



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01145

(22) Data de depozit: 22.11.2010

(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 ENROFLOXACINEI ȘI A IMPURITĂȚILOR ÎNRUDITE CHIMIC DIN PRODUSELE FARMACEUTICE ENRODEM 10% - SOLUȚIE ORALĂ, ENRODEM 50 - PULBERE HIDROSOLUBILĂ ȘI ENROFLOXACINĂ/ ENROFLOXACINA HCL INGREDIENT FARMACEUTIC ACTIV**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă analitică de identificare și dozare a enrofloxacinii și a impurităților înrudite chimic. Metoda conform invenției constă din cromatografie pe o coloană cu silicagel octadecilsilil la o temperatură pe coloană de 40°C, utilizând, drept fază mobilă, acetonitril: H₃PO₄ 25 mM și tetrahidrofuran, testarea coloanei fiind efectuată, se face prin injectarea unei soluții de referință conținând 3 ppm enrofloxacină și 3 ppm ciprofloxacină, cu o concentrație de 1000 ppm,

la un număr de talere teoretice de minimum 2000 pentru enrofloxacină și o rezoluție între picurile componentelor de minimum 1,5, timpul de înregistrare fiind de aproximativ 10 min, adică de două ori timpul de retenție al enrofloxacinii.

Revendicări: 1
Figuri: 1



METODA ANALITICA (HPLC) DE IDENTIFICARE, DOZARE: A
ENROFLOXACINEI SI A IMPURITATILOR INRUDITE CHIMIC DIN
PRODUSELE FARMACEUTICE **ENRODEM 10 %** - SOLUTIE ORALA,
ENRODEM 50 - PULBERE HIDROSOLUBILA SI
ENROFLOXACINA/ENROFLOXACINA HCL – INGREDIENT FARMACEUTIC
ACTIV

Inventia se refera la o metoda analitica (HPLC) de identificare, dozare a **ENROFLOXACINEI** si a impuritatilor inrudite chimic, din produsele farmaceutice **ENRODEM 10 %** - solutie orala, **ENRODEM 50** - pulbere hidrosolubila si **Enrofloxacină / Enrofloxacină HCL** – ingredient farmaceutic activ.

Atat metodele analitice HPLC prezentate in diverse articole stiintifice, cat si cele date de producatorii de materii prime de Enrofloxacină si/sau Enrofloxacină clorhidrat, folosesc drept componenta apoasa a fazei mobile, diverse saruri, ex: Acetat de amoniu, etc, dar si alte substanta ca: Solutie amoniac 25%, NaOH, H₃PO₄, acid trifluoracetic, trietil amina, dietil eter, etc.

O metoda analitica HPLC, cu detectie UV, prezentata de Centrul national de Studii Veterinare si Alimentare, Franta consta in:

Folosirea unei faze mobile care contine H₃PO₄, trietil amina si acetonitril, nu este precizat raportul solventilor in faza mobile si nici concentratia, respectiv pH-ul componentei apoase a fazei mobile. Nu este precizat tipul de elutie.

Multe din metodele de identificare si dozare ale Enrofloxacinei si a impuritatilor inrudite chimic ale acesteia folosesc metode MS-LC sau HPLC cu detector de fluorescenta.

Literatura de specialitate prezinta multe metode de analiza HPLC pentru determinarea enrofloxacinei din tesuturi animale, dar aceasta este o alternativa rapida de dozare a enrofloxacinei/enrofloxacinei clorhidrat, API, si de determinare a impuritatilor inrudite chimic, cunoscute si necunoscute, ale acesteia, folosind un detector UV (VWD sau DAD).

