

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 «Особливості хроматографічних досліджень ступеню чистоти субстанції натрію метамізолу»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи Б 2А
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)

Кузко Алла Вікторівна

(прізвище та ініціали)

Керівник д.х.н., асистент Левін М.Г.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: к.фарм.н., доцент Глущенко О.М.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	7
РОЗДІЛ 1. ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ ЯК СУЧАСНИЙ МЕТОД КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН.....	7
1.1. Характеристика методу ВЕРХ.....	7
1.2. Приклади використання методу ВЕРХ в фармацевтичному аналізі.....	14
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ НАТРІЮ МЕТАМІЗОЛУ.....	21
2.1. Хроматографічні та спектральні методи дослідження натрію Метамізолу субстанції	21
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	27
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АО – антиоксидант

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформаїд

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ФАР – фізіологічно активні речовини

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

Hal – галоген

Heterocycl– гетероциклічний фрагмент

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

Ph – феніл

i-Pr – ізопропіл

Pr – пропіл

Pu – піридин

ВСТУП

Актуальність теми. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є сучасним інструментальним методом, який відіграє в сучасному фармацевтичному аналізі провідну роль. Перевагами методу ВЕРХ є висока селективність, низькі межі виявлення компонентів та відтворюваність результатів аналізу. Актуальним залишається імплементація методу ВЕРХ у контроль якості лікарських речовин, біологічно активних речовин, лікарських форм готових лікарських засобів. Метамізол натрію моногідрат (Анальгін або [(1,5-диметил-3-оксо-2-феніл-2,3-дигідро-1H-піразол-4-іл)-N-метиламіно] метансульфонат натрію) – відомий лікарський засіб з аналгетичною, жарознижувальною та протизапальною дією, однак може призводити за певних умов до небажаних ефектів, таких, як набряк Квінке, анафілактичний шок, синдром Стівенса-Джонсона [1-4]. Контроль якості субстанції метамізолу натрію повинен проводитися ретельно, щоб вчасно виявити неприпустимі супровідні домішки, які будуть небезпечними для здоров'я та життя пацієнта.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є пошук нових хроматографічних умов та розробка методики дослідження методом ВЕРХ хімічного складу метамізолу натрію субстанції на присутність неприпустимих супровідних домішок та інтерпретація результатів інструментальних досліджень з метою подальшого поглибленого вивчення можливості імплементації методу ВЕРХ як найбільш перспективного у фармацевтичний аналіз лікарських засобів.

Проаналізувавши результати хроматографічних досліджень (РХ) метамізолу натрію субстанції щодо ступеню чистоти та присутності специфікованих і неспецифікованих домішок, планується виконати наступні завдання дослідження:

- підібрати умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції на присутність специфікованих та

- неспецифікованих домішок;
- розробити методику хроматографічного дослідження методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції на присутність специфікованих та неспецифікованих домішок;
 - провести хроматографічне дослідження методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції за розробленою методикою та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області, РХ, ВЕРХ (хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором), комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає в імплементації методу ВЕРХ для хроматографічного дослідження метамізолу натрію субстанції на присутність неприпустимих супровідних домішок та інтерпретація результатів інструментальних досліджень з метою подальшого поглибленого вивчення можливостей методу ВЕРХ як найбільш перспективного у фармацевтичний аналіз лікарських засобів.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на Міжнародній науково-практичній конференції «Освіта і наука в період глобальних криз та конфліктів у ХХІ столітті», НАН ВО України, м. Київ, 08-09 грудня 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 – 22.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ ЯК СУЧАСНИЙ МЕТОД КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

1.1. Характеристика методу ВЕРХ

ВЕРХ – це метод розділення компонентів досліджуваної суміші, в якому рідина є рухомою фазою, а тонкодисперсна тверда речовина або рідина на тонкодисперсному твердому носії є нерухомою фазою.

Фармакопейні інструментальні методи аналізу лікарських речовин передбачають використання тонкошарової та рідинної хроматографії, в той час, як метод ВЕРХ недостатньо імplementовано у фармацевтичний аналіз.

Метод рідинної хроматографії базується на механізмах сорбції, розподілу, іонного обміну або розділення за розмірами молекул. Розділення відбувається у колонці рідинного хроматографа, у яку рідина подається під високим тиском.

У методі ВЕРХ використовують скляні або сталеві прямі колонки довжиною 10, 15, 25 см ($d=4-5,5$ мм) або мікроколони 5-6 см ($d=1-2$ мм). На поверхню сорбенту як твердого носія наносять тонку плівку рідкої нерухомої фази. Твердий носій – силікагель з привитими функціональними групами, алюмогель, полімерні сорбенти. Розмір частинок твердого носія становить 5-10 мкм.

Рідка нерухома фаза, яка наноситься на поверхню твердого носія, становить 0,75-1,5 % від маси твердого носія. Для розділення полярних речовин підходять мало полярні рухомі фази або полярні нерухомі фази. Рідкі нерухомі фази – це різні хімічні речовини: гліколи, нітрили, силікони.

Якщо під час аналізу БАР використовувати метод ВЕРХ, то стаціонарну фазу представляють колонки, наповнені дрібними пористими

частинками. Рухома – рідка фаза за допомогою насоса перекачуються вздовж колонок. Удосконалення методу ВЕРХ полягає частіше у технологічних удосконаленнях колонок із новими наповнювачами- абсорбентами. Для цього використовують абсолютно нові, високотехнологічно розроблені матеріали із покращеними адсорбційними властивостями, і з здатністю не призводити до руйнування активних та допоміжних компонентів у складі моно- і багатокомпонентних лікарських засобів, оскільки важливим у цьому методі аналізу не тільки виявити, а й ідентифікувати всі присутні речовини досліджуваної суміші. Крім того, удосконаленням методу є створення нових стаціонарних фаз для покриття частинок. Наступним напрямком удосконалення методу ВЕРХ є удосконалення упаковки колонки.

Колонки наповнюють спеціальними наповнювачами – полярними та неорганічними речовинами. Як стаціонарна фаза використовується рухлива неполярна фаза.

Є два варіанти виконання дослідження методом ВЕРХ – нормально-фазовий і обернено-фазовий. Нормально-фазовий варіант: полярність нерухомої фази вища за полярність рухомої фази. Обернено-фазовий варіант: полярність нерухомої фази є нижчою від полярності рухомої фази.

Для очищення сирих зразків, поділу високо полярних зразків, поділу аналітичного ТШХ використовують нормальну фазову хроматографію. Цей метод має недоліки – при використанні води як сильного розчинника для цього виду хроматографії у рухомій фазі можуть залишатися слідові кількості води, які суттєво будуть впливати на утримання зразка. Якщо після цього змінити рухому фазу, то колонки будуть дуже повільно вирівнюватися. Ці фактори є негативними для якості і швидкості хроматографічних процедур, які виконуються.

Використовують для аналізу зворотно-фазову хроматографію. У якості стаціонарної фази необхідно брати речовини з гідрофобним характером. Рухлива фаза повинна мати полярний характер. В цьому полягає реверс

нормально-фазової хроматографії. При використанні комплексно зворотно-фазової хроматографії та ВЕРХ методу відбувається розвиток гідрофобних сил, які виникають при порушенні дипольної будови розчинників, при чому виділяється енергія. На поділі аналіту між фазами стаціонарною та рухомою базується розподіл досліджуваних речовин.

Молекули речовин, які розчинено, знаходяться між гідрофобною стаціонарною фазою та полярною рухомою фазою у рівновазі. Цікаво, що молекула більш гідрофобна має тривалий час утримання, а іонізовані сполуки органічного походження, неорганічні іони та молекули з полярними металами мало або не затримують час.

Механізм іонообміну заключається у наступному: електростатичні взаємодії між гідратованими іонами зразку та протилежно зарядженими функціональними групами (стаціонарна фаза). Використовують два типи механізмів для розділення:

- перший механізм – елюція використовує рухливу фазу (містить конкуруючі іони, які можуть замінити іони аналітів, можуть їх відштовхувати від колонки;
- другий механізм – додавання комплексоутворювача (комплекс утворюючого агенту) в рухомій фазі та зміна початкової форми видів зразків.

Така модифікація молекул призводить до елюції. Стаціонарні фази (іонообмінні) здатні здійснювати обмін іонів, утримувати специфічні нейтральні молекули. Процес утримання заснований на комплексоутворенні. Специфічні іони, до яких можна віднести перехідні метали, утримуються на катионообмінній смолі та можуть приймати від донорських лігандів однопарні електрони. Нейтральні молекули ліганду здатні утримуватися на смолах, які оброблено іонами перехідних металів.

Неорганічні аніони та катіони металів розділяються іонними взаємодіями з іонообмінною смолою. Іонний обмін можна використовувати

при кількісних визначеннях при низьких концентраціях розчинених речовин. Його можна використовувати при аналізі зразків, розчинених у воді, при аналізі неорганічних аніонів (від 10 мкг/л до 10 мг/л).

Сектор виробництва та аналізу харчових продуктів і напоїв активно використовує метод іонного обміну для визначення галогенів, Сульфуру, Нітрогену, Фосфору та фосфоровмісних речовин. Цей метод використовують, також, для визначення розчинених іонів неорганічних та органічних у природних водних джерелах, у очищеній воді.

Хроматографічний метод виключення розміру дозволяє розділяти розчинені молекули на підставі гідродинамічного обсягу або їх розміру. Колонка використовується для розділення макромолекул та малих молекул, в залежності від їх молекулярної маси. Аналіт вводиться у колонку, після чого малі молекули з меншим розміром пор потрапляють у пористі частинки стаціонарної фази, а потім продвигаються по каналах стаціонарної фази. Малі молекули – це менші компоненти, які мають довший шлях переміщення та довший шлях їх вилучення з колони. Макромолекули мають, навпаки коротший шлях переміщення та коротший шлях їх вилучення з колони. Молекулярний об'єм пов'язаний з молекулярною масою. Тому, обсяг утримання буде залежати від молекулярної маси полімерів.

