> – 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  $^1\text{H}$  – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$  – градуси Цельсія

FQ – Фторхінолони

Hal – галоген

J, Гц – значення константи 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 імуномодулюючу 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 будували б 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 (С-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 містять 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 підтверження 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.

# РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ФТОРХІНОЛОНІВ

## 1.1. Особливості хімічної будови фторхінолонів

Ципрофлоксацин має хімічну номенклатурну назву ІЮПАК 1-циклопропіл-6-фтор-4-оксо-7-піперазин-1-іл-хінолін-3-карбонова кислота. Молекула складається із спряженої ароматичної системи, є поліциклічною, містить гетероциклічний фрагмент піперазину та аліциклічний фрагмент – циклопропану, функціональні групи - кето-, карбокси-, аміно групи. Має основні властивості за рахунок присутності у циклічній системі аміно груп (рис. 1.1.1).

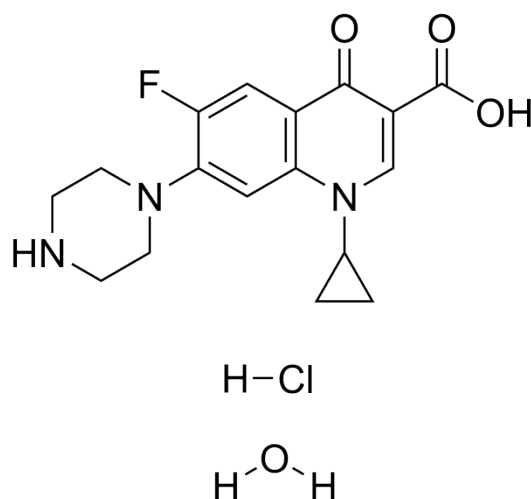


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула ципрофлоксацину.

Ципрофлоксацину гідрохлорид моногідрат є потужним перорально активним інгібітором топоізомерази IV, викликає пошкодження мітохондріальної ДНК та ядерної ДНК, призводить до мітохондріальної дисфункції. Ципрофлоксацину гідрохлориду моногідрат має антипроліферативну дію та індукує апоптоз. Ципрофлоксацину гідрохлориду

моногідрат — антибіотик групи фторхінолонів та має виражену антибактеріальну дію.

Модифікація хінолонів проводилася за допомогою заміни атома Флуору на атом Карбону (при С-6) у каркасі молекули хінолонів. Утворюються фторхінолони (FQ). Першим серед фторхінолоном був флумеквін.

Ключовою модифікацією, яка призвела до підвищення ефективності, було введення піперазинового кільця при С-7. Ця модифікація по С-7 разом із флуором при С-6 сформувала хінолони 2-го покоління. Ці лікарські засоби мають ширший спектр дії та високу біодоступність, покращені фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості. Вони також менш токсичні та менш сприйнятливі до деяких мутацій, які призводили до високих рівнів резистентності до хінолонів 1-го покоління.

Клас хінолонів 2-го покоління з'явився із синтезом норфллоксацину, який довів свою ефективність при лікуванні інфекцій сечостатевої системи та ШКТ, а підвищену активність проти *P. aeruginosa*.

Ципрофлоксацин став першим хінолоном, який продемонстрував ефективну системну дію. Ципрофлоксацин входить до списку лікарських засобів першої лінії для лікування фебрильної нейтропенії з низьким ризиком у онкохворих, як препарат другої лінії для лікування холери, проти ряду ІСШ (спричинені *Pseudomonas aeruginosa*). Він ефективний у лікуванні остеомієліту, простатиту та септицемії (спричинені *Enterobacteriaceae*).

Ципрофлоксацин використовується для лікування бактеріальних інфекцій у різних частинах тіла. Рідка форма та таблетки ципрофлоксацину використовуються для лікування інфекції сибірської виразки. Препарат використовується для лікування та профілактики чуми. Особливості хімічної

структури лікарських засобів, які є похідними фторхінолонів представлено на рисунку 1.1.2.

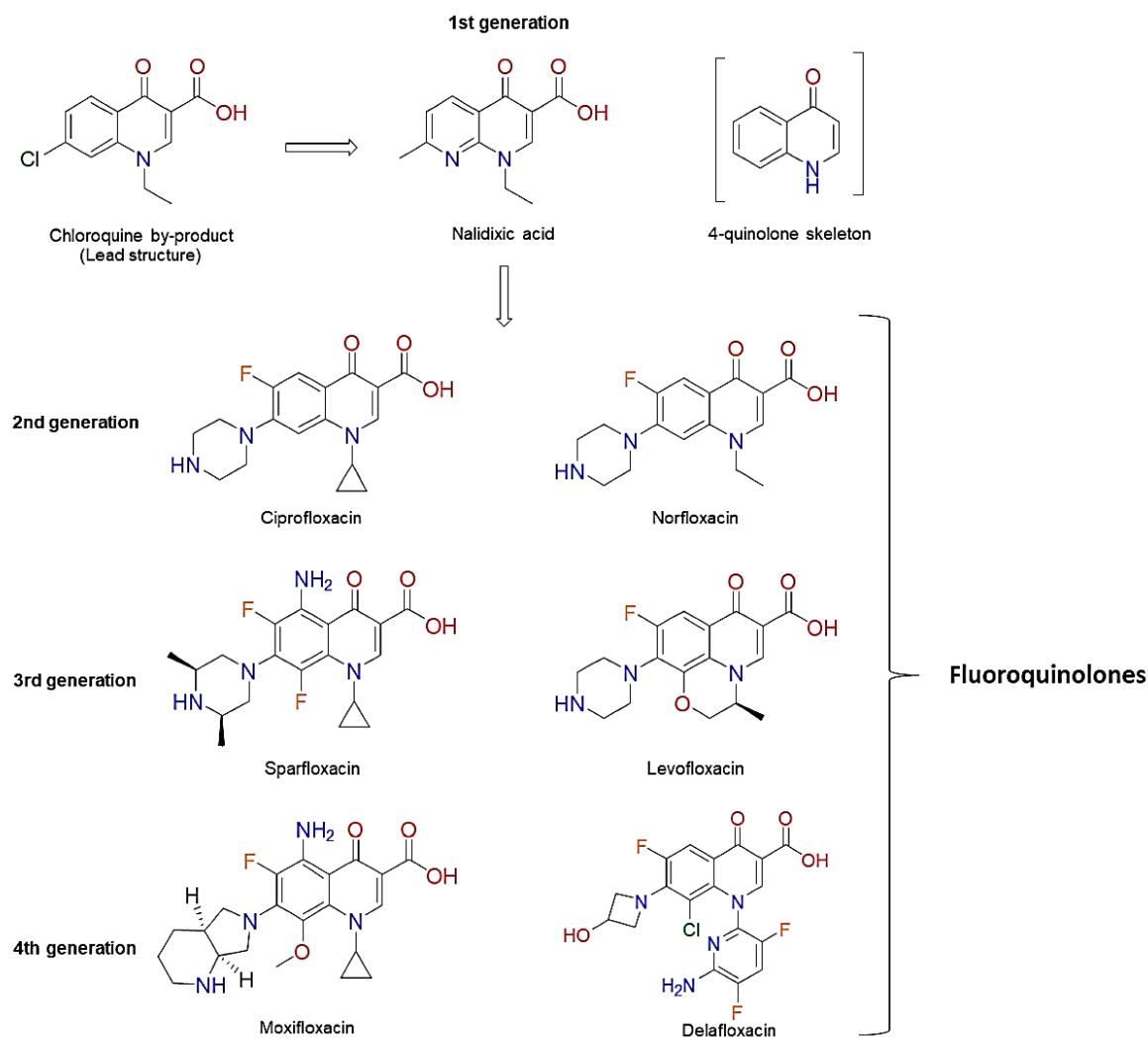


Рисунок 1.1.2. Хімічні формули фторхінолонів.

Як видно із рисунку 1.1.2 основу молекули всіх лікарських засобів фторхінолонів складає 4-хінолоновий скелет. Вихідною речовиною, яку хімічно модифікували і створили лікарські засоби різних поколінь стала речовина – налідиксова кислота.

До фторхінолонів 1-го покоління відноситься хлорохін. До фторхінолонів 2-го покоління відносяться ципрофлоксацин та норфлуксацин.

До фторхінолонів 3-го покоління відносяться спарфлоксацин та

левофлоксацин. До фторхінолонів 4-го покоління відносяться моксіфлоксацин та делафлоксацин.

На рисунку 1.1.3 показано хімічні формули фторхінолонів 4-го покоління, які є сучасними розробками і суттєво відрізняються за хімічною будовою від фторхінолонів 1-го, 2-го та 3-го поколінь, а саме: наявністю циклобутанового (делафтоксацин, забофлоксацин) або циклогексанового (аварофлоксацин, фінафлоксацин) фрагменту, насичених гетероциклічних фрагментів, ацетиленого зв'язку (фінафлоксацин), додаткових атомів Флуору (делафтоксацин, аварофлоксацин).

