



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00777

(22) Data de depozit: 31.08.2010

(41) Data publicării cererii:  
30.08.2011 BOPI nr. 8/2011

(71) Solicitant:  
• NEAGU MARIA, STR. IZVORUL CRIȘULUI  
NR.2, BL.D1, SC.D, AP.31, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• NEAGU MARIA, STR. IZVORUL CRIȘULUI  
NR.2, BL.D1, SC.D, AP.31, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ ANALITICĂ (HPLC) DE IDENTIFICARE, DOZARE A FLORFENICOLULUI ȘI A IMPURITĂȚILOR ÎNRUDITE CHIMIC DIN PRODUSELE FARMACEUTICE FLORFENIDEM 10% - SOLUȚIE ORALĂ, FLORFENIDEM 50 ȘI FLORFENICOL INGREDIENT FARMACEUTIC ACTIV**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă analitică de identificare și dozare a Florfenicolului și a impurităților chimice înrudite, din produsele farmaceutice conținând acest ingredient activ. Metoda conform invenției cuprinde o cromatografie HPLC, folosind o coloană octadecilsilil silicagel, pentru cromatografie R, cu lungimea de 150 mm, diametrul interior de 4,6 mm, dimensiunea particulelor de 5 μm, la o temperatură a coloanei de 25°C, cu eluare izocratică, compoziția fazei mobile fiind Solvent A:Solvent B 60:40 v/v, unde Solventul A este apă HPLC și Solventul B este acetoneitril R, cu un

debit al fazei mobile de 1 ml/min, cu detectare UV la lungimea de 254 nm, coloană în care se injectează 10 μm soluție de referință a, conținând 5000 ppm florfenicol, această soluție reprezentând și soluția pentru testarea sistemului cromatografic, cu condiția existenței a cel puțin 500 de talere teoretice pentru picul de Florfenicol.

Revendicări: 2  
Figuri: 1



60

METODA ANALITICA (HPLC) DE IDENTIFICARE, DOZARE A  
FLORFENICOLULUI SI A IMPURITATILOR INRUDITE CHIMIC DIN  
PRODUSELE FARMACEUTICE FLORFENIDEM 10% - SOLUTIE ORALA,  
FLORFENIDEM 50 SI FLORFENICOL – INGREDIENT FARMACEUTI ACTIV

**Inventia se refera la** Metoda analitica (HPLC) de identificare, dozare a Florfenicolului si a impuritatilor inrudite chimic din produsele farmaceutice Florfenidem 10% - solutie orala, Florfenidem 50 si Florfenicol – ingredient farmaceutic activ.

**Stadiul tehnicii:** Atat metodele analitice HPLC prezentate in diverse articole stiintifice, cat si cea data de producatorul de materie prima de Florfenicol (Zhejiang Hisoar Pharmaceutical&Chemical Co., Ltd) in Drug Master File-ul substantei active, folosesc drept componenta apoasa a fazei mobile, diverse saruri, ex: Acetat de amoniu, Fosfat diacid de de potasiu, dar si alte substanta ca: TEA, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,etc.

Metoda analitica HPLC prezentata de producatorul materiei prime de Florfenicol, pentru dozare, identificare a florfenicolului si a impuritatilor inrudite chimic consta in utilizarea unei faze mobile cu urmatoarea compozitie: Acetonitril : Tampon Acetat , 30:70 v/v. Solutia tampon acetat contine 0,5 g de acetat de amoniu in 1000 ml de apa. Detectia se face UV la 254 nm. S-a utilizat o coloana C18, 150mmx4,6mm I.D. Volumul de injectie fiind de 10µl.

**Dezavantajele** constau in faptul ca folosirea sarurilor in faza mobila, in afara de faptul ca maresc costurile per analiza, creaza probleme tehnice echipamentului prin precipitarea in pompa, coloana, sau capilarele cromatografului, a sarurilor.

**Problema tehnica pe care o rezolva inventia** este folosirea unei metode analitice HPLC de identificarea si dozarea substantei active de Florfenicol si a impuritatilor inrudite chimic ale acestuia, utilizand drept faza mobila doar apa si acetonitril. In acest mod, costurile per analiza se reduc. Se elimina riscul de precipitare a sarurilor in coloana cromatografica si cromatograf. Timpul necesar unei analize complete fiind de aproximativ 90 minute, comparabil cu al celorlalte metode analitice HPLC, similare, cunoscute.

