

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 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.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПІРАЗИНІВ

1.1. Особливості хімічної будови піразинів

За хімічною будовою Бортезоміб відноситься до класу гетероциклів, а основу хімічної структури молекули складає піразин (за систематичною номенклатурою IUPAC [(1R)-3-метил-1-((2S)-3-феніл-2-[(піразил-2-ілкарбоніл)аміно]пропанойл)аміно]бутил]борна кислота (рис. 1.1.1).

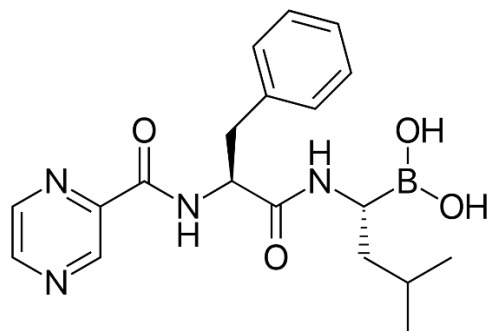


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула сполуки Бортезомібу.

Якщо розглянути молекулу Бортезомібу, яка складається із трьох основних фармакофорних угруповань, можна назвати такі фрагменти: фенілаланін, піразинова кислота та лейцин (рис.1.1.2).

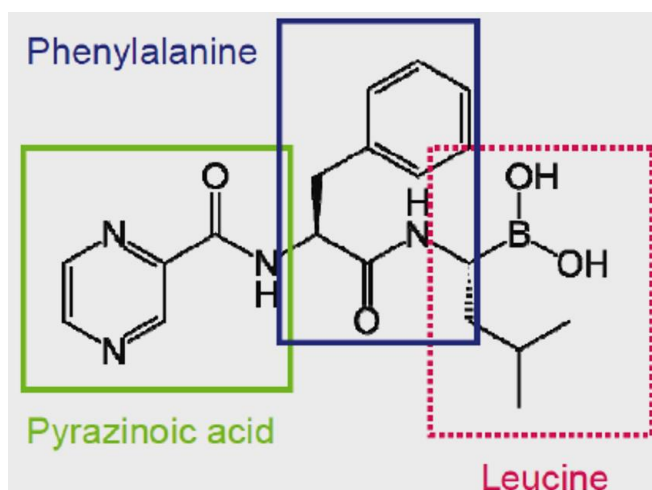


Рисунок 1.1.2. Фармакофорні угруповання молекули Бортезомібу.

Піразинамід – це протитуберкульозний лікарський засіб, який за хімічною будовою є функціональним похідним піразиноївої кислоти (рис. 1.1.3).

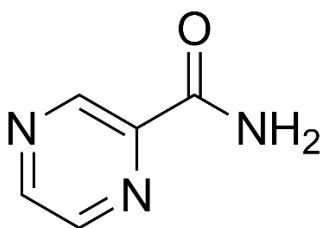


Рисунок 1.1.3. Хімічна формула Піразинамиду.

Наступна речовина 6-(5-Хлор-2-піридил)-6,7-дигідро-7-гідрокси-5Н-пірроло [3,4-в] піразин-5-он (CAS NO: 43200-81-3) – проміжний продукт у синтезі зопіклону II. Зопіклон це синтетичний лікарський засіб із групи снодійних і седативних засобів, є похідним циклопіролону, споріднений із похідними бензодіазепіну (рис. 1.1.4).

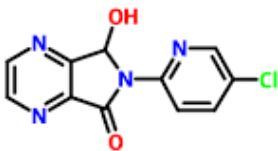
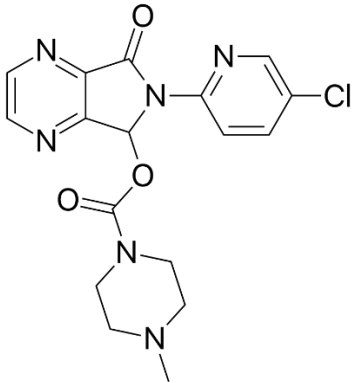
	<p>6-(5-Хлор-2-піридил)-6,7-дигідро-7-гідрокси-5Н-пірроло [3,4-в] піразин-5-он</p>
	<p>Зопіклон (RS)-6-(5-хлоропіридин-2-іл)-7-оксо-6,7-дигідро-5Н-пірроло[3,4-в]піразин-5-іл-4-метилпіперазин-1-карбоксилат</p>

Рисунок 1.1.4. Хімічні формули Зопіклону та його проміжного продукту у синтезі – похідні піразину.

Зопікол має тяжкі небажані ефекти: нічні кошмари, порушення свідомості, агресивність, галюцинації; психотично-подібні симптоми,

неадекватна поведінка; зниження швидкості реакції, амнезія; анафілактичні реакції; порушення функції печінки; сомнамбулізм, фізична/психологічна залежність від лікарського засобу; пригнічення дихальної функції.

Структурованими аналогами Зопіколу є Золпідем (N,N,6-Триметил-2-(4-метилфеніл)імідазол[1,2-а]піридин-3-ацетамід) – снодійний лікарський засіб, похідне імідазопіридину та Золеплон – снодійний лікарський засіб, похідне піразолопіримідинів (рис.1.1.5).

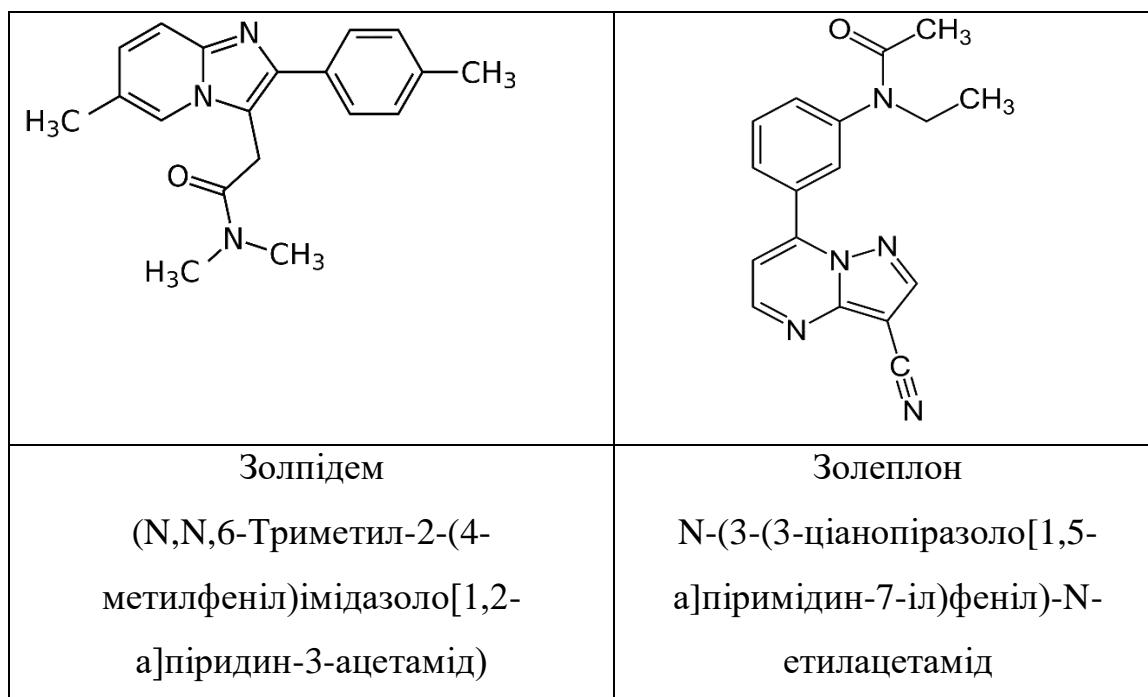


Рисунок 1.1.5. Хімічні формули Золпідему та Золеплону.

Як видно із хімічних формул лікарських засобів – похідних піразину, це речовини основного характеру, містять функціональні групи, гідрофобні фрагменти. Значення рН їх розчинів дорівнює 1.23.

Бортезоміб має лабільну молекулу завдяки великій кількості незахищених функціональних груп, тому у розчині можливі її хімічні модифікації: елімінування бутилборної кислоти – утворення домішки А, яка у свою чергу підлягає гідролізу з утворенням домішки В; існує два ізомери бортезомібу – (R,R) – домішка D; (S,S) – домішка D; елімінування групи В-ОН із фрагменту борної кислоти та ізомеризація – домішка G; елімінування

групи В-ОН із фрагменту борної кислоти та ізомеризація – домішка Е (рис. 1.1.6).

