

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»

Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

Допущено до захисту
Протокол засідання кафедри
№ _____ від “ _____ ” 2023р.

Завідувачка кафедри
Аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії
Кандидат хімічних наук, доцент
Зайцева Г.М.

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

Кількісне визначення ципрофлоксацину у твердих лікарських формах
методом високоефективної рідинної хроматографії

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
Ф1А фармацевтичного факультету

Годун Ольга Василівна

Науковий керівник:

Професор кафедри
аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії, доктор педагогічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Ципрофлоксацин, методи визначення.	7
1.1. Застосування ципрофлоксацину.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості ципрофлоксацину.	7
1.3. Механізм та метаболізм ципрофлоксацину.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	8
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.	11
1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).	12
Розділ 2. Експериментальна частина.	14
2.1. Матеріали та методи.	14
2.1.1. Мета дослідження.	14
2.1.2. Об'єкти дослідження.	14
2.1.3. Посуд та обладнання.	16
2.1.4. Реактиви.	16
2.1.5. Методика та умови хроматографічного визначення.	17
2.1.6. Приготування стандартного розчину.	17
2.1.7. Приготування досліджуваного розчину.	17

2.1.8.	Кількісне визначення.	17
2.2.	Пробопідготовка.	18
	Розділ 3. Результати та обговорення.	19
3.1.	Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.	19
3.2.	Вибір умов детектування.	20
3.3.	Калібрувальна залежність кількісних характеристик хроматографічного піку від концентрації стандартних розчинів.	20
3.4.	Визначення ципрофлоксацину у ТЛФ.	25
3.5.	Часткова валідація методики.	27
3.5.1.	Специфічність методики.	27
3.5.2.	Перевірка лінійності методики.	27
3.5.3.	Перевірка робастності методики.	27
3.5.4.	Перевірка правильності методики.	29
4.1.	Порівняльний аналіз методик кількісного визначення ципрофлоксацину (ципрофлоксацину гідрохлориду).	29
	Висновки.	30
	Список використаних джерел.	31
	Додатки.	34
	Анотація (Summary).	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія

ДФУ - державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

GLP- належна лабораторна практика

GMP - належна виробнича практика

ISO- міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

д.р.- діюча речовина

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр поглинання

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Лікарські засоби з групи фторхінолонів широко використовуються у медицині та фармації. Це група синтетичних хіміотерапевтичних засобів, які є похідними 4-хінолону і являють собою у положенні 7 хінолінового ядра піперазиновий цикл, а у положенні 6 – атом фтору[1]. Станом на сьогодні синтезовано майже 40 препаратів і класифікація цих сполук розподілена на 4 групи (покоління). До I групи відносяться норфлуксацин, офлуксацин, пефлуксацин та ципрофлоксацин[2-6].

Фторхінолони порушують біосинтез ДНК і РНК у топоізомераз і знижують агресивні властивості бактерій (аеробних та анаеробних мікроорганізмів, хламідій, мікоплазм, мікобактерій тощо), гальмують індукцію екзотоксинів і екзоферментів, підвищують чутливість бактерій до фагоцитозу. Фторхінолони проявляють антибактеріальний, імуномодулюючий ефект, є препаратами широкого спектру дії, активні відносно грамнегативних паличок (цитро-, ентеро-, камбілобактерій, сальмонели), усіх видів стафілококів[7-9].

При лікуванні інфекційних захворювань, збудниками яких є грамнегативні або грампозитивні бактерії, часто призначають лікарські засоби, до складу яких входить сполука класу фторхінолонів, наприклад ципрофлоксацин.

Актуальність: Пошук альтернативних методик кількісного визначення сполук класу фторхінолонів.

Мета: розробити методику кількісного визначення ципрофлоксацину у таблетованих формах методом ВЕРХ.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування ципрофлоксацину, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм ципрофлоксацину.
2. Проаналізувати ідентифікацію та методики кількісного визначення ципрофлоксацину.
3. На основі виконаного бібліосемантичного аналізу розробити альтернативну методику кількісного визначення ципрофлоксацину з твердих лікарських форм методом високоефективної рідинної хроматографії.
4. Провести апробацію та часткову валідацію методики кількісного визначення ципрофлоксацину методом високоефективної рідинної хроматографії.

Методи дослідження: Метод високоефективної рідинної хроматографії, бібліосемантичний.

Новизна та значення отриманих результатів: збільшити чутливість кількісного визначення вмісту ципрофлоксацину у таблетках методом високоефективної рідинної хроматографії.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023.

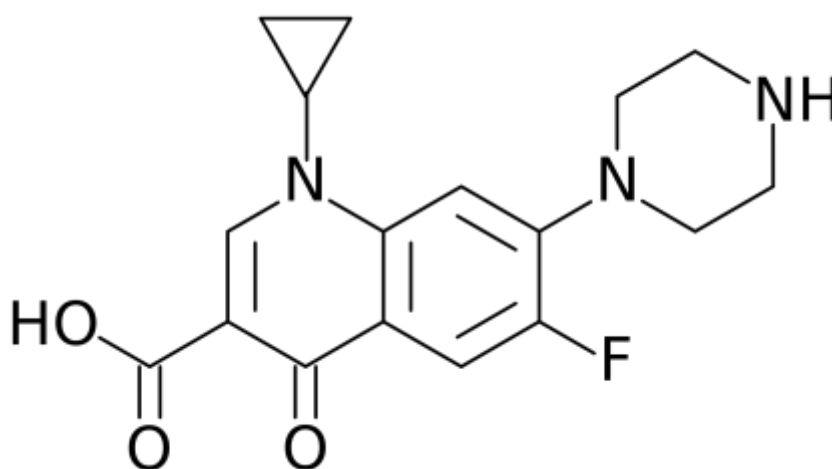
Структура роботи. Робота представлена на 42 сторінках, додатків -4, рисунків- 4, таблиць- 2.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Ципрофлоксацин, методи визначення.

1.1 Застосування ципрофлоксацину.

Ципрофлоксацин відносять до антибактеріального засобу системного застосування. За хімічною будовою сполука відноситься до фторхінолонів[3].

1.2. Фізико-хімічні властивості ципрофлоксацину.



За IUPAC хімічна речовина має наступну назву: 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid.

Молярна маса становить 331,346 г/моль[1,2,5].

За фізико-хімічними властивостями ципрофлоксацин є кристалічною сполукою блідожовтого кольору з поганою розчинністю і воді та органічних розчинниках. Ципрофлоксацин розчиняється у розведеній етановій кислоті і ідентифікується, як правило, за ІЧ-спектром. Кількісно сполуку визначають кислотно-основним титруванням з визначенням точки еквівалентності

потенціометричним методом. Збереження рекомендовано у скляному контейнері без доступу світла[1].

1.3. Механізм дії та метаболізм ципрофлоксацину.

Ципрофлоксацин є антимікробним препаратом I покоління і проявляє швидку бактерицидну дію на мікроорганізми, що знаходяться у різній стадії спокою або розмноження. Резистентність до препарату розвивається повільно[10-16].

Біодоступність ципрофлоксацину становить до 85 відсотків, добре всмоктується після прийому їжі, максимальні концентрації у крові досягаються протягом 100 хвилин. Об'єм розподілу досягає значення 2-3 л/кг, препарат добре проникає у тканини та кістки і приблизно через 2 години концентрація ципрофлоксацину у декілька разів перевищує концентрацію препарату у сировотці крові.

Препарат виводиться з організму нирками майже у незмінному вигляді (до 70 відсотків). Період напіввиведення складає від 3 до 5 годин, 30 відсотків препарату виводиться з калом та жовчю[11].

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Ципрофлоксацин відноситься до фармакологічної групи J01M A02; S01A X13.

Препарат призначають дорослим пацієнтам при:

- Інфекціях нижніх дихальних шляхів;
- Пневмонії;
- Синуситах;
- Циститах та уретритах;
- Пієлонефриті;
- Простатиті;

- Запалюванні органів малого тазу;
- Інфекціях шлунково-кишкового тракту;
- Інфекціях інтраабдомінальних;
- Інфекціях шкіри, кісток.

Препарат призначають дітям при:

- Гострому пієлонефриті;
- Бронхолегеневій інфекції[10-16].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами [10-16].

Одночасний прийом з трициклічними антидепресантами, макролідами, антипсихотиками призводить до адитивного ефекту. Завдяки утворенню хелатних комплексів з будь якими препаратами, які містять метал, абсорбція ципрофлоксацину знижується. Одночасний прийом ципрофлоксацину з продуктами та напоями, до складу яких входить кальцій, призводить також до зниження абсорбції.

