

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 «Модифікація методики хроматографічного дослідження
таксолу як представника групи таксанів»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи ФЗА
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)

Кутенкова Марія Юріївна
(прізвище та ініціали)

Керівники ас. Бут І.О.,

проф., д.м.н. Ніженковська І.В.

(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.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ СПОЛУК ГРУПИ ТАКСАНІВ РЕЧОВИН.....	9
1.1. Особливості хімічної будови таксанів.....	9
1.2. Біологічна активність таксанів.....	13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ТАКСАНІВ.....	16
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості таксанів.....	16
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	23
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 – 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

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

TСХ – тонкослойная хроматография

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

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 спин-спінової взаємодії, герци

Ph – феніл

i-Pr – ізопропіл

Pr – пропіл

Pu – піридин

ВСТУП

Актуальність теми. Органічні речовини, молекули яких за хімічною будовою є похідними терпенів або політерпенів широко використовуються в медицині у якості лікарських засобів. Серед представників групи таксанів є алкалоїди – речовини природного походження. Наприклад, алкалоїд паклітаксел був виділений із кори рослин роду *Taxus*. За хімічною будовою паклітаксел – це дитерпен, а його молекулярну основу складає таксадієн.

Таксинові алкалоїди є токсичними хімічними речовинами, які ізолюють із природних джерел. Кількість алкалоїдів залежить від виду та родини рослин тису. Найбільше алкалоїдів міститься в *Taxus baccata* та *Taxus cuspidata*. Основними алкалоїдами є таксин А і таксин В. Описано 10 різних алкалоїдів таксину. Раніше, до моменту встановлення хімічної будови алкалоїдів таксину, вважалося, що всі вони мають однакову хімічну структуру. Тому, їх називали таксаном.

За біологічною активністю алкалоїди таксину є кардіотоксинами. Серед них таксин В є найбільш активним. Ці речовини не мають медичного застосування. Тільки, паклітаксел та його хімічні аналоги використовують як хіміотерапевтичні препарати.

Таксини є кардіотоксичними антагоністами кальцієвих і натрієвих каналів. При вживанні внутрішньо листя або насіння тису необхідно звернутися по медичну допомогу. На даний момент не описано антидоти при отруєнні тисом. Для лікування симптомів отруєння використовується атропін. Алкалоїди таксину швидко всмоктуються з кишечника, у великих кількостях можуть спричинити смерть через загальну серцеву недостатність, зупинку серця або дихальну недостатність. Таксини ефективно всмоктуються через шкіру. Листя *Taxus Baccata* містять приблизно 5 мг таксинів на 1 г листя. Мінімальна летальна доза цих алкалоїдів становить приблизно 3,0 мг/кг маси тіла для людини. Різні дослідження показують різну токсичність. Це пов'язано із складністю вимірювання алкалоїдів цього виду. Дослідження токсичності

алкалоїдів таксину показали, що механізм їх дії полягає в втручанні в натрієві та кальцієві канали клітин міокарда, збільшують концентрацію кальцію в цитоплазмі. Механізм подібний до механізму дії верапамілу. Однак, таксини є більш кардіоселективними. Вони зменшують швидкість деполяризації потенціалу дії, що призводить до розвитку брадикардії, гіпотензії, аритмій та інших ускладнень.

Таксани – це хіміопрепарати рослинного походження, які відносяться до протипухлинних лікарських засобів. На сьогодні, в результаті успіху органічного синтезу, отримано достатньо широке коло таксанів синтетичного походження [1-4].

Таксол є протипухлинним лікарським засобом, молекула якого містить як основну матрицю фрагмент дитерпену. Особливість хімічної структури таксолу у тому, що вона складається із тетрациклічної системи – 6-8-6-членний карбоцикл (ABC-кільце), а також конденсованого оксетанового кільця (D-кільце), яке вмонтоване подвійним зв'язком на мостіку, та кількох оксигенвмісних функціональних груп.

Структуровими аналогами таксолу є доцетаксел, тесетаксел, які також, відносяться до хіміотерапевтичних агентів для лікування раку молочної залози та лімфовузлів, пухлин у шлунково-кишковому тракті, колоректального раку[5-8].

Поєднання, з одного боку, складної поліциклічної багатофункціональної хімічної будови та, з другого боку, вираженої біологічної активності перетворюють ці речовини на складні за своїм технологічним рівнем виконання об'єкти, що потребує особливих підходів у хіміко-фармацевтичному аналізі.

За систематичною номенклатурою IUPAC паклітасел має назву 2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-біс(ацетилокси)-13-[(2R,3S)-3-(бензоїламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси).

Доцетаксел називається за IUPAC (2R,3S)-N-(карбокси-3-фенілізосерін-

N-трет-бутил-13-5 β ,20-епокси-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -гексагідрокситакс-11-ен-9-он-4-ацетил-2-бензоату тригідрат.

Молекули таксанів містять асиметричні атоми Карбону, здатні вступати у реакції внутрішньомолекулярної конденсації, тому, можна передбачити присутність у складі фармацевтичних композицій таксанів оптичних ізомерів, продуктів конденсації або, навпаки, продуктів деструкції вихідних молекул, які значно ускладнюють як хіміко-токсикологічний, так, й, фармацевтичний аналіз цих сполук.

Крім перелічених супровідних речовин, фармацевтичні композиції таксанів можуть містити побічні продукти синтезу і, безумовно, неприпустимі домішки, що буде впливати на якість кінцевого продукту синтезу. Лікарські засоби з таксанами у своєму складі виявляють велику кількість небажаних ефектів. Серед них: нейропенія, анемія, ураження імунної та нервової систем, почервоніння шкіри, бронхоспазм, нейросенсорні реакції легенів, крововитоки тощо. Тому, використання сучасних та високоселективних методів аналізу сполук групи таксанів є актуальним, оскільки від якості субстанції, а потім і лікарського засобу, залежать здоров'я і життя онкологічних хворих.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка особливих хроматографічних умов та відповідних методик дослідження методом ВЕРХ залишкового вмісту паклітакселу у складі субстанції, за допомогою чого можна підтвердити не тільки присутність неприпустимих супровідних речовин, але, й, підтвердити відповідність умов хроматографування тим, які не призводять до втрати або деструкції паклітакселу; інтерпретація результатів інструментальних досліджень паклітакселу методом ВЕРХ.

Проаналізував результати хроматографічних досліджень субстанції паклітакселу методом рідинної хроматографії (РХ) по її ідентифікації та визначення специфікованих або/і неспецифікованих домішок, заплановано виконати наступні завдання дослідження:

- підібрати умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції паклітакселу для визначення специфікованих та неспецифікованих домішок;
- розробити методику хроматографічного дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу на присутність специфікованих та неспецифікованих домішок;
- провести хроматографічне дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу за розробленою методикою та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ-детектуванням, УФ-спектрометрія (спектрометр Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC), комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає в імплементації методу ВЕРХ у фармацевтичний аналіз субстанції паклітакселу та таксолівмісних композицій, що надає можливість у майбутньому виконувати контроль якості цих речовин на високому технологічному рівні та отримувати вичерпні і коректні дані щодо присутності неприпустимих супровідних домішок у складі цих речовин.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р.

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 – 27.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ СПОЛУК ГРУПИ ТАКСАНІВ РЕЧОВИН

1.1. Особливості хімічної будови таксанів

За хімічною будовою паклітаксел відноситься до класу дитерпенів, а основу хімічної структури молекули паклітакселу складає таксадієн (за систематичною номенклатурою IUPAC– $2\alpha,4\alpha,5\beta,7\beta,10\beta,13\alpha$)-4,10-біс(ацетилокси)-13-[(2*R*,3*S*)-3-(бензоїламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси) (рис. 1.1.1).

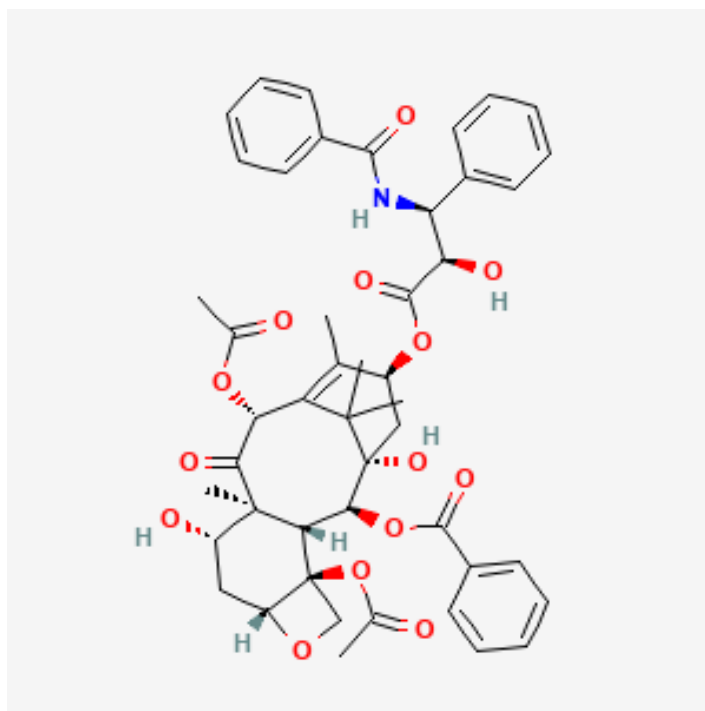


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула сполуки біс(ацетилокси)-13-[(2*R*,3*S*)-3-(бензоїламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси) - паклітакселу.

Однак, таксани представлені не тільки сполуками природного походження, але й синтезована ціла палітра отриманих у лабораторії органічного синтезу сполук цього ряду. Наприклад, таксол, який має наступні структурові особливості: присутність груп –ОН, NH, шестичленний

циклогексеновий цикл з одним подвійним зв'язком (замість п'ятичленного циклу) (рис.1.1.2).

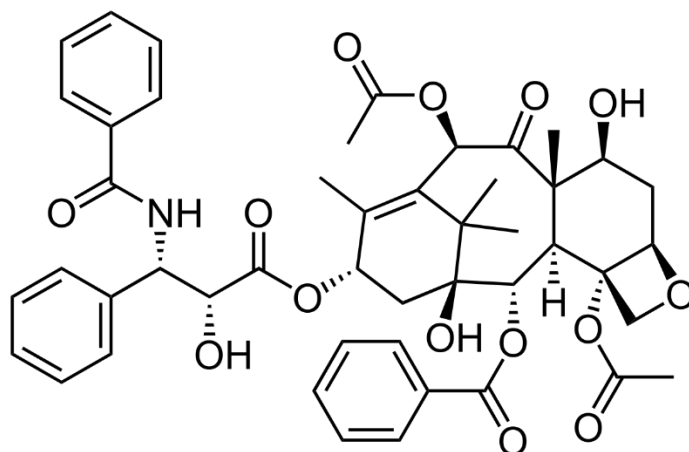


Рисунок 1.1.2. Хімічна формула таксолу.

