

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ

О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

хімії ліків та лікарської токсикології

(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Дослідження субстанції інгібітору карбоангідази
бринзоламідю на вміст недопустимих домішок за допомогою методу
ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1А
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»

(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання

Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»

«Фармація»

(назва освітньої програми)

Шевченко Мирослава Ігорівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: професор, д.фарм.н. Вельчинська О.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: доцент, к.фарм. н. Козіко Н.О.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ СУЛЬФОНАМІДІВ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови сульфонамідів.....	9
1.2. Біологічна активність сульфонамідів.....	15
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ БРИНЗОЛАМІДУ.....	20
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості бринзоламідум.....	20
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38
SUMMARY.....	42
ДОДАТОК 1.....	43

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

МА – місцеві анестетики

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

BZ – Бринзоламін

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

DHPS – дигідроптероатсинтази

Hal – галоген

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

pABA – пара-амінобензойна кислота

ВСТУП

Актуальність теми. Бринзоламід відноситься до інгібіторів карбоангідрازی, наприклад, карбоангідрازی II. Карбоангідраза міститься в еритроцитах, в інших тканинах, включаючи око. Він існує у вигляді ізоферментів. Найактивніший із них – це карбоангідраза II (CA-II).

Застосовують бринзоламід для лікування глаукоми, підвищеного внутрішньоочного тиску, який виникає внаслідок надлишкового утворення водянистої вологи або неадекватного дренажу вологи.

Бринзоламід має побічні ефекти. Це – затуманення зору, свербіж, біль, слезотеча, сухість очей, головний біль, нежить. Всі ці побічні ефекти виникають часто. Більш серйозні побічні ефекти виникають рідко, але мають тяжкий наслідок. Це – нерегулярне серцебиття, непритомність, свербіж, сильне подразнення та набряк очей, набряк обличчя, проблеми з диханням.

Необхідно вживати запобіжні заходи, якщо спостерігається підвищена чутливість до сульфаніламідів, при гострій закритокутовій глаукомі. Необхідно припинити застосування пероральних інгібіторів карбоангідрازی. Не можна приймати бринзоламід при хронічних захворюваннях нирок або печінки середнього та тяжкого ступеня [1-3].

Бринзоламід — білий порошок, у вигляді 1% офтальмологічної суспензії для зниження внутрішньоочного тиску. Фармакологічно бринзоламід є високоспецифічним, неконкурентним, ефективним інгібітором карбоангідрازی II (CA-II). Він здатен пригнічувати утворення водянистої вологи в оці. Як відмічають у літературі, найпоширенішими побічними ефектами з боку очей є розмитість зору (3%-8%), дискомфорт в очах (1,8%-5,9%) і біль в очах (0,7%-4,0%) [4-6].

У деяких клінічних дослідженнях встановлено, що бринзоламід знижує внутрішньоочний тиск на 18 %. Бринзоламід додають до бета-блокаторів та простагландинів. У комбінації з простагландинами він покращує увеосклеральний відтік, збільшує активність в миготливому епітелії із збільшенням секреції водянистої вологи, знижує ефективність аналогів простагландинів. Таким чином, відмічалася покращена ефективність простагландинів та зниження внутрішньоочного тиску. Бринзоламід може мати вторинний можливий вплив на очний кровотік [6-11].

Бринзоламід є сульфонамідом та інгібітором карбоангідрази. Після місцевого введення в очі бринзоламід пригнічує карбоангідразу II. Це гальмування призводить до зменшення секреції водянистої вологи шляхом уповільнення утворення бікарбонатних іонів.

Бринзоламід є небезпечною речовиною, має токсичність та потребує обережного застосування у фармацевтичній практиці.

Контроль якості цієї субстанції потребує ретельних процедур за допомогою інструментальних методів. Якість лікарського засобу субстанції Бринзоламід є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Бринзоламід – це органічна сполука, до хімічної структури якої входять фармакофорні угруповання та функціональні групи – алкіл-радикали, метокси група, аміно група первинна та вторинна, п'яти- та шестичленні гетероцикли, сульфо групи. Необхідно відмітити, що молекула містить три атоми Сульфуру та ароматичну спряжену систему.

Субстанцію та лікарський засіб Бринзоламід аналізують за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів. Молекула Бринзоламід є високоактивною у хімічних реакціях. Можна передбачити формування у субстанції внутрішньомолекулярних зв'язків вільними функціональними групами,

здатність до деградації молекули, гідроліз та заміщення атомів Гідрогену по позиції аміно групи.

Під час синтезу субстанції Бринзоламідум можливе утворення побічних продуктів, супровідних речовин, які у якості домішок впливають на якість субстанції.

Завданням фармацевтичного аналізу субстанції Бринзоламідум залишається якісне виявлення та кількісне визначення специфікованих і неспецифікованих домішок шляхом розширення кола сучасних інструментальних методів, які не описано у Фармакопеях. Важливим є введення нових методів у фармацевтичну практику для підвищення якості аналізу.

Актуальним завданням даного експериментального дослідження є розробка умов хроматографування при дослідженні субстанції Бринзоламідум методом ВЕРХ, підтвердження чистоти субстанції спектральними методами, методик пробопідготовки зразків, що дозволить зробити коректні висновки щодо її якості.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування та спектральних досліджень (ІЧ-абсорбційна спектрофотометрія), методик підготовки досліджуваних розчинів та експериментальних процедур зразків субстанції Бринзоламідум.

Завдання експериментального дослідження:

- Розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції Бринзоламідум;
- розробити методики (ВЕРХ) хроматографування та спектрального дослідження (ІЧ-спектрофотометрія) субстанції Бринзоламідум;
- провести експериментальні дослідження зразків субстанції Бринзоламідум та інтерпретувати результати досліджень.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у розробці нових умов та методик досліджень методом ВЕРХ та спектрофотометрично субстанції Бринзоламиду з метою підтверження її якості.

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

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

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 22.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ СУЛЬФОНАМІДІВ

1.1. Особливості хімічної будови сульфонамідів

Бринзоламід має хімічну номенклатурну назву ІЮПАК (5R)-5-етиламіно-3-(3-метоксипропіл)-2,2-діоксо-2λ,9-дитіа-3-азабіцикло[4.3.0]нона-7,10-дієн-8-сульфонамід. Молекула має у своєму складі фармакофорні угруповання, а також, великий набір функціональних груп – алкіл-радикали, метокси група, аміно група первинна та вторинна, п'яти- та шестичленні гетероцикли, ароматичну спряжену систему, сульфо групи – три атоми Сульфуру. Проявляє властивості основи за рахунок присутності первинних та вторинних аміно групи та вільних електронів на трьох атомах Сульфуру (рис. 1.1.1).