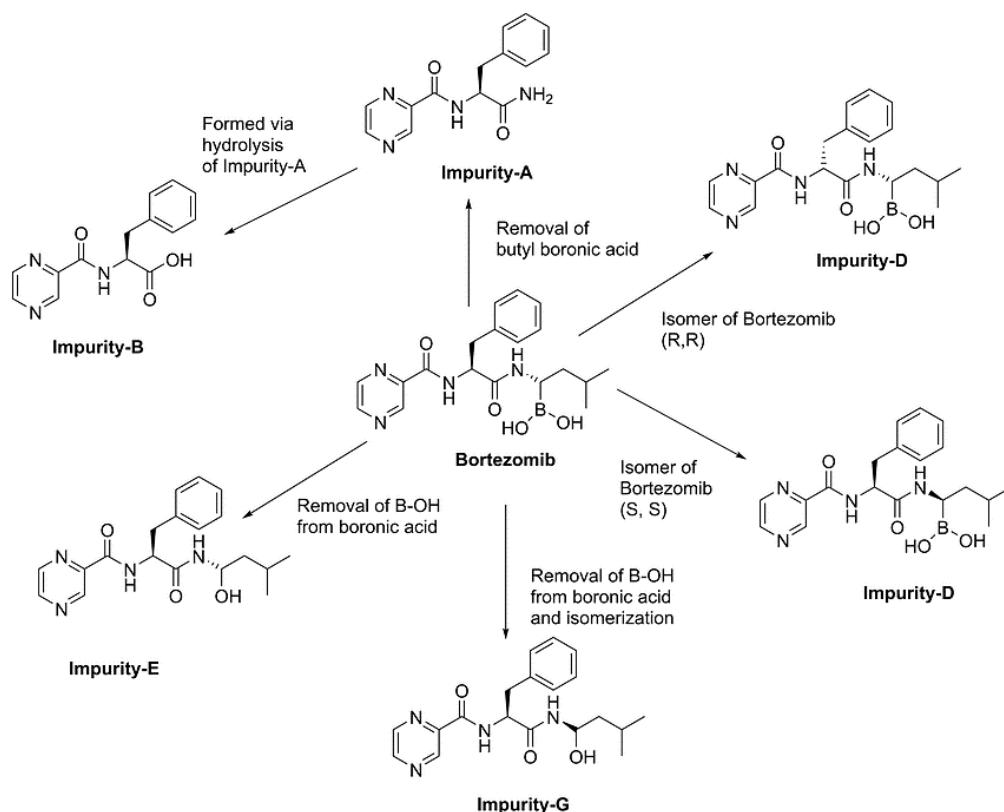


Рисунок 1.1.6. Продукти гідролізу та ізомеризації молекули Бортезомібу.

1.2. Біологічна активність піразинів

Гетероциклічні структури є основою багатьох діючих активних речовин лікарських засобів. Ці лікарські засоби містять Нітроген, Оксиген та Сульфур. Ці атоми здатні приймати електрони, утворювати водневі зв'язки. Такі хімічні властивості підвищують здатність сполуки до цільового зв'язування.

Гетероциклічні сполуки часто використовуються в синтезі ліків та біологічно активних молекул. Значна кількість речовин натурального походження, також, містять гетероциклічних структур.

Гетероциклічне кільце піразину – шестичленна ароматична структура з двома атомами Нітрогену, які розташовані у положеннях 1,4 гетероциклічного кільця (рис. 1.2.1) [7-11].

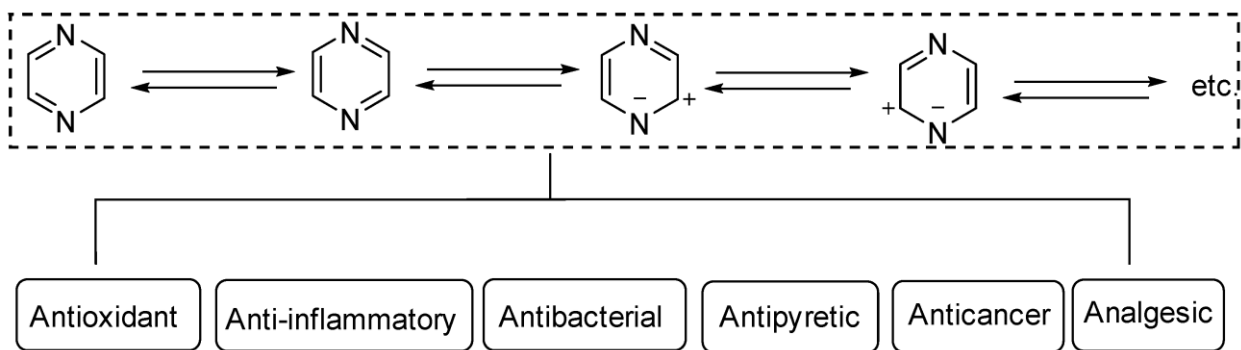


Рисунок 1.2.1. Особливості хімічної структури піразину та їх біологічна активність.

Піразинам притаманна антиоксидантна, протизапалювальна, жарознижувальна, антибактеріальна, протипухлинна, аналгетична дії.

Основа піразину (рКа 0,65) слабша як за піразин (рКа 2,3). Піразин – це резонансний гібрид деяких типових структур, який має резонансну енергію 24,3 ккал/моль, нульовий дипольний момент, оскільки молекула піразину симетрична. При чому, електронна густина атомів Нітрогену зростає, а на Карбоні зменшується.

Похідні піразину були широко вивчені як медіатори розладів. Повідомлялося про препарати феназину з фрагментами піразину, які мають потенційну терапевтичну цінність та використовуються для лікування захворювань людини. Піразин відіграє важливу роль у створенні ліків. Вірус гепатиту С (HCV) — це РНК-вірус поширюється через заражену кров. Відкрити специфічні алостеричні інгібітори NS5B РНК-залежної РНК-полімерази, кодованої вірусом ВГС. Вони були отримані введенням піразинів у С-2 індольні замісники. Сполуки показали хорошу інгібіторну активність щодо RdRp; задовільну проникність, розчинність та ліпофільність.

Були ідентифіковані похідні циннамат-піразину зі значеннями IC50 0,69 і 1,2 мкМ. RhoA є представником Rho GTPase сімейства малих GTP-зв'язуючих білків. RhoA – це важливий регулятор різних клітинних сигнальних шляхів. Є важливим у організації транскрипції та розвитку

клітинного циклу. RhoA може виконувати роль терапевтичної мішені для лікування серцево-судинних захворювань. Інгібітори RhoA містять коричню кислоту. Синтезовані сполуки показали високу інгібіторну активність щодо RhoA. Була ідентифікована серія інгібіторів кінази Pim-2 через високопродуктивний скринінг. Синтезовано похідні коричної кислоти-піразину для посилення їх біологічної активності у нервовій функції та захисті нервово-судинної системи [12-18].

Зростала під дією похідних циннаMAT-піразину активність мікросудинної ендотеліальної клітинної лінії людини (HMEC-2), клітинної лінії нейробластоми людини (SH-SY5Y) проти пошкодження вільними радикалами. Сполуки показали високу активність у клітинах HMEC-2, у клітинах SH-SY5Y (значення EC₅₀ 3,68, 3,74 і 3,62 мкМ).

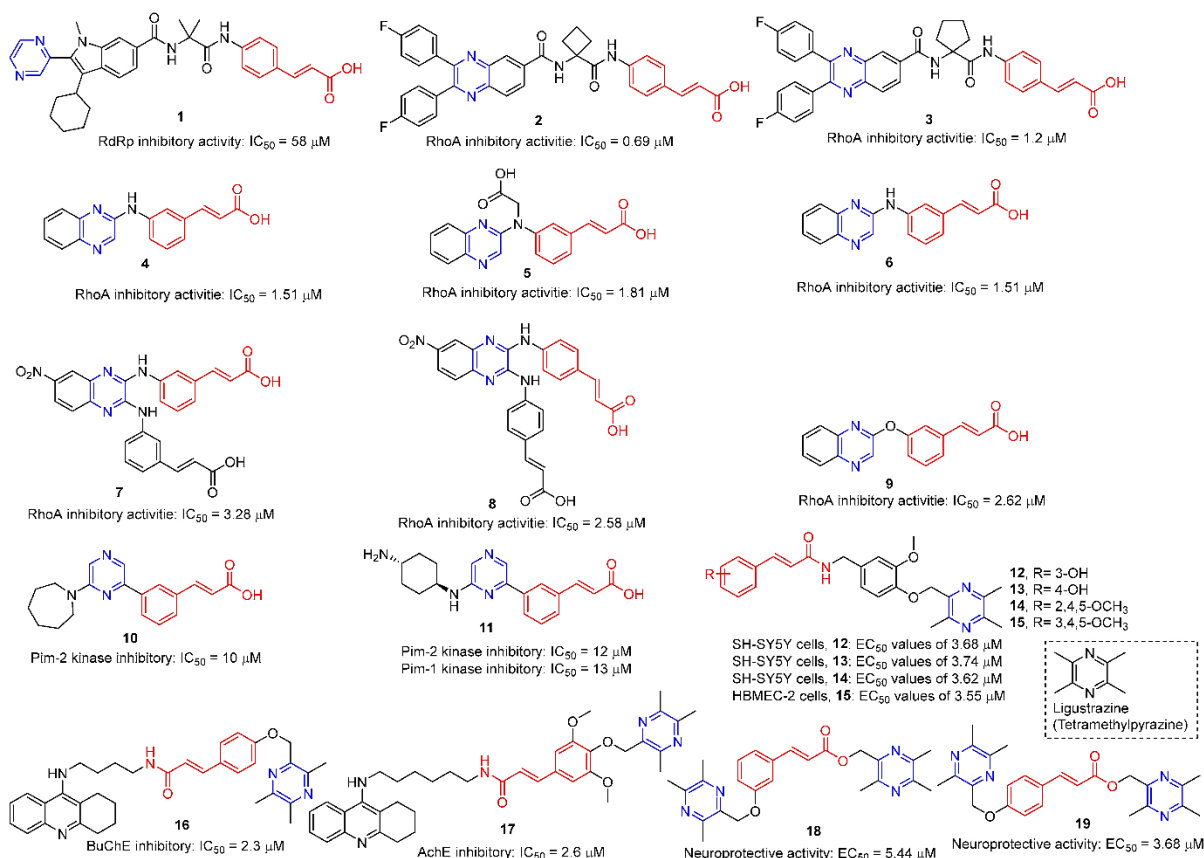


Рисунок 1.2.2. Корична кислота – піразинові похідні.

Для подальшого дослідження антиагрегаційної активності триметилпіразин-2-карбонілоксикоричних кислот та етерів синтезована серію нових сполук, які були ефективними інгібіторами агрегації тромбоцитів із вищими значеннями, ніж озагрель ($IC_{50} = 144,1$ мкМ). Лігустразин-коричні кислоти/етилловий етер мали вищу активність, ніж лігустразин ($IC_{50} = 83,4$ мкМ).