Таксупін В є сполукою природного походження, яка була ізольована із японського тису *Taxus*. Taxuspine Він демонструє таксолоподібну активність для зменшення CaCl_2 -індукованої деполімеризації мікротрубочок серед таксоїдів. Демонструє слабку цитотоксичність (досліди на мишах, лімфома L1210 (IC_{50} =18 мкг/мл), клітини епідермоїдної карциноми людини з інгібуванням при 10 мкг/мл 42,3% та 11,8% відповідно) [9,10] (рис. 1.1.3).

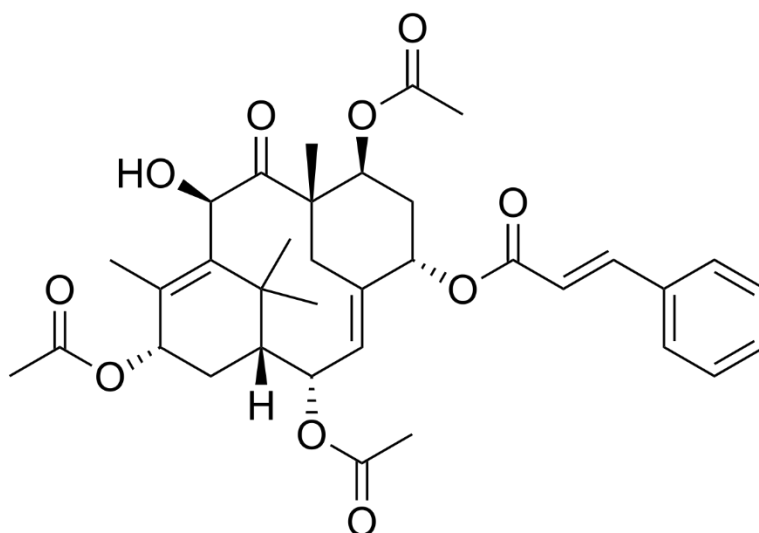


Рисунок 1.1.3. Хімічна формула таксупіну В.

Молекула таксупіну В не містить бензоїламіно групи, а оксетановий цикл

розкрит та переформувався у ацетокси групу.

У молекулі таксупіну А відсутні бензоїламіно групи, оксетановий цикл, а шестичленний циклогексеновий цикл замінено циклопентеновим циклом (рис. 1.1.4)

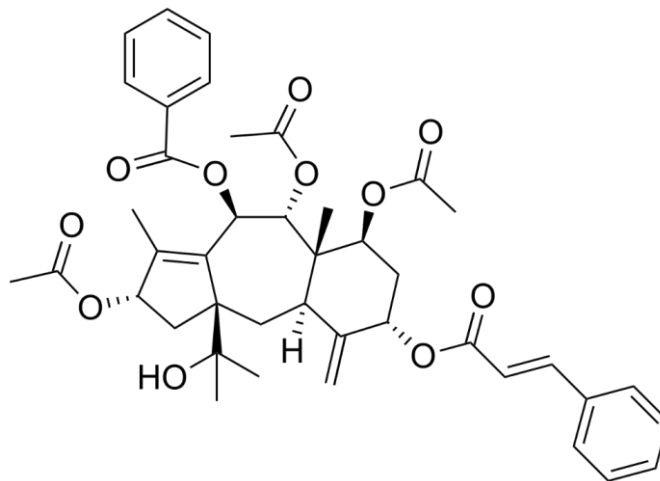


Рисунок 1.1.4. Хімічна формула таксупіну А.

Таксупіни А, В, С мають відмінний від звичайних таксанових дитерпеноїдів скелет (складається з 6/8/6-членної кільцевої системи), виділено, також, разом із відомими таксоїдами зі стовбурів японських тис *Taxus cuspidata*. Їх хімічні структури досліджено завдяки спектральним методам.

Більшість таксоїдів збільшували клітинне накопичення вінкристину в мультирезистентних пухлинних клітинах. Таксол не виявляв такої активності. Таксоїди не показували цитотоксичності або виявили слабку цитотоксичність, Деякі з них помітно зменшували CaCl_2 -індуковану деполімеризацію мікротрубочок.

Можна зробити висновок, що таксоїди можуть бути корисними для подолання лікарської резистентності у пухлинних клітинах.

Протипухлинні препарати таксанового типу – паклітаксел, його напівсинтетичні похідні доцетаксел і кабазитаксел, широко застосовуються для хіміотерапії злоякісних пухлин (рак молочної залози, рак яєчників, недрібноклітинний рак легенів, рак простати).

Клінічне застосування цих препаратів обмежене недостатністю

природних ресурсів (деревина тису), небажаними ефектами та множинною лікарською стійкістю.

Тому, перед розробниками лікарських засобів – таксанів стоїть важливе завдання розробки препаратів цього ряду зі спрощеною структурою, меншою кількістю небажаних ефектів та покращеними фармацевтичними властивостями.

Також, при створенні таких біологічно активних молекул приділяють увагу її дизайну, спрощеному синтезу та підвищеною ефективності біологічній активності паклітаксел-міміків. Такі речовини дуже важливі для досліджень у галузі медичної хімії та онкології.

Якщо зробити порівняльну характеристику хімічних та фармакологічних властивостей трьох найбільш популярних лікарських засобів – паклітакселу, доцетакселу та тесетакселу, можна побачити, вони мають суттєві відмінності у хімічній структурі та у біологічній активності.

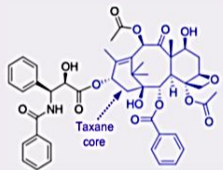
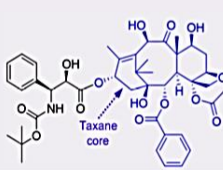
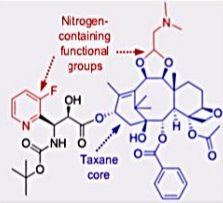
Відомо, паклітаксел та доцетаксел, окрім таксанового ядра, відрізняються кількістю феніл радикалів, кето- і гідрокси- груп.

Тесетаксел містить фармакофорне угруповання у вигляді 5-флуоропіридинового фрагменту та Нітроген-вмісні функціональні групи. Щодо порівняння їх біологічної активності, то паклітаксел і доцетаксел здатні у значній мірі прокачуватися P-gp насосом. Мають біодоступність під час вживання перорально: паклітаксел – 8%, доцетаксел – 18%, тесетаксел – 56%.

Досліджена, також, розчинність цих трьох сполук (мкг/мл): паклітаксел – 0.3, доцетаксел – 0.5, тесетаксел – 41.600. Значення термінального періоду напіввиведення із плазми крові людини ($t_{1/2}$): паклітаксел та доцетаксел – 11 годин, тесетаксел – 193 години (рис.1.1.5).

Chemical and Pharmacologic Properties of Paclitaxel, Docetaxel and Tisetaxel



Molecule	Paclitaxel	Docetaxel	Tisetaxel
Structure			
Substantially effluxed by P-gp pump ^a	Yes	Yes	No
Oral bioavailability in preclinical studies	8% ^b	18% ^c	56%
Solubility ($\mu\text{g/mL}$) ^d	0.3 ^e	0.5 ^f	41,600
Terminal plasma half-life in humans ($t_{1/2}$)	11 hours ^g	11 hours ^h	193 hours ⁱ

^a The P-glycoprotein (P-gp) efflux pump mediates gastric absorption as well as chemotherapy resistance

Рисунок 1.1.5. Порівняльна характеристика деяких хімічних та фармакологічних характеристик препаратів таксолу .

1.2. Біологічна активність таксанів

Біологічна дія таксанів спрямована на функції наступних біологічних мішеней:

- Регуляція цитокінів та вплив на запалювальні процеси, а саме: стратегія потенційної дії на анти-запалення, вплив на: інгібітори цитокінів (TNF α та IL6, в тому числі, талідомід), сполуки природного походження (гінсенозід Rg1 та ресвератрол);
- Стратегія мікротубулярної стабільності та гіпокампального нейрогенезису: потенційної дії як нейропротекторів: інгібіція нуклеотидів фосфодіестерази типу 4-циклічних (наприклад, роліплам), літію;

- Стратегія ендоплазматичного ретикулярного стресу: потенційна стратегія ER-стрес модуляції BiP індуктор X (BIX), флувоксамін. Як результат, ослаблення когнітивних порушень.

В результаті ендоплазматичного ретикулярного стресу та мікротубулярної дисфункції, які розвиваються, відбувається руйнування нейронів, після чого спостерігаються процеси нейрозапалення, абноміального нейрогенезису, апоптоз. Як результат, когнітивні порушення (рис. 1.2.1).

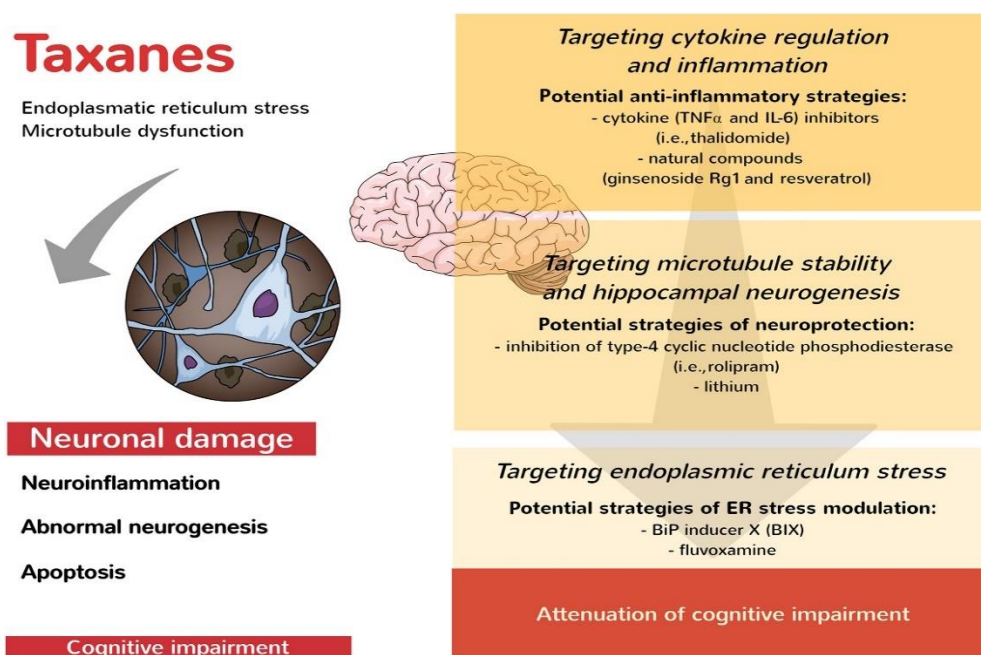


Рисунок 1.2.1. Схема біологічного впливу таксанів.