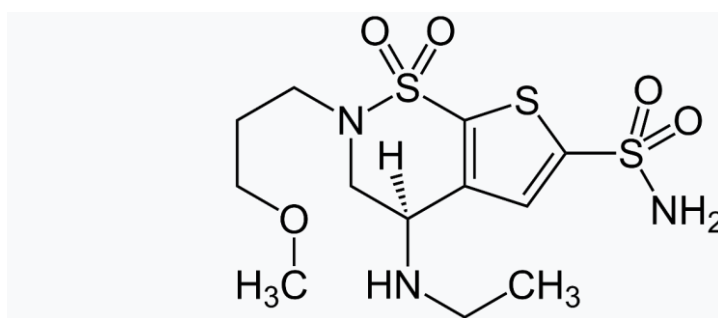
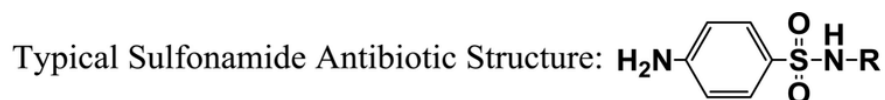


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула Бринзоламід.

Хімічні формули сульфонамідів (сульфацетамід, сульфадіазин, сульфадиметоксин, сульфаметазин, сульфаметоксазол, сульфамеразин тощо) представлені на рисунку 1.1.2.



<u>Compound</u>	<u>R =</u>	<u>Compound</u>	<u>R =</u>
Sulfacetamide (SA)		Sulfamethazine (SM)	
Sulfadiazine (SD)		Sulfamethoxazole (SMZ)	
Sulfadimethoxine (SDM)		Sulfapyridine (SP)	
Sulfaguanidine (SG)		Sulfathiazole (ST)	
Sulfamerazine (SAM)			

Рисунок 1.1.2. Хімічні формули препаратів – сульфонамідів.

Наявність антибіотиків у стічних водах, у поверхневих і підземних водах викликає занепокоєння щодо поширення стійкості до антибіотиків.

Покращення видалення антибіотиків під час очищення стічних вод є головною метою екологічної інженерії.

Птерин-сульфонамідні кон'югати, які утворюються при взаємодії сульфаніламідів з цільовим ферментом для пригнічення синтезу фолієвої кислоти – це є основний шлях біотрансформації сульфонамідів.

Основні кон'югати були присутні у стічних водах. Демонстрація цього шляху біотрансформації, пов'язаного із ростом бактерій, допомагає зрозуміти оптимальні умови видалення сульфонамідів. Кон'югати птерин-сульфонамідів мають антибіотичну активність. Ризик від впливу сульфаніламідних антибіотиків можна знизити під час очищення стічних вод. Таким чином, результати досліджень підтверджують важливість дослідження шляхів

біотрансформації, видалення біологічної активності для оцінки видалення забруднюючих речовин у природних системах (рис. 1.1.3).

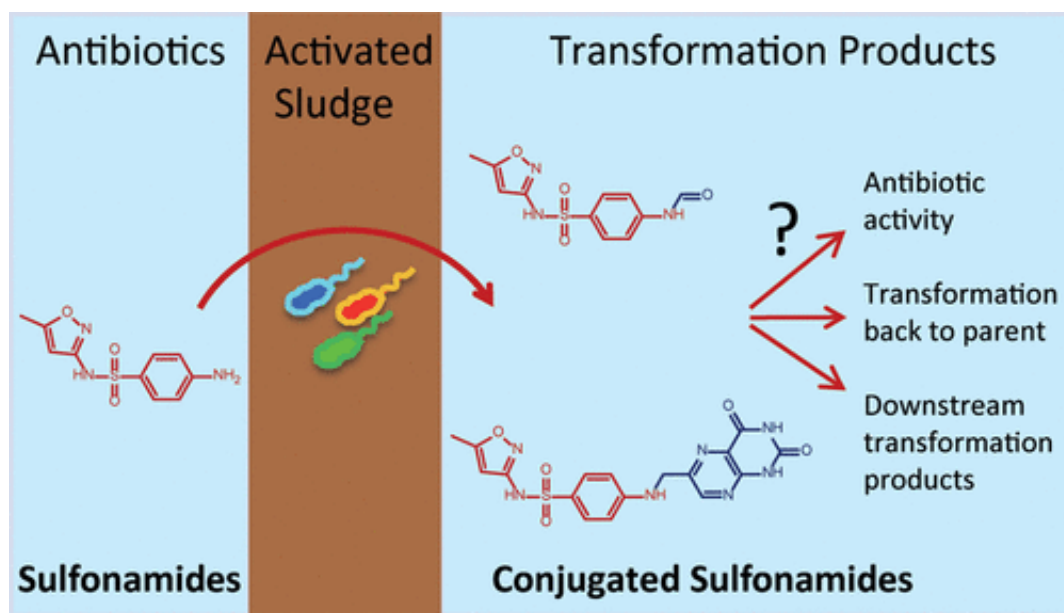


Рисунок 1.1.3. Схема метаболізму сульфонамідів.

Ветеринарні антибіотики – сульфаніламідни, широко використовуються для підвищення ефективності кормів і захисту від хвороб.

Сульфаніламідний протимікробний механізм заключається у блокуванні біосинтезу фолієвої кислоти шляхом конкурентного пригнічення активності бактеріальної дигідрофтероатсинтази (DHPS).

Більшість антибіотиків потрапляють у навколишнє середовище через гній, призводити до дифузного забруднення навколишнього середовища.

Фізіологічні ефекти сульфаніламідів під час росту та розвитку рослин залишаються недослідженими. Реакція рослин залежить від біосинтезу фолієвої кислоти та концентрації антибіотиків. Описано модель стикування хімічної взаємодії між DHPS капусти *Napa* (*Brassica campestris*) та сульфаметоксазолу або сульфаметазину. Ці сульфаніламідни є найпоширенішими з тих, які виявлено у навколишньому середовищі.

Пригнічення росту проростків спостерігалось у рослин сочевиці (*Lens culinaris*), рису (*Oryza sativa*) і капусти під впливом сульфаніламідів.

Сульфонамідні антибіотики націлені на DHPS рослин за модулем, який подібний до бактеріального DHPS. Вони впливають на ранній ріст і розвиток розсади культур. Таким чином, сульфаніламідні діють як забруднювачі на полях посівів [12-17].

Антибіотики – біологічно активні молекули, які використовуються для лікування різних бактеріальних, протозойних і грибкових інфекцій.

Використання антибіотиків як протимікробних агентів зросло в світі через потребу в терапевтичному лікуванні інфекцій і захворювань, спричинених бактеріями.

