



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113712** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 30/00
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

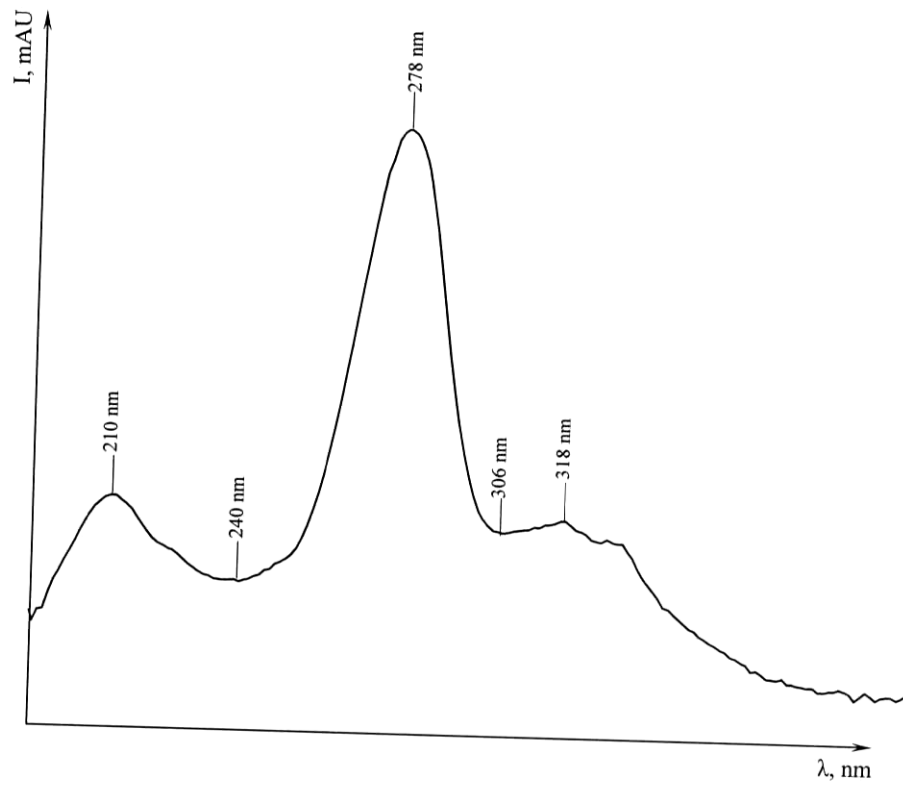
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 08416	(72) Винахідник(и): Дроздов Олексій Леонідович (UA), Білоножко Максим Васильович (UA), Ковалерчик Олег Вікторович (UA), Лозовик Ольга Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.08.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.02.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2017, Бюл.№ 3	(73) Власник(и): Дроздов Олексій Леонідович, вул. Івана Анкіфієва, 15, кв. 14, м. Дніпропетровськ, 49027 (UA), Білоножко Максим Васильович, вул. Ю. Савченка, 3, кв. 53, м. Дніпропетровськ, 49006 (UA), Ковалерчик Олег Вікторович, пр. Гагаріна, 139, кв. 19, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA), Лозовик Ольга Михайлівна, ж/мас. Тополя-3, буд. 8, кв. 80, м. Дніпропетровськ, 49041 (UA)
	(74) Представник: Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ**(57) Реферат:**

Спосіб визначення вмісту ципрофлоксацину, що включає відбір проби досліджуваної субстанції, розчинення, рідинне хроматографування, з використанням октадецилсилільного силікагелю як нерухомої фази та суміші ацетонітрилу з розчином ортофосфорної кислоти як елюенту, доведеним заздалегідь до заданої рН, розділення, ідентифікацію та визначення площі хроматографічного піка як показника концентрації, на довжині хвилі аналізатора 278 нм, причому додатково у розчинену субстанцію додають ацетонітрил, домішують розчин калію фосфорнокислого однозаміщеного у розчин ортофосфорної кислоти, розділяють досліджувану субстанцію шляхом мікроколоночної хроматографії, з використанням засобів діодно-матричного детектування, ідентифікацію проводять в ультрафіолетовому діапазоні за інтенсивностями сигналів у максимумах поглинання, на довжинах хвиль 278, 210, 318 нм і у проїмах між ними, на довжинах хвиль 240, 306 нм, а площу хроматографічного піка визначають при середньостатистичних співвідношеннях інтенсивностей сигналів у максимумах поглинання I_{278}/I_{210} , I_{278}/I_{318} 3,03 і 3,26, відповідно.