Таксани відносяться до кращих хемотерапевтичних агентів (за версією МВС). Вони знаходяться серед протипухлинних лікарських засобів першої ланки для пацієнтів із негативним HER2, позитивним HR. За статистичними даним, використання у медичній практиці Паклітакселу становить 14%, Набпаклітакселу – 12%, Доцетакселу – 7%, Паклітакселу + Гемцитабін – 4%. Вцілому, таксани використовуються у 37% випадках лікування протипухлинних захворювань. В той час, як інші хемотерапевтичні агенти

мають застосування у 27% випадків захворювань, Капецитабін – у 35% випадків захворювань, Ерібулін – у 1% випадків захворювань (рис. 1.2.2).

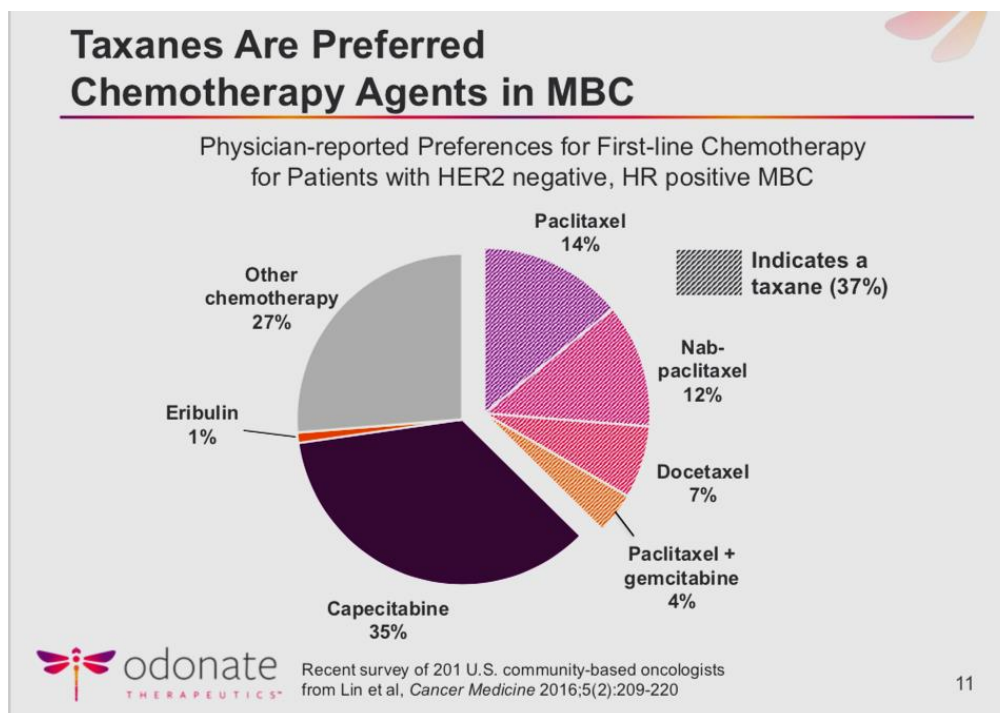


Рисунок 1.2.2. Статистика використання таксанів у порівнянні із іншими хіміотерапевтичними агентами.

За допомогою реакційно-відновлюючих лінкерів були створені наночастинки, які є компонентами нано про-ліквів паклітакселу. Ця розробка виникла у зв'язку із високою експресією GSH та активних форм Оксигену у ракових клітинах. Розроблено та синтезовано декілька димерних нанопроліквів паклітакселу з різними лінкерами, а саме: монотіоефір, дисульфід з метиленовою групою та дисульфід з двома метиленовими групами і естером. Дослідження виконувалися з метою дослідити відмінності в окисно-відновній реакції та протипухлинній здатності. Виявлено, що монотіоестерний зв'язок з одним метиленом є найбільш чутливим до відновлення. Дисульфідний зв'язок з одним метиленом є найбільш чутливим до окислення. Чутливість до окисно-відновної відповіді пов'язана не тільки із окислювально-відновним зв'язком, але й з довжиною карбонового ланцюгу. Це має вплив на процес вивільнення ліків, їх цитотоксичність та протипухлинну здатність [9-12].

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ТАКСАНІВ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості таксанів

Таксол отримують дивергентним синтетичним методом, який побудовано на основі біосинтетичної техніки для синтезу терпенів (рис. 2.1.1).

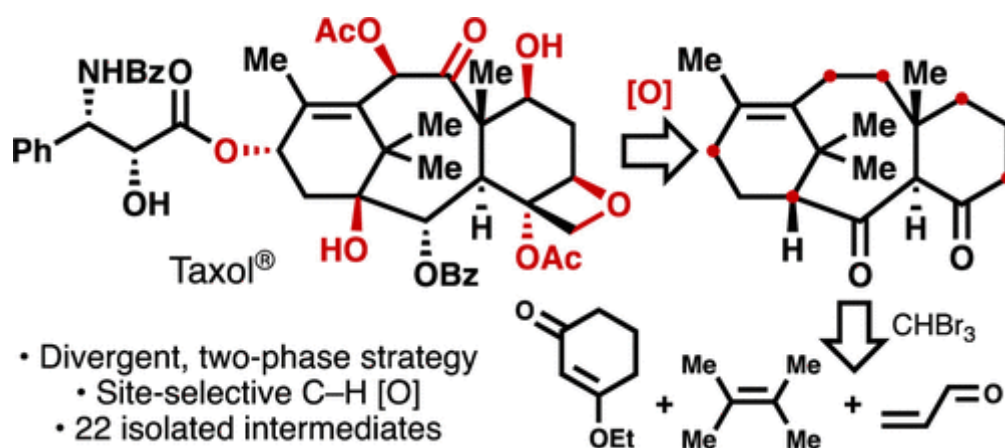


Рисунок 2.1.1. Схема двох-фазового синтезу таксолу.

Всі реакції виконують в атмосфері інертного Аргону, використовуючи просушені розчинники. Сухий ацетонітрил, дихлоретан, ТГФ, діетиловий етер, толуен, ДМФА та бензен попередньо проганяють через алюмінієву колонку з дегазованими наповнювачами. Проходження реакцій контролювали за допомогою методу ТШХ, на пластинці силікагелю Merck 60F254, використовуючи УФ-опромінення як агент візуалізації, фосфор-молібденову кислоту та $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, кислий етановий анісальдегід, калію перманганат. Для ідентифікації структури синтезованих таксолів використовували запис ЯМР спектрів і метод мас-спектрометрії [13-16].

Баран метод синтезу таксолу (сполука 2) [17] базується на двох стадійних перетвореннях. На першій стадії відбувається окислення. Реакція розпочалася з хімічного перетворення комерційного вінілового ефіру (сполука 3). Потім проводили реакцію Міхаеля вінілмагнію броміду з наступним

гідролізом, що призвело до утворення дієнону (сполука 5). 1,6-циклоприєднання у присутності солей купруму алкеніллїтію призводить до перетворення сполуки 6 у сполуку 7. Енантіоселективне додавання кон'югату CH_3MgBr з подальшою циклізацією з акролеїном призводить до утворення відповідного діону (сполуки 8). Внутрішньомолекулярне циклоприєднання за Дільсом-Альдером дозволяє завершити циклізацію трициклічного продукту (рис. 2.1.2).

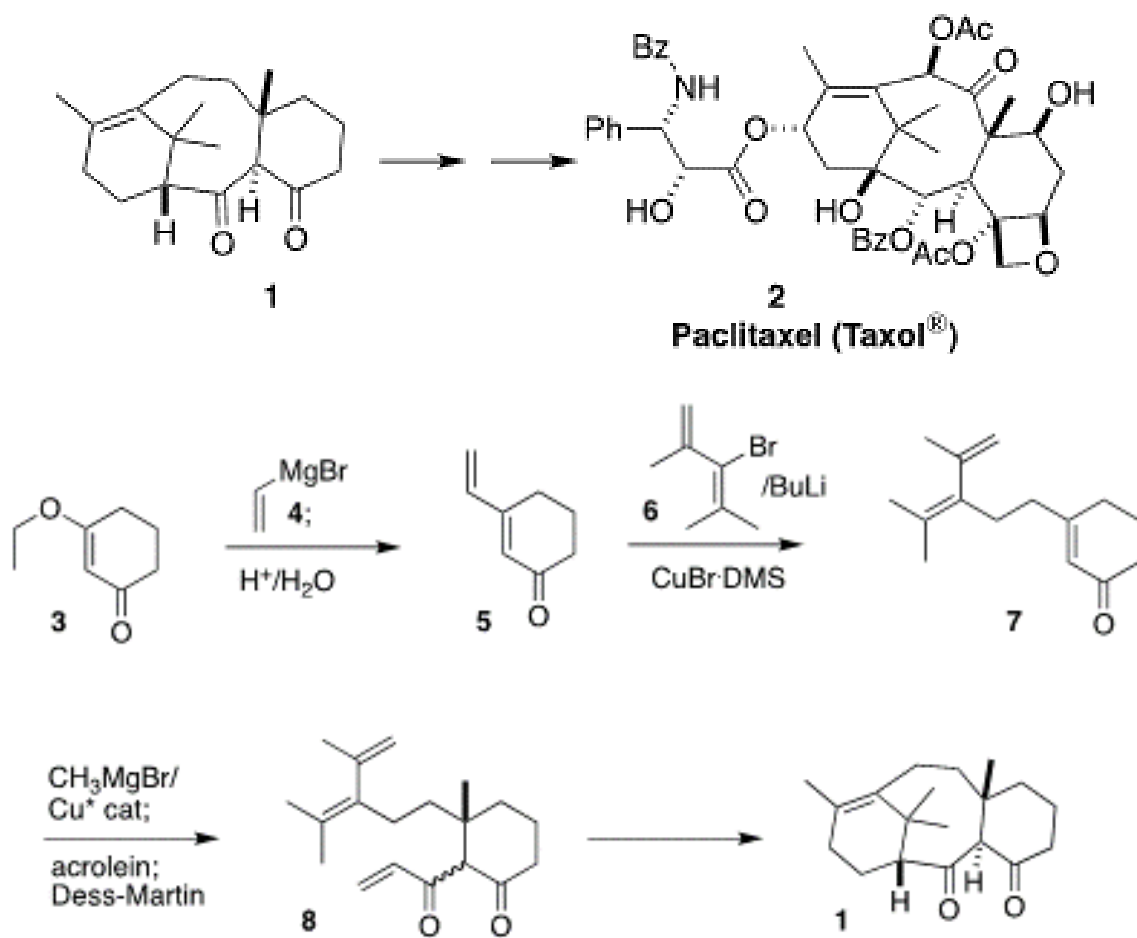


Рисунок 2.1.2. Схема двох стадійного синтезу таксолу (Баран метод).