Кон'югат рапontiцину FRHA був синтезований на основі фолату та дисульфідного лінкеру для впливу на фолатний рецептор (FR). FRHA підтримує високу спорідненість до FR-позитивних клітин.

При обробці FRHA відновником аміно-похідні рапontiцину вивільняються після відновлення дисульфідних зв'язків у нуклеосомі. В умовах *in vivo* FRHA має специфічну активність проти FR-позитивних моделей алотрансплантата та ксенотрансплантата.

Розроблена серія кон'югованих проліків фолієвої кислоти та комбретастатину. Проліки з більшою гідрофільністю підсилюють поглинання клітинами товстої кишки. Куркумін – це поліфенольна сполука, яка була вивчена щодо потенційних протипухлинних ефектів. Синтезовано похідні лігустразину-куркуміну шляхом з'єднання протипухлинних біоактивних сполук етерними зв'язками.

Використовували модифіковані планефроліном ароматичні ліганди та комплекси купруму (II)-стероїдів для вивчення антимікробної стійкості проти *Staphylococcus aureus* та метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Похідне тестостерону показало найсильніший інгібуючий ефект. Похідне естрадіолу продемонструвало найсильніший інгібуючий ефект на MRSA.

Були синтезовані похідні гаудатин-піразину та досліджена їх активність проти вірусу гепатиту В (HBV) у клітинах HepG-2. Сполуки не тільки інгібували секрецію HBsAg та HBeAg, але, й, реплікацію ДНК HBV.

Була досліджена нейропротекторна дія сполук на клітини SH-SY5Y із захисною активністю клітин 22,3%, що перевищує активність діосгеніну.

Також, була вивчена терпен-піразинова гібридизація. Похідне лігустразину з бетуліновою кислотою продемонструвало протипухлинну активність (IC₅₀ 4,19, 5,23, 4,48, 4,23 і 4,34 мкМ проти BEL-7402, HT-29, HepG-2, MCF-7 і HeLa клітини).

Селективний аналіз показав, сполуки мали низьку цитотоксичність для клітин MDCK. Флуоресцентне фарбування та аналіз проточною цитометрією показали, що деякі із синтезованих сполук індукують апоптоз клітин HepG-2. Індукований апоптоз був результатом деполяризації потенціалу мітохондріальної мембрани та підвищення внутрішньоклітинної концентрації вільного Ca²⁺[19-21].

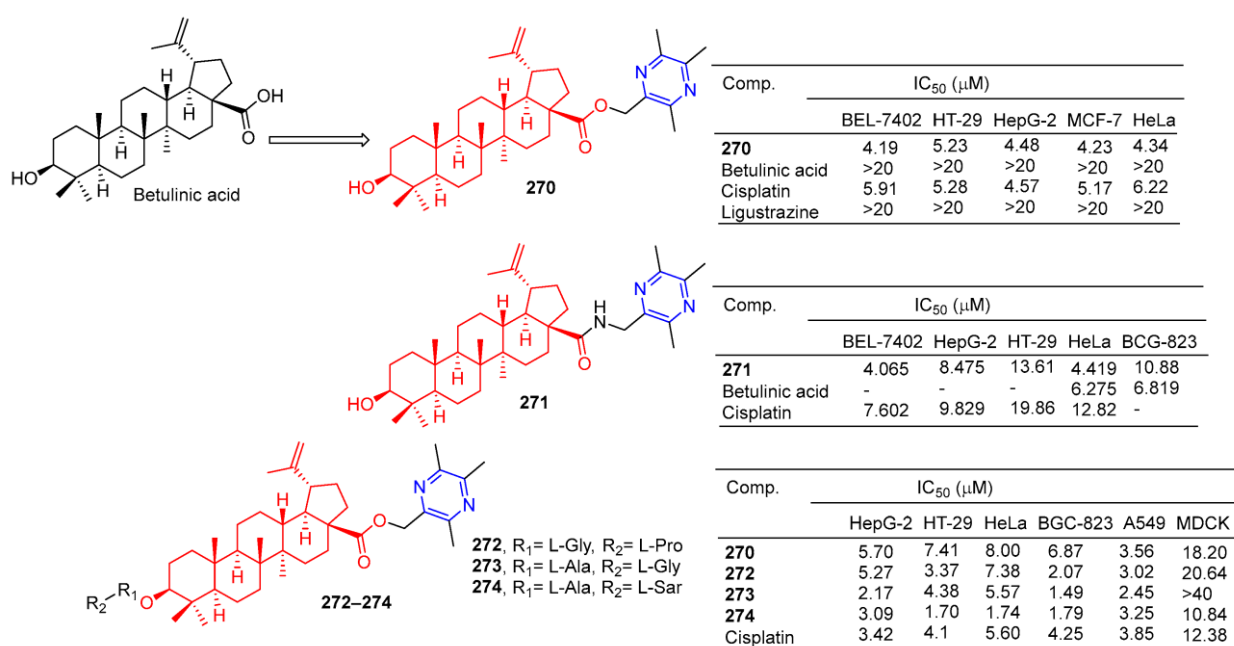


Рисунок 1.2.3. Бетулінова кислота – піразинові похідні..

Похідна бетулінової кислоти пригнічувала диференціювання остеокластів клітин RAW, індуковане RANKL. Рівень інгібування сягав 100%. Активність бетулінової кислоти була вищою [22].

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ БОРТЕЗОМІБУ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості бортезомібу

Існує багато методів органічного синтезу піразину та його похідних. Існують класичні методи синтезу піразинових сполук та сучасні методи.

Піразин синтезується за методом Штеделя-Ругеймера взаємодією 2-хлорацетофенон з амонієм до амінокетону. Потім проходить конденсація та окислення з утворенням піразину (2.1.1).

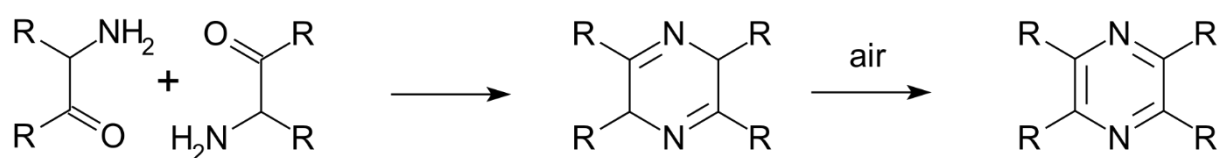


Рисунок 2.1.1. Синтез піразину за методом Штеделя-Ругеймера.

Синтез піразину за методом Гуткнехта заснований на самоконденсації (рис.2.1.2).

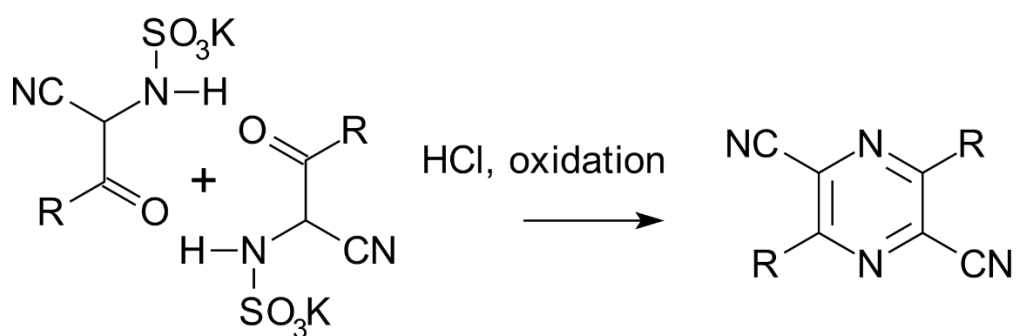


Рисунок 2.1.2. Синтез піразину за методом Гуткнехта.

При конденсації двох молекул амінокарбонілів, з наступним гідролізом та окисненням утворюються похідні піразину (рис. 2.1.3) [23-24].