UA 113712 U



Корисна модель належить до досліджень матеріалів шляхом їх розділення на складові, переважно до рідинної колонкової хроматографії, аналізу медичних препаратів і може бути використаною в спектрофотометрії при контролюванні їхньої якості.

Відомий спосіб кількісного визначення ципрофлоксацину, що включає відбір проби, відокремлювання аналізату шляхом тонкошарової хроматографії, проведення реакції отриманого залишку з хлоридом тербію (III), в присутності триоктил-фосфіноксиду, тетрадецилсульфату натрію та уротропіну при $\text{pH}=6-8$, на пластинці для тонкошарової хроматографії, візуалізацію наявності, інтенсивності люмінесценції іонів тербію (III) під люмінесцентною лампою та її порівняння зі стандартом. Відоме рішення задачі спрощує аналіз, скорочує час кількісного визначення вмісту та знижує межі виявлення ципрофлоксацину [1]. Однак, застосування інтенсивності люмінесценції іонів тербію (III) у видимій області спектру, як засобу ідентифікації ципрофлоксацину, зумовлює викривлення кінцевого результату, через можливість відтворення реакції комплексоутворення тербію (III), отримання люмінесцентних сполук не лише з ципрофлоксацином, як лігандом, але й з багатьма іншими представниками сполук даного класу. Натомість, інтенсивність люмінесценції іонів тербію (III) для простої візуалізації відносно мала, через слабкість сил осциляторів у переходах електронів, а кінцевий результат певністю залежний від людського фактора.

Наближеним до корисної моделі, що заявляється, серед об'єктів аналогічного призначення за найбільшою кількістю істотних ознак, є спосіб визначення вмісту ципрофлоксацину шляхом рідинної хроматографії, що включає відбір проби досліджуваної субстанції, розчинення, рідинне хроматографування, з використанням октадецилсилільного силікагелю як нерухомої фази та суміші ацетонітрилу з розчином ортофосфорної кислоти як елюенту, доведеним заздалегідь до заданої pH , розділення, ідентифікацію та визначення площі хроматографічного піка як показника концентрації, на довжині хвилі аналізатора 278 нм, у відповідності з котрим, суху субстанцію ципрофлоксацину розчиняють у рухомій фазі, доводять pH ортофосфорної кислоти до заданого значення домішкою триетаноламіну, розділяють розчин досліджуваної субстанції шляхом повнорозмірної колоночної хроматографії та ідентифікують в ультрафіолетовому діапазоні за спектральним максимумом на довжині хвилі 278 нм і часом утримання [2]. Недоліками прототипу є недостатня точність детекції, через руйнацію триетаноламіну, наступне появлення забарвлених речовин в рухомій фазі, з наступним утворенням спектральних "шумів" в ультрафіолетовому діапазоні, та відсутністю будь-яких засобів контролю.

Задача, на рішення котрої спрямований запропонований спосіб визначення вмісту ципрофлоксацину, полягає у збільшенні точності детекції шляхом тривимірного діодно-матричного детектування.

Вищезазначений технічний результат досягається тим, що при здійсненні у відомому способі визначення вмісту ципрофлоксацину, що включає відбір проби досліджуваної субстанції, розчинення, рідинне хроматографування, з використанням октадецилсилільного силікагелю як нерухомої фази та суміші ацетонітрилу з розчином ортофосфорної кислоти як елюенту, доведеним заздалегідь до заданої pH , розділення, ідентифікацію та визначення площі хроматографічного піка як показника концентрації, на довжині хвилі аналізатора 278 нм, відповідно до корисної моделі, додатково у розчинену субстанцію додають ацетонітрил, домішують розчин калію фосфорнокислого однозаміщеного у розчин ортофосфорної кислоти, розділяють досліджувану субстанцію шляхом мікроколоночної хроматографії, з використанням засобів діодно-матричного детектування, ідентифікацію проводять в ультрафіолетовому діапазоні за інтенсивностями сигналів у максимумах поглинання, на довжинах хвиль 278, 210, 318 нм і у проїмах між ними, на довжинах хвиль 240, 306 нм, а площу хроматографічного піка визначають при середньостатистичних співвідношеннях інтенсивностей сигналів у максимумах поглинання I_{278}/I_{210} , I_{278}/I_{318} 3,03 і 3,26, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності запропонованих ознак корисної моделі з вищезазначеним технічним результатом полягає в наступному.