Велика кількість хімічних перетворень призвела до синтезу сполуки 2 із сполуки 1. Першими кроками були алільне окислення з утворенням сполуки 9, а потім селективне бромовання – утворення сполуки 10.

Алілове бромовання з наступною Ag -каталітичною іонізацією та зв'язуванням з триетилсиланалом дало утворення сполуки 11 (рис. 2.1.3).

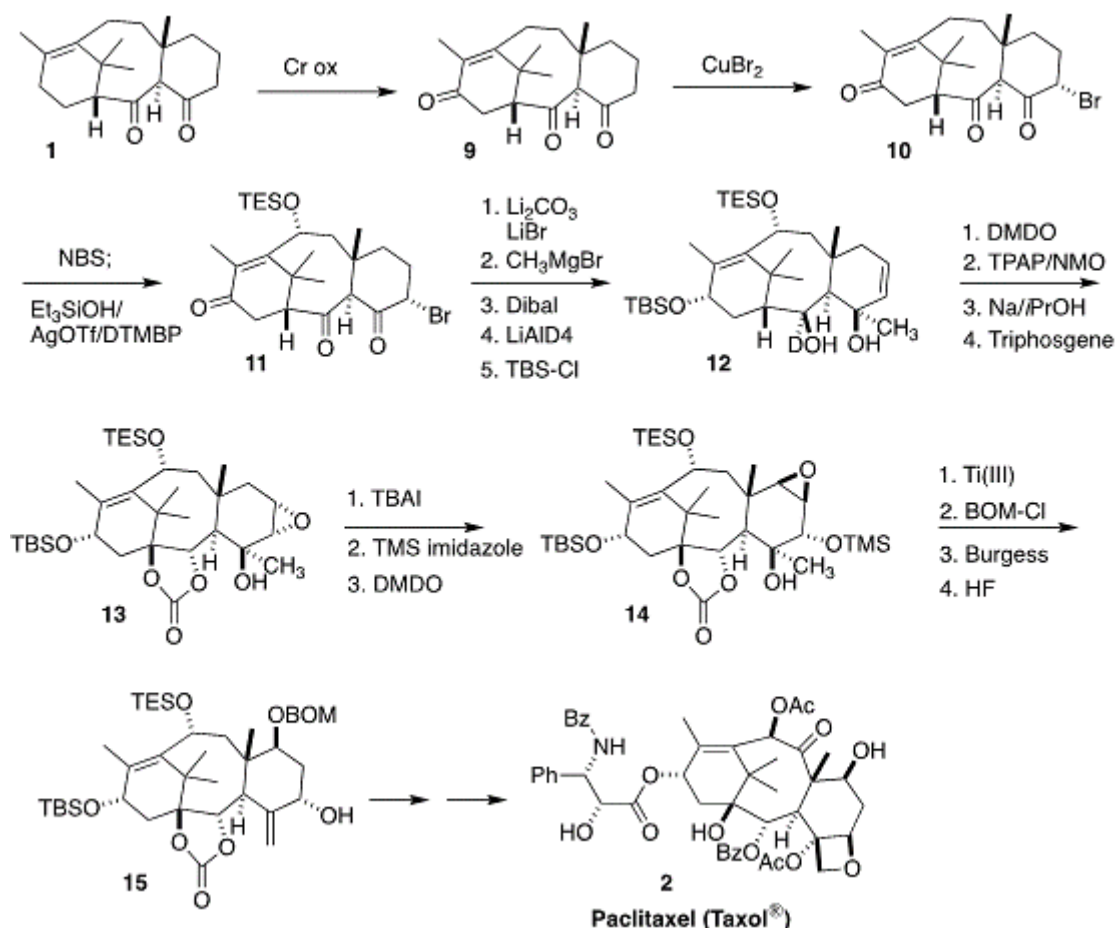


Рисунок 2.1.3. Схема стадій синтезу таксолу.

Елімінація броміду призвело до утворення енону. Додаванням броміду метилмагнію отримали аліловий спирт, який спочатку відновлювали за допомогою Dibal, потім за допомогою дейтериду літію та алюмінію. Дейтерований спирт (сполука 12) був стійким до окислення.

Епоксидуванням DMDO з наступним відновленням і захистом призвело до утворення карбонату (сполука 13), який обробляли йодидом, видаляли та епоксидували для отримання сполуки 14. Регіоселективне відновлення, захист і дегідратація завершили утворення сполуки 15.

Синтез Накада. Синтез таксолу був здійснений з циклічним карбонатом (сполука 4), проміжним продуктом у синтезі Ніколау. Реакція проходила до утворення кетону (сполука 5). Зв'язок C10-C11 утворювався внутрішньомолекулярним алкенілюванням (сполука 6), яке каталізувалося Pd.

Утворення зв'язку C2-C3 відбувалося шляхом додавання вініллітію, отриманого зі сполуки 9 реакцією з альдегідом 8. Обидва оптично активні сполуки 8 і 9 створені шляхом десиметризації 2,2-дизаміщених-1,3-циклогексанионів [18-25] (рис. 2.1.4).

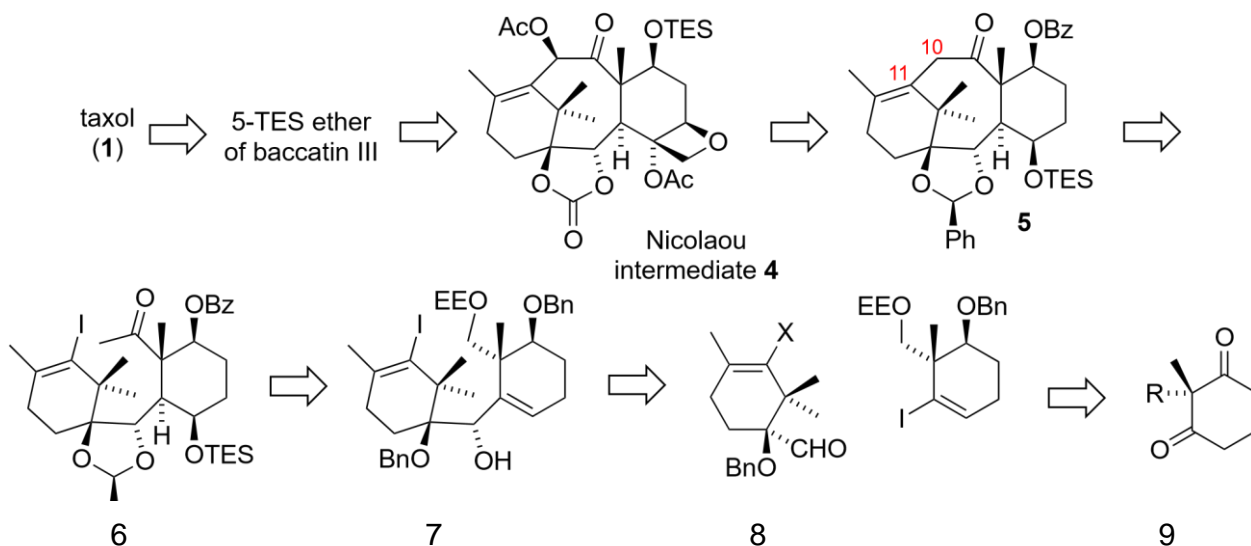


Рисунок 2.1.4. Ретросинтетичний аналіз таксолу (Накада синтез).

Мас-спектр таксеспіну має наступні сигнали:

InChI=1S/C42H48O11/c1-24-31-22-42(40(6,7)48)23-33(49-26(3)43)25(2)36(42)37(53-39(47)30-17-13-10-14-18-30)38(51-28(5)45)41(31,8)34(50-27(4)44)21-32(24)52-35(46)20-19-29-15-11-9-12-16-29/h9-20,31-34,37-38,48H,1,21-23H2,2-8H3/b20-19+/t31-,32+,33+,34+,37-,38+,41+,42+/m1/s1.

ІЧ-спектр таксолу.

ІЧ-спектр таксолу (субстанції) містить нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності деформаційних коливань δ_{NH} при 1600 cm^{-1} , характеристичні смуги валентних коливань $\nu_{C=O}$ при 1715 cm^{-1} , смуги деформаційних коливань δ_{NH_2} спостерігаються при $3500\text{-}3625\text{ cm}^{-1}$.

Про присутність подвійних -C=C- зв'язків у циклічних системах свідчать характеристичні смуги $\nu_{\text{C=C}}$ при $3000\text{-}3100\text{ см}^{-1}$, а деформаційні коливання -C=C- зв'язків $\delta_{\text{C=C}}$ при $650\text{-}750\text{ см}^{-1}$ для цис-ізомерів та при $960\text{-}970\text{ см}^{-1}$ для транс-ізомерів.

Валентні коливання C-C- зв'язків бензенового ядра дають смуги помірної інтенсивності при $1585\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ та $1400\text{-}1500\text{ см}^{-1}$. Їх незручно ідентифікувати, оскільки ця область близька до коливань C=C зв'язків. Коливання $\nu_{\text{C-H}}$ аренів лежать в області при $3020\text{-}3100\text{ см}^{-1}$ та зазвичай вони проявляються у виді групи смужок середньої інтенсивності. В ІЧ-спектрі присутні інтенсивні смуги непласких деформаційних коливань C-H в області $650\text{-}900\text{ см}^{-1}$. У разі відсутності сильних смуг у цій області можна говорити про відсутність ароматичного ядра. Валентні коливання групи -COOH представлено сукупністю коливань кето- та гідрокси-груп при $1750\text{-}1770\text{ см}^{-1}$, якщо відсутні водневі зв'язки (рис. 2.1.5).

