

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 «Хроматографічне дослідження ступеню чистоти бортезомібу
– діючої речовини лікарського засобу мозетрокс методом ВЕРХ»

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)

Лесик Людмила Ігорівна
(прізвище та ініціали)

Керівники ас. Бут І.О.,

проф., д.м.н. Ніженковська І.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: доцент, к.фарм.н. Негода Т.С.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	8
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПІРАЗИНІВ.....	8
1.1. Особливості хімічної будови піразинів.....	8
1.2. Біологічна активність піразинів.....	11
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ БОРТЕЗОМІБУ.....	16
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості бортезомібу.....	16
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	21
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
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

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

BTZ - бортезоміб

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

Hal – галоген

Heterocycl– гетероциклічний фрагмент

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

Ph – феніл

i-Pr – ізопропіл

ВСТУП

Актуальність теми. Піразин та його похідні – біологічно активні речовини, які містяться у природних джерелах, мають застосування у медицині та фармації. Наприклад, метоксипіразини – це складові запашних речовин гороху, бобових, солодкого перцю. Ацетилпіразин ТРА/ТФА – харчовий ароматизатор із смаком та ароматом свіжого хліба, горіхів. Використовують його для випікання хліба, печива, десертів, імбирних пряників. Серед лікарських засобів похідні піразину використовуються як протитуберкульозні лікарські засоби (Піразинамід), інгібітори моноамінооксидази (Пірліндол, Піразидол), протипухлинні лікарські засоби (Бортезоміб). Бортезоміб є інгібітором імунопротеасоми та протеасоми, пригнічує хімотрипсиноподібну дію протеасоми 26S у клітинах, тому його застосовують для лікування множинної рецидивуючої мієломи і лімфоми.

Лікування лікарським засобом Бортезоміб (BTZ) може спричиняти шлунково-кишкову токсичність, розвивається непрохідність кишечника, гематологічні ускладнення (тромбоцитопенія, нейтропенія та анемія). Бортезоміб застосовують у комбінації з Ритуксимабом, Циклофосфамідом, Доксорубіцином при лікуванні пацієнтів з рецидивуючою множинною мієломою (схема VcR-CAP). Розвивається серцева недостатність, порушення функцій нирок та печінки. Бортезоміб є цитотоксичним агентом та здатен швидко вбивати пухлинні плазматичні клітини. При цьому виникають ускладнення, які пов'язані із синдромом лізису пухлини [1-4].

Описано використання Бортезомібу у лікуванні гліобластоми, остеосаркоми [5, 6].

За хімічною будовою Бортезоміб – це органічне похідне борної кислоти. Хімічна номенклатурна назва за ІЮПАК [(1R)-3-метил-1-((2S)-3-феніл-2-[[піразил-2-ілкарбоніл)аміно]пропаноїл}аміно)бутил]борна кислота. Таким чином, молекула містить гетероциклічний піразиновий фрагмент, феніл-радикал, алкільні радикали, функціональні групи аміно-, карбаноїл-

Поєднання складної арен-гетероциклічної хімічно активної структури та вираженої протипухлинної активності і токсичності перетворюють Бортезоміб на складну за своїм технологічним рівнем отримання об'єктом, який потребує специфічних підходів у фармацевтичному аналізі цієї субстанції.

Молекула Бортезомібу містить циклічні фрагменти із делокалізованою електронною густиною, електронодонорні та електроноакцепторні групи, просторово доступні вільні групи –NH, –OH, які здатні утворювати водневі зв'язки і тим самим дезактивувати молекулу.

Враховуючи особливості молекулярної структури Бортезомібу можна передбачати присутність у складі його фармацевтичних композицій продуктів внутрішньомолекулярної конденсації, продуктів деградації молекул, інших супровідних домішок, які призводять до складного перебігу фармацевтичного аналізу цієї сполуки.

Під час синтезу Бортезомібу утворюються побічні продукти реакцій, неприпустимі домішки, присутність яких важлива під час оцінки якості субстанції Бортезомібу.

Тільки точний, селективний та високочутливий інструментальний метод дозволить дослідити чистоту субстанції Бортезомібу, присутність супровідних речовин та неприпустимих домішок, яку не регламентовано Фармакопеями.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка хроматографічних умов та методик виконання хроматографування методом ВЕРХ і приготування випробувальних розчинів для дослідження присутності супровідних домішок у складі субстанції Бортезомібу, які дозволять підтвердити їх присутність та підтвердити коректність умов проведення цих досліджень.

Після аналізу результатів досліджень субстанції Бортезомібу методом рідинної хроматографії (РХ) щодо ідентифікації специфікованих або/і неспецифікованих домішок, нами заплановано до виконання наступні завдання дослідження:

- розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції Бортезомібу з метою визначення супровідних речовин та домішок домішок;
- розробити методику хроматографування методом ВЕРХ субстанції Бортезомібу та методики приготування стандартних і випробувальних розчинів;
- провести хроматографічне дослідження методом ВЕРХ зразків субстанції Бортезомібу у порівнянні зі стандартними зразками субстанції 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 у створенні умов для імплементації методу ВЕРХ у фармацевтичний аналіз субстанції Бортезомібу, що допоможе реалізувати у майбутньому використовувати цей метод для контролю якості субстанції Бортезомібу.

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 – 30.

SUMMARY

Lesyk Lyudmila
CHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE DEGREE OF PURITY OF
BORTEZOMIB – THE ACTIVE SUBSTANCE OF THE DRUG MOZETROX BY HPLC.

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: as. But I.O.;
doctor of medicalsciences, professor Nizhenkovska I.V.

Keywords: Bortezomib, pyrazine, HPLC, pharmaceutical analysis.

Introduction. According to the chemical structure, Bortezomib is an organic derivative of boric acid. Chemical nomenclature name according to IUPAC [(1R)-3-methyl-1-((2S)-3-phenyl-2-[(pyrazyl-2-ylcarbonyl)amino]propanoyl)amino)butyl]boric acid. Thus, the molecule contains a heterocyclic pyrazine fragment, a phenyl radical, alkyl radicals, amino-, carbanoyl-functional groups. The combination of a complex arene-heterocyclic chemically active structure and pronounced antitumor activity and toxicity make Bortezomib a complex object in terms of its technological level of production, which requires specific approaches in the pharmaceutical analysis of this substance.

Materials and methods. Research object is bortezomib 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 for a chromatographic study by the HPLC method of the suitability of the chromatographic system, the tested standard sample and the tested sample of bortezomib substance in the lyophilisate as the active active substance of mozetrox have been developed. HPLC chromatography methods, methods of preparing test solutions of the bortezomib substance in the lyophilizate were developed, the conditions of performance were selected, namely: Mobile phase A - 300 ml of acetonitrile, 300 ml of water, 1 ml of formic acid; Mobile phase B – 800 ml of acetonitrile, 200 ml of water, 1 ml of formic acid.

Conclusions. The conducted UV-spectral and HPLC chromatographic study of the bortezomib substance in the lyophilisate showed that the bortezomib substance under study has $R_t=8.713$ and $\lambda = 270$ nm, specified impurity A – $R_t=11.701$, however, the substance contains unspecified/unidentified impurities: impurity C ($R_t=4.804$), impurity D ($R_t=6.725$), the content of which affects the quality of the substance.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. 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.



2. Лесик Л.І., Бут І.О., Ніженковська І.В. БОРТЕЗОМІБ: ІНСТРУМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДОМ ВЕРХ.
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. 383.