Детектори, частіше за все, використовують у методі РХ. Для цього методу використовують УФ-видимі детектори поглинання, детектори показника заломлення, детектори флуоресценції, як детектор – мас-спектрометрію.

РХ-детектор повинен мати характеристики: 10^{-12} - 10^{-11} г/мл, лінійний динамічний діапазон 5-ти - 6-ти порядків. Основні характеристики детекторів: динамічний діапазон, чутливість детектора, індекс відгуку. лінійність, лінійний динамічний діапазон, реакція детектора.

Найбільш зручними та економічними є УФ-детектори, детектори RI. Вони характеризуються значною селективністю, зручними межами

виявлення. RI детектор – це перший детектор, який став доступним для комерційного використання.

RI детектор є особливо корисним у ВЕРХ методі при розділенні фаз. Розділення відбувається відповідно до розміру молекул. Вимірювання є прямо пропорційним концентрації полімеру та не залежить від молекулярної маси. Чутливість RI – 10^{-6} г/мл. Лінійний динамічний діапазон – від 10^{-6} до 10^{-4} г/мл. Індекс відгуку – від 0,97 до 1,03.

УФ-детектування можливе лише тоді, коли речовини, які опромінують УФ-світлом, можуть реагувати та поглинати ультрафіолетове світло при довжині хвилі вихідного світла.

Більшість сполук поглинають світло в УФ-діапазоні 180-350 нм. До них відносяться речовини з подвійними зв'язками (одна та більше), речовини з нерозділеними електронами. Зв'язок між інтенсивністю ультрафіолетового світла та концентрацією розчиненої речовини підлягає закону Пива.

Rt або час утримання визначається як час (з моменту ін'єкції зразка) до часу елюції з'єднання. Його визначають за вершиною піку – сигналу конкретної речовини або компоненту досліджуваної суміші. Фактори, які визначають час утримання – це структура молекули, швидкість потоку рухомої фази, розмір колонки. Існує поняття «мертвий час», t_0 який визначається як час для незбережених видів молекул, для того, щоб вилучити їх з колонки.

Для безперервного контролю складу елюату використовують диференційні рефрактометри, фотометричні, УФ-спектрофотометричні, люмінесцентні і кондуктометричні детектори.

Диференційний рефрактометр – це універсальний детектор, який дозволяє визначити показник заломлення системи «проба-елюент»: сигнал дають усі компоненти. Показник заломлення відрізняється від показника заломлення елюенту.

УФ-детектор – працює при одній і тій же довжині хвилі, що відповідає найбільш інтенсивній лінії ртутної лампи низького тиску $\lambda = 253,7$ нм. Флуоресцентна приставка дозволяє випромінювання з $\lambda = 280$ нм. УФ-детектор є найбільш чутливим при високих молярних коефіцієнтах світлопоглинання, а елюент не поглинає в УФ-області спектру. Можна використовувати метод градієнтного елюювання (при $\lambda = 254$ нм можна визначають ароматичні сполуки, кетонів та альдегідів ($\epsilon = 20-104$). УФ-детектор є селективним, дозволяє визначати 10^{-9} г при діапазоні лінійності у 5 порядків.

Метод ВЕРХ є високотехнологічним та перспективним порівняно із іншими хроматографічними методами, тому активізація його використання у фармацевтичному аналізі залишається актуальним завданням контролю якості лікарських засобів.

Мас-спектрометрію вважають методом із значною кількістю переваг, порівняно із іншими методами. Мас-спектри отримують за часом досить швидко, аналізується невелика кількість (в мкг) зразку. Дані на спектрах, які записуються є дуже інформативними для розшифрування молекулярної структури.

Метод мас-спектрометрії характеризується високою специфічністю та чутливістю, якщо порівнювати із іншими методами детектування. Часто використовують комбінацію методів ВЕРХ-МС (HPLC-MS).

Такий підхід дозволяє специфічне виявлення та потенційну ідентифікацію хімічних речовин, якщо вони знаходяться у суміші багатокомпонентній. Для використання комбінації цих двох методів необхідно видалити всі розчинники. Після цього виконується аналіз. Використовуються наступні процедури: електророзпилення, іонізація та іонізація термоспрею, фотоіонізація атмосферного тиску.

Детектування при методі розділення ВЕРХ використовують у залежності від особливостей хімічної природи хімічних речовин, які досліджуються, від їх фізико-хімічних параметрів (рис. 1.1.1).

На малюнку показана блок-схема попереднього відбору для методу поділу відповідно до властивостей аналіту.

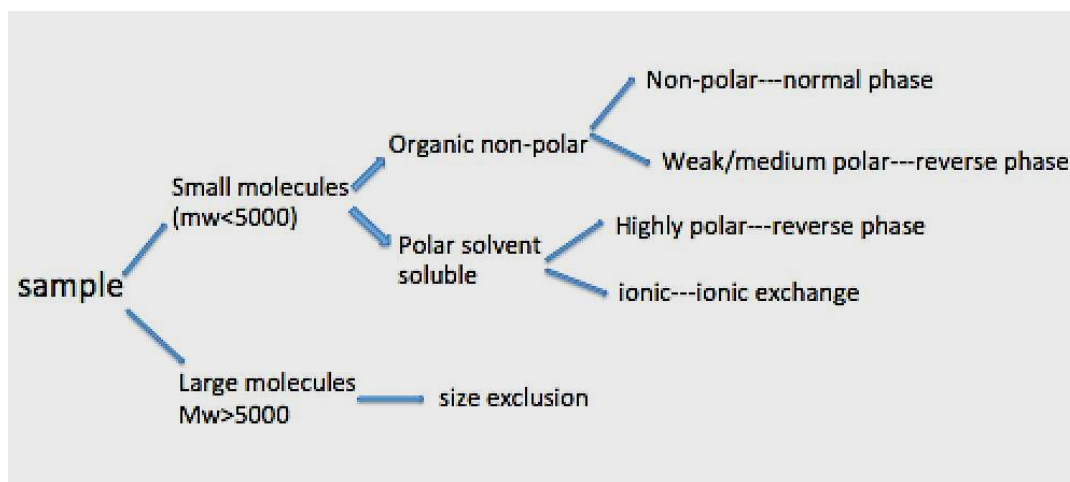


Рисунок 1.1.1. Схема відбору аналіту для методу ВЕРХ.

Можна побачити, що визначають які молекули містить речовина. Яка буде досліджуватися: малі молекули (мм менше 5000) або макромолекули (мм більше 5000), підбір розчинників – органічні неполярні або полярні розчинники. Органічні неполярні розчинники: неполярні розчинники для нормальної фази або підлучені полярні розчинники – для реверсної фази. Полярні розчинники: високо-полярні розчинники – для реверсної фази або іоно-іоно змінені розчинники.

Тільки правильно підібрана комбінація розчинників різної полярності та з різним значенням рН є залогом успіху виконання коректно виконаного аналізу.

Після огляду релевантної літератури щодо використання інструментальних методів під час фармацевтичного або хіміко-токсикологічного аналізу біологічно активних речовин можна зробити

висновок, що найбільш популярними методами аналізу є рідинна (РХ) та газова хроматографія (ГХ), спектральні методи [5-11].

1.2. Приклади використання методу ВЕРХ в фармацевтичному аналізі

Згідно до вимог Державної Фармакопеї України [12], Британської Фармакопеї, Європейської Фармакопеї більшість субстанцій та лікарських засобів аналізується методом РХ. Однак, зрозуміло, що у практику фармацевтичного аналізу необхідно вводити найбільш ефективний і перспективний метод ВЕРХ.

Наведемо декілька прикладів практичної імплементації методу ВЕРХ у практику фармацевтичного аналізу. Аміноглікозиди, зазвичай, ідентифікують методом РХ. Однак, за допомогою методу ВЕРХ удалося провести більш ретельний і тонкий аналіз супровідних домішок у складі субстанції амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-аміногідроксибутаноїл]-дезоксид-D-стрептаміну, яку аналізують методом РХ [13].

Згідно до фармакопейних вимог, специфікованими домішками субстанції є наступні речовини:

O-(3-амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-L-стрептамін (*A*),

O-(3-амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-біс-[(аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-L-стрептамін (*B*),

(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-[[*(2S)*-аміногідроксибутаноїл]амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил]-аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-D-стрептамін (*F*),

(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-[*(2S)*-аміногідроксибутаноїл]-
(діамінодідезоксид- α -D-глюкопіранозил)-дезоксид-D-стрептамін (*H*),

(2*S*)-аміногідроксибутанова кислота (*I*).

C, *D*, *E*, *G* - це неспецифіковані домішки. До них відносять: (амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-[[[(2*S*)-аміногідроксибутаноїл]-аміно]-дезоксид- α -*D*-глюкопіранозил]-2-дезоксид-*D*-стрептамін (*C*), (амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-дезоксид-*D*-стрептамін або канаміцин (*D*), (амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-[[[(2*S*)-аміногідроксибутаноїл]аміно]-дезоксид- α -*D*-глюкопіранозил]-2-дезоксид-*L*-стрептамін (*E*), (амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-*N*-[(2*R*)-аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-*D*-стрептамін (*G*).

Методом ВЕРХ виконано дослідження ступеню чистоти субстанції (амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-(6-аміно-6-дезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-*N*-[(2*S*)-аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-*D*-стрептаміну з метою виявлення неприпустимих та неспецифікованих домішок або супровідних речовин. Дослідження виконували на хроматографі Dionex UltiMate 3000 з DAD детектором.