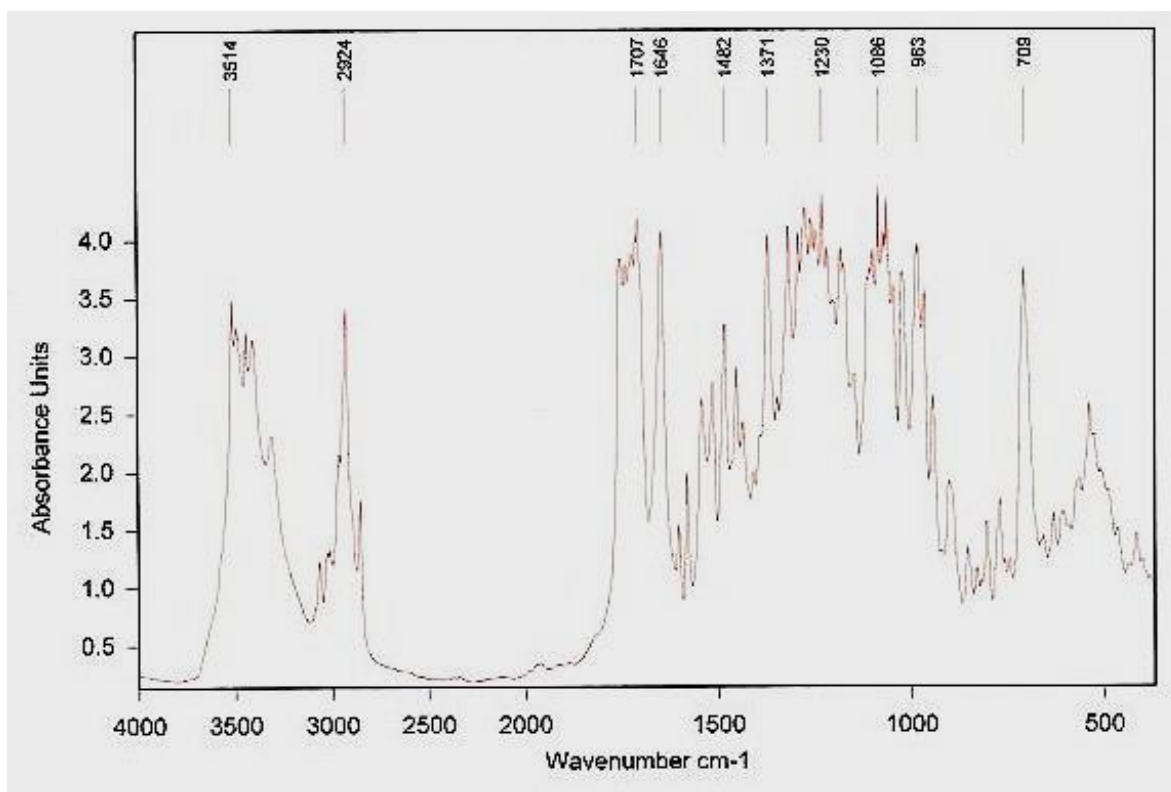


Рисунок 2.1.5. ІЧ-спектр таксолу.

На рисунку 2.1.6 представлено ПМР-спектри таксолів.

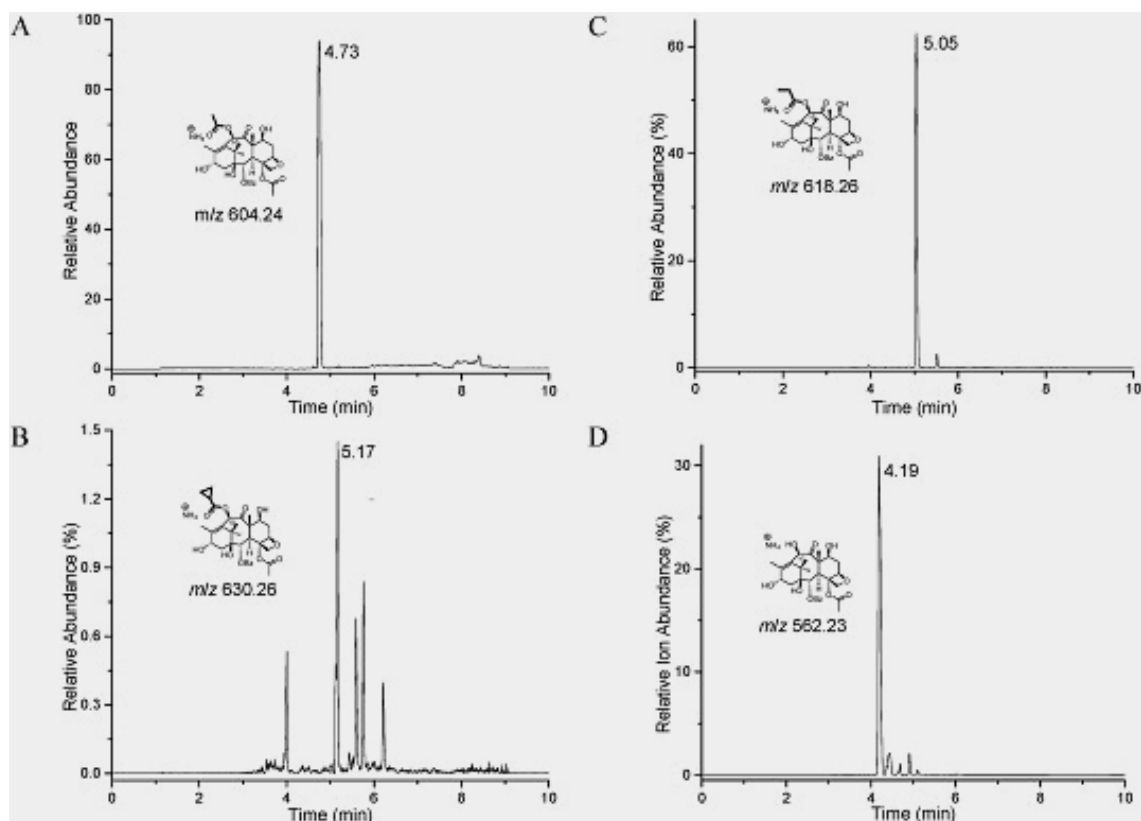


Рисунок 2.1.6. ПМР-спектр таксолів.

Субстанція синтезованого паклітакселу широко використовується у якості активної діючої речовини протипухлинних лікарських засобів.

Державна Фармакопея України не регламентує [26] аналіз паклітакселу, однак, стандартизовані методи аналізу цієї речовини описано у Європейській Фармакопеї [27].

Eur.Ph. регламентує методи аналізу чистоти субстанції паклітакселу та вміст споріднених речовин і домішок. Методи дослідження розроблено з урахуванням природи отриманого паклітакселу – ізольованого із природних джерел або отриманого ферментацією або напів-синтетичного процесу отримання.

Паклітаксел – речовина білого або майже білого кольору, кристалічний порошок, який має різну розчинність: не розчинний у воді, розчинний у метанолі та добре розчинний у метиленхлориді. Ідентифікація проводиться за визначенням показника специфічного оптичного обертання та за ІЧ-спектром.

Порівняння проводиться з паклітакселем CRS.

Визначення показнику специфічного оптичного обертання виконується за монографією 2.2.7 для безводної субстанції. Значення повинно знаходитися у межах 55.0-49.0. Для дослідження субстанцію розчиняють у метанолі.

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ), (2.2.29). Тестові та референтні розчини паклітакселу готують у ацетонітрилі. Детектування виконується УФ-спектрофотометрично при 227 нм.

Мобільна фаза А готується із: метанолу R1, води для хроматографування R (20:80, V/V). Мобільна фаза В готується із: метанолу R1, ацетонітрилу для хроматографування R (20:80, V/V).

Паклітаксел, отриманий із натуральних джерел або ферментацією. Допускається 11 супровідних речовин: А, В, С, D, Е, F, H, O, P, Q та R.

Для специфікованих та неспецифікованих домішок паклітакселу встановлюються лімітовані кількості: Е, R – 0.5%; А, В – 0.4%; С – 0.3%; D, P, Q – 0.2%; F – 0.1. Для неспецифікованих домішок встановлено ліміт 0.10%. Всього допускається присутність домішок не більше, ніж 1.5%.

Паклітаксел, отриманий напів-синтетичним методом. Для специфікованих та неспецифікованих домішок такого паклітакселу встановлюються інші лімітовані кількості: А – 0.7%; L – 0.5%; Е – 0.4%; H, J, M – 0.4%. При чому, до специфікованих домішок відносяться 10 домішок – А, В, С, D, Е, F, O, P, O та R.

Серед супровідних домішок, часто виявляються, необхідно вказати: домішку А – (2,О-дебензоїл-2-О-тиглоїд-паклітаксел), домішку В – цефаломаннін, домішку С – паклітаксел С, домішку D – 7-епі-цефаломаннін, домішку Е – 7-епі-паклітаксел. В цілому, супровідні речовини представлено заміщеними цефаломаніннами або паклітакселеми –діацетил-, ацетил- та інші форми модифікації, які утворюються під час синтезу або деструкції вихідних молекул.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Проведено експериментальне дослідження методом ВЕРХ, який раніше не описано в літературі для паклітакселу субстанції, щодо залишкового вмісту паклітакселу.

Матеріали та методи.

Дослідження проводили на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором.

Нами розроблено нові умови хроматографування в умовах ВЕРХ аналізу. Використовували колонку – XTerra RP18, 150x4,6x3. Час хроматографування – 76 хв. Проводили УФ-детектування при 227 нм.

Крім того, використовували наступні параметри хроматографування:

- температура колонки – 35°C;
- температура зразка – кімнатна;
- потік – 1,2 мл/хв;
- об'єм інжекції – 20 мкл.

Рухому фазу А готували із суміші ацетонітрил-вода у співвідношенні 2:3.

Рухому фазу В готували тільки із ацетонітрилу.

Розведення рухомої фази А та рухомої фази В, а також, градієнти представлено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Градієнти та їх розведення.