Сульфонаміди є найстарішими хімічно синтезованими молекулами антибіотиків з більш ніж 5000 похідними. Більшість сульфаніламідних антибіотиків, що використовуються у медицині та ветеринарії, залишаються біологічно активними як метаболіт після виведення з організму людини.

Щорічне використання сульфаніламідних препаратів у тваринництві або ветеринарії становить приблизно 10–23% від загального використання антибіотиків. Використання антибіотиків у ветеринарних цілях приблизно в п'ять разів більше, ніж для людей.

Майже 90% антибіотиків виводиться з калом і гноєм. Вони потрапляють у середовище шляхом внесення органічного гною для удобрення ґрунту. Широке застосування ветеринарних антибіотиків призвело до частого виявлення антибіотиків – сульфаніламідів у навколишньому середовищі. Ці забруднювачі накопичуються в ґрунті, впливають на мікроорганізми [18-20].

Культурні рослини змінюють свій ріст і розвиток, щоб реагувати на зовнішнє середовище [13,14].

Оскільки антибіотики є фактором екологічного стресу, ріст і розвиток рослин змінюється. Вивчається питання, як антибіотики в ґрунті мають біологічний і фізіологічний вплив на ріст і розвиток рослин.

Антибіотики поглинаються рослинами, забруднюють харчові культури, загрожують здоров'ю людини.

Важливо розуміти потенційний вплив антибіотиків на ріст і розвиток рослин. Спосіб дії (МОА) сульфаніламідів визначений для антимікробної активності – біосинтетичний шлях фолату.

При визначенні мішені антибіотиків вивчаються метаболічні шляхи обчисленням аналізів. Всі речовини зв'язуються зі структурно подібними ендogenousними субстратами та продуктами. Сульфаніламідна структура включає сульфонамідну групу та аміногрупу в пара-положенні бензольного кільця. Сульфонамідні похідні отримують заміщенням R-структури атому Нітрогену в сульфонамідній групі.

pABA (пара-амінобензойна кислота) складається з бензольного кільця, заміщеного аміно- та карбоксильними групами. Вона структурно подібна до сульфонамідних антибіотиків. pABA бере участь у різноманітних метаболічних процесах. Має антиоксидантні, антимуутагенні, захисні та репаративні властивості [19, 20].

Сульфаніламідні замінили pABA в біосинтезі фолієвої кислоти. Вони можуть діяти як альтернативні субстрати для утворення сульфа-DHP за допомогою DHPS. Це вказує, що сульфаніламідні відіграють роль конкурентних інгібіторів DHPS.

Крім того, нокаутний штам *Saccharomyces cerevisiae* DHPS показує нечутливі до сульфонамідів клітини, що підтверджує те, що сульфаніламідні безпосередньо атакують фермент DHPS.

На етапі біосинтезу фолієвої кислоти сульфа-DHP не міг реагувати з дигідрофолатсинтетазою (DHFS). Він зупиняв подальший шлях біосинтезу фолієвої кислоти.

Сульфаніламідні препарати призводять до дефіциту фолієвої кислоти та впливають на поділ і ріст клітин.

Фолати — це розчинні вітаміни. Вони опосередковують перенесення одновуглецевих (C1) одиниць у ряді реакцій, які називають метаболізмом C1. Реакція передачі C1 метаболізму фолієвої кислоти має вирішальну роль у всіх

живих організмах.

Пригнічення біосинтезу фолієвої кислоти впливає на ріст і розвиток живих організмів – мікроорганізми та рослини, які мають цикл біосинтезу фолієвої кислоти. Ссавці потребують харчових запасів розчинних вітамінів через відсутність біосинтезу фолієвої кислоти.

Біосинтез фолієвої кислоти вимагає складного субклітинного компартментування.

Фолати складаються з трьох різних хімічних компонентів: птерину, п-амінобензойної кислоти (pABA) і глутамату.

Біосинтез окремих структурних частин у рослинних клітинах розділені на компартменти: пластиди, цитозолі, вакуолі та мітохондрії. Частина кільця птерину з гуанозинтрифосфату (GTP) у цитозолі та pABA, утворена з хоризмату в пластидах. Потім вона глутамілюється та відновлюється в мітохондріях. pABA і 6-гідроксиметилдигідроцерин (HMDHP) потрапляють у мітохондрії шляхом дифузії транслокації, збираються мітохондріальними ферментами.

На першому етапі збирання частин під час біосинтезу фолієвої кислоти 7,8-дигідроцерин (DHP) виявлений в мітохондріях. Це вказує на те, що каталізуючий фермент знаходиться в мітохондріях.

Молекулярні та біохімічні експерименти показали, що біфункціональний HPPK-DHPS каталізує цю реакцію, вибудовує ідентичну олігомерну структуру в матриці.

6-гідроксиметил-7,8-дигідроцерин перетворюється на 6-гідрозиметил-7,8-дигідроцерин пірофосфат під дією домену HPPK (HMDHP пірофосфокінази). Домен DHPS каталізує конденсацію HMDHP-pp з pABA з утворенням 7,8-дигідроцеринату. Потім DHFS, DHFR і FPGS функціонують послідовно.

Птеринове кільце фолієвої кислоти знаходиться у природі в дигідро- або тетрагідроформі. Кільце повністю окислюється фолієвою кислотою.

Тетрагідрофолат (ТНФ), його похідні називаються фолатами. Сульфаніламід перетворюється на сульфа-DHP за допомогою DHPS у мітохондріях. сульфа-DHP діє як конкурент рАВА.

Сульфонаміди пригнічують DHPS рослин, блокуючи подальші етапи біосинтезу фолієвої кислоти. Вони можуть впливати на накопичення рівня фолієвої кислоти. Сульфаніламідні спричиняють дефіцит фолієвої кислоти в рослинах.

1.2. Біологічна активність сульфонамідів

Ускладнення з боку нирок у зв'язку з введенням сульфаніламідів: кристалурія, тубулярний некроз, інтерстиціальний нефрит, ураження клубочків, синдром васкуліту.

Сульфаніламід та їх метаболіти виводяться із сечею. Вони нерозчинні в кислому середовищі, мають властивість випадати в осад у нирках, в сечоводах.

Нефрокальциноз викликає гематурію, ниркову кольку, гостру ниркову недостатність. Обструкція сечовипускання з анурією/олігурією спостерігалася при застосуванні менш розчинних сульфаніламідів.

З більш розчинними сульфаніламидами рідко утворюється кристали, гостра ниркова недостатність. Ускладнення з боку нирок частіше спостерігалися у хворих на СНІД через застосування великих доз сульфаніламідів у поєднанні з триметопримом.

Зменшене споживання рідини та низький рН сечі сприяють утворенню кристалів. Тому при застосуванні більших доз сульфаніламідів необхідно вживати достатню кількість рідини і підлужнення сечі.