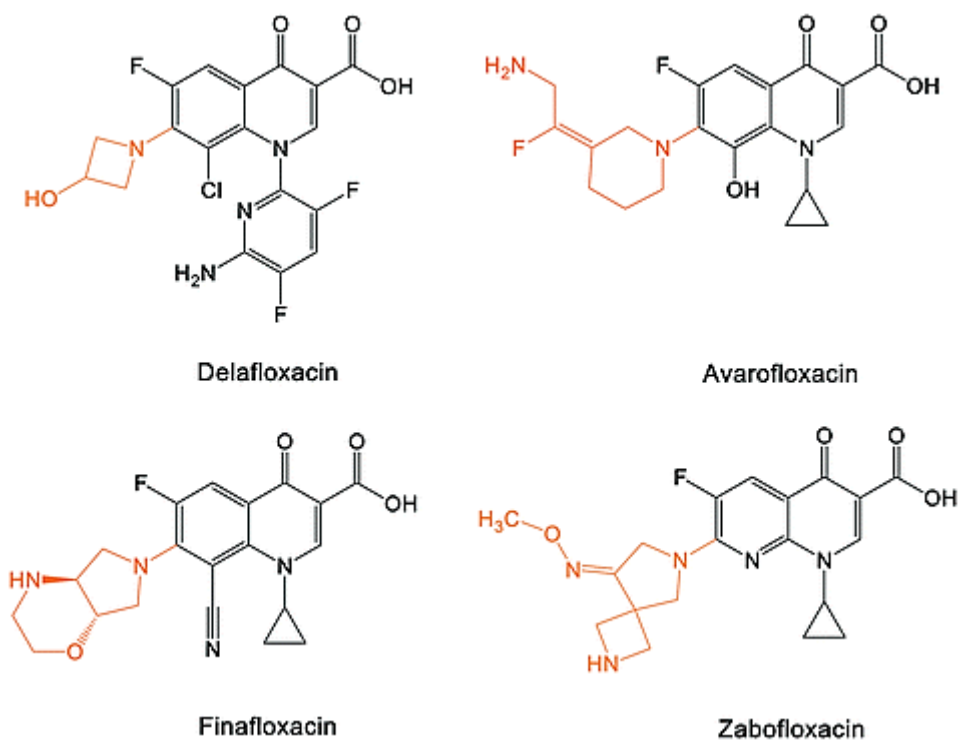


Рисунок 1.1.3. Хімічні формули фторхінолонів 4-го покоління.

Всі молекули фторхінолонів характеризуються делокалізованою електронною густиною, спряженою ароматичною системою та присутністю поліциклічного каркасу з різноманітними, відкритими до хімічної активності функціональними групами.

## 1.2. Біологічна активність фторхінолонів

Основною причиною успіху FQ є те, що вони націлені на бактеріальні топоізомерази типу II, ДНК-гіразу (gyrase) і ДНК-топоізомеразу IV.

ДНК-топоізомерази каталізують взаємоперетворення топологічних форм ДНК (розслабленої суперскрученої, катеновано-декатенованої). Вони є ключовими для пов'язаних з ДНК процесів: реплікація та транскрипція.

Топоізомерази можуть розслабляти ДНК. Тільки гіраза може вводити негативну суперспіральку. Гіраза необхідна для всіх бактерій, але відсутня у вищих еукаріотів. Це робить її ідеальною мішенню для антибактеріальних засобів. Еукаріоти мають ДНК-топоізомеразу II (topo II), але цей фермент відрізняється від бактеріальної гірази та topo IV. Тому, ці ферменти можуть бути спрямовані вибірково. Гіраза та topo IV є гетеротетрамерами. Вони складаються з GyrA та GyrB (A2B2) у випадку, а у випадку topo IV з ParC та ParE (C2E2). Механізм дії цих ферментів передбачає зв'язування двох сегментів ДНК, сегмента G і сегмента T (транспортованого).

Фермент розщеплює G-сегмент в обох ланцюгах ДНК, залучаючи амінокислотні залишки в обох субодиницях, спричиняючи утворення ковалентних зв'язків між ДНК та тирозином активного центру в GyrA та ParC. Це забезпечує проходження сегмента T через розрив G-сегмента. Це призводить до змін в топології ДНК: релаксація та декатенація [17-19].

У випадку гірази сегменти T і G розташовані на одній ділянці ДНК. Це забезпечує векторне проходження ланцюга та введення негативних суперспіралей. Механізм забезпечую гідроліз двох молекул АТФ. Однак, роль АТФ ще належить визначити (рис. 1.2.1).

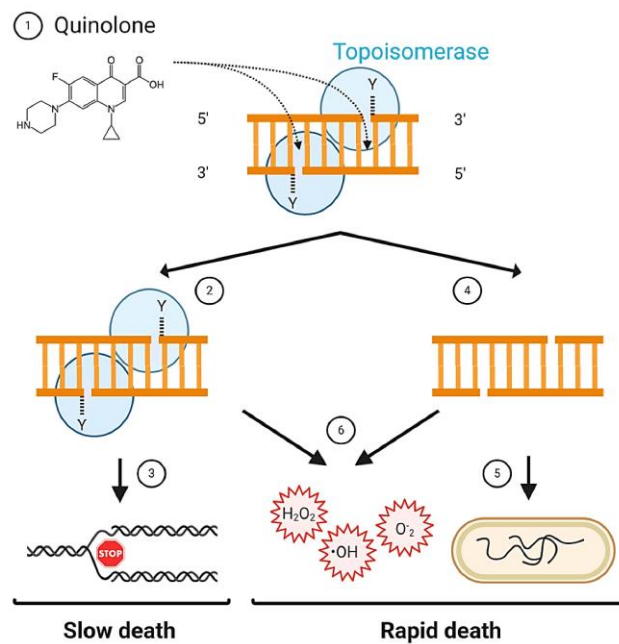


Рисунок 1.2.1. Вплив топоізомераз на загібель бактерій.

Хінолони вбивають бактерії повільно, залежно від їх концентрації. У концентраціях, які вдвічі вище значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), бактерії гинуть після добового лікування хінолонами. При концентраціях, які в 5–10 разів вище значення МІК, бактерії гинуть через кілька годин лікування хінолоном. Першою стадією летального результату хінолону є зв'язування його з комплексом топоізомерази-ДНК. Комплекси розщеплення містять зруйновану ДНК. Вона не може повторно запечатана тією ж топоізомеразою у присутності хінолону. Комплекси розщеплення та їхні «приховані» розриви ДНК є оборотними.

Вважається, що загібель бактерій може виникнути двома шляхами. Якщо комплекс розщеплення не обробляється, реплікація ДНК і транскрипція блокуються. Це призводить до загібелі клітини: повільної смерті. Якщо комплекс розщеплення оброблений (видалення гірази з ДНК за допомогою невідомого білка), а пошкоджена ДНК не відновлюється, то це призводить до фрагментації хромосоми. Хромосома швидко вбиває клітину: швидка смерть.

Наявність пошкодженої ДНК та комплексів розщеплення спричиняють накопичення внутрішньоклітинних АФК, що може призвести до більшої кількості розривів ДНК. Пошкодження ДНК, викликане хінолонами, можна виправити. Це може мати важливі наслідки для виживання клітини під впливом хінолонових і нехінолонових антибіотиків.

Налідиксова кислота (нафтиридон), була отримана як побічний продукт під час синтезу протималарійних хінінових сполук. Вона діє шляхом інгібування активності ферментів бактеріальної топоізомерази типу II, пригнічення розмноження бактерій. Її використання було обмеженим через вузький спектр дії, низькі концентрації в сироватці крові. Були створені вдосконалені аналоги для нових методах лікування діареї та ІСШ, спричинених резистентними *Shigella* та *Escherichia coli*.

Вивчався взаємозв'язок структура-активність хінолонових антибіотиків. На рис. 1.2.2 показано структуру ядра основних хінолонів із двома основними групами: хінолонами та нафтиридонами (ідентифікація за позицією «X»).

