

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Дослідження чистоти діючої речовини оксаліплатину
(субстанція) методом ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1А
напряму підготовки (спеціальності)
226 «Фармація, промислова фармація»
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»
«Фармація»
(назва освітньої програми)

Денісова Вероніка Валеріївна
(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: доцент, к.фарм.н. Козіко Н.О.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ АЛКІЛЮЮЧИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови алкілюючих протипухлинних засобів.....	9
1.2. Біологічна активність алкілюючих протипухлинних засобів.....	13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ОКСАЛПЛАТИНУ.....	16
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості окспліплатину.....	16
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

°C – градуси Цельсія

DACH – діаміноциклогексан

5-FU/LV – 5-фторурацил/лейковорин

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

IFL – іронотекан плюс 5-FU/LV

MCRC – метастатичний колоректальний рак

OXPt – Оксаліплатин

ВСТУП

Актуальність теми. Оксалиплатин (Eloxatin, Sanofi-Synthelabo) – це перший протипухлинний лікарський засіб, розроблений на основі Платини. Він був схваленим для лікування колоректального раку, який є основною причиною смертності від раку в світі. Оксалиплатин має номенклатурну систематичну назву за ІЮПАК – (транс-*R,R*-циклогексан-1,2-діамін)оксалатоплатина. Оксалиплатин продемонстрував ефективність у багатьох лініях ракових клітин і пухлинах, включаючи деякі, які в основному резистентні до цисплатину та карбоплатину [1-4]. Оксалиплатин отримав схвалення для лікування метастатичного колоректального раку (MCRC) з 1998 року. Елоксатин використовується у поєднанні з 5-фторурацилом/лейковорином (5-FU/LV). Ця схема лікування відома під назвою FOLFOX. Вона показала перевагу перед стандартним лікуванням IFL (іронотекан плюс 5-FU/LV) [5]. Оксалиплатин є більш ефективним, краще переноситься з чітким подовженням середнього часу виживання пацієнтів. Найпоширенішою токсичністю є нейротоксичність.

На сьогоднішній день досліджується лікувальний ефект Оксалиплатину при раку підшлункової залози та шлунка [6], недрібноклітинного раку легенів і раку молочної залози [7-10]. Оксалиплатин є не лише стандартним варіантом лікування онкологічних захворювань, але використовується для ад'ювантної терапії при повній резекції первинного раку товстої кишки III стадії [8-11].

Однак, залишається питання щодо ефективності Оксалиплатину: чому він ефективний у резистентних до цисплатину та карбоплатину клітинних лініях і пухлинах, чи є можливості покращити протипухлинні властивості оксалиплатину. Дві основні відмінності між цисплатином і карбоплатином та оксалиплатином є очевидними. Оксалиплатин є значно більш ліпофільним, ніж два комплекси діамінплатини (II). Аддукти, які утворені з первинною цільовою ДНК, по-різному обробляються клітинним механізмом.

Ліпофільність оксаліплатину є результатом ліганду циклогексан-1,2-діамін (1,2-діаміноциклогексан) порівняно з цис- і карбоплатином. Це виражається великим об'ємом розподілу, повільнішим виведенням через нирки. Ліпофільні властивості оксаліплатину можуть сприяти відмінностям у загальній токсичності, зміні поглинання клітинами. Діаміновий ліганд та його стереохімічні властивості відіграють важливу роль у цитотоксичному профілі оксаліплатину. Комплекси платини з аміногрупами в транс-положенні мають кращу цитотоксичну та протипухлинну активність, ніж цис-(R,S)-ізомер. Транс-(R,R)-ізомер є потужним протипухлинним препаратом, ніж транс-S,S-конгенер.

Аддукти, утворені з ДНК кінцевої мішені, розпізнаються інакше, ніж адукти цисплатину та карбоплатину [11-13]. Це можна пояснити тим, що утворюється певний тип водневого зв'язку з ДНК та оксаліплатину. Завдяки метиленовим ланкам циклогексанового кільця на ДНК утворюється неполярна ділянка. Ці властивості сприяють різному розпізнаванню, репарації аддуктів, які утворюються між оксаліплатином і ДНК. Ліганд DACH має помітний вплив на фармакологічний профіль та ефективність оксаліплатину в основному цис- та карбоплатинрезистентних пухлинах. Дериватизація за фрагментом транс-R,R-циклогексан-1,2-діаміну призводить до покращення протипухлинні властивості. Перші результати з аналогами 4-метил і 4-етил-транс-циклогексан-1,2-діаміноксалатолатину(II) показали ефективність. Були синтезовані похідні 4-пропіл-, 4-трет-бутил- та 4-фенілу для дослідження взаємозв'язку структура-активність. Найкраща цитотоксичність була досягнута з замісниками метил- та етил-. Однак, є недолік у синтетичних процедурах. Аналоги оксаліплатину були синтезовані як суміші транс-R,R/S,S (1:1) (замісники у положенні 4) в аксіальному або екваторіальному положенні. Чисті рацемічні суміші готуються з великими проблемами. Вони є основою для розділення енантіомерів. Зв'язки структура-активність, отримані з діастереомерних сумішей, не дають чіткої інформації, на відміну від тих, що

отримані з чистими рацематами. Природа замісників, стереохімія в С(4) циклогексанового кільця значною мірою сприяють цитотоксичності. Тому, важливими є два шляхи отримання селективних рацематів (не сумішей) з чотирма ізомерами: 1) синтетичний шлях субстанцій з екваторіальними замісниками у положенні 4 циклогексанового кільця, 2) конструкція циклогексану-1 – похідні 2-діаміну із замісниками з фіксованою конфігурацією [14-20].