Умовами хроматографування були наступні: колонка – BDS Hypersil C18, 250x4,6x4; температура колонки – 30°C; температура зразка – 8°C; потік – 1,0 мл/хв; об'єм інжекції – 20 мкл.

Буферний розчин готували наступним чином: 1000 мл, 2,7 г калію дигідрофосфат, рН 6,5 калію гідроксид).

Рухому фазі використовували наступну: дегазована суміш метанолу та буферного розчину у співвідношенні 69:31.

Досліджували два зразки субстанції (Амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-*O*-(амінодезоксид- α -*D*-глюкопіранозил)-*N*-[(2*S*)-аміногідроксибута-ноїл]-2-дезоксид-*D*-стрептамін з концентрацією 0,1 мг/мл в рухомій фазі. УФ-детектування проводили при 340 нм.

Стандартом був фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України (Амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-N-[(2S)-аміногідроксибутанол]-2-дезоксид-D-стрептамін з концентрацією 0,001 мг/мл в рухомій фазі.

Для комп'ютерного аналізу користувалися програмою Chromeleon 7.2. Використовували реактиви наступної чистоти: метанол (ВЕРХ), воду (ВЕРХ), калію дигідрофосфат (чистоти AR), калію гідроксид (AR).

Знайдено, що субстанція (Амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-O-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-N-[(2S)-аміногідроксибутанол]-2-дезоксид-D-стрептамін містить неприпустимі сторонні домішки.

Зразок субстанції (Амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-N-[(2S)-аміногідроксибутанол]-2-дезоксид-D-стрептамін та його хроматографічні характеристики представлено рисунку 1.2.1.

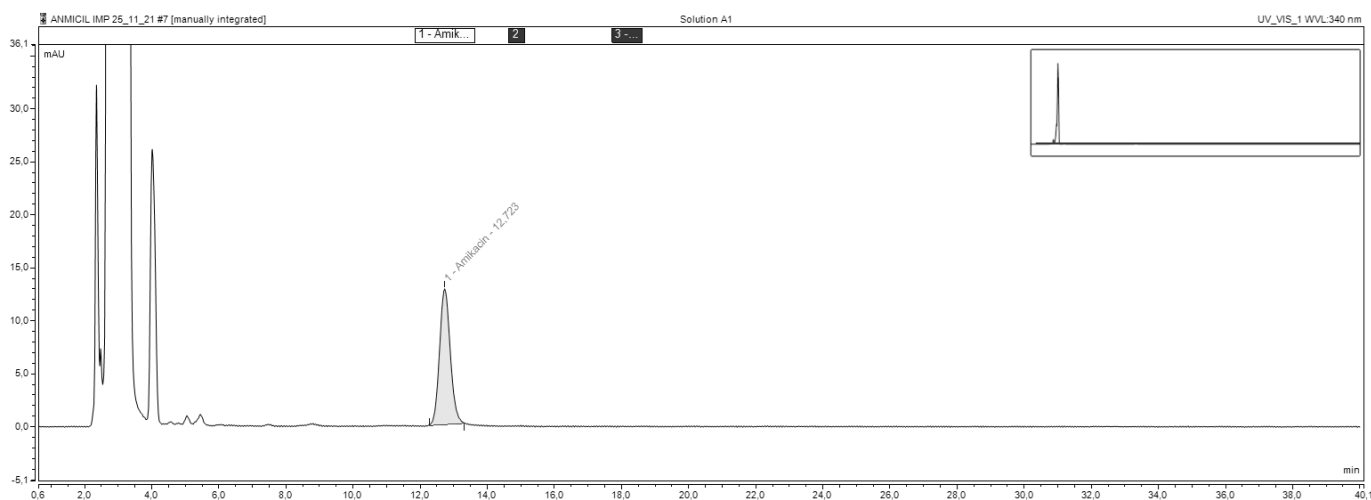


Рисунок 1.2.1. Хроматограма стандартного зразку.

Знайдено, що у двох зразках субстанції (Амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-(амінодезоксид- α -D-глюкопіранозил)-N-[(2S)-аміногідроксибутаноїл]-2-дезоксид-D-стрептамін присутні неприпустимі

домішки (домішка F, домішка C та сума не ідентифікованих домішок), однак їх кількість не перевищують встановлений рівень (рис.1.2.2) у порівнянні з стандартом.

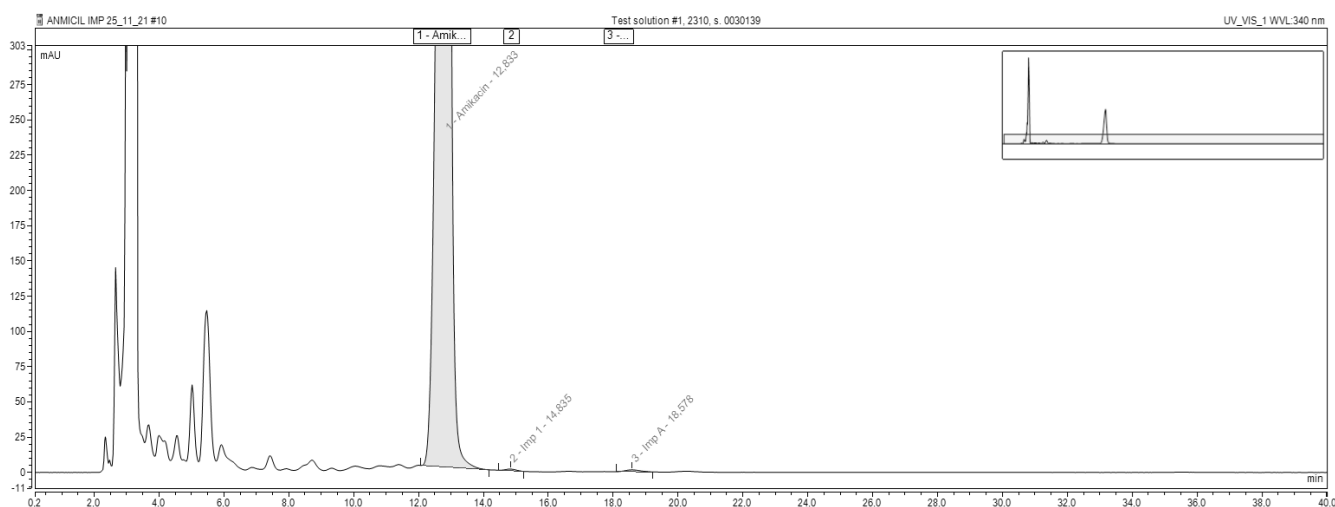


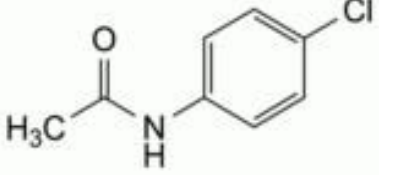
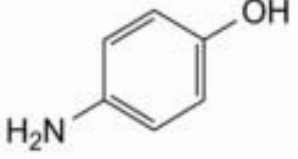
Рисунок 1.2.2. Ідентифіковані домішки (Imp A) ($R_t = 18,578$ хв (Imp A)), не ідентифікованими домішками (imp 1) ($R_t = 14,835$ хв (imp 1)).

Наведемо другий приклад імплементації методу ВЕРХ у практику фармацевтичного аналізу. Зразок, який досліджували – речовина *N*-(4-гідроксифеніл)-ацетамід). Ця речовина є представником хімічного класу анілідів. Вона входить до складу препарату парацетамол. Парацетамол у разі передозування має токсичні прояви, такі, як гостра печінкова недостатність (гепатотоксичність), синдром Стивенса-Джонсона [14-16].

Європейська Фармакопея (монографія 04/2022:0049) декларує проведення аналізу субстанції парацетамолу щодо встановлення складу і ступеню чистоти методом РХ. При чому, допустимими домішками є домішки *J*, *K* (табл. 1.2.1) [17-19].

Таблиця 12.1. Домішки *J*, *K* субстанції *N*-(4-гідроксифеніл)-ацетаміду.

Назва домішки	Хімічна назва, ІЮПАК	Хімічна формула

J	N-(4-chlorophenyl)acetamide (chloroacetanilide)	
K	4-aminophenol	

До неспецифікованих домішок, також, відносять домішки *A, B, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, O*.

Під час дослідження була розроблена ВЕРХ методика приготування стандартного та досліджуваного розчинів, а також, ВЕРХ методика хроматографування.

ВЕРХ дослідження проводили на хроматограф. Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором. УФ- детектування виконували при 245 нм. Використовували наступні умови хроматографування: колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x3,5; температура колонки – 25°C; потік – 0,42 мл/хв; об'єм інжекції – 10 мкл.

Буферний розчин готували з: 1000 мл воиа Р, 0,66 мл кислоти ортофосфатної, рН 6,3 калію гідроксиду.

Використовували розчинник – буферний розчин-ацетонітрил у співвідношенні 80:20 (об/об%).

У якості градієнтів використовували: градієнт А – ацетонітрил, градієнт В – буферний розчин. Речовини беруть у досліди чистоти рівню ВЕРХ (табл. 1.2.2).

Таблиця 12.2. Розведення градієнтів А та В.

Час	А (%)	В (%)
0	10	90
12	10	90
38	30	70
70	30	70
71	10	90
81	10	90

Реактиви.

Використовували реактиви: ацетонітрил (ВЕРХ), вода (ВЕРХ), калію гідроксид, кислоти ортофосфатну (88% м/м, АR).

Знайдено, що досліджувана субстанція містить неприпустимі домішки (imp 1, 2, 3, ibuprofen) ($R_t = 17.149$ хв (imp 1), 20.375 хв (imp 2), 30.729 хв (imp 3), 55.935 хв (imp ibuprofen)) (рис. 1.2.3, 1.2.4).