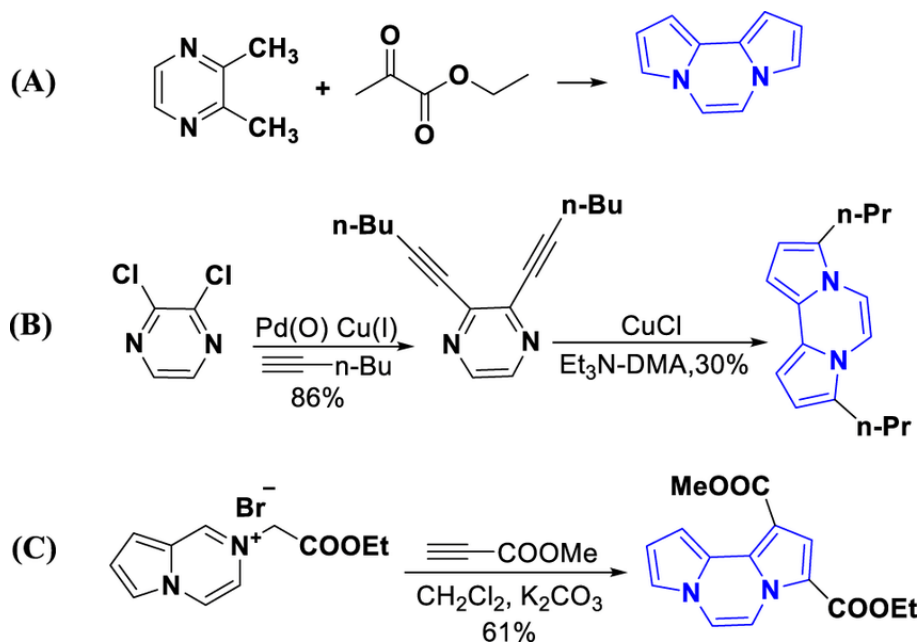
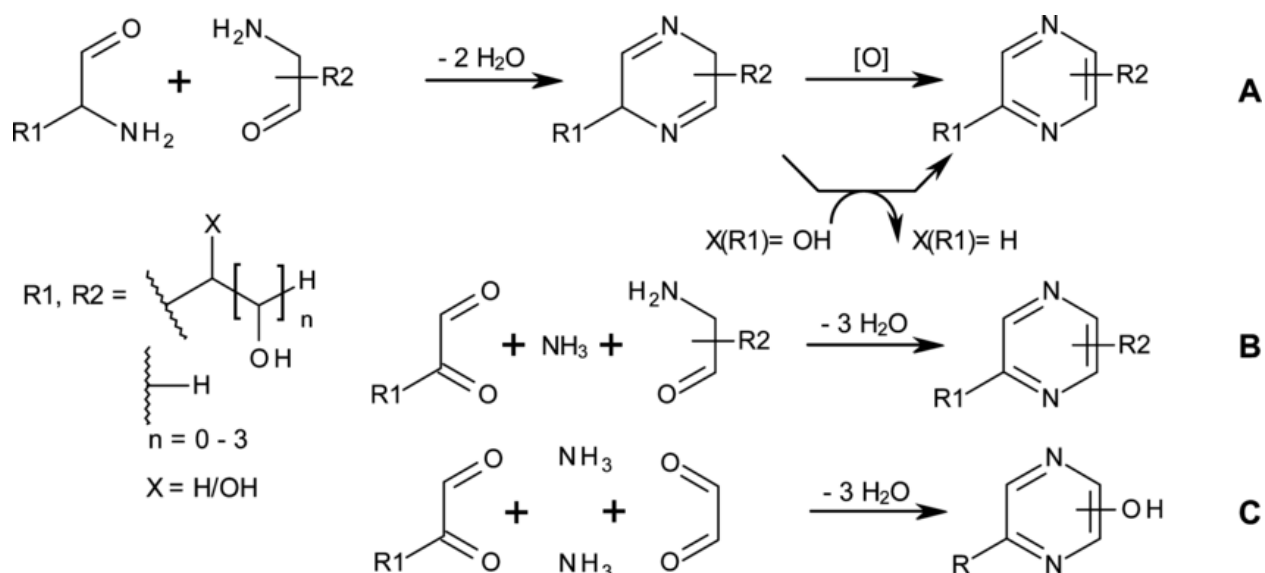


Рисунок 2.1.3. Синтез похідних піразину.

Розроблено зручний, екологічно чистий метод синтезу структурно різноманітних похідних хіноксаліну за допомогою реакцій конденсації похідних 1,2-діамінобензолу та 1,2-дикарбонілів з використанням каталітичної кількості камфорої сульфаної кислоти. За таких же умов синтезовано дибензо[f,h]піrido[2,3-b]хіноксалін та 10-бромаценафто[1,2-

б) піридо[2,3-е]піразин за допомогою реакції піридин-2,3-діамінів та фенантрен-9,10-діону або аценафтилен-1,2-діону (рис. 2.1.4) [25].

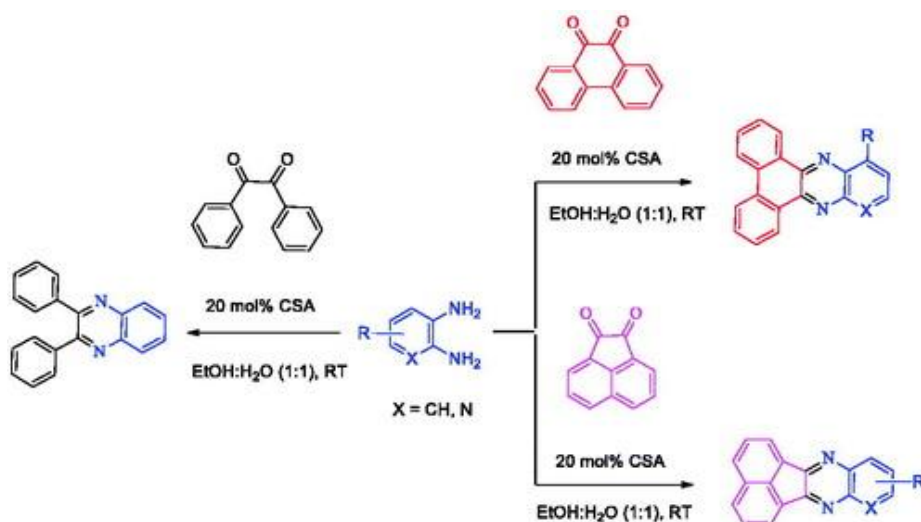


Рисунок 2.1.4. Синтез похідних піридино-піразину.

Реакціями конденсації ароматичних 1,2-діаміно- та 1,2-дикетонних сполук синтезовано бромовмісні хіноксаліни та піридо[2,3-б]піразини. Синтезовані сполуки – це проміжні продукти для постконденсаційної модифікації за допомогою реакції Сузукі-Міяури з утворенням піридо[2,3-б]піразинів (рис. 2.1.5) [26-28].

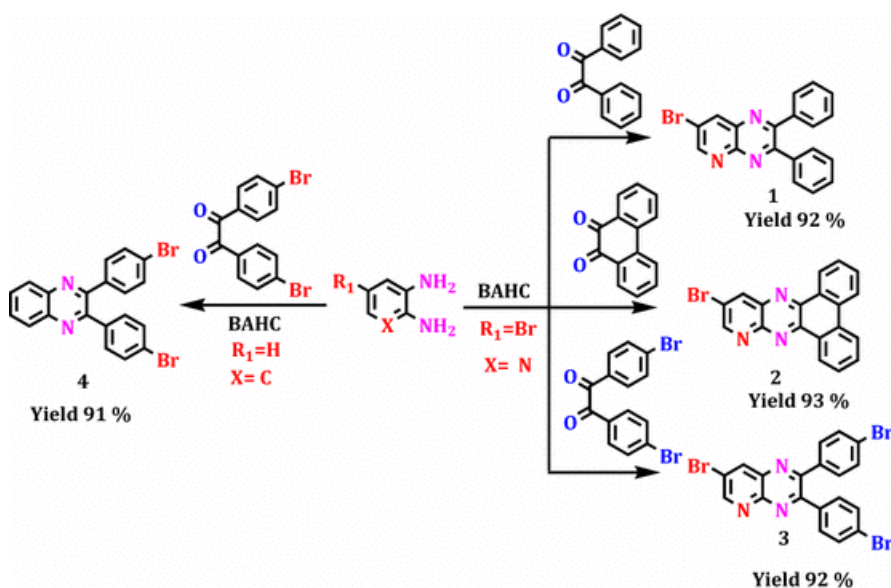


Рисунок 2.1.5. Синтез похідних піразину за методом Сузукі-Міяури.

Бортезоміб синтезують каталітичним амінуванням піразинкарбонової кислоти та метилового естеру L-фенілаланіну (рис.2.1.6).

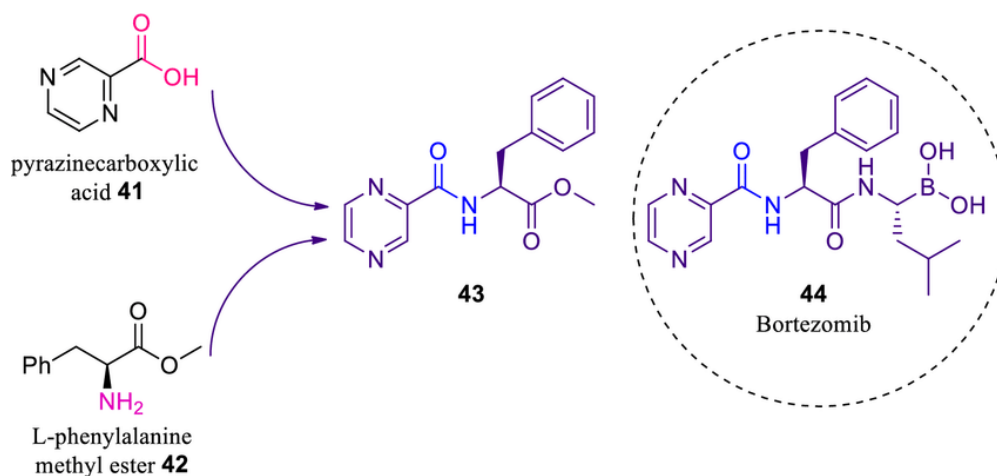


Рисунок 2.1.6. Синтез бортезомібу.

Якщо розглядати Зопіклон як лікарську речовину – субстанцію для проведення фармацевтичного аналізу, то це – білий з жовтуватим порошок, який не розчиняється у полярних розчинниках (вода, етанол). Він легкокорозинний у хлорметані, помірно розчинний в ацетоні. Добре розчиняється у розведених мінеральних кислотах. УФ-спектр має максимум поглинання: $\lambda_{\text{max}} = 303$ нм (у 0,05% розчині кислоти хлороводневої). Зопіклон (субстанцію) ідентифікують за $T_{\text{пл}}$; значенням питомого обертання розчину; ІЧ-спектром поглинання. Для методу дослідження ТШХ (з УФ-опроміненням) описана система елюєнтів: триетиламін — ацетон — етилацетат (2:50:50).