Розчинення проби в ацетонітрилі виключає руйнацію досліджуваної субстанції, а відтак появу забарвлених речовин та утворення "шумів" в ультрафіолетовому спектрі. Змішування розчину ортофосфорної кислоти з розчином калію фосфорнокислого однозаміщеного, перед доведенням фосфатного буферу до заданої pH , стабілізує рухому фазу, підвищує прозорість ультрафіолету, завдяки урівноваженню концентрацій фосфат-іонів у змішуваних розчинах. Додання розчину ортофосфорної кислоти до розчину калію фосфорнокислого однозаміщеного компенсує втрату концентрацій фосфат-іонів у буфері, стабілізуючи рухому фазу, що поліпшує точність детекції. Тривимірне спектрохроматографування розчину ципрофлоксацину нормалізує октадецилсиланову адаптацію до силікагелю, час виходу та формування піків досліджуваної субстанції в умовах кислотного середовища на довжинах хвиль 278, 210, 318 нм аналізатора.

Хроматографічні піки ципрофлоксацину в ультрафіолетовому спектрі окреслюють хроматографічний профіль, складений з максимумів поглинання сигналів та пройм між ними на довжинах 210, 278, 318, 240 і 306 нм (див. креслення), як додаткових засобів контролю ідентичності, що збільшує достовірність визначення ципрофлоксацину у спектрі "шумів", через забарвлення або присутність представників невідомого походження в рухомій фазі. Контролювання наявності пройм між максимумами спектра дозволяє оцінити також "чистоту" хроматографічних піків, поліпшити селективність, як складові детекції. Збільшення достовірності формування спектрального профілю в ультрафіолетовому спектрі за піками сигналів I_{210} , I_{278} , I_{318} збільшує точність детекції у 20-30 разів, оскільки площа хроматографічного піка на хвилі 278 нм визначається в межах відповідності співвідношень відгуків аналітичних сигналів I_{278}/I_{210} , I_{278}/I_{318} значенням стандартного розчину ципрофлоксацину 3,03, 3,26, відповідно.

Таким чином, сукупність ознак заявленої корисної моделі є "суттєвою" для всіх випадків її багаторазового використання, оскільки перебуває у причинно-наслідковому зв'язку з реалізацією вищенаведеного технічного результату, та "новою", оскільки характеризує обсяг запропонованого технічного рішення невідомим.

Додаткові переваги запропонованого способу полягають у відсутності реакцій на гепарин і тіопентал у водному розчині, в економічності, через відмову від засобів повноколонкової хроматографії, вимагаючих залучення високочистих розчинників, а також у виключенні впливу людського фактора на кінцевий результат.

Відомості, які підтверджують відтворення запропонованого рішення задачі з реалізацією вищенаведеного технічного результату полягають в наступному.

Спосіб ілюструється хроматограмою ципрофлоксацину (кресл.).

Суть. Для визначення вмісту ципрофлоксацину у водному розчині або у будь-якій рідині залучають: рідинну хроматографічну систему "Shimadzu LC-20AD" (Японія), складену з 2-х плунжерних насосів "Shimadzu LC-20AD", підтримуючих швидкість потоку елюенту в межах 0,1-1,0 мл/хв., дегазатора "Shimadzu DGU-20A₃", системи градієнту високого тиску, хроматографічних колонок 100 мм довжини, з внутрішнім \varnothing 2 мм, 5 мкм силікагелем, як обернено-фазовим сорбентом, хімічно привитим октадецилсиланом "Kromasil C18", термостату "Shimadzu CTO-20A", спектрометричного діодно-матричного детектора "Shimadzu SPD-M20A" для 180-800 нм хвильового діапазону, автоматичного інжектора "Shimadzu Auto Sampler", та елюент, у вигляді суміші ацетонітрилу з водним розчином ортофосфорної кислоти, доведеним до pH 3,0 розчином калію фосфорнокислого однозаміщеного з pH 3,4.