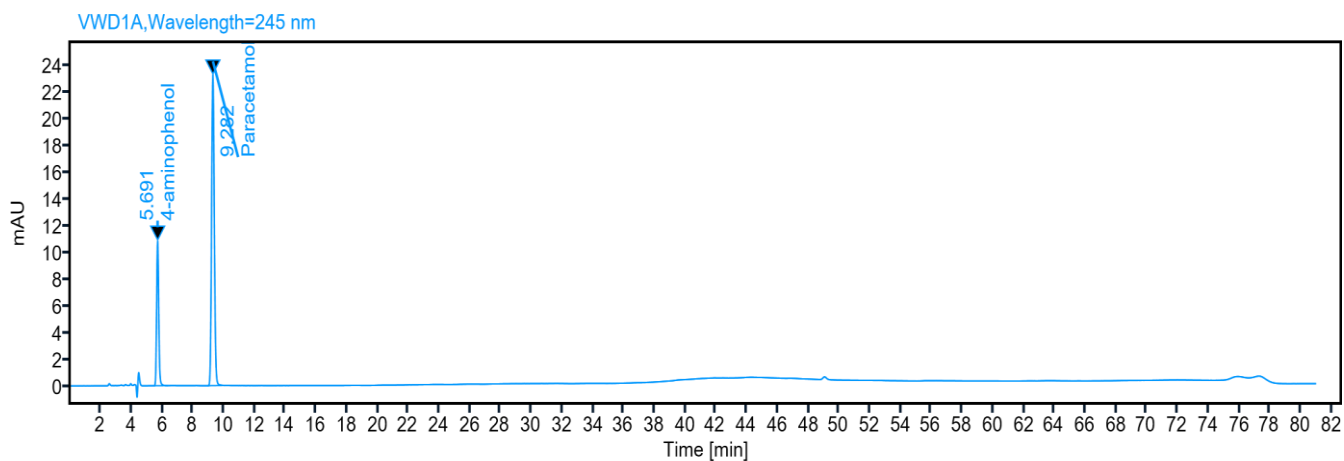


Рисунок 1.2.3. Хроматограма субстанції, домішка К ($R_t = 9.282$ хв, $R_t = 5.691$ хв (Eur.Ph. – 5.4)).

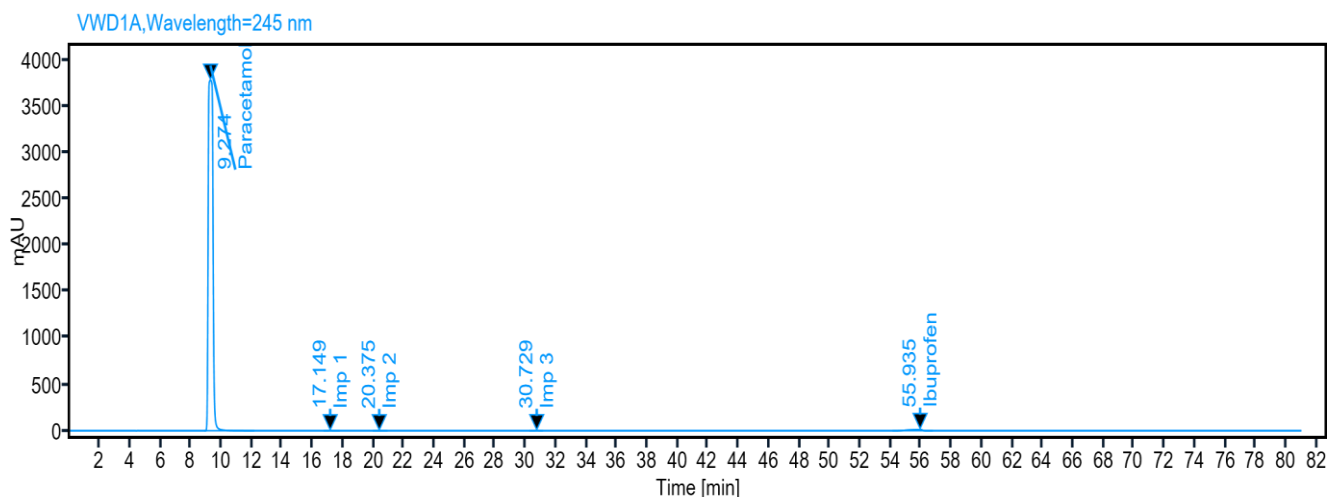


Рисунок 1.2.4. Хроматограма ідентифікованих та не ідентифікованих домішок (imp 1, 2, 3, ibuprofen) ($R_t = 17.149$ хв (imp 1), 20.375 хв (imp 2), 30.729 хв (imp 3), 55.935 хв (imp ibuprofen)).

Досліджувана субстанція містить не задекларовані ДФУ та іншими Фармакопеями неприпустимі домішки *D* ($R_t = 17.149$ хв (imp 1)), *E* ($R_t = 20.375$ хв (imp 2)), *H* ($R_t = 30.729$ хв (imp 3)), домішку Ібупрофену – яка може утворитися під час синтезу субстанції ($R_t = 55.935$ хв (imp ibuprofen)). Неприпустимі домішки можуть негативно впливати на здоров'я пацієнта, призводити до прояву більш виражених токсичних ефектів вживаємого препарату, навіть, до летального наслідку, у разі передозування препарату.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що метод ВЕРХ дозволяє проводити значно ретельніший аналіз досліджуваної субстанції лікарського засобу, виявити ті неприпустимі домішки, сигнали яких не проявляються під час дослідження методом рідинної хроматографії. Це значить, що імплементація методу ВЕРХ у практику фармацевтичного аналізу вкрай важлива, оскільки отримані результати хроматографування запобігають потраплянню на фармацевтичний ринок неякісних лікарських засобів і як наслідок цього, нанесенню шкідливого впливу на організм та збереженню здоров'я пацієнта.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ НАТРІЮ МЕТАМІЗОЛУ

2.1. Хроматографічні та спектральні методи дослідження натрію метамізолу субстанції

У традиційному способі синтезу анальгін 4-аміноантипін перетворюється в анальгін за допомогою чотирьох реакцій, а саме формілювання, метилування, гідролізу та конденсації (рис. 2.1.1):

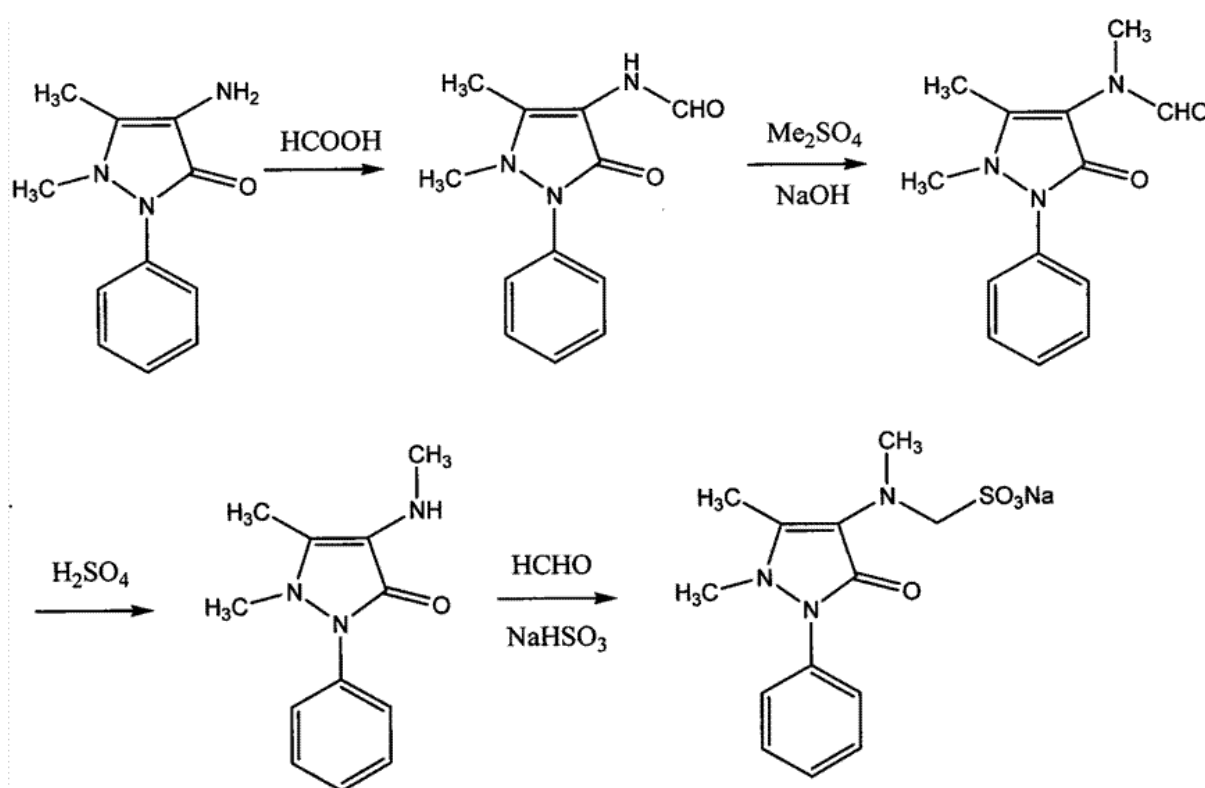


Рисунок 2.1.1. Класична схема синтезу анальгін.