Одночасний прийом пробенциду з ципрофлоксацином гальмує виведення останнього з жовчу і призводить до збільшення його концентрації у плазмі.

Одночасний прийом з метоклопрамідом прискорює всмоктування ципрофлоксацину.

Протипоказано прийом ципрофлоксацину з тизанідіном оскільки у сировотці крові асоціюються гіпотензивні та седативні побочні реакції.

Одночасний прийом з теофіліном та похідними ксантину призводить до збільшення концентрації теофіліну та ксантинів у сировотці крові.

Не рекомендується одночасний прийом препарату з метотрексатом оскільки виникає нирковий метаболізм, що призводить до збільшенню концентрації метотрексату у плазмі.

При одночасному прийомі нестероїдних протизапальних препаратів з ципрофлоксацином нерідко призводить до виникнення судомів.

При одночасному прийомі циклоспорину та ципрофлоксацину спостерігається збільшення концентрації креатинину, тому пацієнтам з подібною патологією необхідний постійний контроль креатинину.

Одночасний прийом антагоністів вітаміну К та ципрофлоксацину посилює антикоагулянтну дію вітаміну К. Ступінь ризику залежить від інфекційного збудника, віку пацієнта, його загального стану.

Одночасний прийом ципрофлоксацину та ропініролу посилює побічні ефекти останнього.

Лідокаїн. Доведено, що ципрофлоксацин є інгібітор ізоензиму CYP450 1A2, тому одночасний прийом останнього з ципрофлоксацином призводить до зниження кліренсу лідокаїну майже на 20% і до побічних ефектів.

Клозапін потрібно контролювати при прийомі ципрофлоксацину оскільки при їх одночасному прийомі концентрації у крові препарату та його похідних знижується до 30%.

При одночасному прийомі з сілденафілом треба ретельно оцінювати співвідношення "ризик-користь" оскільки пероральний прийом 50 г сілденафілу з 500 г ципрофлоксацину збільшує майже удвічі C_{\max} сілденафілу.

Обов'язковий моніторинг концентрацій фенітоїну та ципрофлоксацину рекомендовано при одночасному прийомі препаратів.

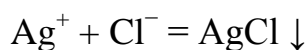
Цукорзнижуючі засоби. При одночасному прийомі ципрофлоксацину з протидіабетичними препаратами були відомі клінічні випадки гіпоглікемії[10-16].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.

За ДФУ[2] та Європейською фармакопеею [5] ципрофлоксацину гідрохлорид (розчинна у воді сіль ципрофлоксацину) ідентифікують:

- за ІЧ-спектром поглинання субстанції;
- реакцією на хлориди:

При додаванні до досліджуваного розчину розчинних солей срібла (нітрату, ацетату) утворюється білий сирнистий осад, який розчиняється у надлишку розчину амоніаку з утворенням безбарвної комплексної сполуки:



- гетероциклічний атом Нітрогену визначають реакціями із загальноалкогоїдними реактивами.

Кількісне визначення:

1. Ципрофлоксацин визначають потенціометрично методом ацидометрії у безводному середовищі;
2. Хлористоводневу сіль визначають методом рідинної хроматографії.

Методика визначення : 25 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50 мл.

Колонка має розмір 0,25м на 4,6 мм, нерухома фаза – силікагель для хроматографії октадецилсилільний деактивований відносно основ, температура 40⁰С. Рухома фаза ацетонітрил Р-розчин фосфорної кислоти Р (2,45 г/л), рН= 3,0. Інжекція 50 мкг, швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв. Детектування проводять спектрофотометрично при довжині хвилі 278 нм (Додаток 1,2).

1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Високоефективна рідинна хроматографія є сучасним методом кількісного та якісного аналізу речовин і відноситься до колонкової хроматографії оскільки розділення або ідентифікація відбувається за рахунок розподілу аналізованої речовини (або речовин) між двома фазами (рухомою та нерухомою) згідно закону розподілу Нернста[17]. Рухомою фазою у ВЕРХ є рідина органічного походження, нерухомою – найчастіше силікагелі різної природи (наприклад, хімічномодифіковані). Особливість розділення речовини між рухомою і нерухомою фазами полягає у тому, що рухома фаза проходить через нерухому під високим гідравлічним тиском. В залежності від механізму розділення речовини розрізняють адсорбційну, розподільчу та іонообмінну хроматографію. Метод ВЕРХ використовують для аналізів будь яких речовин (винятком є гази). Для проведення аналізу використовують рідинні хроматографи і основні системи приладу такі: система підготовки і дегазації рухомої фази, насосна система, інжектор (система вводу проби), хроматографічна колонка і детектор, система для обробки результатів[18-24].

Насосна система. Насоси забезпечують подачу рухомої фази через нерухому з заданою постійною швидкістю (0,1-10 мл/хв). Склад рухомої фази може бути постійним або змінним. Перед насосом іноді вставляють фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

Інжектори. Можуть бути універсальними (від 1 мкл до 2 мл) або дискретними, механічними або автоматичними. Для введення проби механічним способом використовують мікрошприци.

Хроматографічна колонка. Це сталева, скляна або пластикова трубка, яку заповнюють сорбентом (нерухова фаза). Довжина колонки може бути від 5 до 60 см, але, зазвичай розмір її складає: довжина 10-25 см, внутрішній діаметр 2-10 мм. Перед основною колонкою нерідко вставляють

допоміжну, яка несе певні допоміжні (основна-захист хроматографічної колонки) функції.

Нерухома фаза. Крім силікагелю (у тому числі і хімічно-модифікованих) використовують смоли, пористий графіт, полімери алюмінію оксид. Розмір частинок сорбенту може бути різним.

Детектор. Найбільш розповсюдженими детекторами у ВЕРХ є спектрофотометри.

Рухома фаза. Рухомою фазою може бути як індивідуальний розчинник, так і суміш розчинників.

Система обробки даних. Сучасна система обробки даних являє собою спряжену систему хроматографу та персонального комп'ютера з встановленим програмним забезпеченням, яке дозволяє реєструвати та обробляти результати, регулювати роботу хроматографічної системи та слідкувати за певними параметрами.

Безумовно, метод ВЕРХ є найбільш сучасним методом контролю різноманітних лікарських препаратів на рівні міжнародних стандартів GLM, GMP та ISO і єдиним недоліком, на наш погляд, є висока вартість хроматографічної системи, і відповідно, вартість аналізів [18-24].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана у лабораторії рідинної хроматографії Інституту гігієни та екології НМУ.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Метою нашого дослідження було опрацювання альтернативної методики кількісного визначення ципрофлоксацину у ТЛФ методом високоефективної рідинної хроматографії.

2.1.2. Об'єкти дослідження. Об'єктами дослідження було обрано препарат Ципрофлоксацин виробництва Здоров'я ФК (Зразок 1) та Ципрофлоксацин виробництва Лекхім (Зразок 2). Ці тверді лікарські форми реалізуються аптечними закладами та мають склад:

1) Ципрофлоксацин виробництва Здоров'я ФК, Зразок 1.

Склад: таблетка містить ципрофлоксацину 250 мг;

Допоміжні речовини:

Крохмаль кукурудзяний;

Целюлоза мікрокристалічна;

Повідон;

Кремнію діоксид колоїдний безводний;

Магнію стеарат;

Макрогол 6000 (поліетиленгліколь 6000);

Суша суміш «Opadry II white», що містить титану діоксид (E 171);

Тальк;

Поліетиленгліколь;

Полівініловий спирт[3].

2. Ципрофлоксацин виробництва Лекхім, Зразок 2.

Склад: таблетка містить ципрофлоксацину 250 мг;

Допоміжні речовини:

Крохмаль кукурудзяний або картопляний;

Целюлоза мікрокристалічна;

Повідон низькомолекулярний медичний;

Аеросил;

Натрію кроскармелоза;

Магнію стеарат або кислота стеаринова;

Гіпромеллоза;

Титану діоксид;

Тальк;

Твін 80;

Макрогол 6000 або поліетиленгліколь 6000[3].

Наявність у складі лікарських форм ітраконазолу указана в інструкціях для медичного застосування.

Ципрофлоксацин
Здоров`я ФК, Зразок 1

виробництва Ципрофлоксацин
Лекхім, Зразок 2

виробництва



2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний мірний посуд для приготування розчинів класу точності А.
2. Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № С20964330924CS, свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС» (Додаток 3).
3. Спектофотометр з УФ - детектором 2998 для високоефективної рідинної хроматографії з фільтром 0,45 мкм.
4. Мікрошприци для інжекцій на 50 мкл.
5. Ваги лабораторні електронні аналітичні RADWAG AS 220.R2, зав. № 502964, свідоцтво про калібрування № 3816 від 03.06.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС».
6. Хроматографічна колонка, наповнена силікагелем, Nova-Pak C18, розміри 150 мм × 3,9 мм.