Для діагностики сульфаніламідної кристалурії рекомендують тест на лігнін. Кристали можна знайти у сечі пацієнтів, які приймають добре розчинний сульфаметоксазол.

У пацієнтів з нелікованою ВІЛ-інфекцією розвивалася сплутаність свідомості та задишка. В анамнезі вони мав ішемічну хворобу серця та інфекцію гепатиту С.

Виявлено, що у них була пневмонія, спричинена *Pneumocystis jirovecii*, церебральний токсоплазмоз. Пацієнтам призначали ко-тримоксазол для лікування *Pneumocystis pneumonia* та сульфадіазин для лікування токсоплазмозу. Пізніше ко-тримоксазол відмінили через одночасне лікування сульфадіазином.

Також, розвивалася макроскопічна гематурія та профузна кристалурія. Креатинін підвищувався до 250 мкмоль/л. УЗД нирок було нормальним. Морфологічне дослідження кристалів підтвердило наявність сульфаніламідів. Сульфадіазин було скасовано.

Сульфадіазин – це слабка кислота, випадає в осад у вигляді кристалів у просвіті каналців при рН сечі 5,5. Пацієнти, які приймають дози більше 4 г/добу, повинні вживати велику кількість рідини.

Двосторонній біль у боці, прогресуюча олігурія розвивається протягом 3 тижнів у пацієнтів, які приймали сульфадіазин для токсоплазмозного ретиніту. Під час другого КТ було виявлено сечокам'яну хворобу. В сечі виявлено кристали сульфаніламідів.

Спостерігалися інші ускладнення з боку нирок при застосуванні сульфаніламідів: гострий тубулярний некроз, тубулоінтерстиціальний нефрит, інтерстиціальний нефрит. У деяких випадках спостерігалися гранулематозні ураження, гострий васкуліт, гостра ниркова недостатність, сироваткова хвороба, ураження печінки.

Гостра анурія є першим симптомом не тільки у пацієнтів з тубулярним некрозом та нефритом, а й у пацієнтів з алергічним васкулітом.

Може виникати неолігурична ниркова недостатність. Нестабільні гідроксиламінові метаболіти сульфонамідів можуть діяти як прямі ниркові токсини.

За допомогою інфрачервоної спектроскопії проаналізована сеча при сечокам'яній хворобі, яка була спричинена ліками. Це камені з фізично вбудованими ліками (n = 238; 1,0%) – індинавір моногідрат (n = 126; 53%), триамтерен (n = 43; 18%), сульфаніламід (n = 29; 12%) та аморфний кремнезем (n = 24; 10%). Це метаболічний нефролітиаз, індукований лікарськими засобами, що включає добавки кальцію/вітаміну та інгібітори карбоангідази. Камені, спричинені прийомом ліків, - це приблизно 1,6% усіх конкрементів.

У ВІЛ-позитивних пацієнтів з токсоплазмовим енцефалітом після лікування сульфадіазином розвинулася гостра ниркова недостатність. Ультразвукове дослідження нирок показало ехогенні ділянки, які є кристалами сульфату. Кристалурія виникає у 45% пацієнтів, які приймають сульфаніламід. Гостра ниркова недостатність розвивалася у 0,4–29%. Гідратація та підлужнення сечі можуть запобігти та усунути утворення кристалів (рис.1.2.1).

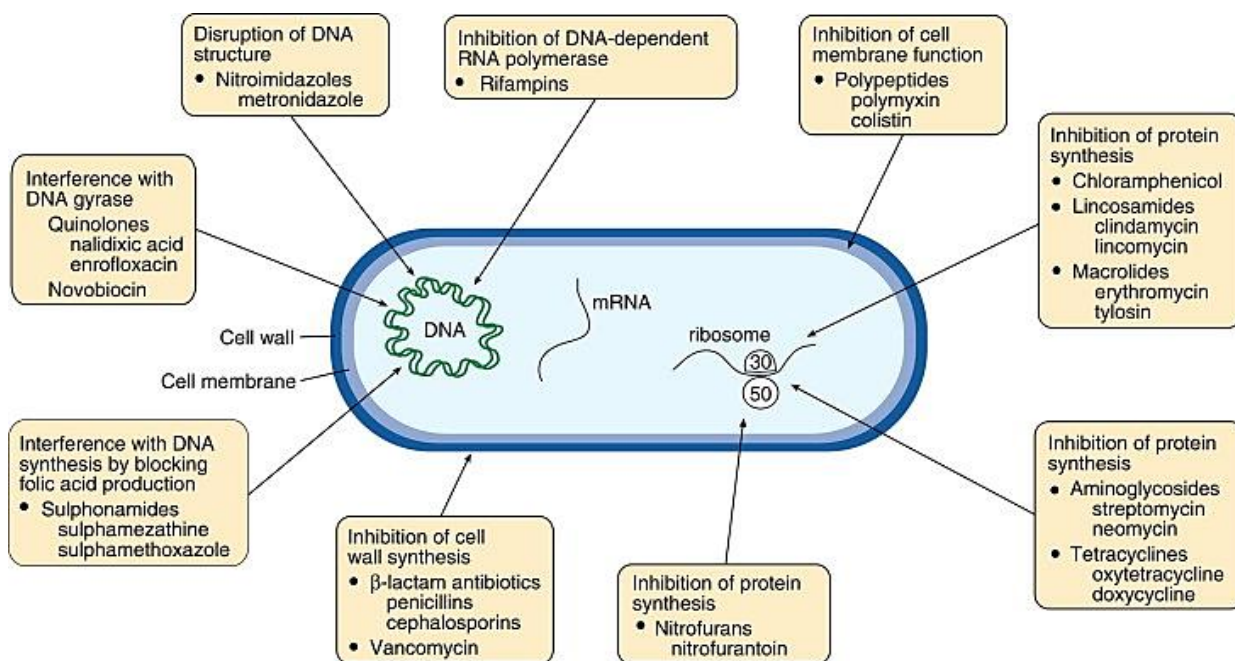


Рисунок 1.2.1. Вплив сульфонамідів на структури і органи.

Бринзоламід 1%/тимолол 0,5% (бринзоламід/тимолол) — це суспензія очних крапель, що містить інгібітор карбоангідрази-II бринзоламід і антагоніст β -адренергічних рецепторів тимолол.

Бринзоламід/тимолол викликав клінічно значуще зниження середнього внутрішньоочного тиску та був більш ефективним, ніж монотерапія бринзоламідом або тимололом. Ефективність зниження ВОТ бринзоламід/тимолол зберігається 12 місяців, була не менш ефективною, ніж дорзоламід 2%/тимолол 0,5% розчин (дорзоламід/тимолол).