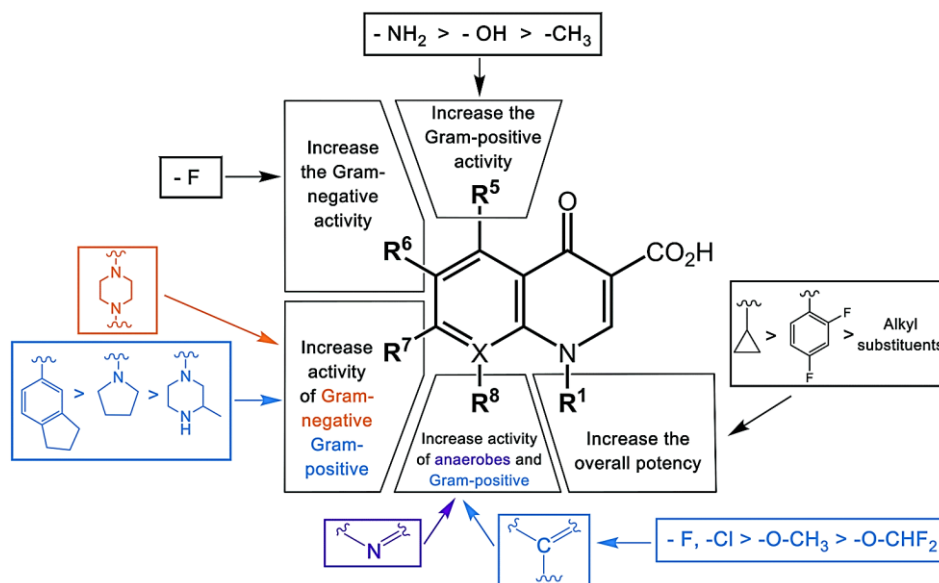


Рисунок 1.2.2. Хінолони та нафтиридоны (ідентифікація за позицією «X»).



Атом Карбону в положенні X визначає хінолони. Атом Нітрогену в положенні X визначає нафтиридони.

За спектром дії хінолони класифікуються на чотири покоління. Розвиток хінолонів відбувався з метою розширення спектру активності. Це – шлях додавання різних замісників у позиціях на фармакофорі.

Найпоширенішими побічними ефектами хінолонів є шлунково-кишкові ефекти та артралгія, які пов'язані зі структурними особливостями фармакофора хінолонів.

Попередні хінолони були обмежені у клінічному застосуванні через небажані побічні ефекти – рідкісні та важкі. Ці недоліки залежать від замісників у різних положеннях на фармакофорі, є специфічними для конкретних агентів. Подовжено інтервал QTc у пацієнтів, які приймали спарфлоксацин і грепафлоксацин. Подовження інтервалу QTc призводить до серцевих аритмій.

Фототоксичність спостерігалася при застосуванні клінафлоксацину та спарфлоксацину.

При тривалому застосуванні фторхінолонів тривалий період описано розрив сухожилля, пошкодження нерва та синдром інвалідності. Ці побічні ефекти вважаються потенційно постійними.

Інші ефекти – це гематологічна токсичність темафлоксацину, гепатит при застосуванні тровафлоксацину, ефекти гіпоглікемії при застосуванні клінафлоксацину та гатифлоксацину.

Імунологічні побічні ефекти спостерігалися при застосуванні ряду фторхінолонів. Це – вплив на ЦНС та генотоксичність.

Генотоксичність хінолонів спостерігається у деяких фторхінолонів під дією ультрафіолетового світла (лемефлксацин, ципрофлоксацин, моксифлксацин). Вони були токсичними та мутагенними після реакції з топоізомеразою ІІа людини в присутності УФ-випромінювання. Токсичність хінолонів була зменшена шляхом хімічних модифікацій. Гареноксацин виявив мало токсикологічних проявів.

Профіль безпеки хінолонів постійно оновлюється. Деякі загрозливі для життя побічні ефекти (розрив та розшарування аорти, спричинені впливом фторхінолонів) отримали додаткові попередження з боку FDA.

Фторхінолони не слід застосовувати пацієнтам з аневризмою аорти або літнім людям.

Було виявлено, що сучасні хінолони призводять до покращення ефективності, зниженню токсичності у порівнянні з класичними хінолонами.

Деякі з сучасних хінолонів є гібридними антибіотиками. Вони мають каркас хінолонів, який приєднано до рифаміцину або до оксазолідинону (МСВ3837). Гібрид фторхінолону та оксазолідинону – кадазолід проходив випробування фази ІІІ для інфекцій, викликаних *Clostridium difficile*.

Щодо стійкості до хінолонів, основні мутації резистентності розташовані на ферментах ДНК-гірази та топоізомерази ІV, які розривають хінолони з комплексів розщеплення. Тому, для подолання цього опору, необхідна розробка нових агентів.

Важливо знайти нове місце зв'язування на ферментах. З цією метою були запропоновані хіназолінедіони як новий клас протимікробних сполук. Вони мають структуру, подібну до хінолонів і не містять фрагменту кетокислоти. Кетокислота була замінена карбонілом R2, який зв'язується з залишком аргініну ферменту водневим зв'язком. Зв'язування долає резистентність, але взаємодія водневого зв'язку виявилася слабшою, ніж

взаємодія метал-іон хінолонів. QnrA знижує сприйнятливість до хіназолін-2,4-діонів.

Дослідження хіназоліндіонів продемонстрували, що агенти класу хіназолідіонів із 3'-(амінометил)піролідинілом як замісником при R7 утворюють сильніше зв'язування з бактеріями.

Цей замісник діє на ферменти типу ІІα людини, що призводить до токсичності. Типи основних замісників при С7, знайдені в нових фторхінолонах та можуть бути застосовані до каркасу хіназоліндіону (рис. 1.2.3).

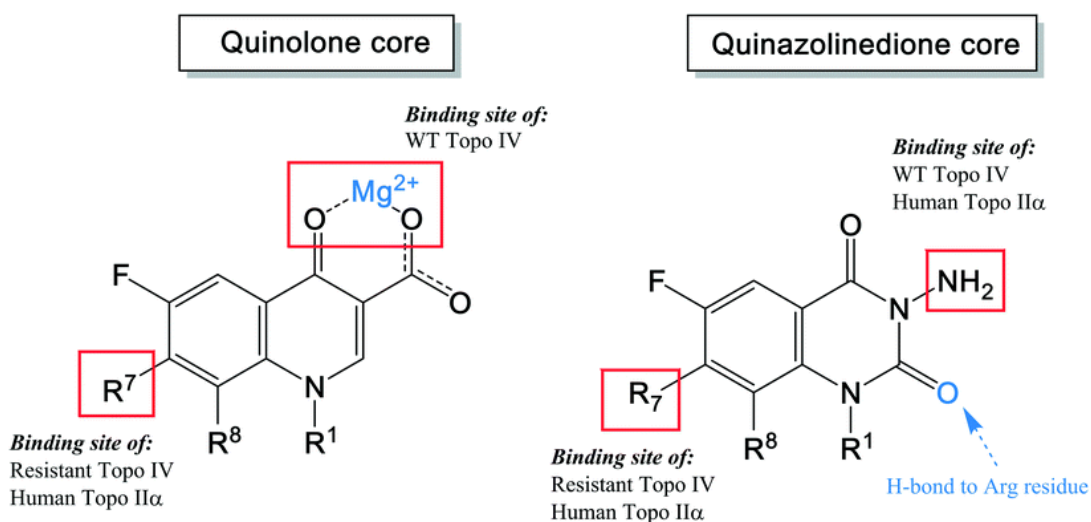


Рисунок 1.2.3. Схема введення нових замісників у каркас молекул хінолонів.

## РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ

### 2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості ципрофлосацину

Синтез ципрофлосацину базується на реакції Байера, без виділення будь-яких проміжних продуктів. В реакції використовують хлорангідрид трифторобензен карбонової кислоти з заміщеним аміноциклопропаном. Вирішальною стадією у синтезі ципрофлосацину була реакція побічного продукту диметиламіно з ацетилхлоридом для розділення його з етилового ефіру ципрофлосацину. Ретельний вибрані розчинників для кожної стадії збільшили практичний вихід кінцевого продукту. Розчинники обрані на основі міркувань безпеки людини відповідно до рекомендацій Міжнародної ради з гармонізації (ICH) (рис. 2.1.1).