*Lupegn*

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2010 00777
Data depozit 31.08.2010

Metoda HPLC propusa este originala, foarte utila tuturor acelora care trebuie sa controleze calitatea unor produse farmaceutice care au drept ingredient activ Florfenicolul, neexistand la acest moment monografie compendiala (European Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia), cu prezentarea vreunei metode de analiza pentru acest ingredient farmaceutic activ, molecula fiind una cu utilizare recenta, pe scara larga in industria farmaceutica. Alaturi de identificarea substantei active si dozarea acesteia in produsele farmaceutice care contin acest ingredient activ si urmatorii excipienti: Lactoza monohidrat, N-methyl 2-pyrrolidone, Propyleneglycol, Polyethylene 300, metoda permite identificarea impuritatii inrudite chimic cunoscute – Thiamphenicol, dar si a impuritatilor inrudite chimic necunoscute.

Este foarte importanta dozarea si identificarea impuritatilor inrudite chimic cunoscute, respectiv necunoscute deoarece depasirea limitelor admise pentru acestea, atat in ingredientul farmaceutic activ cat si in produsul farmaceutic finit poate avea efecte secundare nedorite.

In cazul Florfenicolului limitele impuse pentru impuritatile inrudite chimic sunt urmatoarele:

Impuritate inrudita chimic, necunoscuta, individual: maxim 0.3%; Thiamphenicol (impuritate inrudita chimic cunoscuta): maxim: 0,5%; Total impuritati inrudite chimic, maxim 2,0%;

**Metoda conform inventiei elimina dezavantajele mentionate, prin aceea ca:**

Intr-un sistem cromatografic HPLC care foloseste o coloana cromatografica octadecylsilyl silica gel for chromatography R, cu lungimea de 150 mm, diametrul interior de 4,6 mm si cu dimensiunea particulelor de 5 µm, temperatura coloanei cromatografice fiind de 25 °C, elutia este izocratica, compozitia fazei mobile este Solvent A : Solvent B, 60 : 40 v/v unde, Solventul A este Apa uz HPLC. Millipore sau echivalent si Solventul B este Acetonitrile R, debitul fazei mobile fiind 1 mL/min, detectia este UV si se face la lungimea de unda de 254 nm, se injecteaza 10 µL de Solutie de referinta a, solutie a carei concentratie este de 5000 ppm de florfenicol, aceasta solutie reprezentand si solutia pentru testarea

*M. C. C.*

31-08-2010

sistemului cromatografic, conditia care trebuie indeplinita fiind urmatoarea: minim 500 de talere teoretice pentru picul de Florfenicol.

**Metoda conform inventiei prezinta urmatoarele avantaje:**

- Simultan se poate doza si identifica substanta activa si impuritatea inrudita chimic cunoscuta (Thiamphenicol) si se pot doza impuritatile inrudite chimic necunoscute.
- Folosind drept faza mobila doar apa si acetonitril, costurile per analiza sunt micorate considerabil.
- Nefolosirea sarurilor in compozitia fazei mobile inlatura riscurile de precipitare a acestora in coloana cromatografica sau echipament deci inlatura aparitia unor probleme tehnice.
- Timpul necesar unei analize complete este similar cu cel obtinut folosind celelate metode cromatografice cunoscute.

**Exemplu de realizarea** a metodei conform inventiei (pentru Florfenidem 10 % - solutie orala):

Echipamentul folosit (sistemul cromatografic, comun tuturor determinarilor) este urmatorul:

Cromatograf de lichide de inalta presiune - Agilent 1200 compus din urmatoarele module: Cabinet solventi; Pompa cuaternara de inalta presiune G 1354A cu degazor G 1379B, serie 1200; Termostat pentru coloana G 1316A, serie 1200; Detector spectrofotometric (VWD) G 1314B, serie 1200, sau altul similar; Autosampler G 1329A; Termostat pentru autosampler G1330B, serie 1200; Poate fi folosit orice echipament similar.

Substante de referinta folosite:

- Florfenicol CRS, lot TRC-20030503, Toronto Research Chemicals;
- Thiamphenicol CRS, lot nr.1.a, European Pharmacopoeia;

Solventi, Solutii folosite:

Acetonitril, - gradient grade for liquid chromatography, Merck, lot I462630847

Solvent probe – Faza mobila (Apa : Acetonitril 60:40);

Apa de uz cromatografic – rezistivitate minima 18,2MΩ, continut total de substante organice TOC maxim 30 ppb (apa ultrapurificata).