Суть. Спосіб визначення вмісту ципрофлоксацину включає відбір проби досліджуваної субстанції, її розчинення в ацетонітрилі, рідинне хроматографування шляхом діодно-матричного детектування з використанням суміші ацетонітрилу з водним розчином ортофосфорної кислоти як елюенту, доведеним до pH 3,0 розчином калію фосфорнокислого однозаміщеного з pH 3,4, ідентифікацію в ультрафіолетовому спектрі, за інтенсивностями сигналів у максимумах поглинання, на довжинах хвиль 278, 210, 318 нм, у проймах, на хвилях 240, 306 нм, та визначення площі хроматографічного піка, при середньостатистичних співвідношеннях інтенсивностей сигналів у максимумах поглинання $I_{278}/I_{210}=3,03$ і $I_{278}/I_{318}=3,26$.

На відміну від спектрофотометричного, діодно-матричне детектування у запропонованому вигляді дозволяє здійснити тривимірне хроматографування, з отриманням спектрального профілю досліджуваної субстанції, саме у той проміжок часу, що відповідає часу утримання ципрофлоксацину. Виключення нормалізації pH ортофосфорної кислоти за допомогою триетаноламіну, здатного до руйнації та ініціювання появи кольорових забруднювачів як "шумів" ультрафіолетового спектру, оцінка "чистоти" хроматографічних піків, розширення меж селективності за контролем пройм між максимумами спектра, ідентифікація за ступенем збігу з поточного і стандартного спектральних профілів ципрофлоксацину покращують чутливість, що збільшує точність детекції у 20-30 разів.

Приклад 1. Суху субстанцію ципрофлоксацину розчиняли у ацетонітрилі до концентрації 10 мкг/мл. Рухому фазу готували змішуванням ацетонітрилу з водним розчином ортофосфорної кислоти 2,45 г/л, доведеним до pH 3,0 за допомогою розчину калію фосфорнокислого однозаміщеного, при співвідношенні об'ємних частин 20:80. Відбирали 1 мкл розчину досліджуваної субстанції і вводили у 100 мм хроматографічну колонку, з внутрішнім \varnothing 2 мм, заповнену заздалегідь 5 мкм гранулами октадецилсилільного силікагелю "Kromasil C18". Хроматографування здійснювали шляхом діодно-матричного детектування при швидкості потоку 0,2 мл/хв. Хроматографічний пік ципрофлоксацину ідентифікували за спектральними максимумами на хвилях 210, 278, 318 нм, проймами між ними, на довжинах хвиль 240, 306 нм, і часом утримання досліджуваної субстанції. Визначали інтенсивність сигналів I_{210} , I_{278} , I_{318} у спектральних піках. Розраховували співвідношення інтенсивностей сигналів у визначених

максимумах I_{278}/I_{210} , I_{278}/I_{318} . Відповідність середнє статистичних співвідношень значенням 3,03 і 3,26, свідчила про ідентичність досліджуваної субстанції стандартному розчину ципрофлоксацину й дозволила визначати його концентрацію за площею хроматографічного піка.

5 Наведений приклад демонструє можливість ідентифікації ципрофлоксацину та визначення його концентрації шляхом діодно-матричної детекції, в умовах істотного розширення діапазону лінійних хроматографічних вимірювань, без викривлення кількісно-якісних відбитків і одержання артефактів, з можливістю перевершення точності детекції у 20-30 разів, що відповідає умові "промислова придатність". Використання способу у сфері контролю якості дозволить

10 вдосконалювати випуск продукції, усувати розповсюдження фальсифікату, нормалізувати ефективність лікування.

Характеристика об'єкта, що зазначена у Формулі, визначає відмінність його від об'єктів аналогічного призначення і допускає можливість кваліфікації як корисної моделі процесу.