Час	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0	100	0
26	100	0
66	17	83
67	100	0
75	100	0

Методика приготування розчину порівняння.

Приготування розчину порівняння – розчиняють в ацетонітрилі фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України паклітакселу та фармакопейний стандартний зразок Державної фармакопеї України паклітакселу супровідної домішки В з концентраціями 1,2 мг/мл та 0,006 мг/мл, відповідно.

Методика приготування випробувального розчину

Приготування випробувального розчину – розчиняють в ацетонітрилі субстанцію в концентрації 1,2 мг/мл паклітакселу

Комп'ютерний аналіз отриманих результатів виконували за допомогою програми OpenLab CDS.

Реактиви для визначення сторонніх домішок:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- вода (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати:

При дослідженні стандартних зразків паклітакселу +домішка В отримано наступні результати (табл. 3.2).

Стандартні зразки: Паклітаксел, домішка В

Паклітаксел (Стандарт)

- значення R_t знаходиться в інтервалі 19,745-19,795 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 19,771 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,019 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,09%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 18784,383-18847,305;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 18817,182;
- RSD не перевищує 2%: 0,12%.

Домішка В (Стандарт)

- значення R_t знаходиться в інтервалі 16,010-16,051 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 16,031 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,016 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 42,691-42,962;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 42,815;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Таблиця 3.2. Хроматографічні характеристики стандартних речовин паклітакселу та домішки В (ВЕРХ) - значення, середні значення R_t , площини піку, RSD.

	<i>Стандарний розчин</i>				
	<i>Домішка В</i>		<i>Паклітаксел</i>		<i>R</i> (≥ 1.2)
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	
	16,010	42,730	19,745	18784,383	4,0
	16,018	42,962	19,757	18802,191	4,0
	16,026	42,770	19,767	18817,055	4,0
	16,034	42,863	19,776	18814,965	4,0
	16,045	42,691	19,787	18837,192	4,0
	16,051	42,875	19,795	18847,305	4,0
Середнє	16,031	42,815	19,771	18817,182	4,0
SD	0,016	0,102	0,019	22,861	
RSD($\leq 2.0\%$)	0,10%	0,24%	0,09%	0,12%	

Досліджуваний зразок: Паклітаксел (табл. 3.3).

Паклітаксел

- значення R_t знаходиться в інтервалі 21,209-21,292 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 21,249 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,083 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,09%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 19308,740-19459,273;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 19459,273;
- RSD не перевищує 2%: 0,12%.

Домішка Баккатин III

- значення R_t знаходиться в інтервалі 4,042-4,048 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 4,046 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,006 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 51,261-51,710;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 51,437;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка Етиловий етер

- значення R_t знаходиться в інтервалі 4,470-4,477 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 4,474 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,007 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 34,052-34,389;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 34,182;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка 10-Деацетил-наклітаксел

- значення Rt знаходиться в інтервалі 12,399-12,427 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 12,412 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,028 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 15,171-15,216;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 15,188;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка 7-Епі-наклітаксел

- значення Rt знаходиться в інтервалі 35,119-35,203 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 35,160 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,084 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 14,700-16,751;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 15,732;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка I

- значення Rt знаходиться в інтервалі 9,892-9,910 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 9,902 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,018 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 10,252-10,934;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 10,564;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка II

- значення Rt знаходиться в інтервалі 23,048-23,115 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 23,077 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,067 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 25,871-27,637;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 26,805;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Домішка III

- значення Rt знаходиться в інтервалі 37,867-37,945 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 37,915 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,078 хв.;
- RSD не перевищує 2%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 43,506-46,335;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 45,217;
- RSD не перевищує 2%: 0,24%.

Таким чином, під час дослідження методом ВЕРХ стандартного зразку паклітакселу виявлено домішку В.

Під час дослідження методом ВЕРХ наданого на дослідження зразку паклітакселу виявлено: паклітаксел, 4 домішки супутніх речовин - *Домішка Баккатин III*, *Домішка Етиловий етер*, *Домішка 10-Деацетил-паклітаксел*, *Домішка 7-Епі-паклітаксел*; 3 неспецифіковані домішки – *Домішка I*, *Домішка II*, *Домішка III*.

Таблиця 3.3. Хроматографічні характеристики досліджуваної речовини паклітакселу, супутніх речовин, неспецифікованих домішок (ВЕРХ) - значення, середні значення R_t , площини піку, RSD.

	Зразок														
	баккатин III		етиловий ефір б.л.		домішка 1		10-деацетил-паклітаксел		паклітаксел		домішка 2		7-епіпаклітаксел		домішка
	R_t	Area	R_t	Area	R_t	Area	R_t	Area	R_t	Area	R_t	Area	R_t	Area	R_t
	4,048	51,341	4,477	34,104	9,910	10,934	12,427	15,216	21,292	19308,740	23,115	25,871	35,203	14,744	37,945
	4,047	51,710	4,474	34,389	9,905	10,506	12,411	15,171	21,245	19459,273	23,067	26,907	35,159	16,751	37,933
	4,042	51,261	4,470	34,052	9,892	10,252	12,399	15,178	21,209	19341,489	23,048	27,637	35,119	15,700	37,867
Середнє	4,046	51,437	4,474	34,182	9,902	10,564	12,412	15,188	21,249	19369,834	23,077	26,805	35,160	15,732	37,915

Записано відповідні хроматограми (рис. 3.1, 3.2).

На рисунку 3.1 представлено хроматограму досліджуваного стандартного зразку паклітакселу субстанції ($R_t=19,745$) та специфікованої домішки В – 10-деацетил-7-епі-паклітаксел ($R_t=16,010$), отриману методом ВЕРХ.

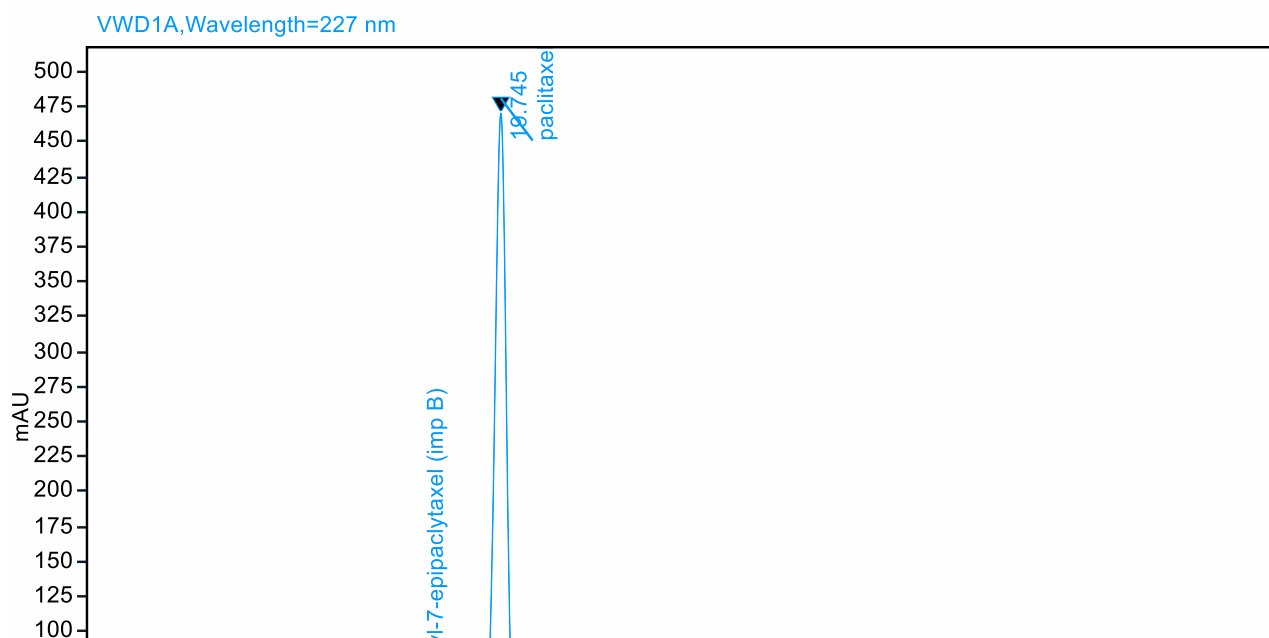


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку паклітакселу ($R_t=19,745$), домішка В – 10-деацетил-7-епі-паклітаксел ($R_t=16,010$).

На рисунку 3.2 представлено хроматограму досліджуваного зразку паклітакселу субстанції ($R_t=21,245$),

4-х супутніх речовин:

- Домішка Баккатин III ($R_t=4,047$),
- Домішка Етиловий етер ($R_t=4,474$),
- Домішка 10-Деацетил-паклітаксел ($R_t=12,411$),
- Домішка 7-Епі-паклітаксел ($R_t=35,159$);

3-х неспецифіковані домішки:

- Домішка I ($R_t=9,905$),
- Домішка II ($R_t=23,067$),
- Домішка III ($R_t=37,933$).