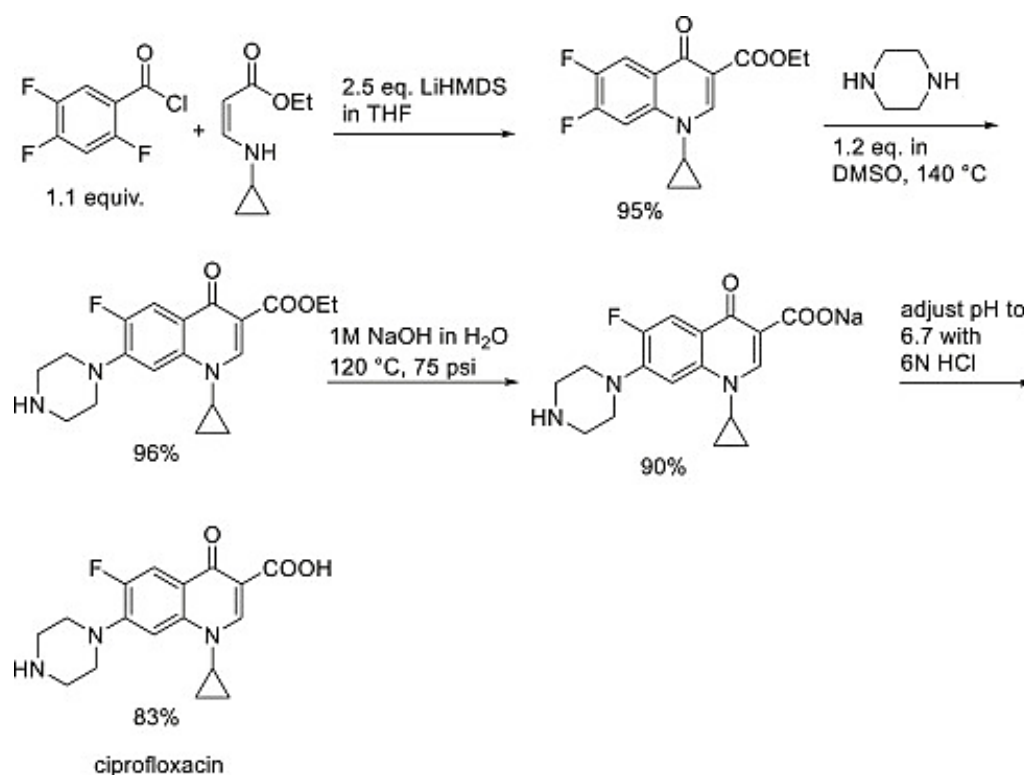


Рисунок 2.1.1. Схема синтезу ципрофлосацину.

За іншим способом синтезу ципрофлоксацину у якості вихідної сполуки використовують амінодихлортолуен. Це багатоступеневий синтез, під час якого відбуваються реакції галогенування, конденсації, УФ-опромінення (рис. 2.1.2).

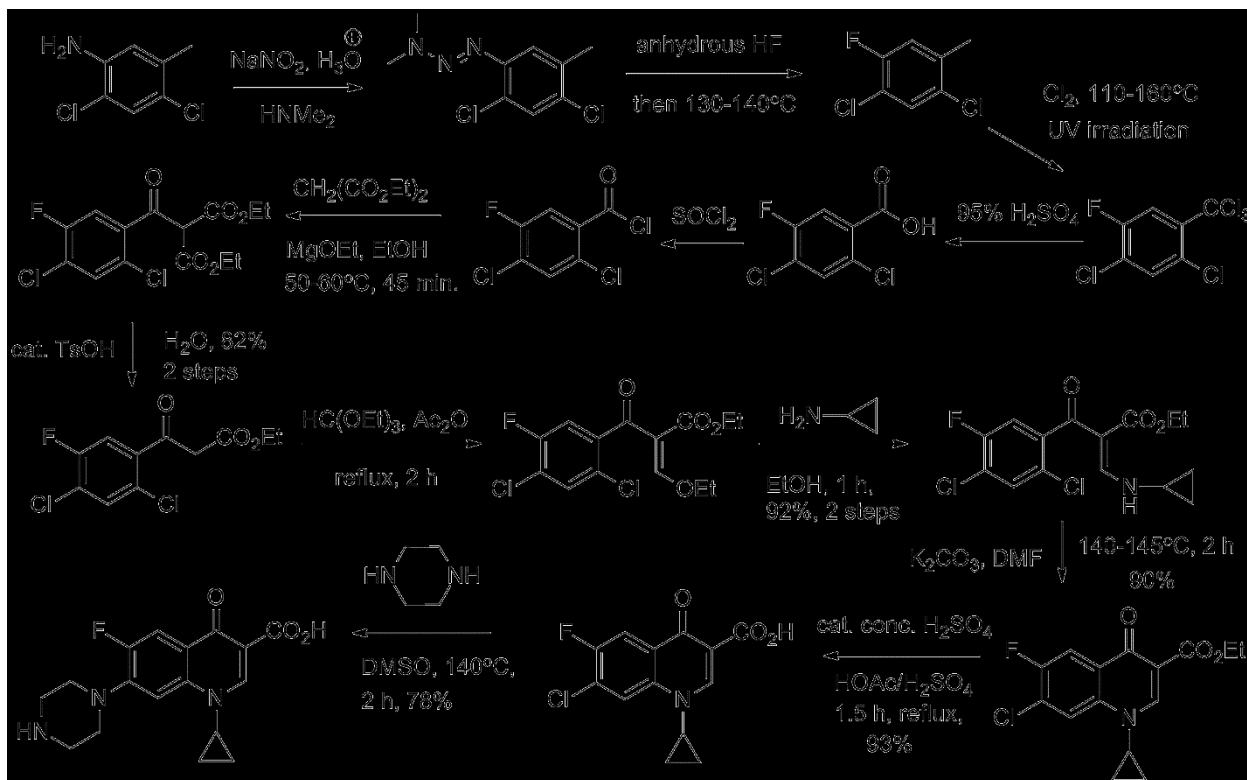


Рисунок 2.1.2. Схема синтезу ципрофлоксацину із амінодихлортолуену.

Досліджено реакцію комплексоутворення іонів Zn(II) з хінолоном у водному розчині залежно від значення рН.

Для дослідження рН-залежності утворення комплексу між Zn(II) та ципрофлоксацином використовували спектральний метод UV-Vis (рис. 2.1.3)

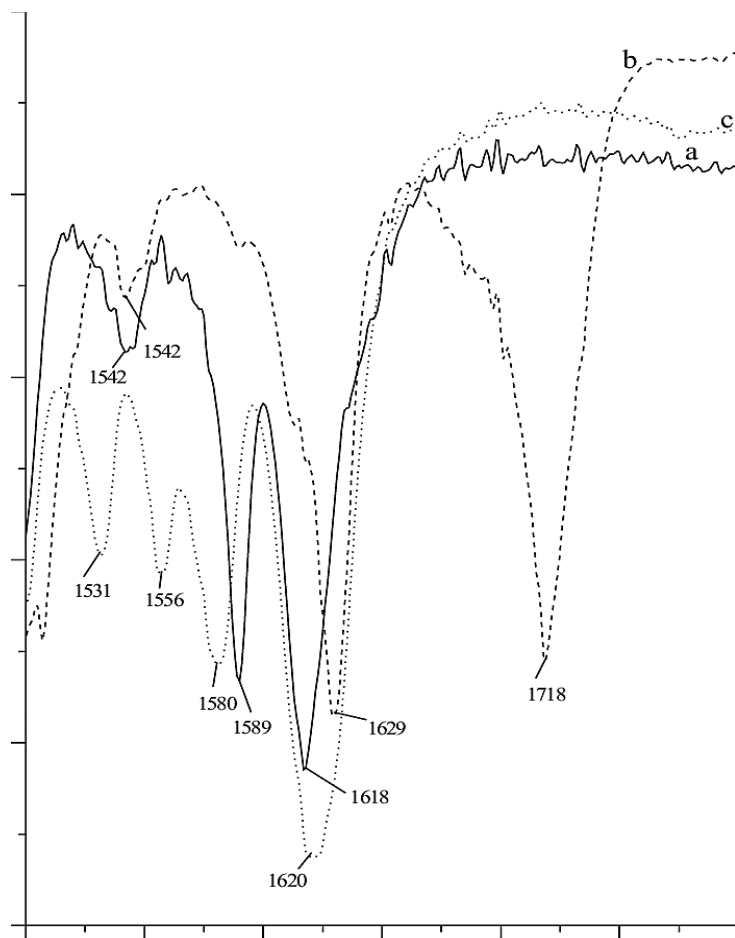


Рисунок 2.1.3. УФ-спектр комплексу ципрофлоксацину з катіонами Zn(II).

На спектрі відсутні деформаційні коливання карбоксильної групи, оскільки комплексоутворення відбувається по позиції карбоксильних груп.

1H ЯМР аналіз препаратів ципрофлоксацину.

Ципрофлоксацин є незамінним синтетичним антибіотиком, «фторхінолоном». Виконано 1H ЯМР дослідження розчинів двох композицій ципрофлоксацину з метою встановлення рівню чистоти субстанцій. Усі піки ципрофлоксацину можна побачити на рисунках 2.1.4-2.1.6.

Залежно від складу субстанцій можна спостерігати декілька допоміжних речовин. Обидва склади містять стеарат магнію (Mg st, Δ),

похідну целюлози – гіпромелозу (гідроксипропілметилцелюлоза) у субстанції одного з виробників, пластифікатор дибутилфталат, домішку D.