Джерела інформації:

15 1. Спосіб кількісного визначення ципрофлоксацину: Пат. 26120 України, МПК G01N 33/15 / Одеська національна акад. харчових технологій; Фізико-хімічний ін-т ім. О.В. Богатського національної академії наук України (Україна); С.В. Бельтюкова, О.І. Теслюк, О.О. Лівенцова (Україна). - № 200701846; заявл. 22.02.07; опубл. 10.09.07.

2. Кількісне визначення ципрофлоксацину шляхом рідинної хроматографії / Державна фармакопея України. Перше вид. - Харків, 2008. - С. 588.

20

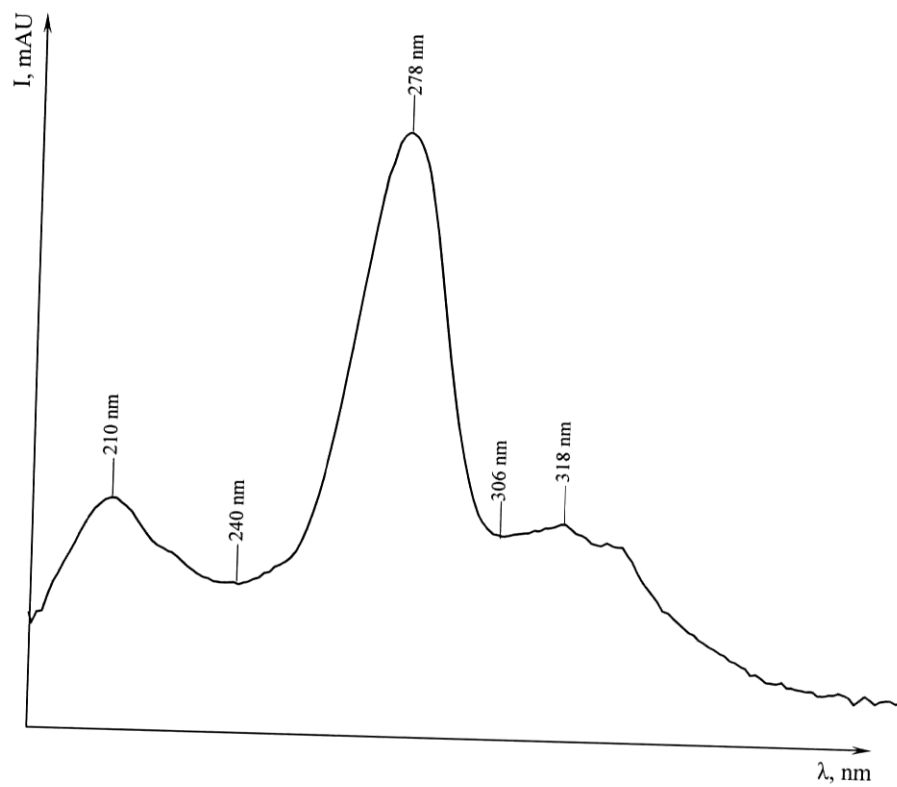
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення вмісту ципрофлоксацину, що включає відбір проби досліджуваної субстанції, розчинення, рідинне хроматографування, з використанням октадецилсилільного силікагелю як нерухокої фази та суміші ацетонітрилу з розчином ортофосфорної кислоти як елюенту, доведеним заздалегідь до заданої рН, розділення, ідентифікацію та визначення площі хроматографічного піка як показника концентрації, на довжині хвилі аналізатора 278 нм, який

25 **відрізняється** тим, що додатково у розчинену субстанцію додають ацетонітрил, домішують розчин калію фосфорнокислого однозаміщеного у розчин ортофосфорної кислоти, розділяють досліджувану субстанцію шляхом мікроколоночної хроматографії, з використанням засобів діодно-матричного детектування, ідентифікацію проводять в ультрафіолетовому діапазоні за інтенсивностями сигналів у максимумах поглинання, на довжинах хвиль 278, 210, 318 нм і у

30 проймах між ними, на довжинах хвиль 240, 306 нм, а площу хроматографічного піка визначають при середньостатистичних співвідношеннях інтенсивностей сигналів у максимумах поглинання I_{278}/I_{210} , I_{278}/I_{318} 3,03 і 3,26, відповідно.

35



Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601