Folosirea sarurilor in faza mobila, in afara de faptul ca mareste costurile per analiza, creaza probleme tehnice echipamentului prin precipitarea in pompa,

coloana, sau capilarele cromatografului, a sarurilor. Celelalte metode prezentate necesita un timp de analiza mai mare, sau au un alt tip de detectie.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este folosirea unei metode analitice HPLC de identificarea si dozarea substantei active de Enrofloxacina si a impuritatilor inrudite chimic ale acestuia, utilizand drept faza mobila acetoneitril : H_3PO_4 25 mM si tetrahidofuran. Metoda permite reducerea timpului necesar unei analize complete. Nu se folosesc saruri in compozitia componentei apoase, eliminand riscul de precipitare a sarurilor in coloana cromatografica si capilarele echipamentului.

Metoda HPLC propusa este originala, foarte utila tuturor acelor care trebuie sa controleze calitatea unor produse farmaceutice care au drept ingredient activ **Enrofloxacina/Enrofloxacina clorhidrat**, neexistand la acest moment monografie compendiala (European Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia), cu prezentarea vreunei metode de analiza pentru acest ingredient farmaceutic activ. Este o alternativa de analiza pentru aceia care au doar un cromatograf de lichide echipat cu un detector UV si nu au LC-MS sau HPLC cu detector de fluorescenta, etc.

Alaturi de identificarea substantei active si dozarea acesteia in produsele farmaceutice care contin acest ingredient farmaceutic activ si urmatorii excipienti: Lactoza monohidrat, hidroxipropil metil celuloza (HPMC), hidroxid de sodiu, alcool benzilic, metoda permite identificarea impuritatii inrudite chimic cunoscute – Ciprofloxacina, a impuritatilor inrudite chimic necunoscute si a impuritatilor totale. 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 pot avea efecte secundare nedorite.

In cazul enrofloxacinei, limitele impuse pentru impuritatile inrudite chimic sunt date in continuare. Impuritatea inrudita chimic cunoscuta (ciprofloxacina): maxim: 0,3%, impuritate inrudita chimic, necunoscuta, individual: maxim 0,5%; impuritatea cu timp de retentie relativ de 2,05: maxim: 0,2%; Total impuritati inrudite chimic, maxim 1,0%;

Metoda conform inventiei inlatura urmatoarele dezavantaje, prin aceea ca:

Parametrii operationali ai metodei cromatografice: Coloana cromatografica:

Octadecylsilyl silica gel for chromatography R, 150 mm L x 4,6 mm i.d. x 5 µm

d.p., Temperatura coloanei cromatografice: 40 °C, Volumul de injectie: 25 µL,

Elutie: gradient liniar, Compozitia fazei mobile: Solvent A: H₃PO₄ 25 mM, Solvent

B: Acetonitrile R, Solvent C: Tetrahidrofuran, Gradientul este urmatorul: 0 min

H₃PO₄ : Tetrahidrofuran : Acetonitril 85 : 0 : 15, la 8 min. H₃PO₄ : Tetrahidrofuran :

Acetonitril 87.7 : 2.8 : 9.5, 12 min. H₃PO₄ : Tetrahidrofuran : Acetonitril 85 : 0 : 15,

Debitul fazei mobile: 2,0 mL/min, Detectie: UV, Lungimea de unda analitica: 279

nm, Testarea sistemului cromatografic consta in injectarea *Solutiei de referinta*

(a), care contine enrofloxacină si ciprofloxacina cu urmatoarele concentratii de 3

ppm enrofloxacină si 3 ppm ciprofloxacina. Concentratia solutiei test este de 1000

ppm. Numarul de talere teoretice pentru picul de Enrofloxacină trebuie sa fie de

minim 2000. Rezolutia intre picurile de ciprofloxacina si enrofloxacină trebuie sa

fie de minim 1,5. Timpul de inregistrare al unei cromatograme este de doua ori

timpul de retentie al Enrofloxacină, adica este de aproximativ 10 minute.

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 sau DAD) G 1314B, serie 1200, sau altul

similar; Autosampler G 1329A; Termostat pentru autosampler G1330B, serie

1200; Poate fi folosit orice echipament similar.