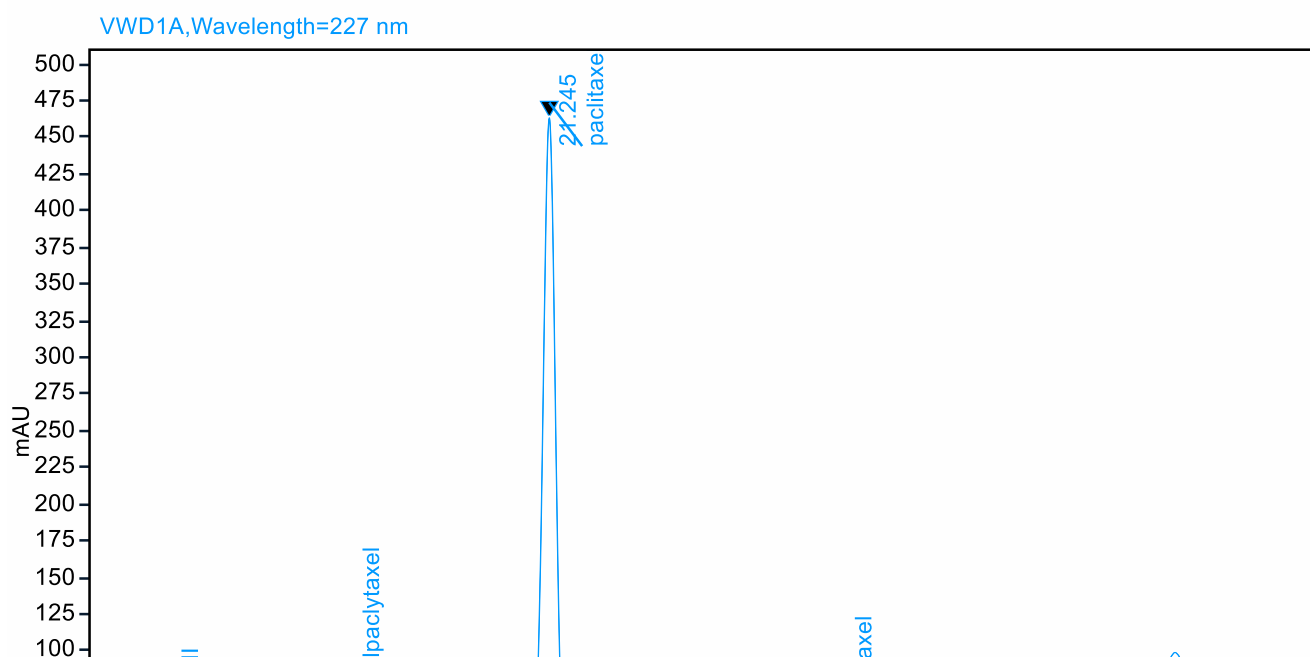


Рисунок 3.2. Хроматограма досліджуваного зразку паклітакселу ($R_t=21,245$), супутніх речовин: Домішка Баккатин III ($R_t=4,047$), Домішка Етиловий етер ($R_t=4,474$), Домішка 10-Деацетил-паклітаксел ($R_t=12,411$), Домішка 7-Епі-паклітаксел ($R_t=35,159$); неспецифіковані домішки: Домішка I ($R_t=9,905$), Домішка II ($R_t=23,067$), Домішка III ($R_t=37,933$).

УФ-спектр поглинання досліджуваного зразку субстанції паклітакселу, 20 мг/л (у метанолі) (спектрометр Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC) представлено на рисунку 3.3.

УФ-спектр субстанції паклітакселу має три максимуми поглинання $\lambda = 268, 279, 350$ нм (Clark, A 1%, 1 cm=250, 285).

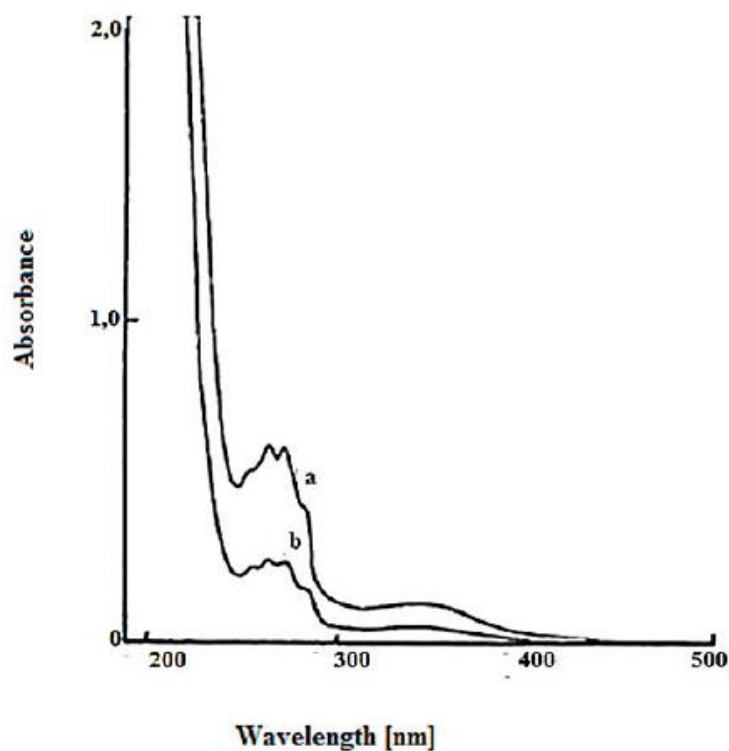


Рисунок 3.3. УФ-спектр паклітакселу субстанції.

Зміщення сигналів на УФ-спектрі доводить присутність у складі субстанції супровідних речовин та неспецифікованих домішок, які було виявлено під час хроматографування методом ВЕРХ.

Необхідно відмітити, що досліджуваний зразок субстанції паклітакселу не містить специфіковані домішки D, E, F, H, O, P, Q, R.

Субстанція містить не регламентовані Європейською Фармакопеею супутні речовини: *Домішка Баккатин III* (Rt=4,047), *Домішка Етиловий етер* (Rt=4,474), *Домішка 10-Деацетил-паклітаксел* (Rt=12,411), *Домішка 7-Епі-паклітаксел* (Rt=35,159) та неспецифіковані домішки: *Домішка I* (Rt=9,905), *Домішка II* (Rt=23,067), *Домішка III* (Rt=37,933).

Отримані результати дозволяють зробити висновок щодо ступеню очистки субстанції паклітакселу та готовності її використання для подальших технологічних процедур.

Необхідно звернути увагу на те, що речовини, які досліджуються у складі субстанцій розподіляються на:

- споріднені речовини (хімічно споріднені, які здатні між собою реагувати);
- супровідні або супутні речовини (фармакологічно індеферентні речовини);
- домішки (які потрапляють у субстанцію з навколишнього середовища, з вихідної сировини, реактиви тощо);
- домішки-енантіомери (особливості просторового розташування, оптичні ізомери), які супроводжують лікарські субстанції.

Домішки класифікують на ідентифіковані або неідентифіковані

- *специфіковані (технологічні)* – вказані у специфікації продукти розкладу лікарської субстанції, при зберіганні (сумарний вміст не перевищує 2%, ДФУ, Eur.Ph);
- *неспецифіковані домішки* (продукти розкладу) – установлюють межі в специфікації, однак не указують окремо з установленням спеціальних критеріїв прийнятності.

Сумарний вміст супутніх домішок не повинен перевищувати 2%. Якщо концентрація домішок перевищує 0,1%, то їх необхідно ідентифікувати. Контроль виконують за розділом «супутні домішки» (АНД) із зазначенням структурних та молекулярних формул і мас.

Монографія має тест «Конкретно зазначувані домішки», за яким контролюють високотоксичні домішки, якщо такі присутні.

Супровідні домішки досліджують хроматографічними методами, спектральними методами.

Виробники лікарської субстанції повинні обґрунтовувати вміст

домішок, наводячи фармакологічні або токсикологічні дані. Якщо субстанція містить її антагоністи, то це вважається неприпустимим, а домішки називають неприпустимими.

Метод регламентованого контролю неспецифічних домішок називають граничним вмістом домішок у лікарських субстанціях. Для виконання граничного вмісту домішок вибирають контрольовані катіони та аніони. Такий вибір обґрунтовується технологічним процесом. Контроль катіонів та аніонів, які входять до складу діючої речовини, не здійснюють. Коцентрацію розчинів або кількість речовини для випробувань зазначають у монографії на лікарську субстанцію. Результат методу випробування на домішки оцінюють порівняно з еталонними розчинами, наведеними у ДФУ.

Якщо порівняти хроматографічні показники паклітакселу субстанції стандарту та паклітакселу субстанції досліджуваної, то можна побачити деякі відмінності:

<i>Паклітаксел (Стандарт)</i>	<i>Паклітаксел</i>
значення R_t знаходиться в інтервалі 19,745-19,795 хв;	значення R_t знаходиться в інтервалі 21,209-21,292 хв;
середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 19,771 хв;	середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 21,249 хв;
середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,019 хв.;	середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,083 хв.;
RSD не перевищує 2%: 0,09%;	RSD не перевищує 2%: 0,09%;
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 18784,383-18847,305;	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 19308,740-19459,273;
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 18817,182;	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 19459,273;
RSD не перевищує 2%: 0,12%.	RSD не перевищує 2%: 0,12%.

Значення R_t стандарту знаходиться в інтервалі **19,745-19,795 хв** – у досліджуваного зразку значення R_t зміщується у інтервал **21,209-21,292 хв**.

Відповідно відбувається зміщення середнього значення R_t стандарту з **19,771 хв** до **21,249 хв** (випробуваного зразку).

Значення площини піку на хроматограмі стандарту коливається в інтервалі **18784,383-18847,305**, значення площини піку досліджуваного зразку на хроматограмі зміщується у інтервал **19308,740-19459,273**.

Відповідно відбувається зміщення середнього значення площини піку стандарту з **18817,182** до **19459,273** (випробуваного зразку).

Зміна цих параметрів вказує на присутність недопустимих супровідних речовин та неспецифікованих неприпустимих домішок у складі досліджуваної субстанції.

Завдяки високотехнологічному методу ВЕРХ при фармацевтичному аналізі субстанції паклітакселу – речовини складної поліциклічної структури з набором фармакофорних угруповань та активних донорно-акцепторних і водневих зв'язків, молекула якої у часі постійно займає таутомерні модифікації та існує у формі оптичних ізомерів, вдалося виявити супровідні речовини у кількості 4-з та 3 неспецифіковані домішки, які, досить, важко виявляються при рідинній хроматографії.

Метод ВЕРХ посідає важливе місце для дослідження ступеню якості фармацевтичних композицій. Метод має значні переваги над іншими інструментальними методами. Дослідження є точними, швидко виконуються, дозволяють ретельний аналіз хімічної суміші.

ВИСНОВКИ

1. Підбрано умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу для визначення специфікованих та неспецифікованих домішок, а також, супровідних речовин, а саме: рухому фазу А: з суміш ацетонітрил-вода у співвідношенні 2:3; рухому фазу В: ацетонітрил.
2. Розроблено методику хроматографування методом ВЕРХ, методики приготування випробувальних розчинів субстанції паклітакселу.
3. Проведене хроматографічне дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу показало, що досліджувана субстанція містить не регламентовані Європейською Фармакопеею 4 супутні речовини: *Домішка Баккатин III* ($R_t=4,047$), *Домішка Етиловий етер* ($R_t=4,474$), *Домішка 10-Деацетил-паклітаксел* ($R_t=12,411$), *Домішка 7-Епі-паклітаксел* ($R_t=35,159$) та 3 неспецифіковані домішки: *Домішка I* ($R_t=9,905$), *Домішка II* ($R_t=23,067$), *Домішка III* ($R_t=37,933$), що викликає сумніви щодо ступеню очистки досліджуваної субстанції.