Для проведення процедури пробопідготовки:

7. Хімічний посуд для проведення екстракції на 1 л.
8. Водяна баня.
9. Ротаційний випарник RE-100-PRO.

2.1.4. Реактиви.

1. Стандартний фармакопейний зразок **Ciprofloxacin hydrochloride**, каталожний номер **С0099**, реєстраційний номер **86393-32-0**.
2. Вода для хроматографії.
3. Метанол (клас HPLC).
4. Етилацетат (клас HPLC).
5. Ацетонітрил (клас HPLC).
6. Натрію сульфат безводний марки ХЧ.

2.1.5. Методика та умови хроматографічного визначення.

Готують рухому фазу (РФ) метанол-вода (70:30). Після процедури пробопідготовки розчиняють у рухомій фазі 0,1 г зразка, проводять хроматографічне визначення і за калібрувальним графіком встановлюють концентрацію ципрофлоксацину.

Умови процесу хроматографії:

Температура колонки : 40⁰С;

Швидкість РФ 1,5 мл/хв;

Довжина УФ -детектування: 278 нм;

Тиск 140 Бар;

Проба (інжекція) 20 мкл.

2.1.6. Приготування стандартного розчину.

Для побудови калібрувального графіка спочатку готують стандартний розчин. Для цього зважують на аналітичних терезах 0,1 фармакопейного стандартного зразка і розчиняють метанольно-водному розчині (4:1), перемішують.

2.1.7. Приготування досліджуваного розчину.

Після проведення процедури пробопідготовки зважують 0,1 г препарату та переносять у колбу на 50 мл, додають метанол та воду (4:1), перемішують.

2.1.8. Кількісне визначення.

Масу (або концентрацію) ципрофлоксацину визначають за стандартними формулами визначення діючої речовини за калібрувальним графіком.

2.2. Пробопідготовка.

З однієї таблетки зразка 1 або 2 готують водну суспензію у колбі на 500 мл, потім поміщають приготовану суспензію у колбу для екстракції на 1 л. Екстрагують діючу речовину тричі порціями по 50 мл етилацетатом для екстракції. Фракції об'єднують і екстракт висушують 20 г безводним натрій сульфатом 60 хвилин. Наступним кроком екстракт переносять у колбу для відгону і проводять концентрацію на ротаційному випарнику при постійній температурі 45°C до об'єму 0,3 мл. На повітрі протягом 24 годин випаровують залишковий розчинник природнім шляхом.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

Перед апробацією методики кількісного хроматографічного визначення ципрофлоксацину дослідником вирішується задача щодо умов температурного режиму розділення та вибору хвилі УФ -детектування аналізованої речовини.

3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.

При вирішенні задачі щодо вибору оптимального температурного режиму хроматографічної колонки необхідно проаналізувати залежність тиску у хроматографічній колонці від температури. Аналіз цієї залежності (Рис. 1), яку ми з'ясовували для стандартного розчину з концентрацією ципрофлоксацину (д.р.) 100 мкг, дозволяє зробити висновок, що оптимально хроматографічне розділення можна проводити при 40⁰С оскільки у системі значно знижується тиск:

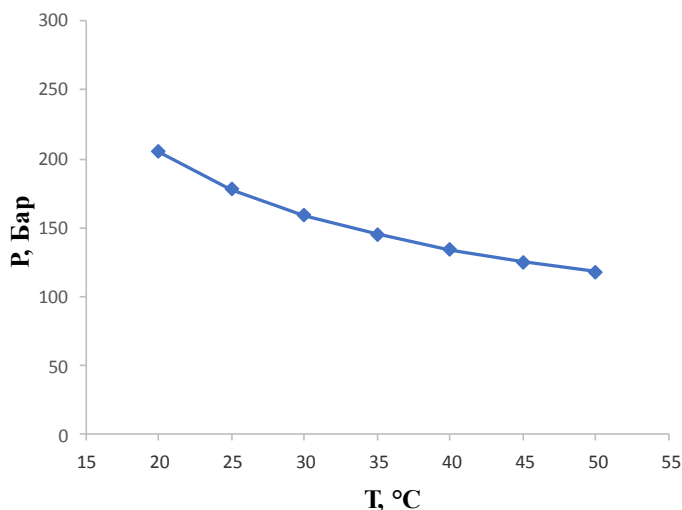


Рис. 1. Графічна залежність тиску у хроматографічній колонці від температури, концентрація ципрофлоксацину 100 мкг.

3.2. Вибір умов детектування.

При проведенні бібліосемантичного аналізу нами було обрано хвилю детектування 278 нм, яка є максимумом спектру поглинання ципрофлоксацину [25].

3.3. Калібрувальна залежність кількісних характеристик хроматографічного піку від концентрації стандартних розчинів.

Готували серію стандартних розчинів з концентрацією 80, 100, 120 мкг/мл шляхом розведення стандартного розчину. Проводили кількісне визначення діючої речовини (д.р.) ципрофлоксацин та будували графічну залежність площі піку від концентрації стандартного розчину. На Рис. 2,3,4 наведено хроматограми зразків стандартних розчинів.