Metoda conform inventiei prezinta urmatoarele avantaje:

- Simultan se poate doza si identifica substanta activa si impuritatea inrudita chimic cunoscuta, ciprofloxacina, se pot doza impuritatile inrudite chimic necunoscute, individual si se poate determina total impuritati inrudite chimic.

- Folosind faza mobila prezentata mai sus se reduce timpul necesar unei analize.

- Nefolosirea sarurilor in compozitia fazei mobile inlatura riscurile de precipitare a acestora in coloana cromatografica sau echipament deci inlatura aparitia unor probleme tehnice.

Exemplu de realizarea a metodei conform inventiei:

Substante de referinta folosite:

- Enrofloxacină WS;

-Ciprofloxacină WS;

Reactivi, Solventi, Solutii:

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

Acid orto-fosforic, lot K39237173 844, Merck;

Tetrahidrofuran, lot I 446501 833, Merck;

Solvent probe – Acid clorhidric 0,1M;

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

Solutia stoc (2000 ppm) – Intr-un balon cotat de clasa de precizie A, de 100 ml se aduc 2 ml de *ENRODEM 10% - solutie orala*, se completeaza la semn cu Solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

Solutia stoc ciprofloxacin (300 ppm)– Intr-un balon cotat de clasa de precizie A, de 20 ml, se aduc 6 mg de *Ciprofloxacin WS*, se dizolva si se completeaza la semn cu Solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

Solutie test (1000 ppm) – 5 ml din *Solutia stoc* se aduc intr-un balon cotat 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), (3 ppm enrofloxacină, 3 ppm ciprofloxacină) - 1 ml de *Solutia stoc ciprofloxacin* si 0,3 ml de *Solutia de referinta (b)*, se aduc intr-un balon cotat 100 ml, clasa de precizie A. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

Solutia de referinta (b), (1000 ppm), 10 mg de Enrofloxacină WS se aduc intr-un balon cotat de 10 ml de clasa de precizie A, se completeaza la semn cu solvent de probe. Se ultrasoneaza 1 minut pentru omogenizare.

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

Identificarea substantei active:

- Solutia de referinta (b)- Enrofloxacină WS – 1000 ppm
- Solutia proba - Enrofloxacină – 1000 ppm

Identificarea ciprofloxacinei:

- Solutia de referinta (a) Ciprofloxacina WS – 3 ppm
- Solutia proba - Enrofloxacină - 1000 ppm

Dozarea substantei active:

- Solutia de referinta (b) - Enrofloxacină – 1000 ppm
- Solutia proba – Enrofloxacină - 1000 ppm

Dozare Ciprofloxacina:

- Solutia de referinta (a) – Ciprofloxacina WS – 3 ppm
- Solutia proba - Enrofloxacină - 1000 ppm

Impuritati inrudite chimic:

- Solutia de referinta (a) – Enrofloxacină 3 ppm, Ciprofloxacina 3 ppm
- Solutia proba - Enrofloxacină - 1000 ppm

5) 