ПМР-спектр бортезомібу (CHD_2CN , HOD). Містить сигнали при δ 9.38 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 8.73 (1H, d; $J = 2.6$ Hz), 8.48 (1H, m), 8.28 (1H, bs), 8.02 (1H, bs), 7.26 (5H, m), 5.36 (1H, dd; $J = 7, 5.5$ Hz), 4.70 (1H, dd; $J = 5.1, 9.0$ Hz), 3.20 (1H, dd; $J = 14, 5.1$), 3.02 (1H, dd; $J = 14, 9.1$), 1.71 (1H, dd; $J = 7, 14.4$), 1.66 (1H, dd; $J = 5.5, 14.4$), 1.52 (1H, m), and 0.98 (6H, d) (рис.2.1.7).

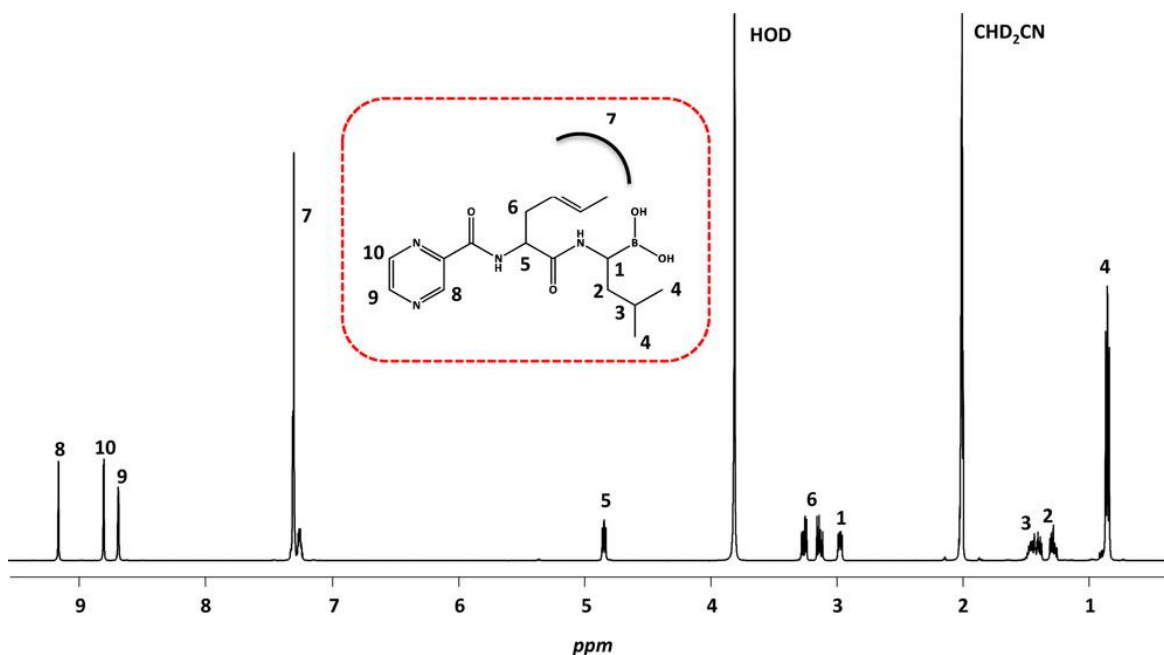


Рисунок 2.1.7. ПМР-спектр бортезомібу.

ІЧ-спектр бортезомібу. ІЧ-спектр бортезомібу (субстанції) містить нехарактеристичні помірні смуги деформаційних коливань δ_{NH} при 1600 cm^{-1} , характеристичні смуги валентних коливань $\nu_{\text{C=O}}$ при 1715 cm^{-1} .

Подвійні -C=C- зв'язки у циклічних системах підтверджуються характеристичними смугами $\nu_{\text{C=C}}$ при $3000\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$, а їх деформаційні коливання $\delta_{\text{C=C}}$ при $650\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$ для цис-ізомерів, при $960\text{-}970 \text{ cm}^{-1}$ для транс-ізомерів.

Валентні коливання C-C- зв'язків ароматичного ядра утворюють смуги помірні при $1585\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ та $1400\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$. Їх незручно ідентифікувати, оскільки ця область близька до коливань інших зв'язків. Коливання ν_{CH} аренів знаходяться в області при $3020\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$.

В ІЧ-спектрі присутні інтенсивні смуги непласких деформаційних коливань C-H в області $650\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$. Якщо сильні смуги у цій області відсутні можна говорити про відсутність ароматичного ядра.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує [29] аналіз VTZ, однак, стандартизовані методи аналізу цієї речовини описано у Європейській Фармакопеї [30].

Eur.Ph. регламентує методи аналізу чистоти субстанції VTZ та вміст споріднених речовин і домішок. Субстанція VTZ є активною діючою речовиною лікарського засобу мозетроксу. Субстанція VTZ має природу синтетичного походження.

Бортезоміб – речовина білого кольору, порошок, який має різну розчинність: розчинний у етанолі (35 мг/мл), добре розчинний у ДМСО (50 мг/мл). Молекулярна маса 384.2 г/моль. Температура плавлення субстанції 139-143°C.

Субстанція зберігається у ексікаторі при – 20 °C протягом 2 років, у вигляді розчину при – 20 °C 3 місяці.

Чистота. >99% (підтвердження методом ВЕРХ), структура (підтвердження методом ПМР).

Ідентифікація проводиться за визначенням температури плавлення, за ІЧ-спектром та ПМР-спектром. Порівняння проводиться з бортезомібом CRS. Для дослідження субстанцію розчиняють у етанолі або ДМСО.

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ), (2.2.29). Тестові та референтні розчини бортезомібу готують у суміші ацетонітрил + кислота мурашина. Детектування виконується УФ-спектрофотометрично при 270 нм.

Мобільна фаза А готується із: ацетонітрилу R1, води для хроматографування R та мурашиної кислоти. Мобільна фаза В готується із: ацетонітрилу R1, води для хроматографування R та мурашиної кислоти.

Бортезоміб може мати 6 супровідних речовин: А, В, D (2 ізомери), Е, G.

Для специфікованих та неспецифікованих домішок бортезомібу встановлюються лімітовані кількості: Е, G – 0.4%; А, В – 0,3%; D – 0.2%. Для

неспецифікованих домішок встановлено ліміт 0.10%. Всього допускається присутність домішок не більше, ніж 1.5%.

Специфіковані домішки у складі бортезомібу ідентифіковано: після елімінування фрагменту бутилборної кислоти – домішка А, яка гідролізується з утворенням домішки В; два ізомери бортезомібу – (R,R) – домішка D; (S,S) – домішка D; при елімінуванні групи В-ОН із фрагменту борної кислоти та ізомеризації – домішка G; при елімінуванні групи В-ОН із фрагменту борної кислоти та ізомеризації – домішка Е (рис. 3.1).

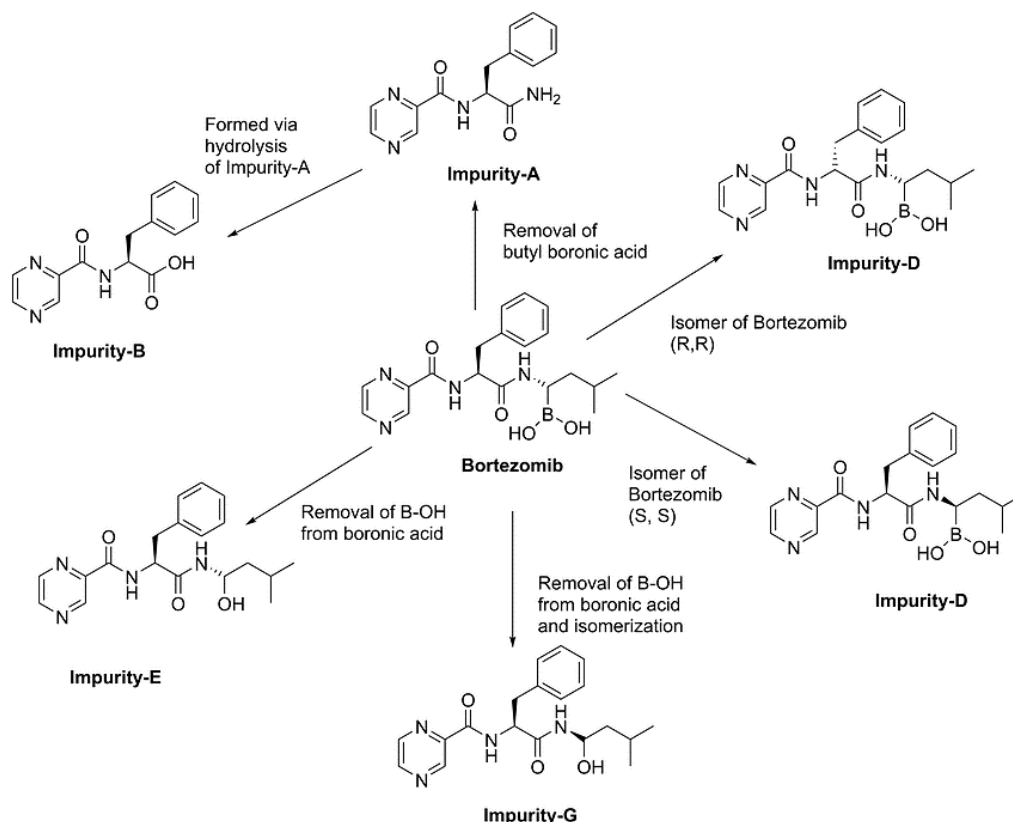


Рисунок 3.1. Специфіковані домішки субстанції Бортезомібу.

Виконано дослідження методом ВЕРХ, яке не описано в літературі для Бортезомібу субстанції, як супровідної домішки у складі мозетроксу.

Використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором (УФ-детектування проводили при 270 нм).