За іншим способом синтезу анальгін 4-аміноантипін, параформальдегід і натрій гідросульфит безпосередньо піддають конденсації з утворенням 4-N-диметиланальгін, а 4-N-диметиланальгін і диметилсульфат піддають метилуванню в слабких лужних умовах з утворенням анальгін (рис. 2.1.2):

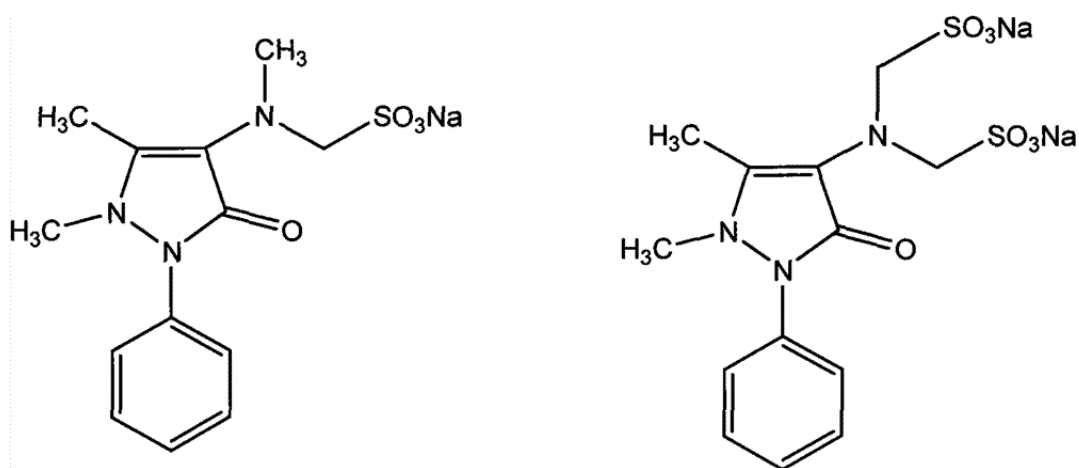


Рисунок 2.1.2. Хімічні формули двох основних продуктів синтезу – анальгін та 4-N-диметилсульпірину.

При заміні параформальдегідом формаліну, за участю метилату сульфанової кислоти, утворюється ще один продукт – 4-N-диметилсульпірин.

Метамізол натрію є неопіодним анальгетиком. В останній час з'ясовується проблема щодо рівня ризику агранулоцитозу або апластичної анемії, до яких може призвести цей лікарський засіб. Як відомо, лікарський засіб призводить до розвитку агранулоцитозу, апластичної анемії, нейтропенії та панцитопенії. З цих випадків три (два агранулоцитози; один апластична анемія) ймовірно пов'язані з вживанням метамізолу.

Приблизні оцінки частоти агранулоцитозу та апластичної анемії, пов'язаних із застосуванням метамізолу, становили 0,16 та 0,08 випадків/млн людино-днів застосування. Постійний національний нагляд за безпекою показує, що, незважаючи на можливість медикаментозної дискразії крові при застосуванні метамізолу, ризик є мінімальним.

Проаналізовано вплив метамізолу та його активного метаболіту, 4-метиламіноантипірину (МАО), на життєздатність промієлоцитів HL60, їх ДМСО-індукованих диференційованих гранулоцитів. Метамізол та МАО у дозі 75 мкМ не змінювали гранулоцитарну диференціацію клітин HL60. При концентраціях вище 100 мкМ, а це значно перевищує фармакологічний діапазон, метамізол індукує апоптоз у приблизно 30% промієлоцитів HL60, а

HL60-гранулоцитарні диференційовані клітини є більш стійкими до апоптотичної дії. Якщо порівнювати вплив метамізолу з ефектами ацетилсаліцилової кислоти (АСК) та диклофенаку на клітини (еквівалентні концентрації), то їх апоптотичні ефекти були подібними.

Промієлоцити HL60 є більш чутливими до апоптозу, ніж гранулоцитарні диференційовані клітини. Крім того, гранулоцити, які отримано з крові людини, обробляли метамізолом, МАА та АСК (конц. 75 мкМ), диклофенаком (конц. 3 мкМ), з'ясовано, що менше 10% - це апоптичні гранулоцити. При токсикологічних/макс.фармакологічних концентраціях (10 мМ) виявлено 90% гранулоцитів, які були апоптичними.

Таким чином, метамізол, МАА, АСК і диклофенак у фармакологічних концентраціях не впливають на процес диференціювання гранулоцитів і не індукують відповідний апоптоз диференційованих гранулоцитів.

Згідно Державної Фармакопеї України [12] ідентифікацію субстанції метамізолу натрію виконують абсорбційною спектрофотометрією в ІЧ-області.

Виконують якісне виявлення:

- реакція з перекисом водню дає синє забарвлення, яке переходить у інтенсивного червоного;
- реакція виявлення за виділенням пари сірки діоксиду, пара реагує з калію йодатом і розчином крохмалю – забарвлення фільтрувального паперу у синій колір;
- реакція з натрієвою сіллю хромотропової кислоти у сульфатній кислоті – синьо-фіолетовий колір;
- реакції з окисниками – феруму (III) хлоридом, хлорним вапном, кислотою нітратною концентрованою – забарвлені продукти реакції;
- реакції субстанції на натрій;
- реакція з калію йодатом – малинове забарвлення напівпродуктів реакції, при подальшому додаванні реагенту випадає бурий осад

йоду.

Виконуються випробування на прозорість розчину субстанції(2.2.1) – розчин S має бути прозорим, його кольоровість (2.2.2. метод I) забарвлення розчину S після приготування має бути не інтенсивніше за еталон ВУ.

Кислотність або лужність. До 5 мл розчину S необхідно додати 0,1 мл розчину фенолфталеїну P1. Розчин повинен бути безбарвним. Після додавання не більше 0,1 мл 0,02 М розчину натрію гідроксиду повинне з'явитися рожеве забарвлення.

Супровідні домішки виявляють методом РХ (2.2.29) з УФ-детектуванням при 254 нм: специфіковані домішки С і Е, неспецифіковані домішки А, В, D.

Випробуваний розчин, розчини порівняння a, b, d, e готують у метанолі, розчин c – у метанолі та ментолі.

Рухома фаза – метанол, буферний розчин (28:72) (6,0 г/л натрію дигідрофосфату P – триетиламін P (1000:1), рН якого доводять до 7,0 натрію гідроксиду розчином концентрованим P.

УФ-спектр анальгіну. Характеристичні смуги в УФ-спектрі натрію метамізолу (анальгіну) (кисле середовище): містить максимум поглинання $\lambda_{\max} = 258$ нм (рис. 2.1.3).

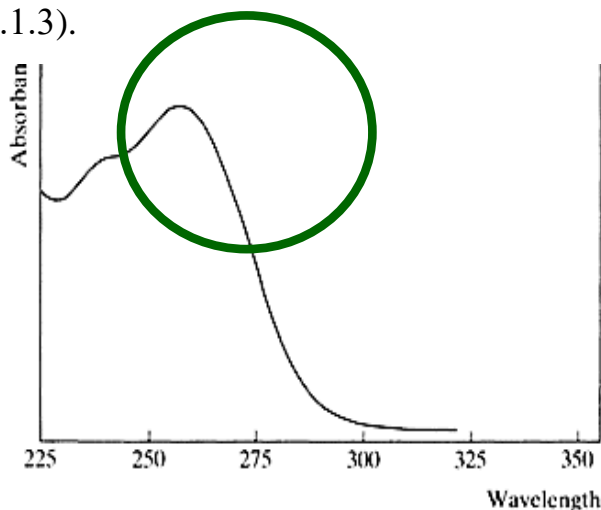


Рисунок 2.1.3. УФ-спектр натрію метамізолу у кислому середовищі, $\lambda_{\max} = 258$ нм

ІЧ-спектр анальгіну. Характеристичні смуги в ІЧ-спектрі натрію

метамізолу (анальгін): 1672, 1639, 1208, 1179, 1163, 1159 cm^{-1} (рис. 2.1.4).

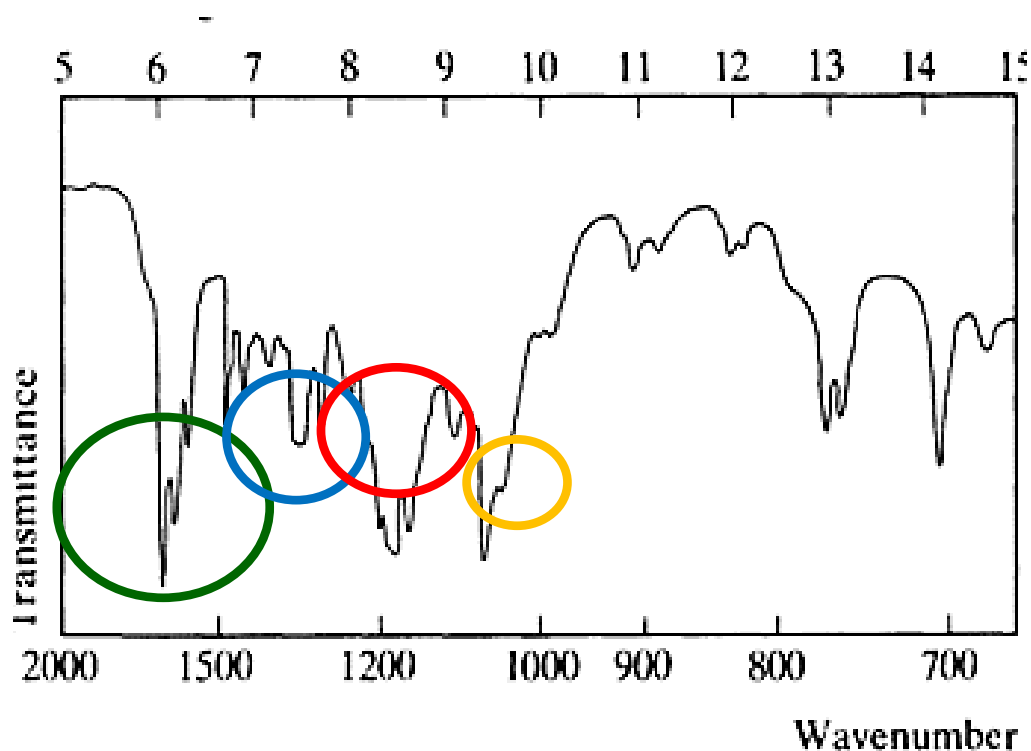


Рисунок 2.1.4. ІЧ-спектр натрію метамізолу: 1672, 1639, 1208, 1179, 1163, 1159 cm^{-1}

За хімічною класифікацією натрію метамізол це похідне піразолону, молекула якого містить феніл-радикал, метил-радикали, оксо-групу, N-метиламіно-групу, сульфо-групу (рис. 2.1.5).