Рис. 2. Хроматограма стандартного розчину, концентрація д.р. 80 мкг/мл

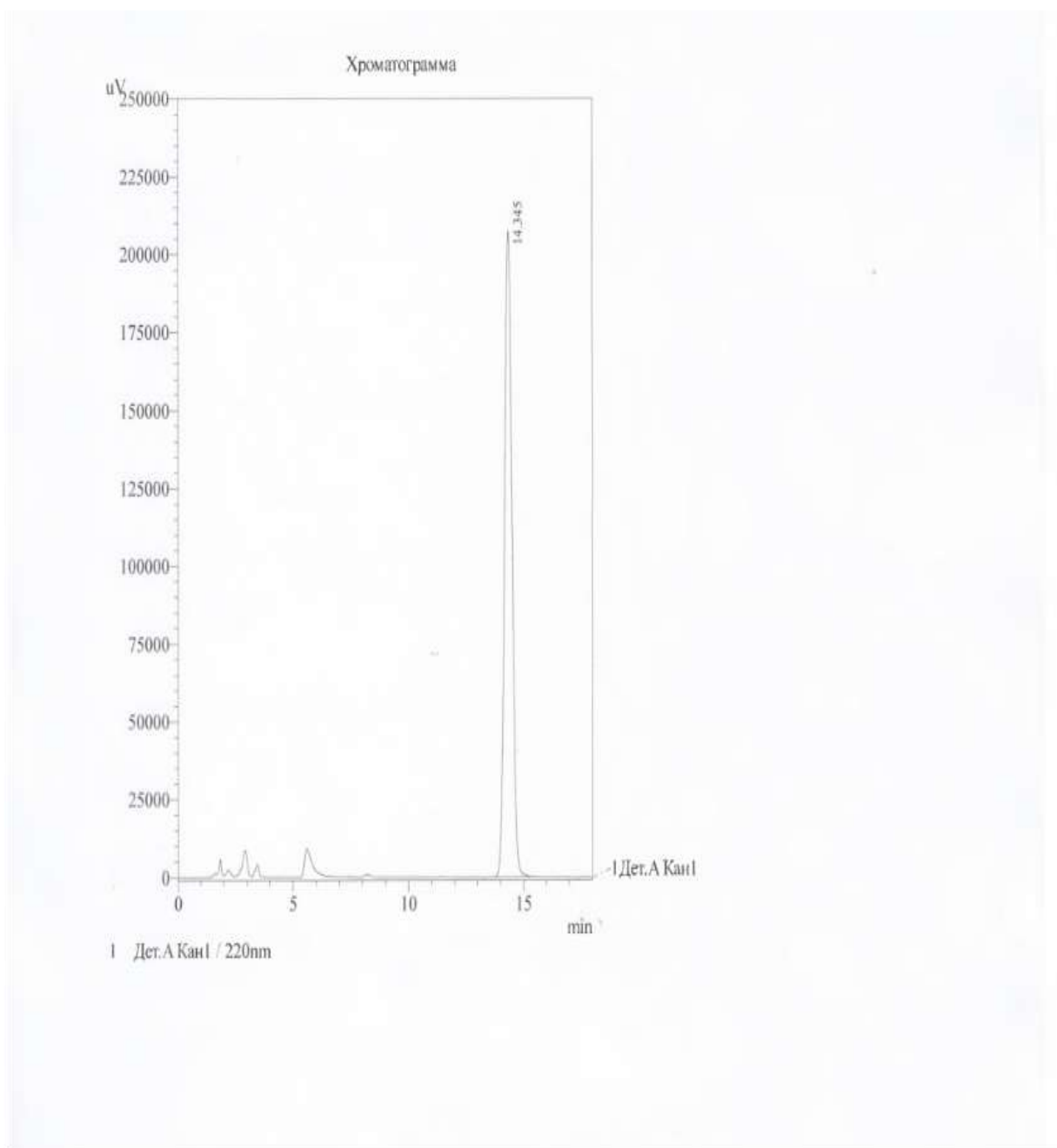


Рис. 3. Хроматограма стандартного розчину, концентрація д.р. 100 мкг/мл

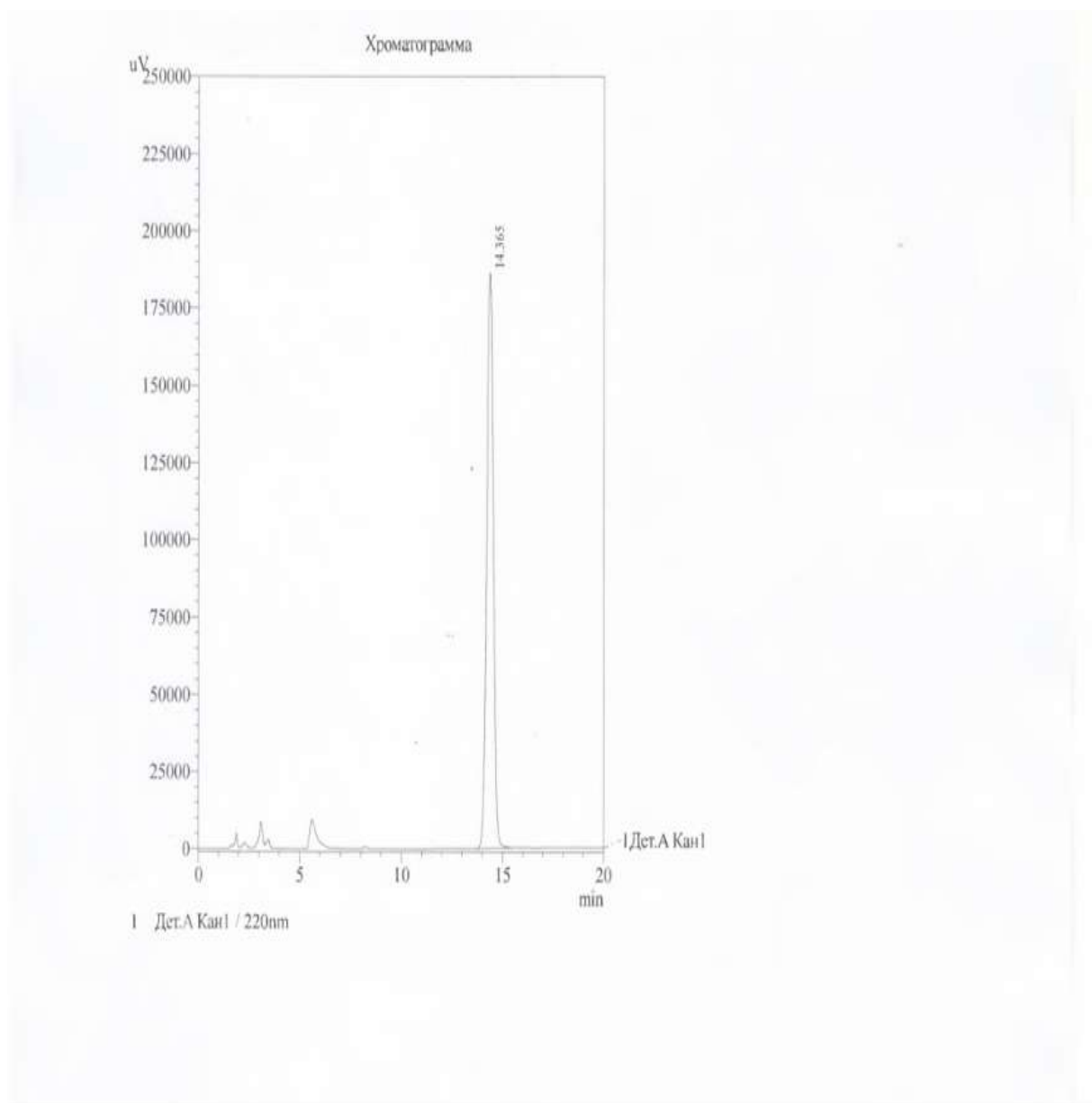
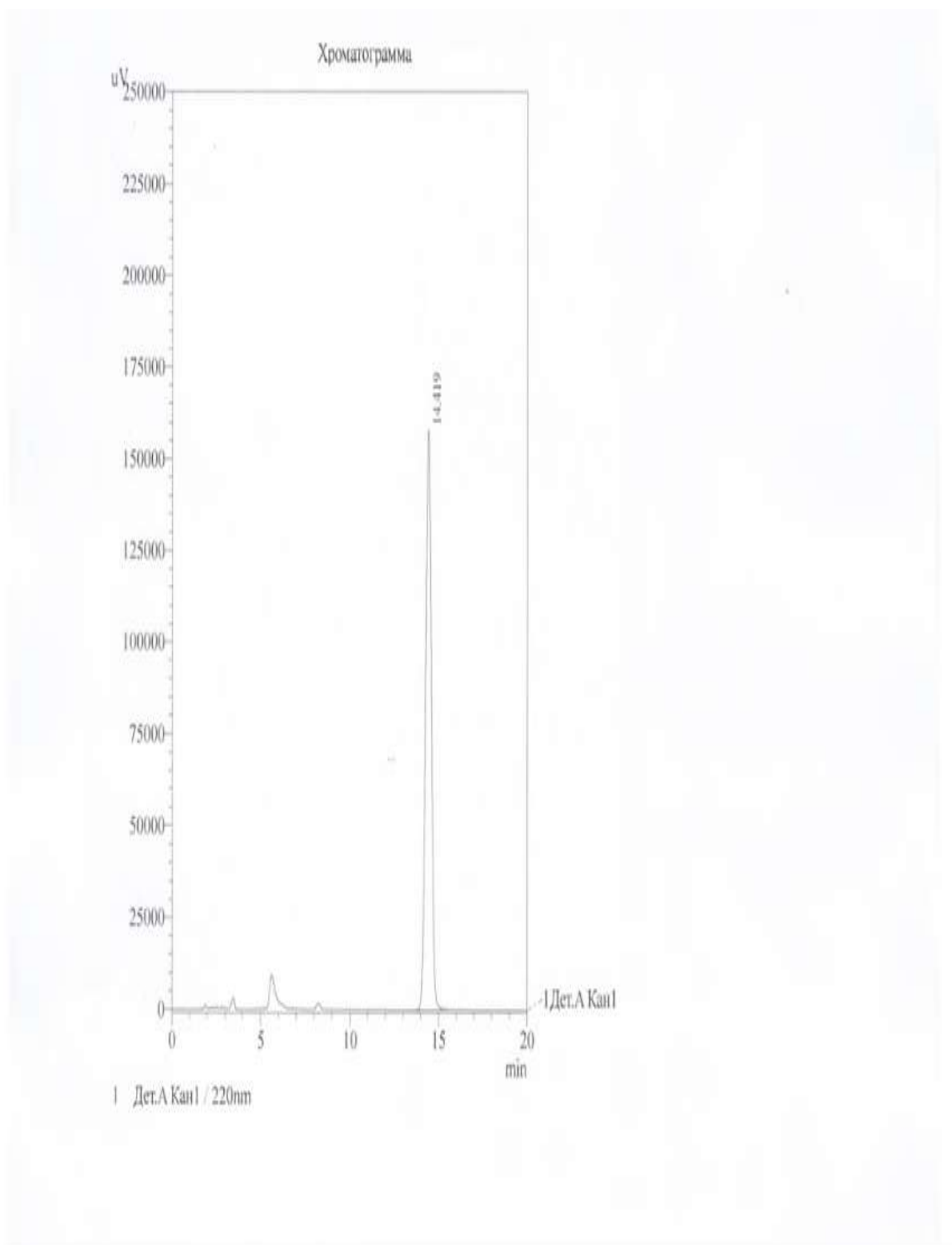


Рис. 4. Хроматограма стандартного розчину, концентрація д.р. 120 мкг/мл



При вирішенні питання щодо умов методики проведення хроматографічного аналізу необхідно визначати параметри лінійності калібрувального графіка[26-28]. Для підтвердження лінійної залежності аналізують:

1. Вільний член a (повинен статистично не відрізнятися від нульового значення, критерій статистичної незначущості на перевищує свій довірчий інтервал);
2. Коефіцієнт кореляції R^2 повинен мати значення не менше 0,999.