Наступні умови ВЕРХ хроматографування були запропоновані:

- колонка – Symmetry 300 C18, 250x4,6x3;

- температура колонки – 25°C;
- потік – 1,0 мл/хв;
- об'єм інжекції – 20 мкл;
- температура зразка – кімнатна;
- *Рухома фаза А* – 300 мл ацетонітрилу, 300 мл води, 1 мл кислоти мурашиної;
- *Рухома фаза В* – 800 мл ацетонітрилу, 200 мл води, 1 мл кислоти мурашиної.
- Час на хроматографування – 55 хв.

Схема приготування градієнтів представлена 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
15	100	0
30	0	100
45	0	100
47	100	0
55	100	0

Методика приготування розчину порівняння.

Приготування розчину порівняння – розчиняють в рухомій фазі А фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України бортезомібу з концентрацією 1 мг/мл.

Методика приготування випробувального розчину.

Приготування випробувального розчину – розчиняють в рухомій фазі А субстанцію з концентрацією 200 мг/мл бортезомібу.

Методика приготування розчину придатності хроматографічної системи.

Приготування розчину придатності хроматографічної системи – розчиняють в рухомій фазі А фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України бортезомібу та супровідної домішки А з концентраціями 1 мг/мл.

Проведення комп'ютерного аналізу – за програмою OpenLab CDS.

Реагенти:

Завдання – визначення сторонніх домішок.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- воду (чистоти для ВЕРХ),
- мурашину кислоту (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати:

При дослідженні стандартних зразків ДФУ бортезоміб +домішка А отримано наступні результати (табл. 3.2).

Стандартні зразки: Бортезоміб, домішка А

Бортезоміб (Стандарт, у складі ліофілізату мозетроксу)

- значення R_t знаходиться в інтервалі 8,703-8,728 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 8,719 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,009 хв.;
- RSD не перевищує 5%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 117,879-122,867;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 118,939;
- RSD не перевищує 5%: 2,40%.

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

Мозетрокс, ліофілізат			
Супровідні домішки			
	<i>Стандартний розчин</i>		
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>N (≥1000)</i>
	8,703	117,879	5245
	8,720	119,918	5388
	8,721	120,425	5296
	8,721	114,408	5465
	8,723	122,867	5243
	8,728	118,136	5302
Середнє	8,719	118,939	5323
SD	0,009	2,860	
RSD(≤5.0%)	0,10%	2,40%	

Придатність хроматографічної системи (Стандарт) (табл. 3.3).

- значення R_t бортезомібу знаходиться при 8,624 хв;
- значення R_t домішки А знаходиться при 11,601 хв;
- значення $R (>4,0) = 6,9$;

Таблиця 3.3. Придатність хроматографічної системи.

Придатність хроматографічної системи			
	Бортезоміб	Домішка А	R (≥4.0)
RT	8,624	11,601	6,9

Досліджуваний зразок: Ліофілізат мозетрокса (табл. 3.4).

Бортезоміб.

- значення R_t знаходиться в інтервалі 8,713-8,727 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 8,721 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,014 хв.;
- RSD не перевищує 5%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 26143,301-26156,640;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 26151,285;
- RSD не перевищує 5%: 2,40%.

Домішка А.

- значення R_t знаходиться в інтервалі 11,701-11,717 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 11,708 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,016 хв.;
- RSD не перевищує 5%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 24,202-24,792;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 24,488;
- RSD не перевищує 5%: 2,40%.

Домішка С

- значення R_t знаходиться в інтервалі 4,804-4,810 хв;
- середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 4,808 хв;
- середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,006 хв.;
- RSD не перевищує 5%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 16,011-16,642;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 16,642;
- RSD не перевищує 5%: 2,40%.

Домішка D

- значення Rt знаходиться в інтервалі 6,725-6,734 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 6,731 хв;
- середня різниця значень Rt знаходиться в інтервалі 0,009 хв.;
- RSD не перевищує 5%: 0,10%;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 7,808-9,094;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 8,471;
- RSD не перевищує 5%: 2,40%.

Таблиця 3.4. Хроматографічні характеристики досліджуваної речовини Бортезомібу та домішок (ВЕРХ) - значення, середні значення Rt, площини піку, RSD.

	<i>Проба А</i>							
	<i>Домішка С</i>		<i>Домішка D</i>		<i>Бортезоміб</i>		<i>Домішка А</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	4,804	16,011	6,725	7,808	8,713	26156,640	11,701	24,202
	4,810	16,185	6,734	9,094	8,723	26143,301	11,706	24,792
	4,810	16,642	6,733	8,510	8,727	26153,915	11,717	24,471
Середнє	4,808	16,279	6,731	8,471	8,721	26151,285	11,708	24,488

Таким чином, під час дослідження методом ВЕРХ стандартного зразку виявлені бортезоміб, домішка А.

Під час дослідження методом ВЕРХ наданого на дослідження зразку ліофілізату виявлено: бортезоміб, 3 неспецифікованих домішки.

Хроматограми, записані під час виконання досліджень (рис. 3.2-3.4).

На рисунку 3.2 представлено хроматограму, яка отримана методом ВЕРХ та демонструє придатність хроматографічної системи досліджуваного стандартного зразку бортезомібу субстанції ($R_t=8,924$) та специфікованої домішки А ($R_t=11,601$) і неспецифікованої/не ідентифікованої домішки ($R_t=15,578$).

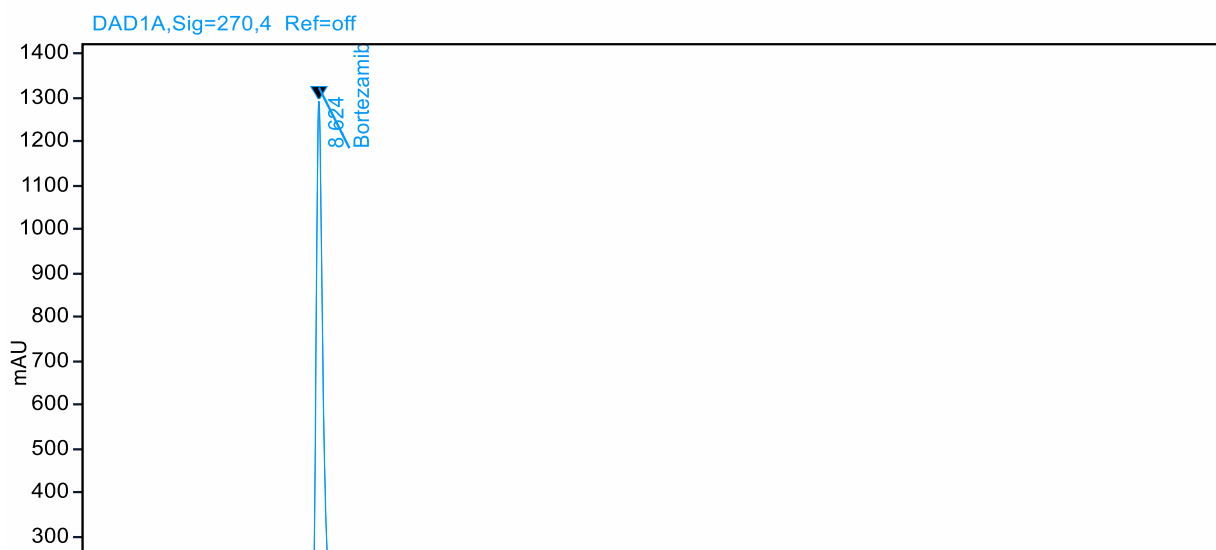


Рисунок 3.2. Хроматограма придатності хроматографічної системи стандартного зразку бортезомібу субстанції ($R_t=8,924$) та специфікованої домішки А ($R_t=11,601$) і неспецифікованої/не ідентифікованої домішки ($R_t=15,578$).

На рисунку 3.3 представлено хроматограму стандартного зразку, яка отримана методом ВЕРХ та демонструє присутність бортезомібу субстанції ($R_t=8,703$) та неспецифікованих/не ідентифікованих домішок з нечітким віднесенням значень R_t .

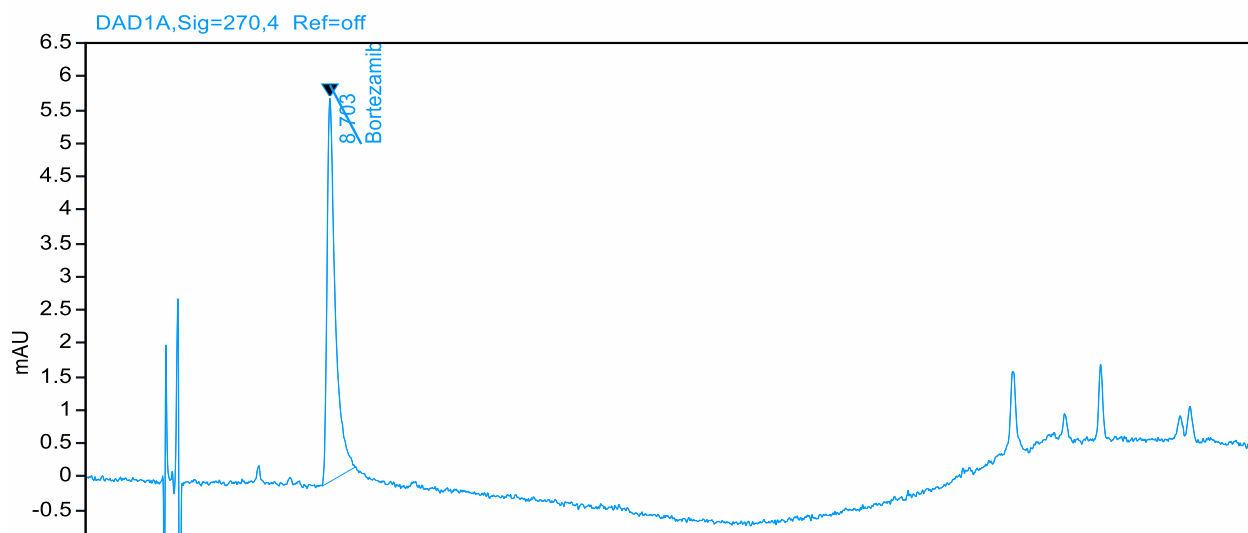


Рисунок 3.3. Хроматограма стандартного зразку, сигнал бортезомібу субстанції ($R_t=8,703$) та неспецифікованих/не ідентифікованих домішок з нечітким віднесенням значень R_t .