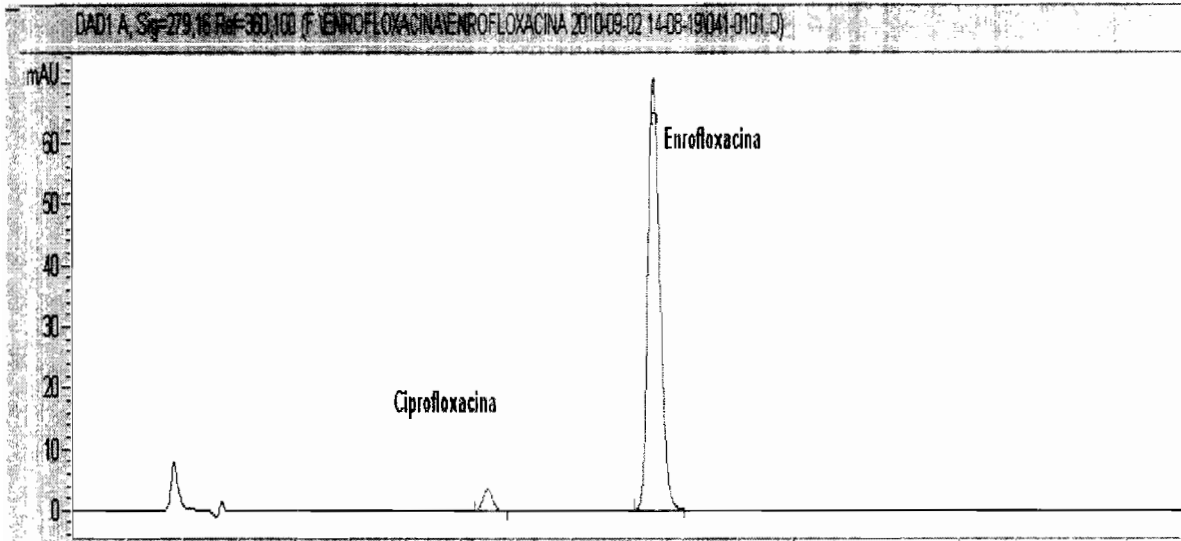
METODA ANALITICA (HPLC) DE IDENTIFICARE, DOZARE A
ENROFLOXACINEI SI A IMPURITATILOR INRUDITE CHIMIC DIN
PRODUSELE FARMACEUTICE **ENRODEM 10 %** - SOLUTIE ORALA,
ENRODEM 50 - PULBERE HIDROSOLUBILA SI
ENROFLOXACINA/ENROFLOXACINA HCL – INGREDIENT FARMACEUTIC
ACTIV

Revendicare

Metoda analitica (HPLC) de identificare, dozare a **ENROFLOXACINEI** si a impuritatilor inrudite chimic, din produsele farmaceutice **ENRODEM 10 %** - solutie orala, **ENRODEM 50** - pulbere hidrosolubila si **Enrofloxacină / Enrofloxacină HCL** – ingredient farmaceutic activ, **caracterizata prin aceea ca:** Parametrii operationali ai metodei cromatografice: Coloana cromatografica: Octadecylsilyl silica gel for chromatography R, 150 mm L x 4,6 mm i.d. x 5 µm d.p., Temperatura coloanei cromatografice: 40 °C, Volumul de injectie: 25 µL, Elutie: gradient liniar, Compozitia fazei mobile: Solvent A: H₃PO₄ 25 mM, Solvent B: Acetonitrile R, Solvent C: Tetrahidrofuran, Gradientul este urmatorul: 0 min H₃PO₄ : Tetrahidrofuran : Acetonitril 85 : 0 : 15, la 8 min. H₃PO₄ : Tetrahidrofuran : Acetonitril 87.7 : 2.8 : 9.5, 12 min. H₃PO₄ : Tetrahidrofuran : Acetonitril 85 : 0 : 15, Debitul fazei mobile: 2,0 mL/min, Detectie: UV, Lungimea de unda analitica: 279 nm, Testarea sistemului cromatografic consta in injectarea *Solutiei de referinta (a)*, care contine enrofloxacină si ciprofloxacina cu urmatoarele concentratii de 3 ppm enrofloxacină si 3 ppm ciprofloxacina. Concentratia solutiei test este de 1000 ppm. Numarul de talere teoretice pentru picul de Enrofloxacină trebuie sa fie de minim 2000. Rezolutia intre picurile de ciprofloxacina si enrofloxacină trebuie sa fie de minim 1,5. Timpul de inregistrare al unei cromatograme este de doua ori timpul de retentie al Enrofloxacinei, adica este de aproximativ 10 minute.



Fig. 1: Cromatograma obtinuta in urma injectarii unei solutii care contine Ciprofloxacina 0,3 ppm si Enrofloxacina 100 ppm.



Julia
6