Лінійність досліджували в інтервалі концентрацій 80-120 мкг/мл.

Для кожної концентрації ($n=6$) проводили п'ять послідовних інжекцій, результати представляли залежністю $y = ax + b$ у нормалізованій системі координат (Рис. 5):

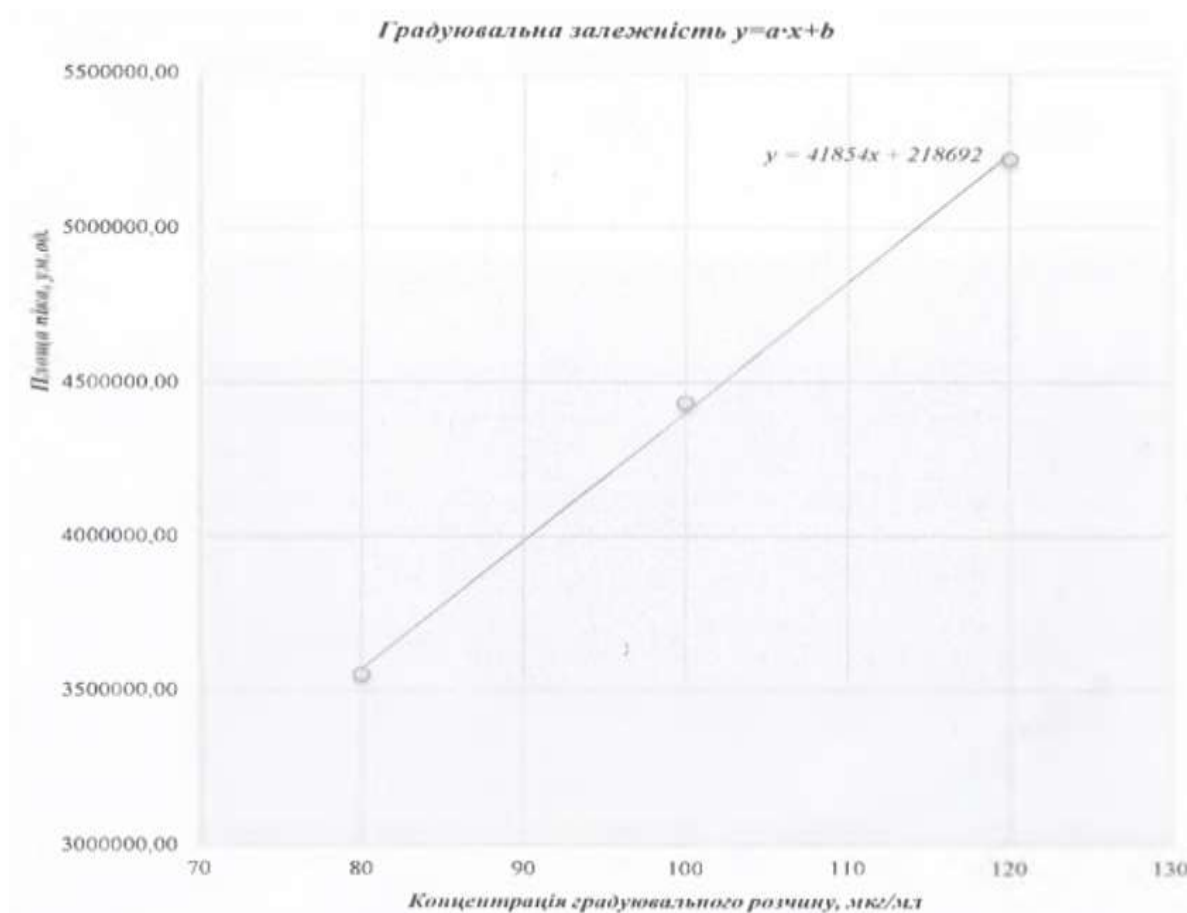


Рис 5. Залежність площі піку (ум.од.) від концентрації градувальних (стандартних) розчинів (мкг/мл).

Враховуючи вищезазначене (Рис.5), маємо висновки:

1. Перевірка результатів на викиди не перевищує 1,887.
2. Однорідність дисперсії 0,7.
3. Коефіцієнт $a/st100\%$ не більше 0,9.
4. Практична незначущість a у рівнянні прямої лінії не перевищує 2,5%.
5. Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,999$, що не заперечує критеріям ДФУ та Європейській фармакопеї.

Враховуючи вищезазначене можна стверджувати, що методика лінійна у досліджуваному діапазоні концентрацій.

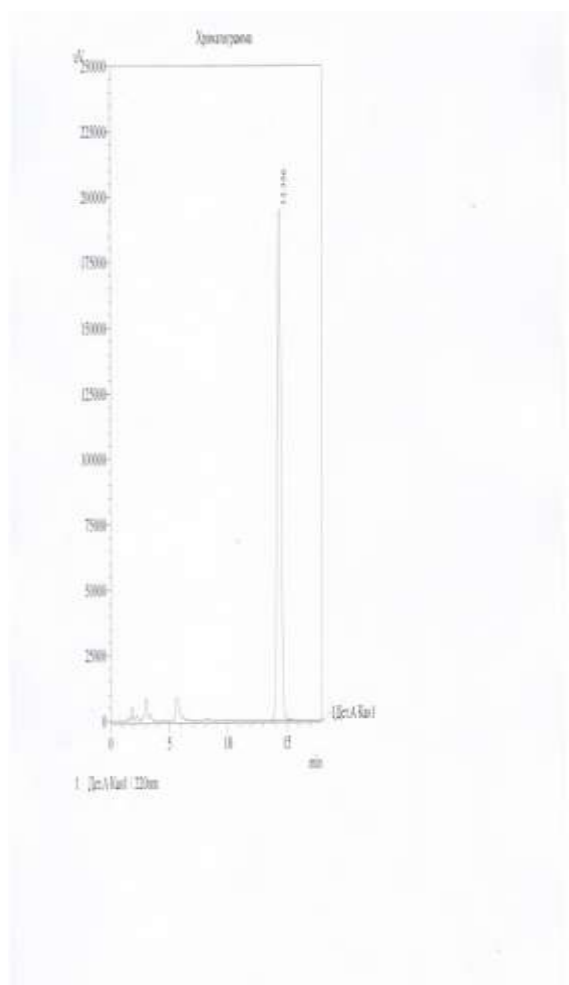
3.4. Визначення ципрофлоксацину у ТЛФ.

Після побудови калібрувальної залежності та аналізу лінійності методики проводили визначення ципрофлоксацину у таблетках (зразок 1 та 2 окремо) методом високоефективної рідинної хроматографії (згідно п.2.1.5.):

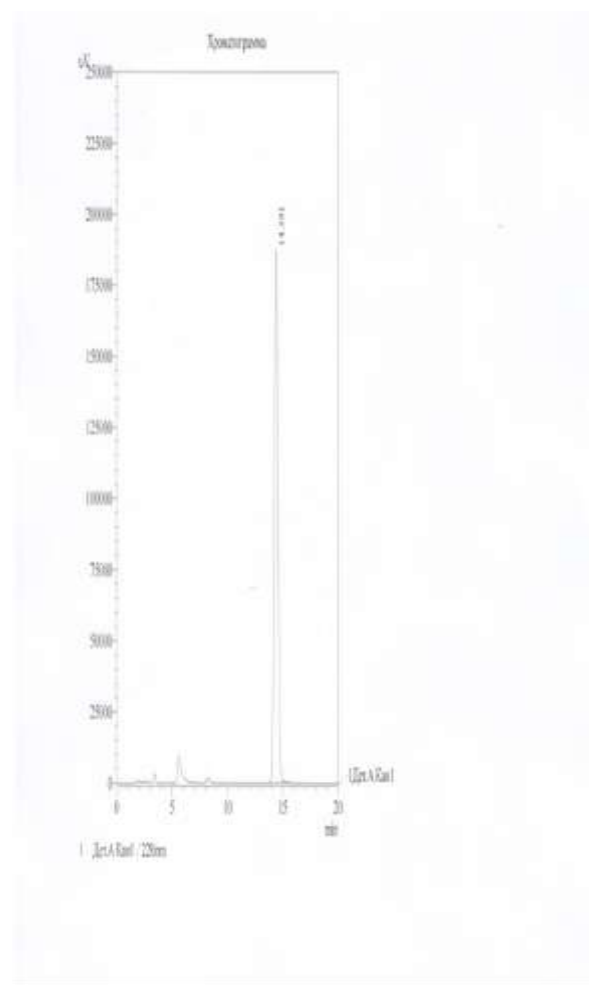
Для цього після процедури пробопідготовки готували метанольний розведений розчин з аналізованого. 4 мл аналізованого розчину розчиняли у 200 мл метанолу. Вважали, що густина розчину 1. Проводили хроматографічні визначення. Визначали концентрацію проби за калібрувальним графіком. Нижченаведено результати та хроматограми кількісного визначення діючої речовини ципрофлоксацин у зразках 1 та 2 (Вміст* д.р. у ТЛФ – вміст діючої речовини у зразках враховуючи розведення, мг):

Зразок 1			
Висота піку, ум.од.	Площа піку, д.р., ум.од.	Вміст д.р., мкг	Вміст*, мг
195120	4438554	101,23	248,86
Зразок 2			
195120	45395365	101,23	249,64

Хроматограма Зразка 1



Хроматограма Зразка 2



3.5. Часткова валідація методики.