Концентрацію домішки D у композиції визначали шляхом порівняння площ сигналу її протонів 2 і 8 з площею сигналу H2 ципрофлоксацину. Рівень домішки D сягає 1,2% - це значно вище дозволеної межі межі (Європейська Фармакопея), яка дозволяє максимальний вміст 0,2% для домішки D.

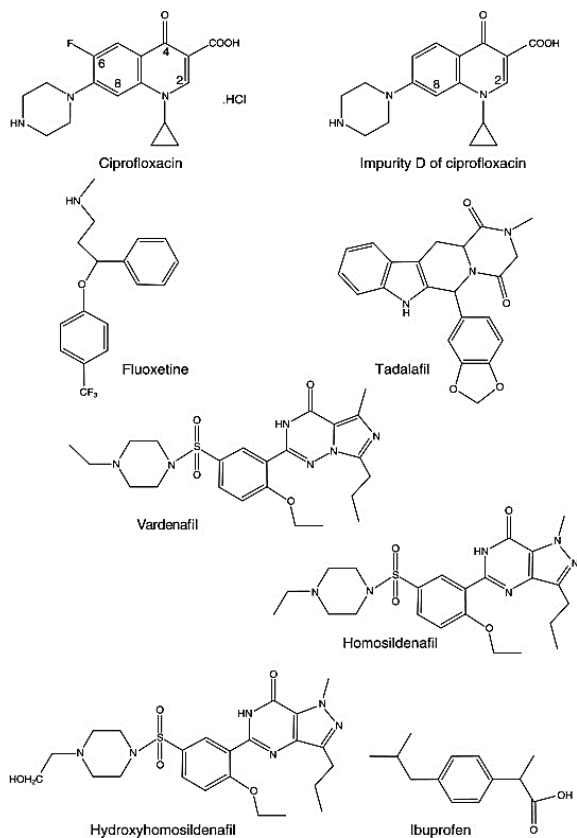


Рисунок 2.1.4. Хімічні формули домішок у субстанціях ципрофлоксацину.

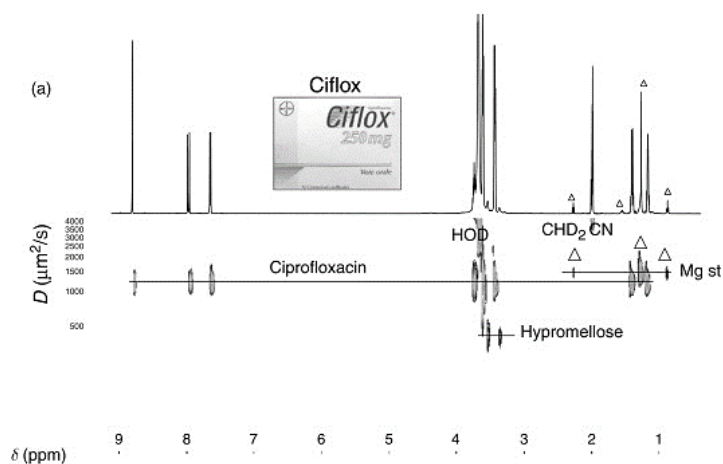


Рисунок 2.1.5. ПМР-спектр субстанції ципрофлоксацину (зразок 1).

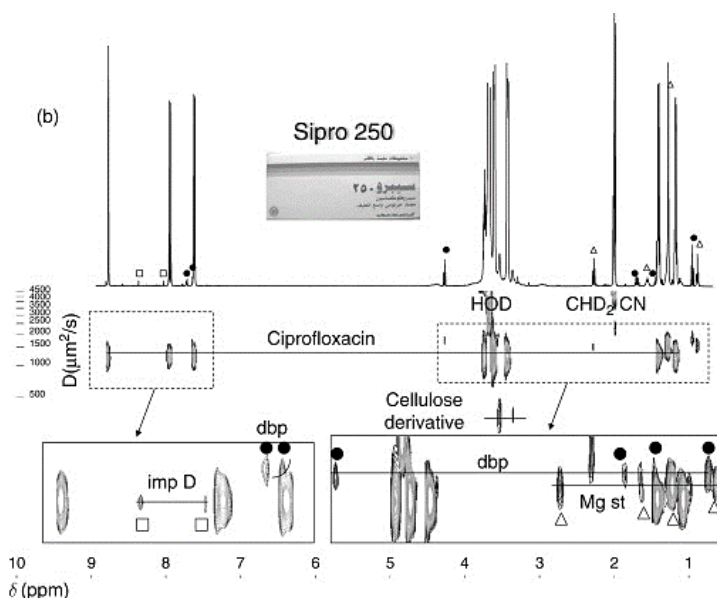


Рисунок 2.1.6. ПМР-спектр субстанції ципрофлоксацину (зразок 2).

Фторхінолони досліджуються різними інструментальними методами. Метод рідинної хроматографії активно використовують для аналізу лікарських форм та субстанцій ципрофлоксацину різних виробників, а також, для розділення та кількісного визначення нових фторхінолонів у біологічних матрицях і фармацевтичних композиціях.

Використовують кілька методів рідинної хроматографії: обернено-фазова вискоєфективна рідинна хроматографія (RP-HPLC), іонообмінна



високоєфективна рідинна хроматографія (ІЕХ-НРЛС), рідинна хроматографія гідрофільної взаємодії (НІЛІС), висока-ефективна тонкошарова хроматографія (НРТЛС) та інші хіральні хроматографічні методи (рис.2.1.7).

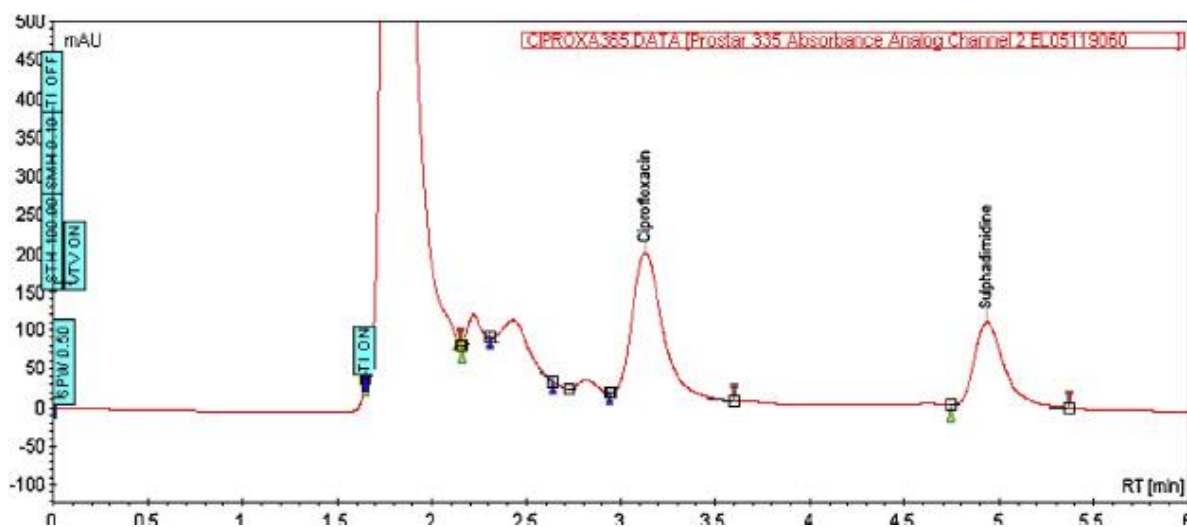


Рисунок 2.1.7. РХ хроматограма субстанції ципрофлоксацину.

Якщо розглядати Ципрофлоксацин як лікарську речовину – субстанцію для проведення фармацевтичного аналізу, то ДФУ регламентує аналіз цієї речовину виді ципрофлоксацину гідрохлориду [21]. Європейська Фармакопея [22] регламентує аналіз ципрофлоксацину та ципрофлоксацину гідрохлориду.

Ципрофлоксацину гідрохлорид – це кристалічний порошок блідо-жовтого кольору. М.м. 367,8 (безводна речовина).

Його хімічна номенклатурна назва за ІЮПАК – 1-циклопропіл-6-фтор-4-оксо-7-піперазин-1-іл-хінолін-3-карбонова кислота (рис.2.1.8).

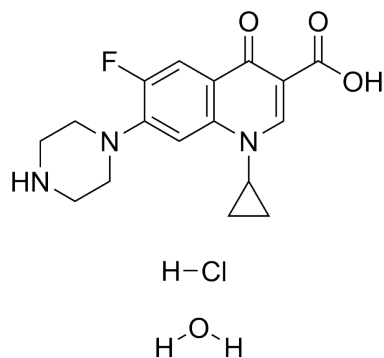


Рисунок 2.1.8. Хімічна формула ципрофлоксацину гідрохлориду.