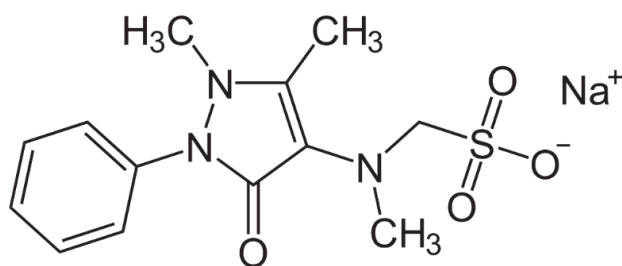


Рисунок 2.1.5. Хімічна формула натрію метамізолу або [(1,5-диметил-3-оксо-2-феніл-2,3-дигідро-1H-піразол-4-іл)-N-метиламіно] метансульфонату натрію.

Речовина є кристалічним порошком білого кольору. Легко гідролізується. Легко розчинний у полярних розчинниках, таких, як вода, 96%-й розчин етанолу.

Аналіз особливостей хімічної будови натрію метамізолу дозволяє інтерпретувати сигнали в його ІЧ-спектрі, а саме: в спектрі спостерігаються інтенсивні смуги непласких деформаційних коливань C-H в області 650-900 cm^{-1} .

Зазвичай, відсутність виражених смуг в області 650-900 cm^{-1} підтверджує відсутність в структурі речовини ароматичного ядра.

Відношення сигналів в ІЧ-спектрі натрію метамізолу наведено в таблиці 2.1.1.

Таблиця 2.1.1. Сигнали ІЧ-спектру натрію метамізолу.

Структуровий елемент молекули натрію метамізолу	Валентні коливання, ІЧ-спектр $\nu, \delta, \text{cm}^{-1}$
$\nu \text{C}=\text{C}$	1639, 1672
Pyrazole, νCH	1500-1565
$\delta\text{N-R}$	1500-1600
δCH_3 , at $\text{C}=\text{C}$	1159, 1163
$\delta\text{C}=\text{O}$	1208
δCH_2	1179

В сполуках з ізольованим подвійним зв'язком сигнал $\text{C}=\text{C}$ знаходиться при 1600-1680 cm^{-1} , однак, в напружених циклічних системах значення цієї частоти значно нижче.

Частота коливань подвійного зв'язку підвищується із зростанням ступеня її заміщення.

Спектри ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР анальгінну має наступні сигнали:

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ : 2.18 (с, 3H), 2.80 (с, 3H), 3.78 (д, $J=6.96$ Гц, 2H), 4.00 (м, 1H), 7.25 (м, 1H), 7.45 (м, 4H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ : 161.8, 140.8, 135.4, 128.9 (2), 125.3, 122.1 (2), 120.0, 62.4, 37.7, 10.4.

Кількісне визначення натрію метамізолу виконують за допомогою методу титриметрії. Субстанцію розчиняють в охолодженій хлористоводневій кислоті, титрують розчином йоду. Наприкінці титрування додають 2 мл розчину крохмалю Р, титрують до блакитного забарвлення, яке не зникає протягом 2 хв і більше. У процесі титрування температура розчину повинна бути не вище 10°C .

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Інструментальні досліджень виконувалися за допомогою методу ВЕРХ. Використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором.

В експерименті підбрано наступні умови хроматографування:

- колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (або аналогічна);
- потік – 1,0 мл/хв
- детектування – УФ при 215 нм
- об'єм інжекції – 5 мкл
- температура колонки – 25°C
- рухома фаза А (3,2 г триетиламіна розчиняють у 1000 мл води та доводять рН розчину до $3,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти)
- рухома фаза В – метанол
- градієнт наступні:

Таблиця 3.1. Схема градієнту.

Час	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0,0	100	0
3,5	100	0
5,5	50	50
7,5	50	50
10,0	100	0
13,0	100	0

- час хроматографування – 13 хв

Приготування випробувального розчину.

Готували розчин препарату анальгіну з концентрацією 25 мг/мл у суміші етанол-вода у співвідношенні 1:1.

У якості стандартного зразку використовували фармакопейні стандартні зразки Державної фармакопеї України натрію формальдегідсульфоксилат дигідрат (ронгаліт). Наважку 65 мг ронгаліту розчиняли в 100 мл суміші етанол-вода у співвідношенні 1:1.

Формальдегід сульфоксилат дигідрат або натрію формальдегід сульфоксилат (Ронгаліт, Rongalite) є відноситься до небезпечних для організму людини хімічних речовин; використовують як антиоксидант, у синтезі полімерів, для відбілювання тканин (рис. 3.1).

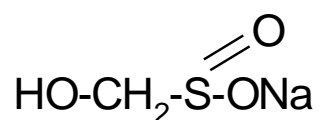


Рис. 3.1. Хімічна формула натрію формальдегід сульфоксилату дигідрату – супровідної домішки метамізолу натрію субстанції.

Ронгаліт використовується як антиоксидант у виробництві ін'єкційних препаратів. Проведено його дослідження у якості антидоту при отруєнні ртуттю та його сполуками. Ронгаліт застосовують як промисловий відбілювач, в органічному синтезі сульфонів у якості нуклеофільного агента.

При дії на ронгаліт сильних окиснювачів, розведених кислот відбувається його деструкція. Ронгаліт відноситься до помірно токсичних речовин. При нагріванні ронгаліт розкладається і виділяє токсичні гази сірки діоксид і натрію оксиду. Ці гази викликають подразнення очей, шкіри, дихальних шляхів і слизових оболонок ШКТ.

Ронгаліт використовують як C1 синтон у синтезі дивергентних піридинів та хінолінів (рис. 3.2).

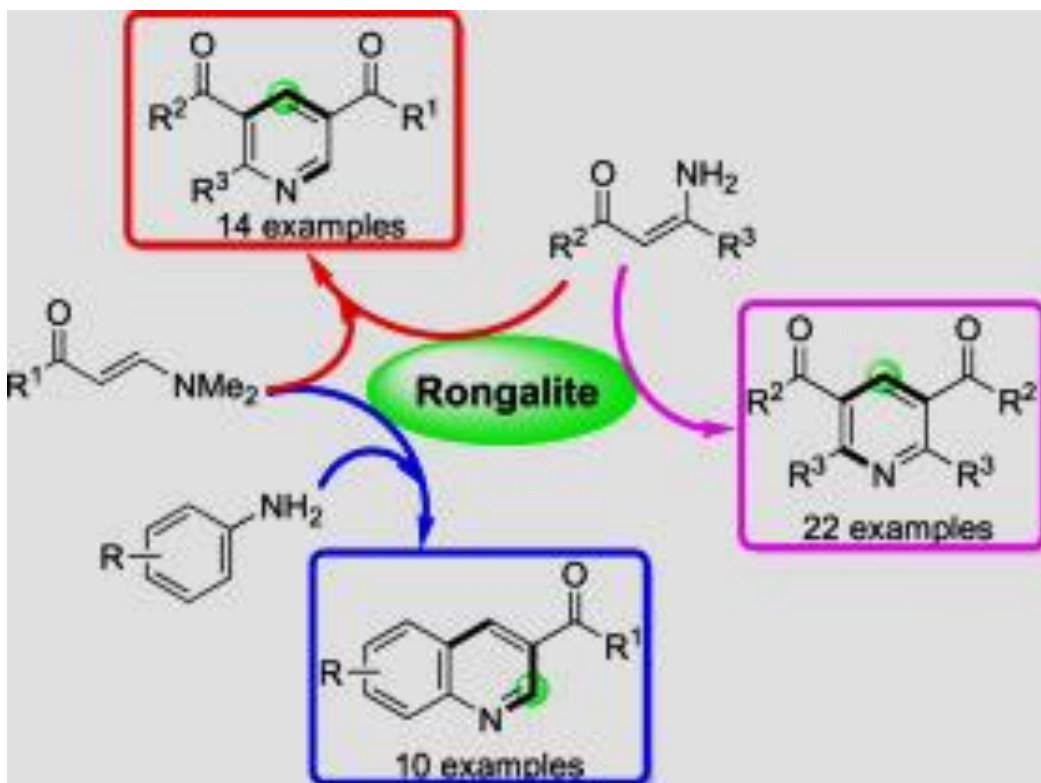


Рис. 3.2. Використання натрію формальдегід сульфоксилату дигідрату у органічному синтезі дивергентних піридинів та хінолінів у якості C1 синтону.

Ронгаліт використовують як джерело сульфону у синтезі біологічно активних гетероциклів (рис. 3.3).