Бринзоламід/тимолол добре переноситься, характеризується значно нижчими показниками дискомфорту в очах. Основною побічною реакцією з боку очей було розмитість зору (рис. 1.2.2).

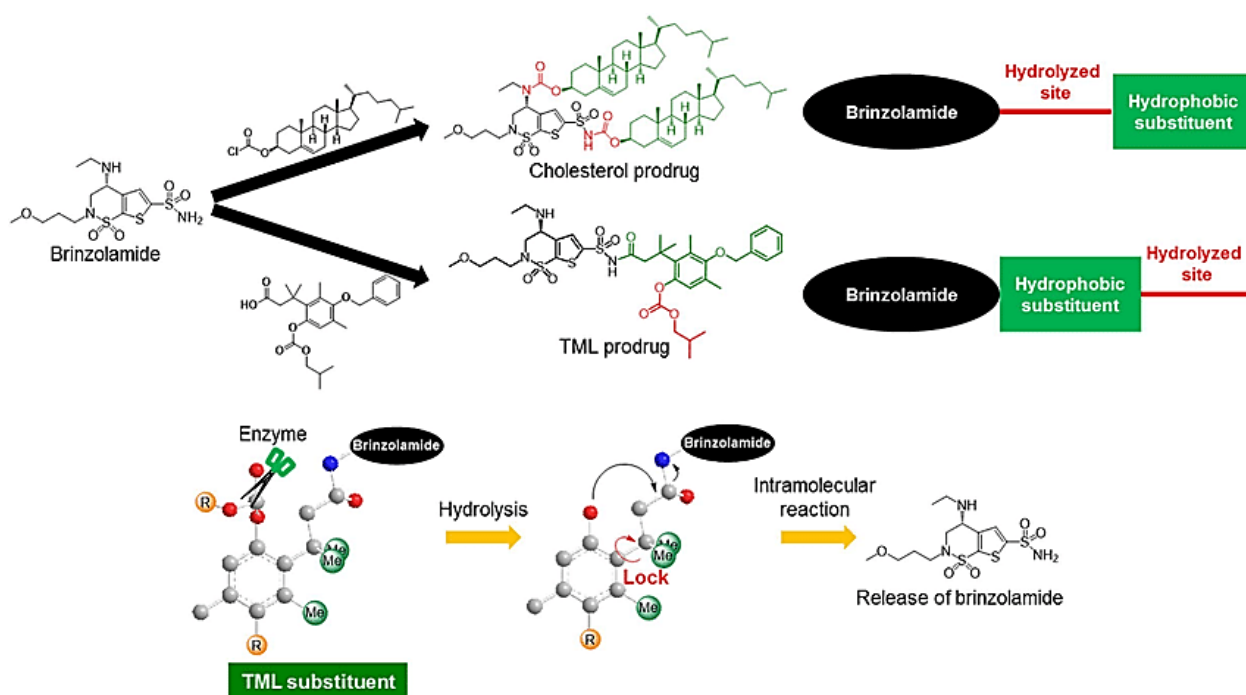


Рисунок 1.2.2. Вплив Бринзоламід/тимололу.

Основним фактором ризику розвитку ПОУГ є підвищення ВОТ, тому сульфонаміди, які знижують ВОТ, є основним методом лікування глаукоми. Лікарські засоби, що знижують вироблення АГ – це антагоністи β -адренорецепторів (тимолол, бетаксоллол, левобунолол), агоністи α_2 -

адренорецепторів (бримонідин, апраклонідин), інгібітори карбоангідрози (дорзоламід і бринзоламід).

Медична практика продовжує обмежувати використання таких препаратів, оскільки АГ важлива для живлення тканин передньої камери. Проте β -блокатори та інгібітори карбоангідрози часто призначають першими.

Звичайні препарати, що стимулюють відтік, включають мускаринові холінергічні агоністи (пілокарпін). Препарати, що стимулюють увеосклеральний відтік, представлені простагландинами класу FP (латанопрост, травопрост, біматопрост, ізопропіловий ефір унопростону).

В даний час простагландини класу FP є основними препаратами вибору для лікування очної гіпертензії та глаукоми.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ БРИНЗОЛАМІДУ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості бринзоламідру

Описано класичні та сучасні методи синтезу бринзоламідру.

Один із методів синтезу, який є ефективним і масштабованим процесом фармацевтичного бринзоламідру, базується на заміщенні тозилату первинним аміном (з інверсією) для отримання вторинного аміну (рис.2.1.1).

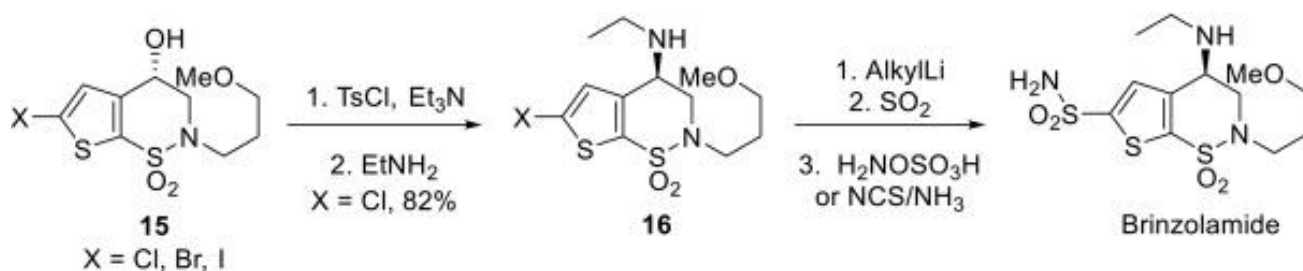


Рисунок 2.1.1. Синтез бринзоламідру.

Окиснення хлоральдегідів (R = Me, Et), опосередковане нітратом срібла, дало карбонові кислоти, які піддалися декарбоксилюванню, утворюючи хлороксидами. Дериватизація їх відбулася шляхом подальшого заміщення хлориду O-, N- та S-нуклеофілами з утворенням продуктів реакції (рис. 2.1.2).