Ципрофлоксацину гідрохлорид. Чистота 98,0-102,0% (суха речовина).  
Субстанція розчинна у воді *P*, мало розчинна у метанолі *P*, дуже мало розчинна у етанолі (96%) *P*, практично не розчинна у ацетоні *P*, етилацетаті *P* та метилен хлориді *P*.

За ДФУ Ципрофлоксацину гідрохлорид ідентифікується методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду хімічним методом – реакціями на хлориди (2.3.1).

Домішку А (фторхінолонова кислота) виявляють методом ТШХ (2.2.23). Тестовий розчин: субстанцію розчиняють у розведено розчині аміаку у воді.

Рухома фаза: ацетонітрил *P* – аміаку розчин конц. *P* –метанол *P* – метилен хлорид *P* (10 : 20 : 40 : 40, V/V/V/V).

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Ципрофлоксацину гідрохлорид проводять методом РХ (2.2.29).

Тестовий розчин готують у рухомій фазі.

Для приготування рухомої фази використовують суміш розчинників: ацетонітрил *P* – розчин 2,45 г/л фосфорної кислоти *P*, рН доводять до 3.0 триетиламіном *P* (13 : 87, V/V).

УФ-детектування при 278 нм.

Специфіковані домішки – В, С, D, Е.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України [21] висуває певні вимоги до фармацевтичного аналізу Ципрофлоксацину гідрохлориду. Eur.Ph. (01/2017:1089) [22] висуває певні вимоги до фармацевтичного аналізу Ципрофлоксацину та Ципрофлоксацину гідрохлориду.

В даній роботі дослідження ципрофлоксацину субстанції, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція ципрофлоксацину має різну розчинність у органічних та неорганічних розчинниках: розчинна у воді *P*, мало розчинна у метанолі *P*, дуже мало розчинна у етанолі (96%) *P*, практично не розчинна у ацетоні *P*, етилацетаті *P* та метилен хлориді *P*.

Чистота. 98.0-102.0%.

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, хроматографічним методом РХ. Порівняння проводиться із стандартом ципрофлоксацину гідрохлоридом CRS.

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29). Субстанцію розчиняють у суміші розчинників: ацетонітрил *P* – розчин 2,45 г/л фосфорної кислоти *P*, рН доводять до 3.0 триетиламіном *P* (13 :87, V/V). Тестовий розчин готують розчиненням субстанції ципрофлоксацину гідрохлоридом CRS у рухомій фазі.

Серед регламентованих ДФУ специфікованих домішок субстанції ципрофлоксацину гідрохлоридом CRS 5 речовин: А, В, С, D, Е.

ДФУ встановлюються поправкові коефіцієнти та ліміти на домішки:

Поправкові коефіцієнти:

Домішка В- 0,7;

Домішка С – 0,6;

Домішка D – 1,4;

Домішка Е – 6,7.

Ліміти для домішок:

- ліміт для домішки E – 0.3%;
- ліміт для домішок B, C, D – 0.2%.

Для неспецифікованих домішок ліміт 0.10%, разом – 0.5%.

Контроль специфікованих та неспецифікованих домішок виконується методом РХ.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції ципрофлоксацину з метою розробки та опрацювання умов хроматографування та методик проведення процедур.

### **Матеріали та методи.**

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором; колонка – INERTSIL ODS-3V, 0,25x4,6x5 з температурою – 40°C.

Умови хроматографування:

- час хроматографування – 56 хв;
- потік – 1,5 мл/хв;
- детектування – УФ при 278 нм;
- об'єм інжекції – 50 мкл;
- *рухома фаза*: ацетонітрил *P* – аміаку розчин конц. *P* – метанол *P* – метилен хлорид *P* (10 : 20 : 40 : 40, V/V/V/V).

*Методика приготування випробувального розчину:*

25,0 мг субстанції ципрофлоксацину розчиняють у рухомій фазі, доводять до об'єму 50,0 мл розчином рухомої фази.

*Методика приготування розчину порівняння (a):*

25,0 мг субстанції ципрофлоксацину ФСЗ розчиняють у рухомій фазі, доводять до об'єму 50,0 мл розчином рухомої фази.

*Методика приготування розчину порівняння (b):*

5,0 мг субстанції ципрофлоксацину ФСЗ для ідентифікації піку (містить домішки В, С, D, Е) розчиняють у рухомій фазі, доводять до об'єму 10,0 мл розчином рухомої фази.

*Методика приготування розчину порівняння (с):*

1,0 мл випробувального розчину розчиняють у рухомій фазі, доводять до об'єму 50,0 мл розчином рухомої фази.

Комп'ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- аміаку розчин концентрований (чистоти для ВЕРХ),
- метанол (чистоти для ВЕРХ),
- метилен хлорид (чистоти для ВЕРХ).

### Отримані результати.

При дослідженні стандартних зразків ДФУ – розчинів порівняння, розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1. Розчини стандартних речовин.

	Стандарт (а)		Стандарт (b)	
	Ципрофлоксацин			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	2,143	59,837	2,144	62,047
	2,145	61,500	2,139	63,333
	2,138	59,467		
<b>Середнє</b>	<b>2,142</b>	<b>59,268</b>	<b>2,143</b>	<b>62,690</b>
<b>SD</b>	<b>0,093</b>	<b>1,083</b>	<b>0,070</b>	<b>0,909</b>
<b>RSD(≤2.0%)</b>	<b>0,38%</b>	<b>1,80%</b>	<b>0,30%</b>	<b>1,45%</b>

*Розчини стандартні:*

*Ципрофлоксацин, стандарт (а):*

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 2,138-2,145 хв;

- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 2,142 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268;
- SD  $R_t$  0.093;
- SD Ar 1.083;
- RSD  $R_t$  (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

*Ципрофлоксацин, стандарт (b):*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 2,139-2,144 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 2,143 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62.690;
- SD  $R_t$  0.070;
- SD Ar 0.909;
- RSD  $R_t$  (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Таблиця 3.2. Розчини випробувального зразку.

<b>Зразок</b>					
	<i>Ципрофлоксацин</i>	<i>Домішка E</i>	<i>Домішка C</i>	<i>Домішка 3</i>	<i>Домішка D</i>
	<i>RT</i>	<i>RT</i>	<i>RT</i>	<i>RT</i>	
	1,804	2,797	5, 517	4,869	9,690
	1,546	2,688	5,512	4,872	9.688
	1,644	2,784	5,489	4,876	9.585

*Розчин зразку :*

*Ципрофлоксацин, зразок 1:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 1,546-1,804 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 1,765 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 35992,141-35999,784;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 35995,000;

*Домішка E:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 2,688-2,797 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 2,714 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 36,364-37,330;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 36,883;

*Домішка C:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 5,489-5,517 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 5,508 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 63,970-64,577;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 64.259;

*Домішка D:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 4,869-4,876 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 4,871 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 63,970-64,577;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 64.259;

*Домішка 3:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 9,585-9,690 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 9,658 хв;

- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 63,970-64,577;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 64.259.

Виявлено неприпустимі неідентифіковані домішки з Rt 1,324; з Rt 1,682.

Таким чином, виявлені специфіковані домішки С, D, E та неспецифікована *Домішка 3* з Rt 4,872 та 2 неприпустимі неідентифіковані домішки з Rt 1,324; 1,682.

Хроматограми представлено на рисунках 3.1, 3.2.

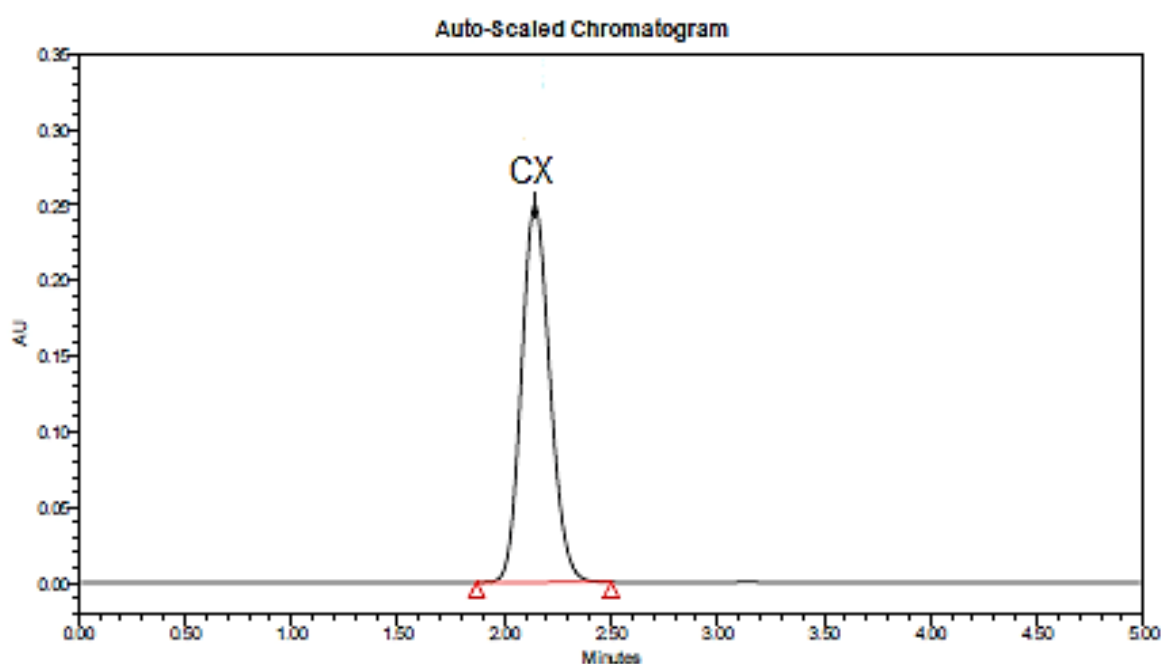


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку: ципрофлоксацин (Rt=2,143 хв).