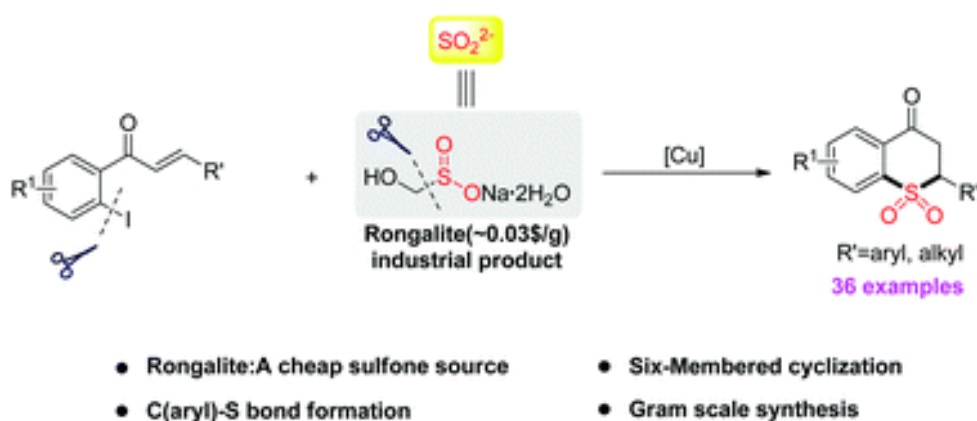


Рис. 3.3. Використання натрію формальдегід сульфоксилату дигідрату у органічному синтезі у якості джерела сульфону.

Ронгаліт зберігають у щільно закритих контейнерах, без доступу УФ-опромінення, при кімнатній температурі 15–30 °С, яка повинна контролюватися [20-22].

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви: фосфорну кислоту (чистоти AR), метанол (чистоти для ВЕРХ), воду (чистоти для ВЕРХ) триетиламін (чистоти для ВЕРХ).

При проведенні дослідження на присутність неприпустимих супровідних домішок у складі метамізолу натрію субстанції методом ВЕРХ нами була модифікована методика їх виявлення та кількісного визначення, саме: рухома фаза А (3,2 г триетиламіну розчиняють у 1000 мл води та доводять рН розчину до $3,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти), рухома фаза В – метанол.

Отримані результати:

При дослідженні методом ВЕРХ стандартних речовин (Стандарт 1, Стандарт 2) отримано наступні результати:

Стандартні зразки: Ронгаліт

- значення R_t знаходиться в інтервалі 1,990-1,994 хв. (Стандарт 1), 1,992-1,993 хв. (Стандарт 2);
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 1,991-1,993 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,001-0,002 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,04-0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 258,359-259,483 (Стандарт 1), 258,158-260,702 (Стандарт 2);
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартних зразків коливається в інтервалі 258,832-259,430.

Досліджувані зразки: Ронгаліт

- значення R_t знаходиться в інтервалі 1,983-2,009 хв. (Зразок 1), 1,997-2,003 хв. (Зразок 2);
- середнє значення R_t зразків знаходиться в інтервалі 1,998-2,000 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,017 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,04-0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 38,371-40,692 (Зразок 1), 41,287-44,148 (Зразок 2);
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартних зразків коливається в інтервалі 39,698-42,623 (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Значення, середні значення R_t , площини піку, RSD стандартних зразків 1 і 2, досліджуваних зразків 1 і 2.

	<i>Стандарт 1</i>				<i>Стандарт 2</i>			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> (≤ 2.5)	<i>N</i> (≥ 2000)	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> (≤ 2.0)	<i>N</i> (≥ 1000)
	1,990	259,483	1,1	5119	1,992	258,158	1,1	5115
	1,993	258,894	1,1	5132	1,993	260,702	1,1	5198
	1,990	258,950	1,1	5110				
	1,994	258,473	1,1	5115				
	1,990	258,359	1,1	5121				
Середнє	1,991	258,832	1,1	5119	1,993	259,430	1,1	5157
SD	0,002	0,446			0,001	1,799		
RSD($\leq 2\%$)	0,10%	0,17%			0,04%	0,69%		
	<i>Зразок 1</i>		<i>Зразок 2</i>					
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>				
	1,983	40,032	1,999	42,435				
	2,009	40,692	1,997	44,148				

	2,003	38,371	2,003	41,287
Середнє	1,998	39,698	2,000	42,623

Отримані хроматограми:

На рисунку 3.4. представлено хроматограму стандартного зразку ронгаліту, отриману методом ВЕРХ.

Стандартний зразок

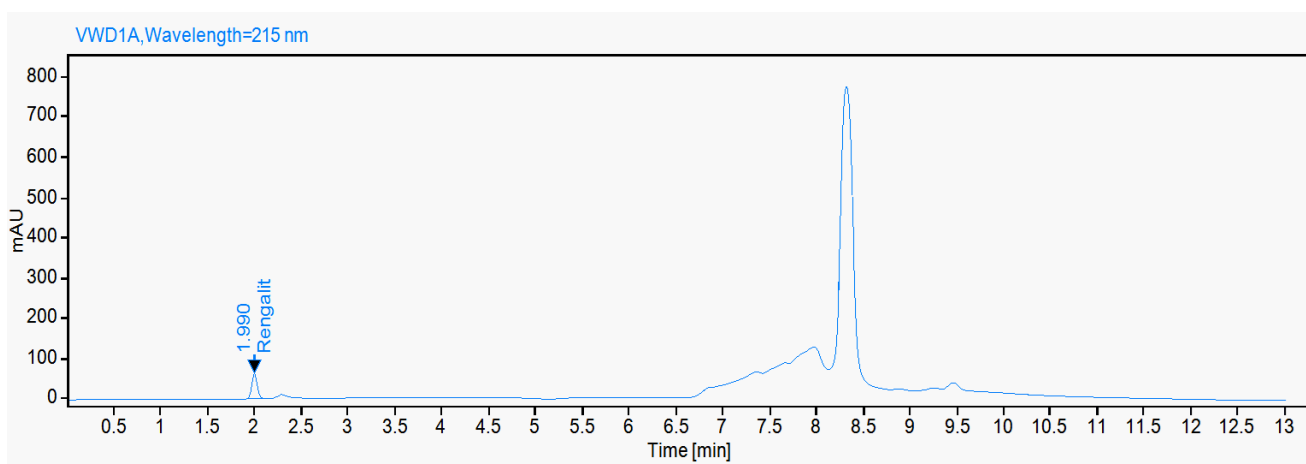


Рис. 3.4. Хроматограма стандартного зразку (метод ВЕРХ) – Rt (ронгаліт) 1,990 хв.

- значення Rt знаходиться в інтервалі 1,990 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,04-0,10%;
- площа піка на хроматограмі дорівнює 40,032;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартних зразків коливається в інтервалі 258,950-259,483.

Досліджуваний зразок

На рисунку 3.5. представлено хроматограму досліджуваного зразку натрію метамізолу субстанції з супровідною неприпустимою домішкою ронгаліту, отриману методом ВЕРХ.

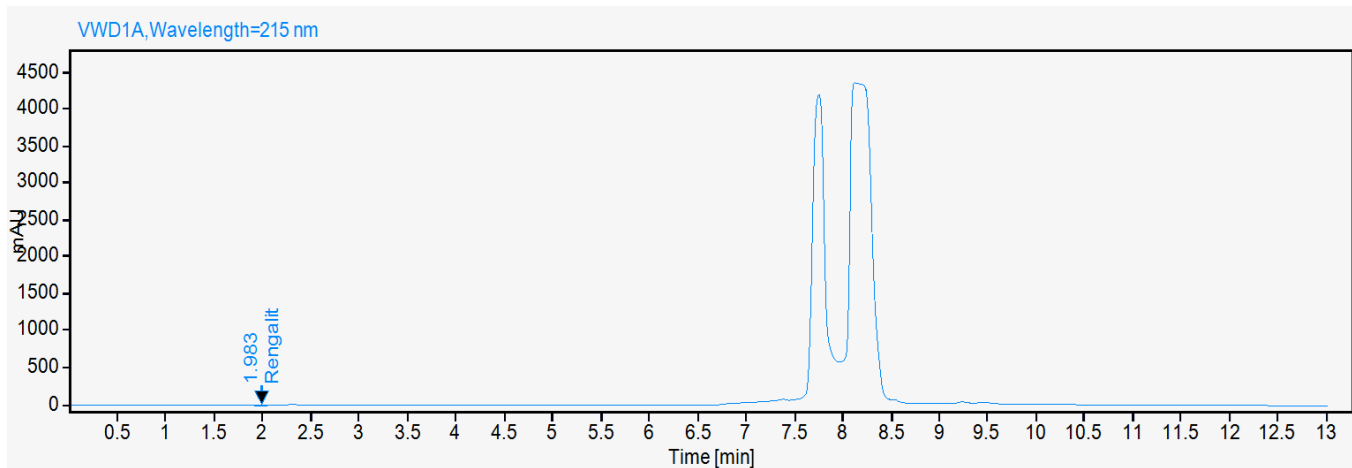


Рис. 3.5. Хроматограма досліджуваного зразку натрію метамізолу субстанції з домішкою ронгаліту (метод ВЕРХ) – Rt (ронгаліт) 1,983 хв.

- значення Rt знаходиться в інтервалі 1,983 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,04-0,10%;
- площа піка на хроматограмі дорівнює 258,950;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартних зразків коливається в інтервалі 258,950-259,483.

За допомогою методу ВЕРХ виявлена присутність натрію формальдегід сульфоксилат дигідрату (ронгаліту) – неприпустимої домішки, яка може потрапляти у субстанцію натрію метамізолу під час його синтезу: Rt в інтервалі 1,997-2,009 хв. (при 215 нм) з перевищенням у порівнянні із стандартними зразками (Rt 1,990-1,994 мін, при 215 нм), а саме:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 1,983 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,04-0,10%;
- площа піка на хроматограмі дорівнює 258,950;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартних зразків коливається в інтервалі 258,950-259,483.

При проведенні дослідження на присутність неприпустимих супровідних домішок у складі метамізолу натрію субстанції методом ВЕРХ нами була

модифікована методика їх виявлення та кількісного визначення, саме: рухома фаза А (3,2 г триетиламіну розчиняють у 1000 мл води та доводять рН розчину до $3,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти), рухома фаза В – метанол.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що метод ВЕРХ дозволяє проводити ретельніший аналіз досліджуваної субстанції лікарського засобу натрію метамізолу, виявити ті неприпустимі домішки, сигнали яких не проявляються під час дослідження методом рідинної хроматографії.