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. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. (2004). Ed. by R.J. Lewis. — 11th edn. — New York.
3. Takahiro Watanabe, Kyohei Oga, Hiroaki Matoba, Masanori Nagatomo, Masayuki Inoue. Total Synthesis of Taxol Enabled by Intermolecular Radical Coupling and Pd-Catalyzed Cyclization. *Journal of the American Chemical Society*. 2023, 145 (47), 25894-25902. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c10658>
4. Xiao Han, Kun Liu, Anran Fu, Zongchen Ma, Zhe Wang, Xiaolei Li, Xuli Tang, Dahai Zhang, Guoqiang Li. Heterolactone and Heterolactams A–M, Verticillane Diterpenoids with Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Activities from the Soft Coral *Heteroxenia ghardaqensis*. *Journal of Natural Products*. 2023, 86 (9), 2131-2138. Long Min, Jing-Chun Han, Wen Zhang, Chen-Chen Gu, Yun-Peng Zou, Chuang-Chuang Li. Strategies and Lessons Learned from Total Synthesis of Taxol. *Chemical Reviews*. 2023, 123 (8) , 4934-4971. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00763>
5. Melecio A. Perea, Brian Wang, Benjamin C. Wyler, Jin Su Ham, Nicholas R. O'Connor, Shota Nagasawa, Yuto Kimura, Carolin Manske, Maximilian Scherübl, Johnny M. Nguyen, Richmond Sarpong. General Synthetic Approach to Diverse Taxane Cores. *Journal of the American Chemical Society*. 2022, 144 (46) , 21398-21407. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10272>
6. Zhao Wang, Meiyu Cui, Biao Ma, Lei Yang, Yingli Yu, Haiyan Cui, Dongri Jin, Haibo Shang, Donghao Li. Rapid and One-Step Screening of Taxane

- Compounds by a Two-Dimensional Carbon Microfiber Fractionation System Combined with Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022, 70 (15), 4774-4782. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00573>
7. Shota Iiyama, Keisuke Fukaya, Yu Yamaguchi, Ami Watanabe, Hiroaki Yamamoto, Shota Mochizuki, Ryosuke Saio, Takashi Noguchi, Takeshi Oishi, Takaaki Sato, Noritaka Chida. Total Synthesis of Paclitaxel. *Organic Letters*. 2022, 24 (1), 202-206. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c03851>
 8. Jian Wang, Qing Pei, Rui Xia, Shi Liu, Xiuli Hu, Zhigang Xie, Xiabin Jing. Comparison of Redox Responsiveness and Antitumor Capability of Paclitaxel Dimeric Nanoparticles with Different Linkers. *Chemistry of Materials* 2020, 32 (24), 10719-10727. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c04080>
 9. Michał Łomzik, Muhammad Hanif, Aleksandra Budniok, Andrzej Błaż, Anna Makal, Daniel M. Tchoń, Barbara Leśniewska, Kelvin K. H. Tong, Sanam Movassaghi, Tilo Söhnle, Stephen M. F. Jamieson, Ayesha Zafar, Jóhannes Reynisson, Błażej Rychlik, Christian G. Hartinger, Damian Plażuk. Metal-Dependent Cytotoxic and Kinesin Spindle Protein Inhibitory Activity of Ru, Os, Rh, and Ir Half-Sandwich Complexes of Ispinesib-Derived Ligands. *Inorganic Chemistry*. 2020, 59 (20), 14879-14890. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00957>
 10. Meili Shen, Hui Jiang, Yan Zhao, Liangqiang Wu, Haiqin Yang, Yixuan Yao, Hao Meng, Qingbiao Yang, Linlin Liu, Yapeng Li. Shear Stress and ROS Dual-Responsive RBC-Hitchhiking Nanoparticles for Atherosclerosis Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2023**, 15 (37), 43374-43386. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c07371>
 11. Dengyuan Hao, Qian Meng, Chaonan Li, Shaojin Lu, Xiujuan Xiang, Qing Pei, Xiabin Jing, Zhigang Xie. A Paclitaxel Prodrug with Copper Depletion

- for Combined Therapy toward Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Nano* **2023**, *17* (13), 1238312393. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c01792>
12. Ya-Jian Hu, Chen-Chen Gu, Xin-Feng Wang, Long Min, Chuang-Chuang Li. Asymmetric Total Synthesis of Taxol. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143* (42), 17862-17870. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c09637>
13. Fabian Schneider, Lu Pan, Moritz Ottenbruch, Tatjana List, Tanja Gaich. The Chemistry of Nonclassical Taxane Diterpene. *Accounts of Chemical Research*. 2021, *54* (10), 23472360. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00873>
14. Yuzuru Kanda, Yoshihiro Ishihara, Nathan C. Wilde, Phil S. Baran. Two-Phase Total Synthesis of Taxanes: Tactics and Strategies. *The Journal of Organic Chemistry*. 2020, *85* (16), 10293-10320. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01287>
15. Ya-Jian Hu, Li-Xuan Li, Jing-Chun Han, Long Min, Chuang-Chuang Li. Recent Advances in the Total Synthesis of Natural Products Containing Eight-Membered Carbocycles (2009–2019). *Chemical Reviews*. 2020, *120* (13), 5910-5953. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00045>
16. Yuzuru Kanda, Hugh Nakamura, Shigenobu Umemiya, Ravi Kumar Puthukanoori, Venkata Ramana Murthy Appala, Gopi Krishna Gaddamanugu, Bheema Rao Paraselli, Phil S. Baran. Two-Phase Synthesis of Taxol. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, *142* (23), 10526-10533. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c03592>
17. Takeshi Nanjo, Xuan Zhang, Yusuke Tokuhito, Yoshiji Takemoto. Divergent and Scalable Synthesis of α -Hydroxy/Keto- β -amino Acid Analogues by the Catalytic Enantioselective Addition of Glyoxylate Cyanohydrin to Imines. *ACS Catalysis*. 2019, *9* (11), 10087-10092. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03394>
18. Hiroaki Matoba, Takahiro Watanabe, Masanori Nagatomo, Masayuki Inoue. Convergent Synthesis of Taxol Skeleton via Decarbonylative Radical

- Coupling Reaction. *Organic Letters*. 2018, 20 (23), 7554-7557. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03302>
19. Ya-Jian Hu, Jian-Hong Fan, Shaoping Li, Jing Zhao, Chuang-Chuang Li. Synthetic Study toward the Total Synthesis of Taxezopidines A and B. *Organic Letters*. 2018, 20 (18), 5905-5909. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02571>
20. Mohamed F. El-Mansy^{a,b} and William A. Donaldson. Recent advances in the synthesis of taxoids: 2015-2020. A Platinum Open Access Journal of Organic Chemistry. 2021, V, 110-137.
21. Rūta Gerasimaitė, Jonas Bucevičius, Kamila A. Kiszka, Sebastian Schnorrenberg, Georgij Kostiuk, Tanja Koenen, Gražvydas Lukinavičius. Blinking Fluorescent Probes for Tubulin Nanoscopy in Living and Fixed Cells. *ACS Chemical Biology*. 2021, 16 (11), 2130-2136. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00538>
22. Phu Hoang Dang, Hai Xuan Nguyen, Truc Thanh Thi Duong, Thao Kim Thi Tran, Phuc Thi Nguyen, Trang Kieu Thi Vu, Hung Chi Vuong, Nguyen Huu Trong Phan, Mai Thanh Thi Nguyen, Nhan Trung Nguyen, and Suresh Awale. α -Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Taxane Diterpenoids from the Stem Bark of *Taxus wallichiana*. *Journal of Natural Products*. 2017, 80 (4), 1087-1095.
23. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00006>
24. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/applications/analytical-chemistry/thin-layer-chromatography>
25. 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.
26. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 3469-3473.

SUMMARY

Kutenkova Maria

MODIFICATION OF THE METHOD OF CHROMATOGRAPHIC STUDY OF TAXOL AS A REPRESENTATIVE OF THE TAXANE GROUP

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: as. But I.O.;

doctor of medicalsciences, professor Nizhenkovska I.V.

Keywords: paclitaxel, taxol, HPLC, pharmaceutical analysis.

Introduction. Taxol is an anticancer drug whose molecule contains a diterpene fragment as the main matrix. The peculiarity of the chemical structure of taxol is that it consists of a tetracyclic system - a 6-8-6-membered carbocycle (ABC ring), as well as a condensed oxetane ring (D ring), which is mounted with a double bond on the bridge, and several oxygen-containing functional groups. Medicinal products with taxanes in their composition reveal a large number of undesirable effects. Among them: neuropenia, anemia, damage to the immune and nervous systems, redness of the skin, bronchospasm, neurosensory reactions of the lungs, bleeding, etc. Therefore, the use of modern and highly selective methods of analysis of compounds of the taxane group is relevant, since the health and life of oncological patients depend on the quality of the substance, and then of the medicinal product.

Materials and methods. Research object is paclitaxel substance, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of paclitaxel substance. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), UV-spectrophotometry (Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC), computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. The conditions of chromatographic research using the HPLC method of the paclitaxel substance were selected for the determination of specified and unspecified impurities, as well as accompanying substances, namely: mobile phase A: a mixture of acetonitrile and water in the ratio 2:3; mobile phase B: acetonitrile. The method of HPLC chromatography, the method of preparation of test solutions of paclitaxel substance was developed. The HPLC chromatographic study of the paclitaxel substance showed that the substance under study contains 4 concomitant substances not regulated by the European Pharmacopoeia: Impurity Baccatin III (Rt=4.047), Impurity Ethyl ether (Rt=4.474), Impurity 10-Deacetyl-paclitaxel (Rt=12,411), Impurity 7-Epi-paclitaxel (Rt=35,159) and 3 unspecified impurities: Impurity I (Rt=9,905), Impurity II (Rt=23,067), Impurity III (Rt=37,933).

Conclusions. The HPLC chromatographic study of the paclitaxel substance showed that the substance under study contains 4 concomitant substances not regulated by the European Pharmacopoeia and 3 unspecified impurities: Impurity I (Rt=9,905), Impurity II (Rt=23,067), Impurity III (Rt=37,933), which raises doubts about the degree of purification of the investigated substance

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. Кутенкова М.Ю., Бут І.О., Ніженковська І.В.
ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛИШКОВОГО
ВМІСТУ В СУБСТАНЦІЇ ПОХІДНОГО ТАКСАНУ. Тези доповіді
на конференцію «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан,
проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю
фармацевтичного факультету Національного медичного
університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р., стор. 472.



2. 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.