Валідація методики є необхідним актом експериментального дослідження, який дозволяє провести певні дії, направлені на визначення доказів, що запропонована методика підходить до передбачуваного використання[26-28].

3.5.1. Специфічність методики.

Під специфічністю розуміють здатність проводити аналітичні дії (визначати аналізовану речовину) у присутності інших. Альтернативна методика кількісного визначення ципрофлоксацину методом ВЕРХ була апробована безпосередньо на твердих лікарських формах, тому ми порівнювали результати з концентраціями діючої речовини, які зазначено в інструкціях для медичного застосування для ТЛФ. Аналізуючи результати, можна стверджувати, що запропонована альтернативна методика визначення ципрофлоксацину у ТЛФ є специфічною.

3.5.2. Перевірка лінійності методики.

При аналізі калібрувальної залежності лінійність методики була продемонстрована у п. 3.3.

3.5.3. Перевірка робастності методики.

Робастність методики перевіряють при проведенні досліджень у різних лабораторних умовах (температурі, різних реактивах та обладнанні тощо). У нашому дослідженні вимірювання проводили у різні календарні дні [26-28].

	День 1	День 2	Різниця значень, %
	Вміст діючої речовини, мкг		
1	248,86	249,17	Не більше 2,0
2	250,02	249,32	Не більше 2,0
3	252,65	249,33	Не більше 2,0
4	250,34	250,25	Не більше 2,0
5	248,73	250,00	Не більше 2,0
6	248,42	247,59	Не більше 2,0

Зразок 2

	День 1	День 2	Різниця значень, %
	Вміст діючої речовини, мкг		
1	249,64	250,22	Не більше 2,0
2	251,31	250,51	Не більше 2,0
3	251,78	251,21	Не більше 2,0
4	250,55	248,87	Не більше 2,0
5	252,43	250,77	Не більше 2,0
6	249,82	250,46	Не більше 2,0

3.5.4. Перевірка правильності методики.

Одним з критеріїв валідації методики є правильність. Правильність характеризує відповідність отриманих результатів відомим результатам. Висновок про правильність ми встановлювали після вивчення лінійності, специфічності та робастності методики[26-28].

Враховуючи представлені результати, альтернативну методику кількісного визначення ципрофлоксацину у ТЛФ методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) можна вважати правильною.

4.1. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення ципрофлоксацину (ципрофлоксацину гідрохлориду).

Кількісно ципрофлоксацин згідно з Європейською фармакопеею та ДФУ визначають кислотно-основним титруванням у неводному середовищі (Додаток 1 та 2). Кінцеву точку титрування (КТТ) встановлюють потенціометрично, але, на наш погляд метод потенціометрії має низку недоліків, а саме:

- Процес титрування є трудомістким та довготривалим;
- Обов'язково проводять процедуру стандартизації робочих розчинів, у нашому випадку перхлоратної кислоти;
- Певна токсичність перхлоратної кислоти;
- Інертна атмосфера;
- Постійна стандартизація потенціометра.

Метод ВЕРХ має високу чутливість і є сучасним, повністю автоматичним, екологічним та безпечним, простим у використанні та обробці результатів.

ВИСНОВКИ

1. У ДФУ та Європейській фармакопеї наведено методики кількісного визначення субстанції ципрофлоксацин гідлохлорид методом ацидометричного титрування у неводному середовищі, визначення ципрофлоксацину методом ВЕРХ у твердих лікарських формах не знайдено.

2. На основі бібліосемантичного аналізу та проведених експериментальних досліджень альтернативною методикою ВЕРХ було встановлено концентрацію ципрофлоксацину у ТЛФ різних виробників. Запропонована методика є сучасною, екологічною та високоточною.

3. Проведено часткову валідацію методики, встановлено, що валідаційні характеристики відповідають критеріям ДФУ і дану методику можна використовувати для кількісного визначення ципрофлоксацину у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/148/ciprofloksacin>.
2. ДФУ. 1-ше вид. — Х., 2001;
3. Компендиум 2015 — Лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко. — К., 2015;
4. От субстанции к лекарству / Под ред. В.П. Черных. — Х., 2005;
5. European Pharmacopoeia 5;
6. The Merk index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biological. — 13 Ed. — 2001. — № 1.
7. Ширококов В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / Видання 3-є, перероблене і доповнене / [Ширококов В.П. Климнюк С.І., Понятовський В.А. та ін.]. — Вінниця: Нова Книга, 2021. — 920 с.
8. Ширококов В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. / [Ширококов В.П. Климнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.]. — Тернопіль: ТДМУ, 2019. — 564 с.
9. Ширококов В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Ширококов В.П. та ін.]. — Вінниця: Нова Книга, 2018. — 576 с.
10. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак Кюон, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.- К.ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
11. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М., Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. — 572 с.
12. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В., Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А.,

Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.

13. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.

14. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rx index Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.

15. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.

16. www.pharma-center.com.ua. веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL

17. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свечнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.

18. Мала гірничо-енциклопедія : у 3 т. / за ред. В. С. Білецького. — Д. : Східний видавничий дім, 2013. — Т. 3 : С — Я. — 644 с

19. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). *Кількісна аналітична хімія*. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.

20. Буссі Хуан. (2007). Високопродуктивна рідинна хроматографія. [PDF]. Отримано з: fing.edu.uy.

21. Вікіпедія. (2019). Високоєфективна рідинна хроматографія. Відновлено з: en.wikipedia.org

22. Кларк Джим. (2007). Високоєфективна рідинна хроматографія. Отримано з: chemguide.co.uk

23. Матвій Баркович. (05 грудня 2019 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія. Хімія LibreTexts. Відновлено з: chem.libretexts.org

24. Г.П. Томас. (15 квітня 2013 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) - методи, переваги та застосування. Отримано з: azot.com

25. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.

26. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.

27. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

28. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton. 2013-2014. P. 3–90.

ДОДАТКИ

Додаток 1 Витяг з Європейської Фармакопеї

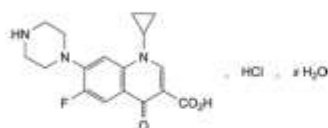
Ciprofloxacin hydrochloride

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

04/2011:0888
corrected 7.4

CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE

Ciprofloxacini hydrochloridum

 $C_{17}H_{18}ClFN_3O_3 \cdot xH_2O$ M_r 367.8 (anhydrous)

DEFINITION

1-Cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid hydrochloride. It contains a variable quantity of water.

Content: 98.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance).

CHARACTERS

Appearance: pale yellow, crystalline, slightly hygroscopic powder.

Solubility: soluble in water, slightly soluble in methanol, very slightly soluble in anhydrous ethanol, practically insoluble in acetone, in ethyl acetate and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: ciprofloxacin hydrochloride CRS.

B. 0.1 g gives reaction (b) of chlorides (2.3.1).

TESTS

Solution S. Dissolve 0.5 g in carbon dioxide-free water R and dilute to 20 mL with the same solvent.

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution GY₁ (2.2.2, Method II).

Dilute 10 mL of solution S to 20 mL with carbon dioxide-free water R.

pH (2.2.3): 3.5 to 4.5 for solution S.

Impurity A. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Test solution. Dissolve 50 mg of the substance to be examined in water R and dilute to 5 mL with the same solvent.

Reference solution. Dissolve 10 mg of ciprofloxacin impurity A CRS in a mixture of 0.1 mL of dilute ammonia RI and 90 mL of water R and dilute to 100 mL with water R. Dilute 2 mL of the solution to 10 mL with water R.

Plate: TLC silica gel F₂₅₄ plate R.