На рисунку 3.4 представлено хроматограму випробуваного зразку, яка отримана методом ВЕРХ та демонструє присутність бортезомібу субстанції ($R_t=8,713$), специфікованої домішки А ($R_t=11,701$), двох неспецифікованих/не ідентифікованих домішок: домішка С ($R_t=4,804$), домішка D ($R_t=6,725$).

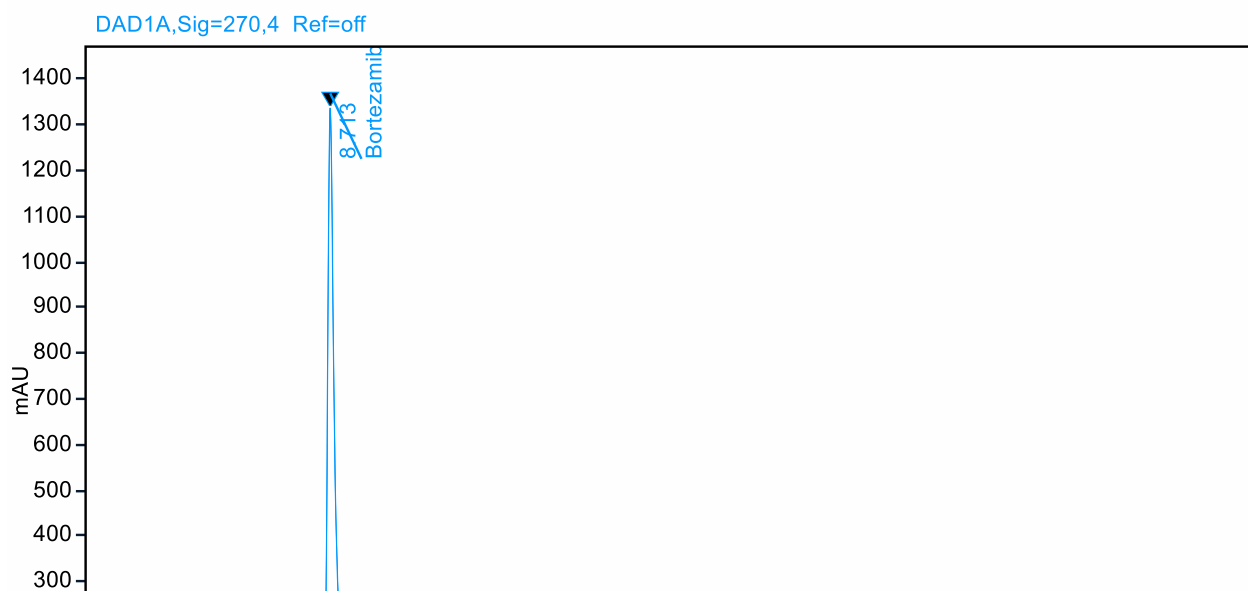


Рисунок 3.4. Хроматограма випробуваного зразку: бортезомібу субстанції ($R_t=8,713$), специфікована домішки А ($R_t=11,701$), неспецифікованих/не ідентифіковані домішки: домішка С ($R_t=4,804$), домішка D ($R_t=6,725$).

Стандартні зразки, ліофілізат мозетроксу: Бортезоміб	Випробуваний зразок, ліофілізат мозетроксу: Бортезоміб
<p>Бортезоміб</p> <p>значення R_t знаходиться в інтервалі 8,703-8,728 хв;</p> <p>середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 8,719 хв;</p> <p>середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,009 хв.;</p> <p>RSD не перевищує 5%: 0,10%;</p> <p>площина піка на хроматограмі в інтервалі 117,879-122,867;</p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 118,939;</p> <p>RSD не перевищує 5%: 2,40%.</p>	<p>Бортезоміб</p> <p>значення R_t знаходиться в інтервалі 8,713-8,727 хв;</p> <p>середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 8,721 хв;</p> <p>середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,014 хв.;</p> <p>RSD не перевищує 5%: 0,10%;</p> <p>площина піка на хроматограмі в інтервалі 26143,301-26156,640;</p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 26151,285;</p> <p>RSD не перевищує 5%: 2,40%.</p>

Бортезоміб (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Значення R_t стандарту знаходиться в інтервалі **8,703-8,728 хв** – у досліджуваного зразку значення R_t зміщується у інтервал **8,713-8,727 хв**.

Відповідно відбувається зміщення середнього значення R_t стандарту з **8,719 хв** до **8,721 хв** (випробуваного зразку).

Значення площини піку на хроматограмі стандарту коливається в інтервалі **117,879-122,867**, значення площини піку випробуваного зразку на хроматограмі зміщується у інтервал **26143,301-26156,640**.

Відповідно відбувається зміщення середнього значення площини піку стандарту з **118,939** до **26143,301-26156,640** (випробуваного зразку).

<p><i>Стандартні зразки, ліофілізат мозетроксу: домішка А</i></p>	<p>Випробуваний зразок, <i>ліофілізат мозетроксу: Домішка А</i></p>
<p>значення R_t знаходиться при 11,601 хв.</p>	<p>значення R_t знаходиться в інтервалі 11,701-11,717 хв; середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 11,708 хв; середня різниця значень R_t знаходиться в інтервалі 0,016 хв.; RSD не перевищує 5%: 0,10%; площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 24,202-24,792; середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 24,488; RSD не перевищує 5%: 2,40%.</p>

Домішка А (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Значення R_t стандарту знаходиться при **11,601 хв** – у досліджуваного зразку значення R_t зміщується у інтервал **11,701-11,717 хв**;

Відповідно відбувається зміщення середнього значення R_t стандарту з **11,600 хв** до **11,701-11,717 хв** (випробуваного зразку).

Зміна цих параметрів вказує на присутність неспецифікованих неприпустимих домішок у складі досліджуваної субстанції: *Домішка С* з R_t у інтервалі 4,804-4,810 хв; *Домішка D* з R_t у інтервалі 6,725-6,734 хв.

УФ-спектр поглинання досліджуваного зразку субстанції бортезомібу, 20 мг/л (у етанолі) (спектрометр Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC) представлено на рисунку 3.5.

УФ-спектр досліджуваної субстанції бортезомібу має максимум поглинання $\lambda = 270$ нм (Clark, A 1%, 1 cm=275).

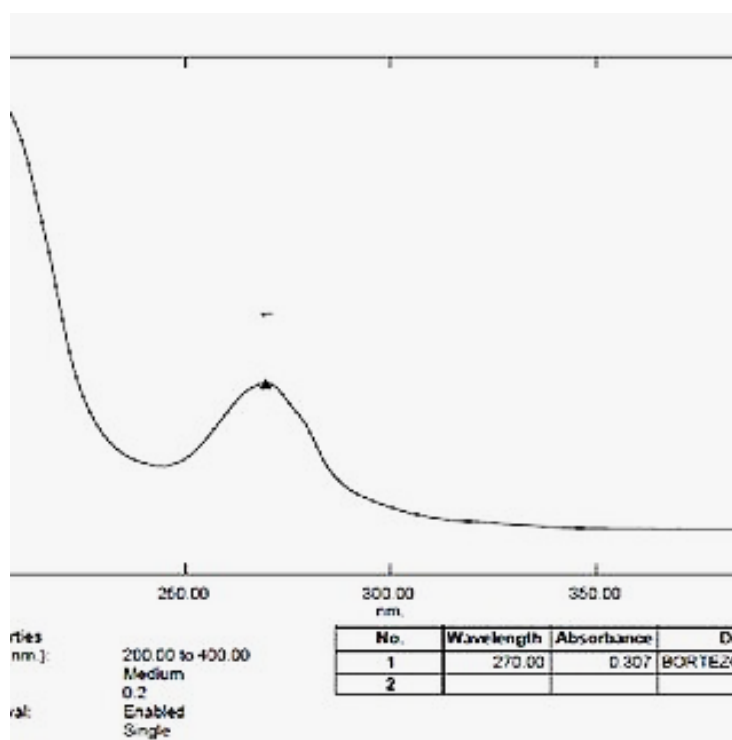


Рисунок 3.5. УФ-спектр бортезомібу субстанції.

Зміщення сигналів на УФ-спектрі доводить присутність у складі субстанції неспецифікованих домішок, які було виявлено під час хроматографування методом ВЕРХ. Отримані результати дозволяють зробити висновок щодо ступеню очистки субстанції бортезомібу та готовності її використання для подальших технологічних процедур.

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.