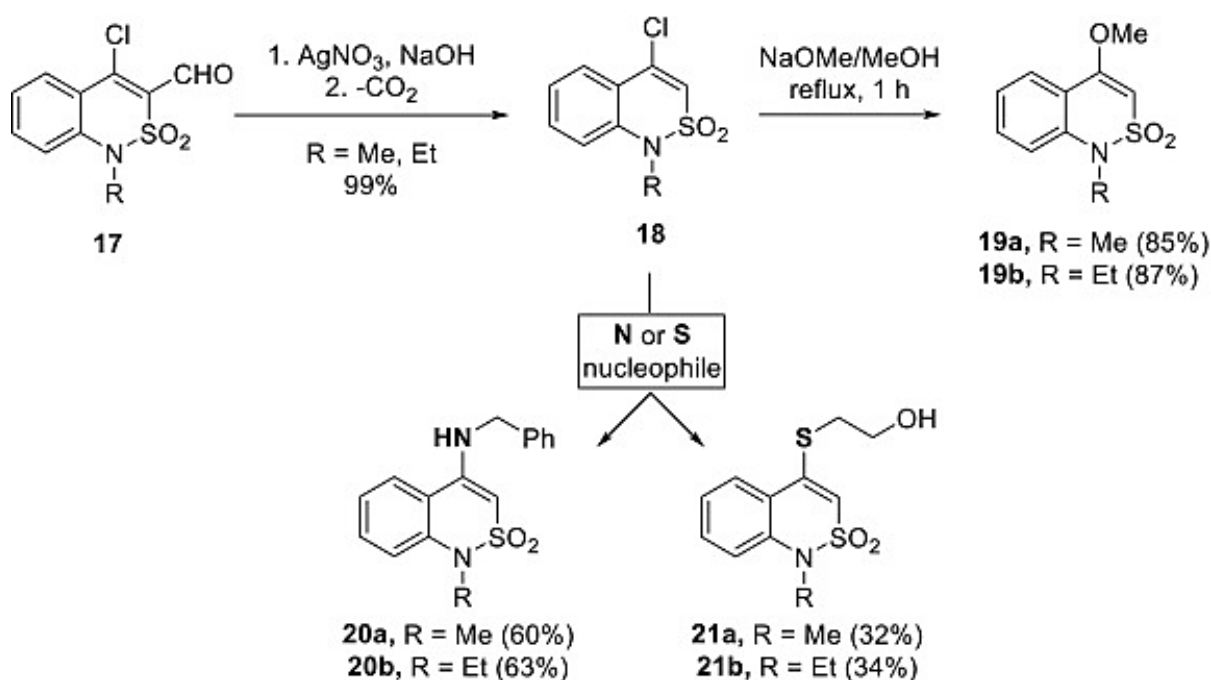


Рисунок 2.1.2. Окиснення хлоральдегідів.

Оксикам було перетворено на трифлат, який вступив у реакцію Судзукі-Міяури для встановлення системи арильного кільця. Це був приклад дериватизації, але сполука була неактивною під час тестування на інгібіторну активність проти 11 β -гідростероїддегідрогеназа типу 1 (рис. 2.1.3).

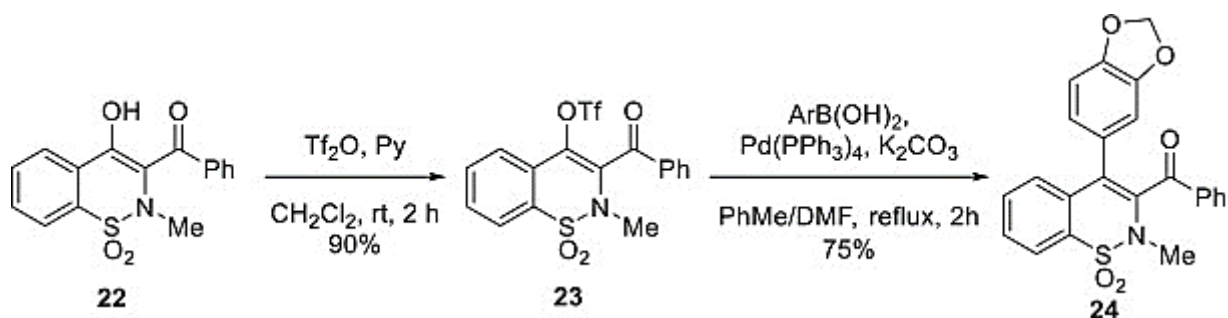


Рисунок 2.1.3. Перетворення Оксикаму на трифлат.

Сполуку 25 перетворена на 26 введенням метоксигрупи. Сполуки переважно існують у своїй енольній формі (рис.2.1.4).

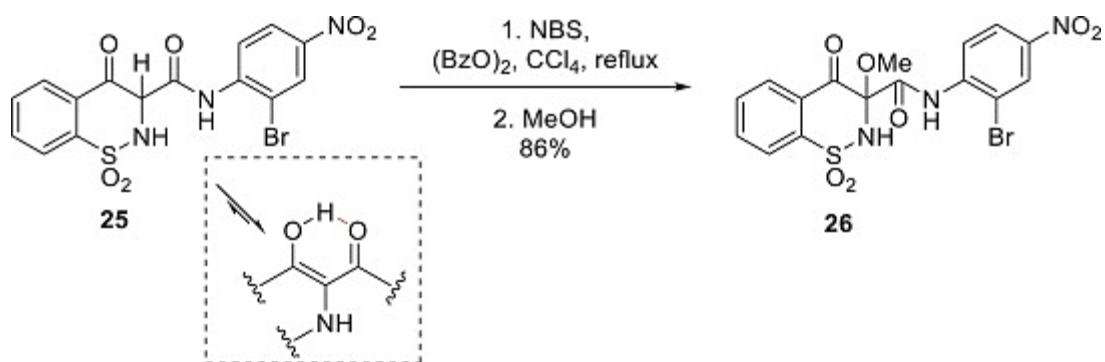


Рисунок 2.1.4. Схема введення метоксигрупи.

Ряд бісфосфонатів утворювався як реакційноздатні проміжні продукти з ряду тiazинтіонів. Циклізація була досягнута при нагріванні до кипіння у NaOEt/EtOH. Запропонований механізм включає розкриття кільця з наступним замиканням кільця з екструзією сірководню (рис.2.1.5).

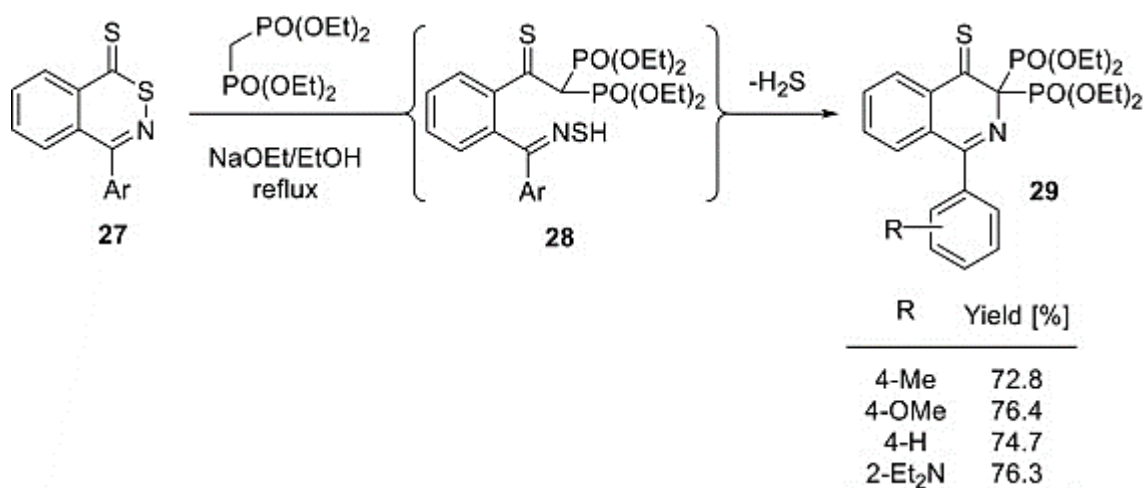


Рисунок 2.1.5. Утворення бісфосфонатів.