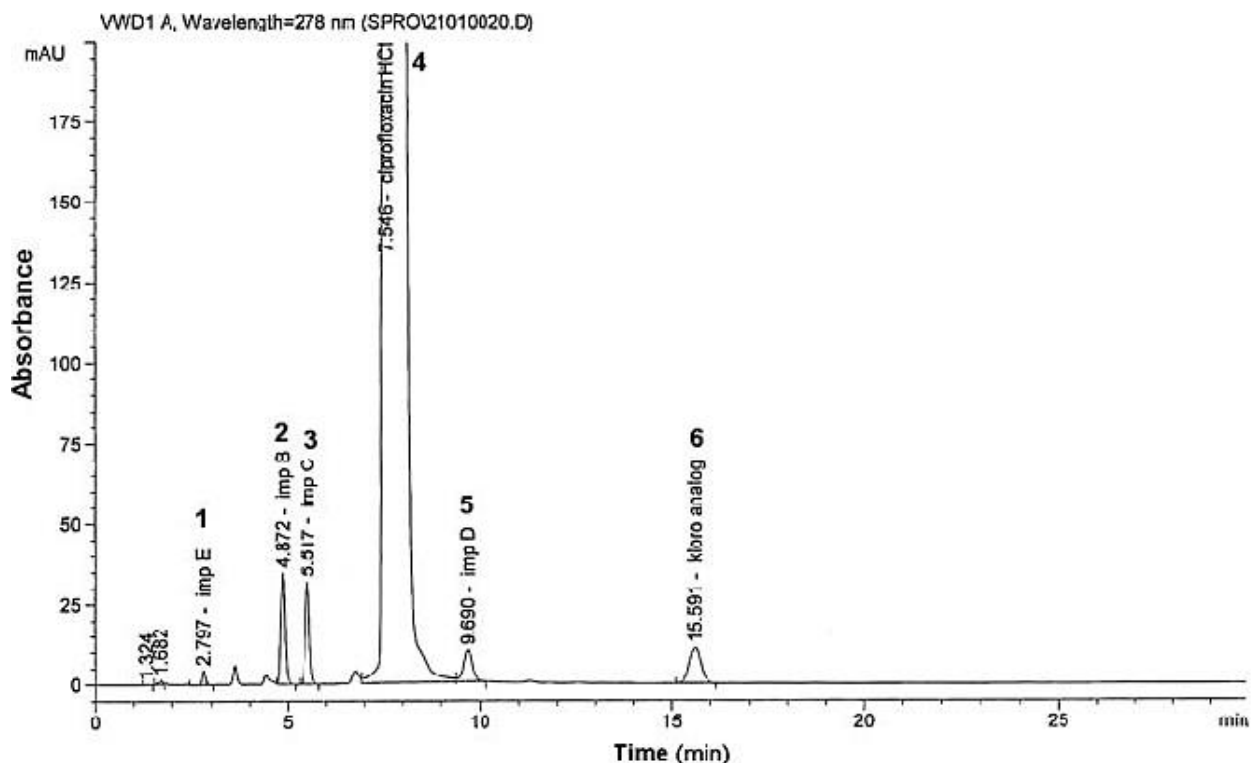


Рисунок 3.2. Хроматограма досліджуваного зразку: ципрофлоксацин ( $R_t=1,546$  хв), специфіковані домішки: домішка С ( $R_t=5,517$  хв), домішка Е ( $R_t=2,797$  хв), домішка D ( $R_t=9,690$  хв); неспецифікована домішка З ( $R_t=4,872$  хв); неприпустимі неідентифіковані домішки ( $R_t=1,324$ ;  $1,682$  хв).

З метою дослідження змін у ІЧ-спектрі ципрофлоксацину субстанції з неприпустимими домішками ( $R_t=1,324$ ;  $1,682$  хв) у своєму складі, методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80) отримано ІЧ-спектр досліджуваної субстанції ципрофлоксацину. ІЧ-спектри зразків готували у виді таблеток з KBr.

ІЧ-спектр ципрофлоксацину характеризується основними піками поглинання функціональних груп при:  $1628,81$ ,  $1507,34$  і  $1473,82$   $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$ , бензеновий цикл);  $1721$  і  $3403$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{COOH}$ );  $1396$  і  $941$   $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$ );  $740$   $\text{cm}^{-1}$  (вторинний амін) (рис. 3.3).

Записаний ІЧ-спектр підтвержує структуру ципрофлоксацину, при порівнянні зі спектром стандартної речовини ципрофлоксацину гідрохлориду.

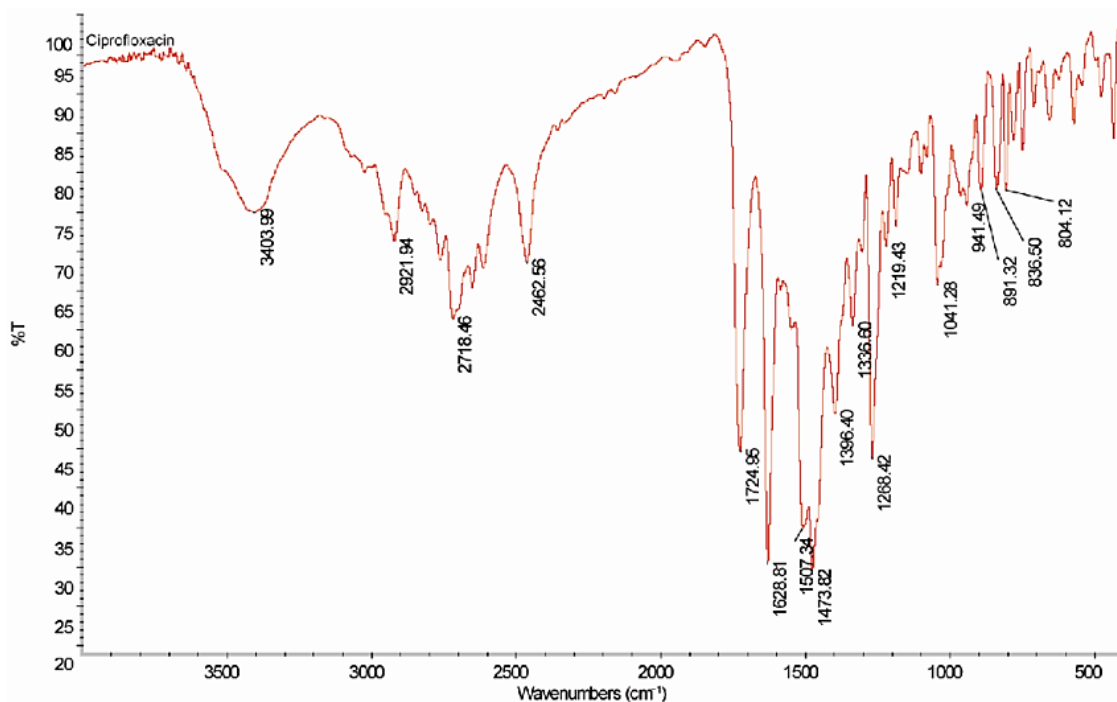


Рисунок 3.3. ІЧ-спектр досліджуваного зразку ципрофлоксацину.

В таблиці 3.3 представлена порівняльна характеристика сигналів функціональних груп молекули ципрофлоксацину гідрохлориду (стандарт) та досліджуваного зразку ципрофлоксацину.

Таблиця 3.3. Порівняльна характеристика ІЧ-спектрів стандарту та зразку ципрофлоксацину субстанції.