Mobile phase: acetonitrile R, concentrated ammonia R, methanol R, methylene chloride R (10:20:40:40 V/V/V/V).

Application: 5 µL.

Development: at the bottom of a chromatographic tank, place an evaporating dish containing 50 mL of concentrated ammonia R. Expose the plate to the ammonia vapour for 15 min in the closed tank. Withdraw the plate, transfer to a 2nd chromatographic tank and develop over 3/4 of the plate.

Drying: in air.

Detection: examine in ultraviolet light at 254 nm.

Limit:

- impurity A: any spot corresponding to impurity A is not more intense than the principal spot in the chromatogram obtained with the reference solution (0.2 per cent).

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 25.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dissolve 25.0 mg of ciprofloxacin hydrochloride CRS in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 5 mg of ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS (containing impurities B, C, D and E) in the mobile phase and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (c). Dilute 1.0 mL of the test solution to 50.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
 - stationary phase: base-deactivated octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm);
 - temperature: 40 °C.
- Mobile phase: mix 13 volumes of acetonitrile R and 87 volumes of a 2.45 g/L solution of phosphoric acid R previously adjusted to pH 3.0 with triethylamine R.

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 278 nm.

Injection: 50 µL of the test solution and reference solutions (b) and (c).

Run time: 2.3 times the retention time of ciprofloxacin.

Identification of impurities: use the chromatogram supplied with ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities B, C, D and E.

Relative retention with reference to ciprofloxacin (retention time = about 9 min): impurity E = about 0.4; impurity B = about 0.6; impurity C = about 0.7; impurity D = about 1.2.

System suitability: reference solution (b):

- resolution: minimum 1.3 between the peaks due to impurities B and C.

Limits:

- correction factors: for the calculation of content, multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity B = 0.7; impurity C = 0.6; impurity D = 1.4; impurity E = 6.7;
- impurity E: not more than 1.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.3 per cent);
- impurities B, C, D: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.2 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.10 per cent);
- total: not more than 2.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.5 per cent);
- disregard limit: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.05 per cent).

Heavy metals (2.4.8): maximum 20 ppm.

Dissolve 0.25 g in water R and dilute to 30 mL with the same solvent. Carry out the prefiltration. The filtrate complies with test E. Prepare the reference solution using 5 mL of lead standard solution (1 ppm Pb) R.

Water (2.5.12): maximum 6.7 per cent, determined on 0.200 g.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g in a platinum crucible.

Додаток 2 Витяг з Державної фармакопеї України

Цинку хлорид

ЦИНКУ ХЛОРИД

Zinci chloridum

ZINC CHLORIDE

ZnCl₂
[7646-85-7]

М.м. 136.3

Вміст: не менше 95.0 % і не більше 100.5 %.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або лупи білі або майже білі палички. Розчиняється на повітрі.

Розчинність. Дуже легко розчинний у воді *P*, легко розчинний в етанолі (96 %) і гліцерині *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. 0.5 г субстанції розчиняють в азотній кислоті розведеної *P* і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 10 мл. Одержаний розчин дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

B. 5 мл розчину *S*, приготованого як зазначено в розділі «Випробування», дають реакцію на цинк (2.3.1).

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин *S*. До 2.0 г субстанції додають 38 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, *P*, приготованої із води дистильованої *P*; і краплями хлористоводневої кислоти розведеної *P* до повного розчинення субстанції. Одержаний розчин доводять водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P*, приготованою із води дистильованої *P*, до об'єму 40 мл.

pH (2.2.3). Від 4.6 до 5.5.

1.0 г субстанції розчиняють у 9 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, *P*. Не звертають увагу на слабе помутніння розчину.

Оксихлориди. 10.0 г субстанції розчиняють у 10 мл води, вільної від вуглецю діоксиду, *P*. Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон II (2.2.1). До 1.5 мл одержаного розчину додають 7.5 мл етанолу (96 %) *P*; розчин може помутніти протягом 10 хв. Будь-яке помутніння розчину має зникати при додаванні 0.2 мл хлористоводневої кислоти розведеної *P*.

Сульфати (2.4.13). Не більше 0.02 % (200 ppm).

5 мл розчину *S* доводять водою дистильованою *P* до об'єму 15 мл. Еталон готують із використанням суміші 5 мл сульфату еталонного розчину (10 ppm SO₄) *P* і 10 мл води дистильованої *P*.

Алюміній, кальцій, важкі метали, залізо, магній. До 8 мл розчину *S* додають 2 мл аміаку розчину концентрованої *P* і струшують; розчин має бути прозорим (2.2.1) і безбарвним (2.2.2, метод II). До одержаного розчину додають 1 мл динатрію гідрофосфату розчину *P*; розчин має залишатися прозорим протягом не менше 5 хв. При додаванні 0.2 мл розчину натрію сульфідів *P* утворюється білий осад, а наосадова рідина має залишатися безбарвною.

Амонію солі (2.4.1). Не більше 0.04 % (400 ppm).

0.5 мл розчину *S* доводять водою *P* до об'єму 15 мл.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.250 г субстанції розчиняють у 5 мл оцтової кислоти розведеної *P* і проводять комплексометричне титрування цинку (2.5.11).

1 мл 0.1 *M* розчину натрію едетату відповідає 13.63 мг ZnCl₂.

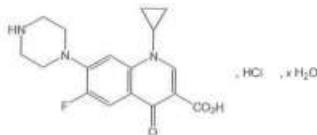
ЗБЕРІГАННЯ

У неметалевому контейнері.

ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ
ГІДРОХЛОРИД

Ciprofloxacin hydrochloridum

CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE



C₁₇H₁₈ClFN₃O₃·xH₂O М.м. 367.8 (безводна речовина)

1-Циклопропіл-6-фтор-4-оксо-7-(піперазин-1-іл)-1,4-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти гідрохлорид. Містить змінну кількість води.

Ципрофлоксацину гідрохлорид

Вміст: не менше 98.0 % і не більше 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок блідо-жовтого кольору. Слабо гігроскопічний.

Розчинність. Розчинний у воді *P*, мало розчинний у метанолі *P*, дуже мало розчинний в етанолі *P*, практично не розчинний в ацетоні *P*, етилацетаті *P* і метилхлориді *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду.

B. 0.1 г субстанції дає реакцію (b) на хлориди (2.3.1).

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 0.5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.

Прозорість розчину (2.2.1). 10 мл розчину *S* доводять водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P* до об'єму 20 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

Кольоровість розчину (2.2.2, метод II). Забарвлення розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину», має бути не інтенсивнішим за еталон GY₃.

pH (2.2.3). Від 3.5 до 4.5. Вимірюють pH розчину *S*.

Домішка A. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 50 мг субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

Розчин порівняння. 10 мг ФСЗ ципрофлоксацину домішки *A* розчиняють у суміші 0.1 мл аміаку розчину розведеного *P* і 90 мл води *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 100 мл. 2 мл одержаного розчину доводять водою *P* до об'єму 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю *F*₂₅₄ *P*.

Рухома фаза: ацетонітрил *P* - аміаку розчин концентрований *P* - метанол *P* - метилхлорид *P* (10:20:40:40).

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: пластинку поміщають у камеру, на дні якої знаходиться випарна чашка, що містить 50 мл аміаку розчину концентрованого *P*, камеру закривають і пластинку витримують у парі аміаку протягом 15 хв. Пластинку виймають, поміщають в іншу хроматографічну камеру і продовжують випробування поки рухома фаза пройде 3/4 довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати:

— **домішка A:** пляма, відповідна домішці *A*, не має бути інтенсивнішою за основну пляму на хроматограмі розчину порівняння (0.2 %).

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин. 25.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 50.0 мл.

Розчин порівняння (a). 25.0 мг ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до об'єму 50.0 мл.

Розчин порівняння (b). 5 мг ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду для ідентифікації піка (містить домішки В, С, D і E) розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

Розчин порівняння (c). 1.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

Колонка:

— **розмір:** 0.25 м × 4.6 мм;

— **нерухома фаза:** силікагель для хроматографії, октадецилсилільний, деактивований відносно основ *P* (5 мкм);

— **температура:** 40 °С.

Рухома фаза: ацетонітрил *P* - розчин 2.45 г/л фосфорної кислоти *P*, pH якого попередньо доводять до 3.0 триетиламіном *P*, (13:87).

Швидкість рухомої фази: 1.5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 278 нм.

Інжекції: 50 мкл. Вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (b) і (c).

Час хроматографування: у 2.3 рази більший часу утримування ципрофлоксацину.