N-Сульфоніл-гетероцикли досліджені на предмет різноманітної біологічної активності. Деякі із них – це інгібітори фосфодіестерази

(силденафіл і варденафіл), продаються для лікування еректильної дисфункції (ЕД) і легеневої гіпертензії.

Серед антибіотиків азтреонам містить N-сульфоніловий гетероцикл. Азтреонам є бета-лактамним антибіотиком (монобактамом) із широким спектром антибактеріальної дії.

Мезлоцилін – один напівсинтетичний ампіцилін, який має N-сульфоніл-гетероцикл, має антибактеріальну активність для лікування різних інфекцій шкіри, сечостатевого шляху.

Деякі нестероїдні протизапальні засоби мають N-сульфоніл-гетероциклічні каркаси – піроксикам і мелоксикам. Обидва використовуються для лікування остеоартриту та ревматоїдного артрити.

Бринзоламід є інгібітором карбоангідази, який містить N-сульфований N-гетероцикл, який використовується для зниження внутрішньоочного тиску. Сультіам – ще один інгібітор карбоангідази, який забезпечує терапевтичну ефективність для лікування дитячої фокальної епілепсії.

Альмотриптан використовується для лікування мігрени через його агоністичний вплив на серотонінові рецептори. Тіазидний діуретик (Політіазид) був схвалений для лікування гіпертензії та набряків.

Інгібітор янус-кінази (JAK), барицитиніб, може інгібувати JAK1 і JAK2, використовується для лікування середнього та важкого ревматоїдного артрити.

Було розроблено чутливу та швидку УФ-спектрофотометричну методику та метод рідинної хроматографії з оберненою фазою для аналізу бринзоламиду та бримонідину тартрату в офтальмологічній формі.

Діапазони лінійності для обох методів становили 5–25 мкг/мл та 1–5 мкг/мл для бринзоламиду і бримонідину тартрату.

Максимуми поглинання спостерігалися при 232 і 257 нм для бринзоламиду і бримонідину. Ультрафіолетовий аналіз офтальмологічного

складу показав % в діапазоні від 98,90 до 101,01% для бринзоламід у та від 98,20 до 100,80% для бримонідину.

Середній відсоток чистоти становить 99,82% та 99,80% для бринзоламід у та бримонідину. Встановлено, що час хроматографічного утримання бринзоламід у та бримонідину становить 5,9 та 8,4 хв. Коефіцієнт становив 0,808 і 0,860 для бринзоламід у та бримонідину тартрату. Метод було валідовано згідно з рекомендаціями ІСН, було визнано придатним для визначення бринзоламід у та бримонідину тартрату з комбінованої офтальмологічної форми (рис.2.1.6).

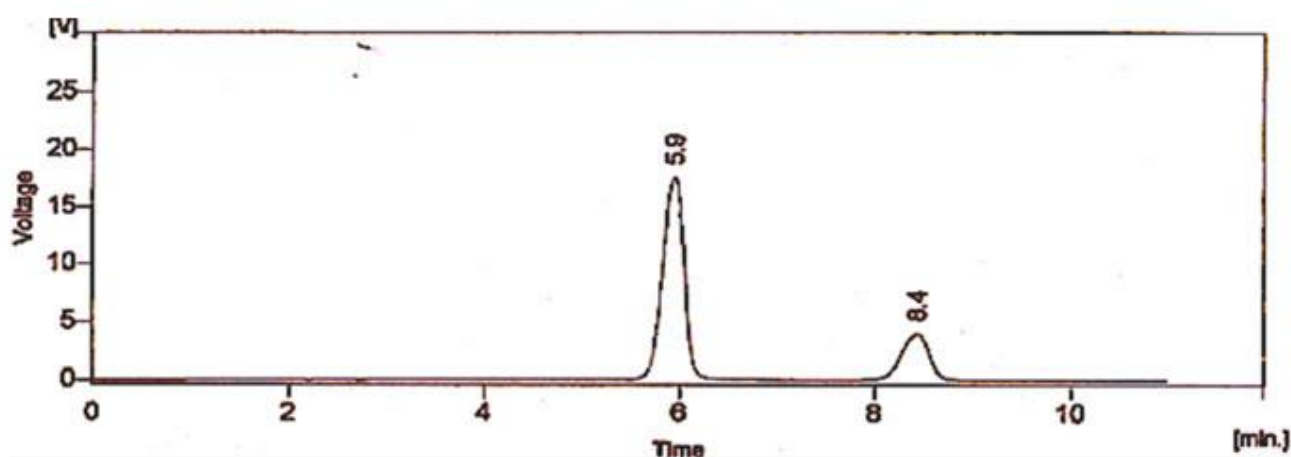


Рисунок 2.1.6. УФ-спектр бринзоламід у та бримонідину.

Бринзоламід – це субстанція для виготовлення лікарських форм.

ДФУ та Європейська Фармакопея не регламентує аналіз цієї речовини [21, 22]. Бринзоламід є відомою діючою речовиною, яка не описана в Європейській фармакопеї (Ph.Eur.). Однак доступна монографія у Фармакопеї США (USP).

Бринзоламід. М.м. 383,5. Температуру плавлення 131°C.

Це білий порошок, нерозчинний у воді, добре розчинний у метанолі та розчинний у етанолі, ДМСО (77 мг/мл). Розчиняється при рН 7.2.

Чистота 98,5-101,0% (суха речовина).

Речовина являє собою білий або майже білий негігроскопічний порошок, малорозчинний у спирті та метанолі та нерозчинний у воді.

Бринзоламід має ізомери. Йому притаманний поліморфізму.

Для бринзоламиду була розроблена система нормальної фази тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Для бринзоламиду розроблено кілька різних систем вискоелективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Для оцінки енантіомерної чистоти бринзоламиду було розроблено дві різні системи хіральної ВЕРХ.

Встановлено, що бринзоламід є вискоелективним препаратом у твердому стані.