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.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ придатності хроматографічної системи, досліджуваного стандартного зразку і випробуваного зразку бортезомібу субстанції у ліофілізаті як активної діючої речовини мозетроксу.
2. Розроблено методики хроматографування методом ВЕРХ, методики приготування випробувальних розчинів субстанції бортезомібу у ліофілізаті, підбрано умови виконання, а саме: *Рухома фаза А* – 300 мл ацетонітрилу, 300 мл води, 1 мл кислоти мурашиної; *Рухома фаза В* – 800 мл ацетонітрилу, 200 мл води, 1 мл кислоти мурашиної.
3. Проведене УФ-спектральне та хроматографічне дослідження методом ВЕРХ субстанції бортезомібу субстанції у ліофілізаті показало, що досліджувана субстанція бортезомібу має значення $R_t=8,713$ та $\lambda = 270$ нм, специфікована домішка А – $R_t=11,701$, однак субстанція містить неспецифіковані/не ідентифіковані домішки: домішка С ($R_t=4,804$), домішка D ($R_t=6,725$), вміст яких впливає на якість 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. Natural Products-Pyrazine Hybrids: A Review of Developments in Medicinal Chemistry. Chen GQ, Guo HY, Quan ZS, Shen QK, Li X, Luan T. *Molecules*. 2023 Nov 5;28(21):7440. doi: 10.3390/molecules28217440.PMID: 37959859.
3. Development of AMBER Parameters for Molecular Simulations of Selected Boron-Based Covalent Ligands. Chiacchio MA, Legnani L, Fassi EMA, Roda G, Grazioso G. *Molecules*. 2023 Mar 22;28(6):2866. doi: 10.3390/molecules28062866.PMID: 36985837.
4. Integrative transcriptome analysis of SARS-CoV-2 human-infected cells combined with deep learning algorithms identifies two potential cellular targets for the treatment of coronavirus disease. Gonçalves RL, de Souza GAP, de Souza Terceti M, de Castro RFG, de Mello Silva B, Novaes RD, Malaquias LCC, Coelho LFL. *Braz J Microbiol*. 2023 Mar;54(1):53-68. doi: 10.1007/s42770-022-00875-2. Epub 2022 Nov 26.PMID: 36435956.
5. Targeting Key Signaling Pathways in Glioblastoma Stem Cells for the Development of Efficient Chemo- and Immunotherapy. Helweg LP, Storm J, Witte KE, Schulten W, Wrachtrup L, Janotte T, Kitke A, Greiner JFW, Knabbe C, Kaltschmidt B, Simon M, Kaltschmidt C. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 26;23(21):12919. doi: 10.3390/ijms232112919.PMID: 36361720.
6. Proteasome Inhibitors and Their Potential Applicability in Osteosarcoma Treatment. Van Stiphout CM, Luu AK, Vilorio-Petit AM. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 20;14(19):4544. doi: 10.3390/cancers14194544.PMID: 36230467

7. Barreca, M.; Spanò, V.; Rocca, R.; Bivacqua, R.; Gualtieri, G.; Raimondi, M.V.; Gaudio, E.; Bortolozzi, R.; Manfreda, L.; Bai, R.; et al. Identification of pyrrolo[3',4':3,4]cyclohepta[1,2-d][1,2]oxazoles as promising new candidates for the treatment of lymphomas. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, 254, 115372.
8. Bivacqua, R.; Barreca, M.; Spanò, V.; Raimondi, M.V.; Romeo, I.; Alcaro, S.; Andrei, G.; Barraja, P.; Montalbano, A. Insight into non-nucleoside triazole-based systems as viral polymerases inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, 249, 115136.
9. Huigens, R.W., III; Brummel, B.R.; Tenneti, S.; Garrison, A.T.; Xiao, T. Pyrazine and Phenazine Heterocycles: Platforms for Total Synthesis and Drug Discovery. *Molecules* 2022, 27, 1112.
10. Choudhary, D.; Garg, S.; Kaur, M.; Sohal, H.S.; Malhi, D.S.; Kaur, L.; Verma, M.; Sharma, A.; Mutreja, V. Advances in the Synthesis and Bio-Applications of Pyrazine Derivatives: A Review. *Polycycl. Aromat. Compd.* 2023, 43, 4512–4578.
11. Masaret, G.S.; Farghaly, T.A.; Al-Hussain, S.A.; Zaki, M.E.A.; Alsaedi, A.M.R.; Muhammad, Z.A. Site-Selectivity of the Reaction of 3-Amino-4-Cyano-5-Phenyl-1H-Pyrrole-2-Carboxylic Acid Amide with α -Halocarbonyl Compounds. Antimicrobial Activity and Docking Study for COVID-19 of the Products. *Polycycl. Aromat. Compd.* 2023, 43, 7110–7126.
12. Guo, Q.; Xu, M.; Guo, S.; Zhu, F.; Xie, Y.; Shen, J. The complete synthesis of favipiravir from 2-aminopyrazine. *Chem. Pap.* 2019, 73, 1043–1051.
13. Agrawal, U.; Raju, R.; Udawadia, Z.F. Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Med. J. Armed Forces India* 2020, 76, 370–376.
14. Manabe, T.; Kambayashi, D.; Akatsu, H.; Kudo, K. Favipiravir for the treatment of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2021, 21, 489.

15. Liu, Y.; Zhou, Y.; Qiao, J.; Yu, W.; Pan, X.; Zhang, T.; Liu, Y.; Lu, S.E. Phenazine-1-carboxylic Acid Produced by *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 Is Effective against *Acidovorax citrulli*. *Microorganisms* 2021, 9, 2012.
16. Montazeri, K.; Bellmunt, J. Erdafitinib for the treatment of metastatic bladder cancer. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2020, 13, 1–6.
17. Weng, W.; Hong, J.; Owusu-Ansah, K.G.; Chen, B.; Zheng, S.; Jiang, D. Pralatrexate mediates effective killing of gemcitabine-resistant pancreatic cancer: Role of mTOR/4E-BP1 signal pathway. *Heliyon* 2022, 8, e12064.
18. Bogani, G.; Monk, B.J.; Coleman, R.L.; Vergote, I.; Oakin, A.; Ray-Coquard, I.; Mariani, A.; Scambia, G.; Raspagliesi, F.; Bolognese, B. Selinexor in patients with advanced and recurrent endometrial cancer. *Curr. Probl. Cancer* 2023, 100963.
19. Wang, M.; Cao, G.; Zhou, J.; Cai, J.; Ma, X.; Liu, Z.; Huang, X.; Wang, H. Ligustrazine-Derived Chalcones-Modified Platinum(IV) Complexes Intervene in Cisplatin Resistance in Pancreatic Cancer through Ferroptosis and Apoptosis. *J. Med. Chem.* 2023, 66, 13587–13606.
20. Nkepeng, G.; Bio, M.; Rajaputra, P.; Awuah, S.G.; You, Y. Folate Receptor-Mediated Enhanced and Specific Delivery of Far-Red Light-Activatable Prodrugs of Combretastatin A-4 to FR-Positive Tumor. *Bioconjug. Chem.* 2014, 25, 2175–2188.
21. Chen, L.Z.; Shu, H.Y.; Wu, J.; Yu, Y.L.; Ma, D.; Huang, X.; Liu, M.M.; Liu, X.H.; Shi, J.B. Discovery and development of novel pyrimidine and pyrazolo/thieno-fused pyrimidine derivatives as potent and orally active inducible nitric oxide synthase dimerization inhibitor with efficacy for arthritis. *Eur. J. Med. Chem.* 2021, 213, 113174.
22. Guo, W.B.; Zhang, H.; Yan, W.Q.; Liu, Y.M.; Zhou, F.; Cai, D.S.; Zhang, W.X.; Huang, X.M.; Jia, X.H.; Chen, H.S.; et al. Design, synthesis, and biological evaluation of ligustrazine—Betulin amino-acid/dipeptide derivatives as anti-tumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2020, 185, 111839.

23. Frederic Ballaschk, Hellmuth Erhardt and Stefan F. Kirsch. Synthesis of substituted pyrazines from *N*-allyl malonamides. *RSC Adv.*, 2017, 7, 55594-55597.
24. [Pyrazine | C4H4N2 | ChemSpider](#)". *www.chemspider.com*. Retrieved 4 January 2022.
25. Gurpreet Kaur, Arvind Singh, Navdeep Kaur & Bubun Banerjee (2021) A general method for the synthesis of structurally diverse quinoxalines and pyrido-pyrazine derivatives using camphor sulfonic acid as an efficient organo-catalyst at room temperature, *Synthetic Communications*, 51:7, 1121-1131, DOI: [10.1080/00397911.2021.1873383](https://doi.org/10.1080/00397911.2021.1873383).
26. Kaur, G.; Singh, A.; Bala, K.; Devi, M.; Kumari, A.; Devi, S.; Devi, R.; Gupta, V. K.; Banerjee, B. Naturally Occurring Organic Acid-Catalyzed Facile Diastereoselective Synthesis of Biologically Active (E)-3-(Arylimino)Indolin-2-One Derivatives in Water at Room Temperature. *Curr. Green Chem.* 2019, 23, 1778–1788. DOI: [10.2174/1385272822666190924182538](https://doi.org/10.2174/1385272822666190924182538).
27. Singh, A.; Kaur, G.; Kaur, A.; Gupta, V. K.; Banerjee, B. A General Method for the Synthesis of 3,3-Bis(Indol-3-yl)Indolin-2-Ones, Bis(Indol-3-yl)(Aryl)Methanes and Tris(Indol-3-yl)Methanes Using Naturally Occurring Mandelic Acid as an Efficient Organo-Catalyst in Aqueous Ethanol at Room Temperature. *Curr. Green Chem.* 2020, 7, 128–140. DOI: [10.2174/2213346107666200228125715](https://doi.org/10.2174/2213346107666200228125715).
28. Kaur, G.; Shamim, M.; Bhardwaj, V.; Gupta, V. K.; Banerjee, B. Mandelic Acid Catalyzed One-Pot Threecomponent Synthesis of α -Aminonitriles and α -Aminophosphonates under Solvent-Free Conditions at Room Temperature. *Synth. Commun.* 2020, 50, 1545–1560. DOI: [10.1080/00397911.2020.1745844](https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1745844).

29. 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.
30. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 3469-3473.

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.