Ідентифікація домішок: використовують хроматограму, що надається до ФСЗ ципрофлоксацину гідрохлориду для ідентифікації піка та хроматограму розчину порівняння (b) для ідентифікації піків домішок В, С, D і E.

Відносні утримування до ципрофлоксацину (час утримування ципрофлоксацину близько 9 хв): до-

Ципрофлоксацину гідрохлорид

мішки Е — близько 0.4; домішки В — близько 0.6; домішки С — близько 0.7; домішки D — близько 1.2.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b):

— **ступінь розділення:** не менше 1.3 між піками домішки В і домішки С.

Нормування:

— **поправкові коефіцієнти:** для розрахунку вмісту множать площі піків наведених нижче домішок на відповідний поправковий коефіцієнт: для домішки В — 0.7, для домішки С — 0.6, для домішки D — 1.4, для домішки Е — 6.7;

— **домішка Е:** площа піка не має перевищувати 1.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.3 %);

— **домішки В, С, D:** площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.2 %);

— **неспецифіковані домішки:** площа піка кожної домішки не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.10 %);

— **сума домішок:** сума площ піків не має перевищувати 2.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.5 %);

— **не враховують:** домішки, площа піків яких менше 0.25 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (c) (0.05 %).

Важкі метали (2.4.8, метод Е). Не більше 0.002 % (20 ppm).

0.25 г субстанції розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину водою Р до 30 мл. Проводять передфільтрацію. Одержаний фільтрат має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 5 мл свинцю еталонного розчину (1 ppm Pb) Р.

Вода (2.5.12). Не більше 6.7 %. Визначення проводять із 0.200 г субстанції.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції у платиновому тиглі.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29) як описано у випробуванні «Супровідні домішки» із такими змінами.

Інжекції: 10 мкл. Вводять випробовуваний розчин і розчин порівняння (a).

Вміст $C_{17}H_{16}ClFN_3O_3$ обчислюють, у відсотках.

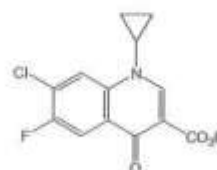
ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці.

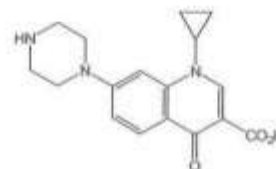
ДОМІШКИ

Специфіковані домішки: А, В, С, D, Е.

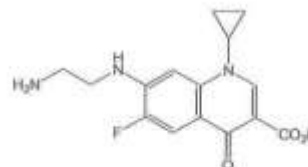
Інші домішки, що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також 5.10. «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): F.



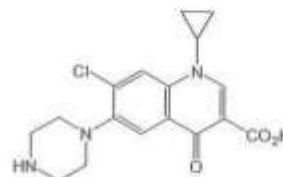
A. 7-хлор-1-циклопропіл-6-фтор-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота (фторхінолонова кислота),



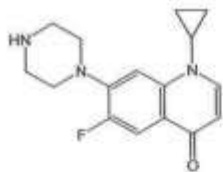
B. 1-циклопропіл-4-оксо-7-(піперазин-1-іл)-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота (дефторована сполука),



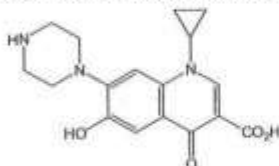
C. 7-[(2-аміноетил)аміно]-1-циклопропіл-6-фтор-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота (етилендіамінова сполука),



D. 7-хлор-1-циклопропіл-4-оксо-6-(піперазин-1-іл)-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота,



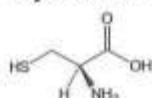
Е. 1-циклопропіл-6-фтор-7-(піперазин-1-іл)хінолін-4(1*H*)-он (декарбоксільована сполука),



Ф. 1-циклопропіл-6-гідрокси-4-оксо-7-(піперазин-1-іл)-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота.

ЦИСТЕЇН^N

Cysteinum



$C_3H_7NO_2S$

М.м. 121.2

(*R*)-2-аміно-3-меркаптопропанова кислота.

Вміст: не менше 98,0 % і не більше 101,0 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого кольору або безбарвні кристали з характерним запахом.

Розчинність. Легко розчинний у воді *P* та етанолі (96 %) *P*, практично не розчинний у ефірі *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В.

Друга ідентифікація: А, С, D, Е.

А. Субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного обертання як зазначено в розділі «Випробування».

В. Абсорбційна спектроскопія в інфрачервоній області (2.2.24).

Підготування зразка: субстанцію досліджують у дисках

Відповідність: спектру ФСЗ цистеїну.

С. Близько 10 мг субстанції розчиняють у 2 мл води *P*, додають 0,1 *M* розчин хлористоводневої кислоти до рН близько 4,0, 0,5 мл розчину 2,5 г/л нітгідрину *P*, нагрівають на водяній бані протягом 10 хв; з'являється жовте або жовто-коричневе забарвлення. Одержаний розчин охолоджують до кімнатної температури, додають краплями від 1 мл до 2 мл 0,1 *M* розчину натрію гідроксиду; з'являється червоно-фіолетове забарвлення.

D. Близько 5 мг субстанції розчиняють у 5 мл води *P*, додають 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного *P* і 0,2 мл розчину 25 г/л натрію нітропрусиду *P*; з'являється жовте забарвлення, що протягом 2 хв переходить у червоне.

Е. 0,10 г субстанції обережно змішують з 1 мл водню пероксиду розчину концентрованого *P* і 0,1 мл заліза (III) хлориду розчину *P* і охолоджують. До одержаного розчину додають 1 мл хлористоводневої кислоти розведеної *P*, 5 мл води *P*, 1 мл барію хлориду розчину *P*; протягом 3 хв з'являється біла каламуть або осад.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 2,5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. Розчин використовують свіжоприготованим.

Прозорість розчину (2.2.1). Розчин S має бути прозорим.

Кольоровість розчину (2.2.2, метод II). Розчин S має бути безбарвним.

pH (2.2.3). Від 4,5 до 6,0. Вимірюють pH розчину S.

Питоме оптичне обертання (2.2.7). Від +8,0 до +9,5, у перерахунку на суху речовину. 3,00 г субстанції розчиняють у розчині 220 г/л хлористоводневої кислоти *P* і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 25,0 мл.

Речовини, виявлені нітгідринном. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 0,10 г субстанції розчиняють у 6 мл розчину 20 г/л *N*-етилmaleїміду *P*. Одержаний розчин використовують протягом 15 хв.

Розчин порівняння. 1 мл випробовуваного розчину доводять водою *P* до об'єму 100 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

Рухома фаза: вода *P* - оцтова кислота льодяна *P* - бутанол *P* (25:25:50).

Додаток 3

Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № C20964330924CS,
свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ
СЕРВІС».



Анотація (Summary)

Introduction. In the treatment of various infectious diseases, doctors often prescribe fluoroquinolone derivatives, such as ciprofloxacin, to patients. According to DFU, ciprofloxacin is quantitatively determined by the method of non-aqueous neutralization with determination of the equivalence point by the potentiometric method. In our opinion, the potentiometric determination method has certain disadvantages, namely: laboriousness of the process, titrant standardization, inert atmosphere, toxicity of the standard. The aim of the study. To develop a methodology for the quantitative determination of ciprofloxacin in tablet forms by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC).

Research methods. High performance liquid chromatography.

The results. The HPLC method is modern, sensitive, fully automated, easy to use, but always chromatographic analysis is preceded by a certain sample preparation. In our case, the sample preparation was as follows: 1 tablet was ground in a porcelain mortar, the powder was transferred to a 0.5-liter flask, and the suspension was prepared. The prepared mixture was transferred to an extraction flask and the active substance was extracted with ethyl acetate. After that, the extract was dried with anhydrous sodium sulfate for 120 minutes and concentrated on a rotary evaporator.

After the sample preparation procedure, the mobile phase was prepared with methyl alcohol - distilled water (70:30), the flow rate of the mobile phase was 1.5 ml/min. Column temperature 400C, injection 20 µl, pressure 140 Bar. Chromatography procedure was carried out. The concentration of ciprofloxacin in the analyzed samples (according to the instructions for medical use, the content of the active substance ciprofloxacin is 250 mg) was established using a calibration

graph. Standard solutions for building a calibration graph were prepared by diluting a standard pharmacopoeial sample.

The obtained results of the determined content of ciprofloxacin in solid dosage forms (sample 1 and sample 2) were, respectively, 248.86 mg and 249.64 mg.

Conclusions. The proposed alternative method of quantitative determination of ciprofloxacin by HPLC is highly sensitive, modern, fully automated, environmentally friendly and can be used to determine the mass of the active substance ciprofloxacin in solid dosage forms.