Таким чином, Оксаліплатин відноситься до токсичних лікарських речовин. Контроль якості цього препарату повинен проводитися високотехнологічними інструментальними методами, оскільки висока якість цього лікарського засобу є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Оксаліплатин є поліфункціональною органічною сполукою. Молекула містить фармакофорні угруповання, функціональні групи – аміно групу, гетероцикл, кето групу, циклогексановий фрагмент. Субстанцію Оксаліплатину досліджують хімічними методами та інструментальними методами. Можна передбачити формування у субстанції внутрішньомолекулярних зв'язків за рахунок вільних функціональних груп, особливо – кето та аміно групи, реакцій деградації молекули, елімінування. Можливе утворення побічних продуктів, які знаходяться у реакційній суміші під час синтезу субстанції. Можливе утворення супровідних речовин та неприпустимих домішок, які будуть впливати на якість субстанції. Важливим завданням фармацевтичного аналізу Оксаліплатину є введення у фармацевтичну практику сучасних інструментальних методів, розширення кола методів, які рекомендовано Фармакопеями, для підвищення якості аналізу.

Актуальним завданням є розробка хроматографічних умов при дослідженні субстанції Оксаліплатину методом ВЕРХ, методик пробопідготовки зразків при виконанні досліджень методом ВЕРХ, які дозволять зробити коректні висновки щодо якості досліджуваного зразку.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування методом ВЕРХ та методик дослідження зразку субстанції Оксаліплатину, які дозволять зробити висновок щодо її якості.

Завдання експериментального дослідження:

- розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою визначення її чистоти;
- розробити методики хроматографування методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину;
- провести хроматографічні дослідження зразків субстанції Оксаліплатину у порівнянні зі стандартними зразками та інтерпретувати результати досліджень.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у розробці умов та методик досліджень методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою підтвердження її якості.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-23», Запоріжжя, 23-24 листопада 2023 року.

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 26.

SUMMARY

Denisova Veronika
INVESTIGATION OF THE PURITY OF THE ACTIVE INGREDIENT
OXALIPLATIN (SUBSTANCE) BY HPLC

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharm.sciences Welchinska Olena.

Keywords: Oxaliplatin, antitumour activity, HPLC, admixture.

Introduction. Oxaliplatin (Eloxatin, Sanofi-Synthelabo) is the first anticancer drug developed on the basis of Platinum. It has been approved for the treatment of colorectal cancer, which is the leading cause of cancer death in the world. Oxaliplatin has a nomenclature systematic name for IUPAC - (trans-R, R-cyclohexane-1,2-diamine) oxalatoplatinum. Oxaliplatin has demonstrated efficacy in many cancer cell lines and components, including some that are largely resistant to cisplatin and carboplatin. Oxaliplatin belongs to toxic medicinal substances. The quality control of this drug should be carried out by high-tech instrumental methods, since the high quality of this medicinal product is important for protecting the health and life of patients. Oxaliplatin is a multifunctional organic compound. Molecules contain pharmacophore groups, functional groups - amino group, hetero cycle, keto group, cyclohexane fragment. Oxaliplatin substance is investigated by chemical methods and instrumental methods.

Materials and methods. Research object are Oxaliplatin substance, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of Oxaliplatin. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. The conditions of chromatographic research and methods of preparation of samples using the HPLC method of Oxaliplatin substance were developed in order to determine its purity, namely, modifications were proposed: working solutions of OXPt (100.0 µg/ml) were prepared by dissolving 10.0 mg of the substance in 100 ml of water cleaned; mobile phase: acetonitrile - formic acid (0.01 M) (10 : 90; V/V); the flow rate is 1.5 ml/min, as a result of which the chromatograms of the standard and test samples were compared. Using the HPLC method, unacceptable impurities were found in the sample: Impurity 1 (Rt 1.018 min); Impurity 2 (Rt 1.235 min), Impurity 3 (Rt 11.234 min).

Conclusions. It was found that under the proposed conditions of chromatography using the HPLC method, the Oxaliplatin peaks of the standard (according to Eur.Ph.) and the sample have a shift: The Rt value of the Oxaliplatin sample is in the range of 1.989-2.006 min compared to the Rt values of the Oxaliplatin standard - in the range of 4.143-5.101 min, which can be explained by the influence of impermeable impurities in the substance under study.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

Вельчинська Олена, *Денісова Вероніка*, Шевченко Мирослава.
Розробка методик визначення оптичної густини металовмісних похідних саліцилової кислоти. Тези доповіді. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-23», Запоріжжя, 23-24 листопада 2023, стор. 22.



FIP Symposium, Digital Event
«Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-oriented model of practice»,
12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.