ІЧ-спектр ципрофлоксацину HCl (стандарт), $\text{cm}^{-1}$ , $\delta\text{OH}$ , $\text{NH}$ , $\text{C}=\text{O}$ , $-\text{CH}_2-$ $\nu\text{OH}$ , $\text{NH}$ , $\text{C}=\text{O}$ , $-\text{CH}_2-$	Функціональна група	ІЧ-спектр ципрофлоксацину (зразок), $\text{cm}^{-1}$ , $\delta\text{OH}$ , $\text{NH}$ , $\text{C}=\text{O}$ , $-\text{CH}_2-$ $\nu\text{OH}$ , $\text{NH}$ , $\text{C}=\text{O}$ , $-\text{CH}_2-$
3020-3100	$-\text{CH}_2-$	1628,81 1507,34 1473,82
Середня інтенсивність		
1750	$\text{C}=\text{O}$	1721
1770	(у складі $-\text{COOH}$ )	3403

Середня інтенсивність		
3200-3600	-OH	941
Середня інтенсивність		1396
1580-1625	-NH-	740
Середня інтенсивність	(вторинний амін)	

Таким чином, можна спостерігати зміщення валентних коливань функціональних груп  $\delta\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $\nu\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-$ , що пов'язано із наявністю у субстанції неприпустимих домішок. Деформаційні коливання  $\sigma\text{NH}$  дають нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності в області  $1580-1625\text{ см}^{-1}$ , в той час, як у зразку деформаційні коливання  $\sigma\text{NH}$  розташовуються в області  $740\text{ см}^{-1}$ .

Ципрофлоксацин (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

<i>Ципрофлоксацин, стандарт (а):</i>	<i>Ципрофлоксацин, зразок:</i>
значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>2,138-2,145 хв;</b>	значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>1,546-1,804 хв;</b>
середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>2,142 хв;</b>	середнє значення $R_t$ стандартів знаходиться в інтервалі <b>1,765 хв;</b>
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>59,467-61,500;</b>	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>35992,141-35999,784;</b>
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>59.268;</b>	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>35995,000.</b>
SD $R_t$ 0.093;	
SD Ar 1.083;	
RSD $R_t$ (<2.0%) 0.38%;	
RSD Ar (<2.0%) 1.80%;	
RSD Ar (<2.0%) 1.45%.	

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження та методики приготування зразків за методом ВЕРХ субстанції ципрофлоксацину з метою визначення її чистоти: *рухома фаза*: ацетонітрил *P* – аміаку розчин конц. *P* – метанол *P* –метилен хлорид *P* (10 : 20 : 40 : 40, V/V/V/V), методику спектрального дослідження методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області субстанції ципрофлоксацину (спектрометр Specord M-80), в результаті чого порівняно спектри стандартного та досліджуваного зразків.
2. Виявлено, що хроматографічні умови та методики дослідження за методом ВЕРХ розроблено коректно та отримано наступні результати: ципрофлоксацин ( $R_t=1,546$  хв) порівняно із  $R_t=2,138-2,145$  хв стандарту; в ІЧ-спектрі спостерігати зміщення валентних коливань функціональних груп  $\delta\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-$   $\nu\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-$ : так, деформаційні коливання  $\sigma\text{NH}$  дають нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності в області  $1580-1625\text{ см}^{-1}$  (у зразку деформаційні коливання  $\sigma\text{NH}$  розташовуються в області  $740\text{ см}^{-1}$ ).
3. За допомогою ВЕРХ методу знайдено у складі досліджуваного зразку специфіковані домішки: домішка С ( $R_t=5,517$  хв), домішка Е ( $R_t=2,797$  хв), домішка D ( $R_t=9,690$  хв); неспецифікована домішка З ( $R_t=4,872$  хв); неприпустимі неідентифіковані домішки ( $R_t=1,324$ ;  $1,682$  хв).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hong, Y.; Li, Q.; Gao, Q.; Xie, J.; Huang, H.; Drlica, K.; Zhao, X. Reactive oxygen species play a dominant role in all pathways of rapid quinolone-mediated killing. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 576–585.
2. Sun, Y.; Saha, S.; Wang, W.; Saha, L.K.; Huang, S.-Y.N.; Pommier, Y. Excision repair of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC). *DNA Repair* **2020**, *89*, 102837.
3. Andryukov, B.G.; Somova, L.M.; Timchenko, N.F. Molecular and genetic characteristics of cell death in prokaryotes. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* **2018**, *33*, 73–83.
4. Hong, Y.; Zeng, J.; Wang, X.; Drlica, K.; Zhao, X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 10064–10071.
5. Pribis, J.P.; García-Villada, L.; Zhai, Y.; Lewin-Epstein, O.; Wang, A.Z.; Liu, J.; Xia, J.; Mei, Q.; Fitzgerald, D.M.; Bos, J.; et al. Gamblers: An antibiotic-induced evolvable cell subpopulation differentiated by reactive-oxygen-induced general stress response. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 785–800.e7.
6. Collin, F.; Maxwell, A. The microbial toxin microcin B17: Prospects for the development of new antibacterial agents. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 3400–3426.
7. Papkou, A.; Hedge, J.; Kapel, N.; Young, B.; MacLean, R.C. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *Staphylococcus aureus* isolates. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3970.
8. Chuppava, B.; Keller, B.; El-Wahab, A.A.; Meißner, J.; Kietzmann, M.; Visscher, C. Resistance of *Escherichia coli* in turkeys after therapeutic or environmental exposition with enrofloxacin depending on flooring. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 1993.
9. Li, J.; Hao, H.; Dai, M.; Zhang, H.; Ning, J.; Cheng, G.; Shabbir, M.A.B.; Sajid, A.; Yuan, Z. Resistance and virulence mechanisms of *Escherichia*

- coli* selected by Enrofloxacin in Chicken. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01824-18.
10. Ching, C.; Zaman, M.H. Development and selection of low-level multi-drug resistance over an extended range of sub-inhibitory ciprofloxacin concentrations in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8754.
  11. Blazquez, J.; Rodriguez-Beltran, J.; Matic, I. Antibiotic-induced genetic variation: How it arises and how it can be prevented. *Annu. Rev. Microbiol.* **2018**, *72*, 209–230.
  12. Barrett, T.C.; Mok, W.W.K.; Murawski, A.M.; Brynildsen, M.P. Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1177.
  13. Richards, G.A.; Brink, A.J.; Feldman, C. Rational use of the fluoroquinolones. *S. Afr. Med. J. S. Afr. Med. Tydskr.* **2019**, *109*, 378–381.
  14. Ching, C.; Orubu, E.S.F.; Wirtz, V.J.; Zaman, M.H. Bacterial antibiotic resistance development and mutagenesis following exposure to subminimal inhibitory concentrations of fluoroquinolones in vitro: A systematic literature review protocol. *BMJ Open* **2019**, *9*, e030747.
  15. Germe, T.; Vörös, J.; Jeannot, F.; Taillier, T.; Stavenger, R.A.; Bacqué, E.; Maxwell, A.; Bax, B.D. A new class of antibacterials, the imidazopyrazinones, reveal structural transitions involved in DNA gyrase poisoning and mechanisms of resistance. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 4114–4128.
  16. Jeannot, F.; Taillier, T.; Despeyroux, P.; Renard, S.; Rey, A.; Mourez, M.; Pöeverlein, C.; Khichane, I.; Perrin, M.-A.; Versluys, S.; et al. Imidazopyrazinones (IPYs): Non-quinolone bacterial topoisomerase inhibitors showing partial cross-resistance with quinolones. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3565–3581.
  17. Rodríguez-Rosado, A.I.; Valencia, E.Y.; Rodríguez-Rojas, A.; Costas, C.; Galhardo, R.S.; Rodríguez-Beltrán, J.; Blázquez, J. N-acetylcysteine blocks

- SOS induction and mutagenesis produced by fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, 74, 2188–2196.
18. Abdullah Alzahrani, Ahmed Adel Ali Youssef, Samir Senapati, Siddharth Tripathi, Suresh Bandari, Soumyajit Majumdar, Michael A. Repka, Formulation Development and In Vitro–Ex Vivo Characterization of Hot-Melt Extruded Ciprofloxacin Hydrochloride Inserts for Ocular Applications: Part I, *International Journal of Pharmaceutics*, 2022, 122423, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122423>.
19. U.S. Pharmacopeia/National Formulary [current revision]. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc; March 2020.
20. Allen LV Jr. Summary of quality-control testing for sterile and nonsterile compounded preparations, part 1: physical and chemical testing. *IJPC*. 2019;23:211-216.
21. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 714-717.
22. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 2223-2226.

## 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  $\delta\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-\nu\text{OH}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2-$ : yes, the deformation vibrations of  $\sigma\text{NH}$  give uncharacteristic bands of moderate intensity in the region of  $1580-1625\text{ cm}^{-1}$  (in the sample, the deformation fluctuations of  $\sigma\text{NH}$  are located in the region of  $740\text{ cm}^{-1}$ ).

**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, симпозиумів.

<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 COVID», 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>	