За результатами хроматографування методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції виявлено роналгіт (натрію формальдегід сульфоксилат дигідрат) – неприпустиму супровідну домішку, яка може утворитися під час синтезу, у складі субстанції з R_t в інтервалі 1,997-2,009 хв. (при 215 нм) з перевищенням у порівнянні із стандартними зразками (R_t 1,990-1,994 мін, при 215 нм).

Хоча, додатково до хроматографічного дослідження, обов'язково необхідно використовувати інші методи дослідження (якісне, кількісне).

Наприклад, ідентифікацію субстанції натрію метамізолу методом ІЧ-спектроскопії, йодометрією (пряме титрування, індикатор – крохмаль, $S=1$).

При цьому, вкрай важливим є якісне виявлення, яке виконується за допомогою кольорових, мікрокристалоскопічних, осадових реакцій. Наприклад, реакція натрію метамізолу з розчином водню пероксиду концентрованого. При цьому утворюється синє забарвлення, яке зникає і швидко переходить у інтенсивне-червоне.

Субстанція дає реакції на натрій на фільтрувальному папері, змоченим розчином калію йодату та розчином крохмалю. Виділяється пара сульфуру (IV) оксиду та забарвлює папір у синій колір.

ВИСНОВКИ

Метод ВЕРХ при фармацевтичному аналізі субстанції натрію метамізолу посідає важливе місце під час встановлення ступеню якості його фармацевтичних композицій. Метод має значні переваги над іншими інструментальними методами, а саме, швидкість виконання аналізу, точність отриманих даних, визначення присутності не тільки задекларованих в фармацевтичній документації на субстанцію специфікованих і неспецифікованих домішок, але, й супровідних неприпустимих домішок, визначення яких іншими інструментальними методами залишається сумнівним.

1. Підібрано умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції на присутність специфікованих та неспецифікованих домішок, а саме: рухома фаза А (3,2 г триетиламіну розчиняли у 1000 мл води та доводили рН розчину до $3,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти), рухома фаза В – метанол.
2. Розроблено методику хроматографування методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції на присутність супровідної домішки ронгаліту.
3. За результатами хроматографування методом ВЕРХ натрію метамізолу субстанції у порівнянні зі стандартними зразками виявлено роналгіт (натрію формальдегід сульфоксилат дигідрат) – неприпустиму супровідну домішку, яка може утворитися під час синтезу, у складі субстанції з R_t в інтервалі 1,997-2,009 хв. (при 215 нм) з перевищенням у порівнянні із стандартними зразками (R_t 1,990-1,994 мін, при 215 нм).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. European Medicines Agency (EMA). (2019). Metamizole containing medicinal products. March 20, 2019. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/metamizole-containing-medicinal-products>. [Accessed March 18, 2022].
2. Drugs.com. Metamizole. (2022). Available at: <https://www.drugs.com/international/metamizole.html>. [Accessed March 18, 2022].
3. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. (2004). Ed. by R.J. Lewis. — 11th edn. — New York.
4. Deborah Rudin, Maurice Schmutz, Noëmi Johanna Roos, Jamal Bouitbir, Stephan Krähenbühl. Reactive Metamizole Metabolites Enhance the Toxicity of Hemin on the ATP Pool in HL60 Cells by Inhibition of Glycolysis. *Biomedicines*. 2020, 07-18. PMID [32674331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674331/).
5. González-González, Mirna; Mayolo-Deloisa, Karla & Rito-Palomares, Marco. (2020). Chapter 5 - Recent advances in antibody-based monolith chromatography for therapeutic applications. *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, Elsevier, 105-116.
6. Zhao, M., Vandersluis, M., Stout, J., Haupts, U., Sanders, M., Jacquart, R. (2019). Affinity chromatography for vaccines manufacturing: finally, ready for prime time? *Vaccine*, 37 (36), 5491-5503.
7. Chen, Y., Ding, X., Zhu, D., Lin, X., Xie, Z. (2019). Preparation and evaluation of highly hydrophilic aptamer-based hybrid affinity monolith for on-column specific discrimination of ochratoxin A. *Talanta*, 200, 193-202.

8. Tucker J, Fischer T, Upjohn L, et al. Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated with US Food and Drug Administration Warnings. JAMA Network Open. 2018; ahead of print. Available at:
<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2706496>
9. Ioulia K. Tseti. Melatonin as a Food Supplement for Sleep Disorders
Published: February 28th 2020, DOI: 10.5772/intechopen. 91410
<https://www.intechopen.com/chapters/71288>
10. Останіна Н.В., Кузнецова О.М. (2019). Роль дієтичних добавок для харчування людей та стан контролю їх безпеки та якості для споживання на сучасному етапі. Гігієна населених місць : збірник наукових праць / ред. кол.: А. М. Сердюк (голов. ред.) та ін. К.: Вип. 69. стор. 185-191.
11. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/applications/analytical-chemistry/thin-layer-chromatography>
12. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 442-444.
13. British Pharmacopoeia 2020. London. 2020: I-589 591, 139, 142.
www.webofpharma.com.
14. <http://repo.knmu.edu.ua/handle/123456789/7647>
15. Acetaminophen – Compound Summary. (2011). PubChem. The National Library of Medicine.
16. Левашова О. Л. (2014). Квантово-хімічні властивості молекули парацетамолу: [доповідь на науковому семінарі], Харків, 10.11.2014 / О. Л. Левашова; ХНМУ. – Харків, 10 с.

17. Paracetamol monograph draft (PA/PH/EXP. 10A/T (19) 136 ANP published in *Pharmeuropa* 32/1 (01/2020).
18. *Eur. Ph.; Suppl.* 10- Chap. 2.2.46. Chromatographic separation techniques.
19. Zeshan Aqeel, Dirk Hansen, Heiko Behr. (2020). European Pharmacopoeia Paracetamol Monograph Draft Method: Achieving Improved Sensitivity, Resolution, and Separation for Paracetamol and All 14 Related Impurities using Kinetex® 5 µm C18 Core-Shell Columns. *Phenomenex:TN-1274*:16.
20. Xiang-Long Chen, Bo-Cheng Tang, Cai He, Jin-Tian Ma, Shi-Yi Zhuang, Yan-Dong Wu and An-Xin Wu. (2020). Rongalite as a sulfone source: a novel copper-catalyzed sulfur dioxide anion incorporation process. *Chem. Commun.* 56, 13653-13656.
21. Sivaparwathi Golla, Naveenkumar Anugu, Swathi Jalagam and Hari Prasad Kokatla. (2020). Rongalite-induced transition-metal and hydride-free reductive aldol reaction: a rapid access to 3,3'-disubstituted oxindoles and its mechanistic studies. *Org. Biomol. Chem.*, 20, 808-816.
22. Fu-Sheng He, Man Zhang, Mengke Zhang, Xiangxiang Luo and Jie Wu. (2021). Iminyl radical initiated sulfonylation of alkenes with rongalite under photoredox conditions. *Org. Chem. Front.*, 8, 3746-3751.

SUMMARY

Kuzko Alla

PECULIARITIES OF CHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE DEGREE OF PURITY OF THE SODIUM METAMIZOLE SUBSTANCE

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: doctor of chemical sciences Levin M.G.

Keywords: analgin, HPLC, pharmaceutical analysis.

Introduction. Metamizole sodium monohydrate (Analgin or [(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-N-methylamino] sodium methanesulfonate) is a well-known drug with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effect, but under certain conditions can lead to undesirable effects, such as Quince's edema, anaphylactic shock, Stevens-Johnson syndrome. Quality control of the substance metamizole sodium must be carried out carefully in order to timely detect unacceptable accompanying impurities that will be dangerous to the health and life of the patient.

Materials and methods. Research objects are metamizole sodium monohydrate substance, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of metamizole sodium monohydrate. Methods: absorption spectrophotometry in the IR region, LC, HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. Using the HPLC method, the presence of sodium formaldehyde sulfoxylate dihydrate (rongalite) was detected - an unacceptable impurity that can enter the sodium metamizole substance during its synthesis: R_t in the interval 1.997-2.009 min. (at 215 nm) with an excess compared to standard samples (R_t 1,990-1,994 min, at 215 nm), namely:

- the value of R_t is in the interval of 1.983 min.;
- RSD does not exceed 2%: 0.04-0.10%;
- the plane of the peak on the chromatogram is equal to 258.950;
- the average value of the peak plane on the

chromatogram of standard samples ranges from 258.950 to 259.483.

When conducting a study on the presence of unacceptable accompanying impurities in the composition of metamizole sodium substance by the HPLC method, we modified the method of their detection and quantitative determination, namely: mobile phase A (dissolve 3.2 g of triethylamine in 1000 ml of water and adjust the pH of the solution to ± 3.0 0.05 using phosphoric acid), mobile phase B is methanol.

Conclusions. According to the results of HPLC chromatography of sodium metamizol of the substance compared to standard samples, ronalgit (sodium formaldehyde sulfoxylate dihydrate) was detected - an unacceptable accompanying impurity that can be formed during synthesis, in the composition of the substance with an R_t in the interval of 1.997-2.009 min. (at 215 nm) with an excess compared to standard samples (R_t 1,990-1,994 min, at 215 nm).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. Вельчинська О., Белей В., Кузко А. Переваги методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в аналізі фармацевтичних композицій. Міжнародна науково-практична конференція «Освіта і наука в період глобальних криз та конфліктів у ХХІ столітті» (Секція «Природничі науки»), НАН ВО України, м. Київ, 08-09 грудня 2023 року.