**Solutia stoc (10 000 ppm)** – Florfenidem 10% solutie orala – Intr-un balon cotate de clasa de precizie A, de 100 ml se aduc 10 ml de **Florfenidem 10% - solutie orala**, se completeaza la semn cu Solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

**Solutia stoc Thiamphenicol (50 ppm)**– Intr-un balon cotate de clasa de precizie A, de 100ml, se aduc 5 mg de **Thiamphenicol CRS**, se dizolva si se completeaza la semn cu Solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

**Solutie test (5000 ppm)** – 5 ml din **Solutia stoc** se aduc intr-un balon cotate de clasa de precizie A, de 10 ml si se completeaza la semn cu solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

**Solutia de referinta a, (5000 ppm)**– 50 mg de **Florfenicol CRS** se aduc intr-un balon cotate de 10 ml de clasa de precizie A, se adauga 2 ml de acetonitril si se completeaza la semn cu solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

**Solutie de referinta b, (25 ppm)** – 5 mL de **Solutie stoc de Thiamphenicol** se aduc intr-un balon cotate de 10 ml de clasa de precizie A, se completeaza la semn cu Solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

**Solutia de referinta c, (15 ppm)** – 0,3 ml de **Solutia de referinta a** se aduc intr-un balon de 100 ml de clasa de precizie A, se completeaza la semn cu Solvent probe.

Solutiile utilizate in functie de tipul determinarii sunt prezentate in continuare:

Identificarea substantei active:

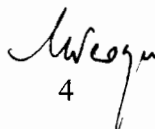
- Solutia de referinta a - Florfenicol CRS – 5000 ppm
- Solutia proba - Florfenicol – 5000 ppm

Identificarea Thiamphenicolului:

- Solutia de referinta b Thiamphenicol - Thiamphenicol CRS – 25 ppm
- Solutia proba - Florfenicol - 5000 ppm

Dozarea substantei active:

- Solutia de referinta a - Florfenicol CRS – 5000
- Solutia proba - Florfenicol - 5000 ppm

  
4

Dozare Thiamphenicol:

- Solutia de referinta b - Thiamphenicol CRS – 25 ppm
- Solutia proba - Florfenicol - 5000 ppm

Impuritati inrudite chimic:

- Solutia de referinta c - Florfenicol CRS - 15 ppm
- Solutia proba - Florfenicol - 5000 ppm

*M. Sogor*  
5

METODA ANALITICA (HPLC) DE IDENTIFICARE, DOZARE A  
FLORFENICOLULUI SI A IMPURITATILOR INRUDITE CHIMIC DIN  
PRODUSELE FARMACEUTICE FLORFENIDEM 10% - SOLUTIE ORALA,  
FLORFENIDEM 50 SI FLORFENICOL – INGREDIENT FARMACEUTIC ACTIV

**Revendicare**

Metoda analitica (HPLC) de identificare, dozare a Florfenicolului si a impuritatilor inrudite chimic din produsele farmaceutice Florfenidem 10% - solutie orala, Florfenidem 50 si Florfenicol – ingredient farmaceutic activ, **caracterizata prin aceea ca:** Intr-un sistem cromatografic HPLC care foloseste o coloana cromatografica octadecylsilyl silica gel for chromatography R, cu lungimea de 150 mm, diametrul interior de 4,6 mm si cu dimensiunea particulelor de 5 µm, temperatura coloanei cromatografice fiind de 25 °C, elutia este izocratica, compozitia fazei mobile este Solvent A : Solvent B, 60 : 40 v/v unde, Solventul A este Apa uz HPLC, Millipore sau echivalent si Solventul B este Acetonitrila R, debitul fazei mobile fiind 1 mL/min, detectia este UV si se face la lungimea de unda de 254 nm, se injecteaza 10 µL de Solutie de referinta a, solutie a carei concentratie este de 5000 ppm de florfenicol, aceasta solutie reprezentand si solutia pentru testarea sistemului cromatografic, conditia care trebuie indeplinita fiind urmatoarea: minim 500 de talere teoretice pentru picul de Florfenicol.

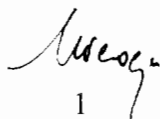
  
1

Fig.1: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii **Solutiei de referinta b** si a **Solutiei de referinta a**.

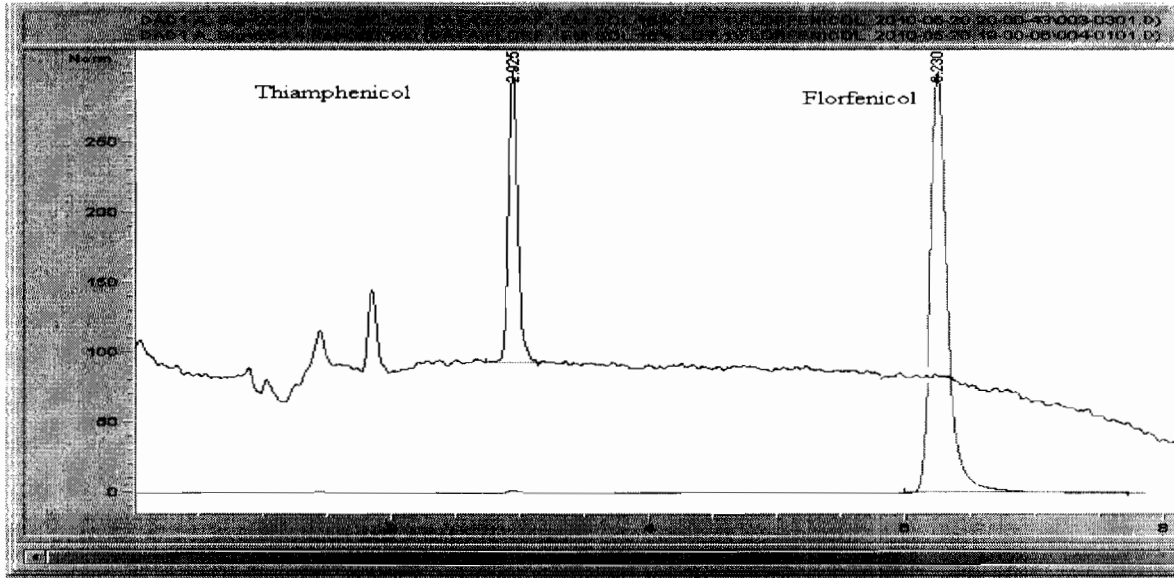
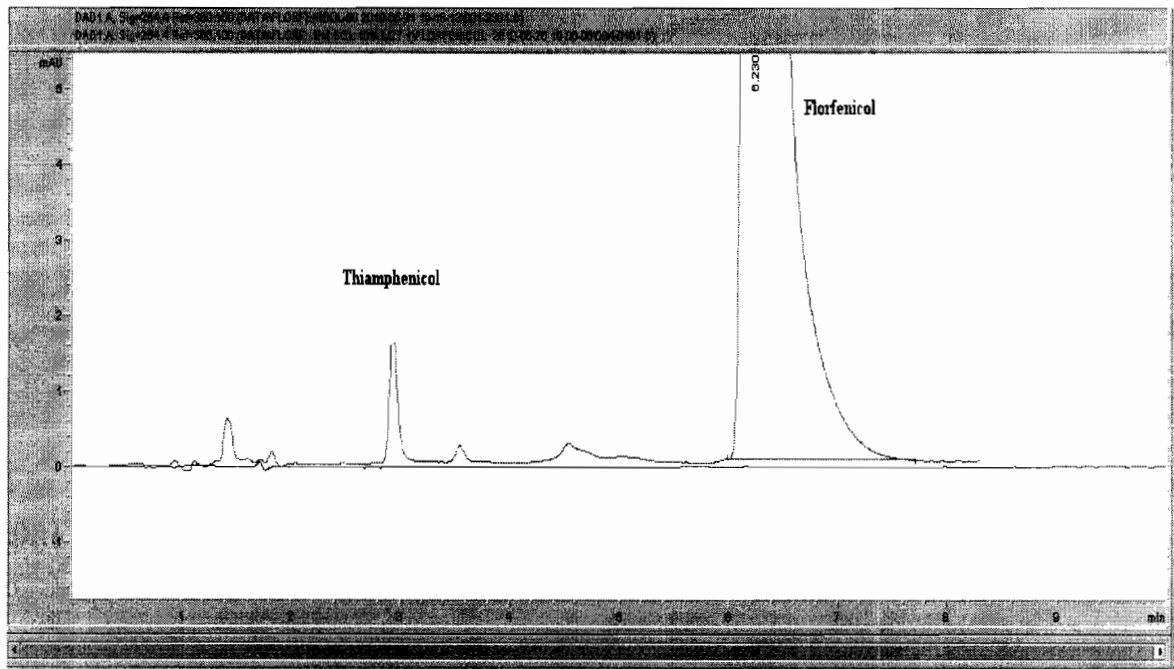


Fig.2: Suprapunerea cromatogramelor obtinute in urma injectarii **Solutiei test** si a **Solventului de probe** (Faza mobila).



Wesley  
6