Бринзоламід, розчинність: субстанція нерозчинна у воді *P*, добре розчинна у метанолі *P*, розчинна в етанолі (96%) *P*.

За Фармакопеею США бринзоламід ідентифікують методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії – відповідність спектру ФСЗ бринзоламиду, ТШХ.

Для процедури ТШХ розчин стандарту та досліджуваного зразків готують розчиненням їх у метанолі *P*.

Рухома фаза: аміак розчин концентрований *P* – метанол *P* (0.1 : 100, V/V). Виявлення плями бринзоламиду виконують обприскуванням розчином йодовісмутатом розчином розведеним *P*.

Встановлено ліміти для домішок:

Ліміт для неспецифікованих домішок – 0.1%;

Сума домішок – 1.0%.

Домішки визначають методом РХ. Для приготування рухомої фази А виконують процедуру: 0.23 г натрію дигідрофосфату моногідрату *P* та 3.626 г динатрію гідрофосфату дигідрату *P* розчиняють у воді *P*, доводять об'єм до 1000 мл водою (розчин з рН 8.0). Рівні об'єми рухомої фази А та ацетонітрилу

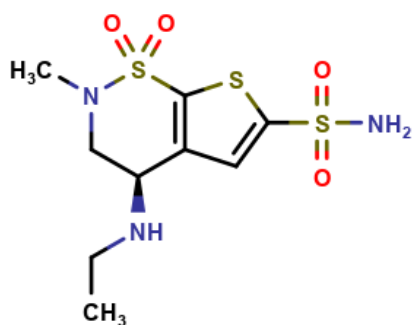
P змішують.

Рухома фаза В: ацетонітрил *P*.

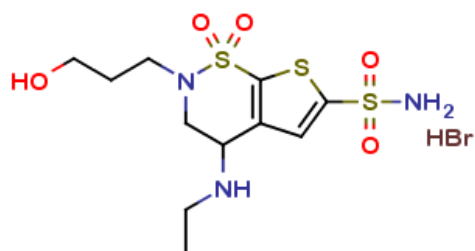
УФ-детектування при 256 нм.

Специфікованих та неспецифіковані домішок: 12:

- Бринзоламід домішка 10



- Бринзоламід домішка С Гідробромід



- Бринзоламід домішка G

- 4-Десетил-аміно-4-оксо Бринзоламід

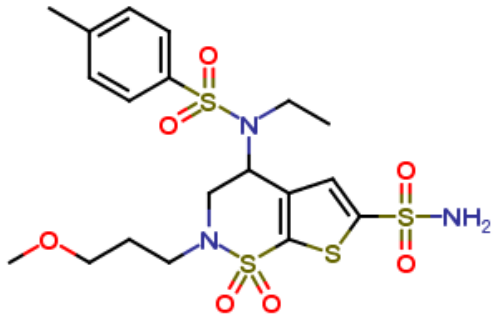
- Бринзоламід ізопропіл домішка

- Бринзоламід домішка Метансульфоніламід

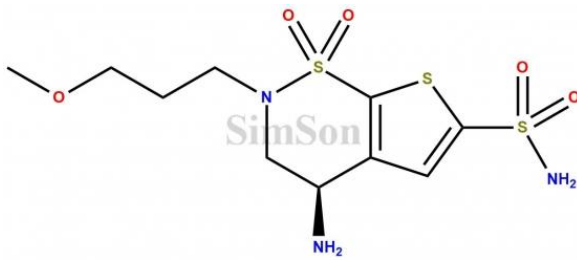
- Бринзоламід домішка N-етанол



- Бринзоламід домішка тозіл



- Бринзоламід домішка USP related compound B



- Бринзоламід домішка N-десетил
- Бринзоламід домішка N-нітрозо
- D-Десметил Бринзоламід домішка

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України та Eur.Ph [21, 22] не описують процедури фармацевтичного аналізу Бринзоламідю.

В даній роботі дослідження бринзоламідю субстанції, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція бринзоламідю має різну розчинність у полярних та неполярних розчинниках: нерозчинна у воді *P*, добре розчинна у метанолі *P*, розчинна в етанолі (96%) *P*.

Чистота субстанції. 98,5-101,0 %.

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, ТШХ, хроматографічним методом РХ. Порівняння проводиться із стандартом бринзоламідом CRS.

Споріднені речовини досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ).

Проводили хроматографічне розділення та записували хроматограми з використанням кількох розчинників з різними буферами як *рухомою фазою*, розчинники:

- метанол
- вода
- ацетонітрил
- калій-фосфатний буфер з рН 4, 5, 6, 7, 10
- натрій-фосфатний буфер з рН 7.

Рухому фазу фільтрували через нейлоновий мембранний фільтр 0,45 мкм, дегазували в ультразвуку

Колонка: швидкістю потоку 1,0 мл/хв.

Температуру колонки – 25°

УФ-Детектування – 254 нм

Об'єм ін'єкції – 20 мкл.

Встановлено ліміти для домішок:

Ліміт для неспецифікованих домішок – 0.1%;

Сума домішок – 1.0%.

Не враховують домішки (піки) – 0.05%.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції бринзоламідю з метою розробки та опрацювання умов хроматографування та методик проведення процедур.

Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором; колонка – INERTSIL ODS-3V, 0,25x4,6x5 з температурою – 25°C.

Умови хроматографування:

- час хроматографування – 60 хв;
- потік – 1,0 мл/хв;
- детектування – УФ при 254 нм;
- об'єм інжекції – 20 мкл;

Рухома фаза А: ацетонітрил-вода (50 : 50, V/V) + метанол

Або у іншому варіанті:

Рухома фаза: метанол-ацетонітрил (50 : 50, V/V)

Рухома фаза: фосфатний буфер, 50 мл (рН 7 або 6,6)-метанол-ацетонітрил (45:40:15, V/V/V)

Методика приготування випробувального розчину:

50,0 мг субстанції бринзоламідю розчиняють у рухомій фазі А, доводять до об'єму 10,0 мл розчином рухомої фази А.

Методика приготування розчину порівняння (а):

5,0 мг субстанції бринзоламіну ФСЗ розчиняють у рухомій фазі А, доводять до об'єму 100,0 мл розчином рухомої фази А. 1,0 мл розчину доводять до об'єму 100,0 мл розчином рухомої фази А. 1,0 мл розчину доводять до об'єму 10,0 мл розчином рухомої фази А.

Комп'ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

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

Отримані результати.

При дослідженні стандартних зразків USPh – розчинів порівняння, розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1. Розчини стандартної та досліджуваної речовин.

	Стандарт (а)		Зразок	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	5,634	59,837	5,677	62,047
	5,640	61,500	5,697	63,333
	5,700	59,467		
Середнє	5,687	59,268	5,692	62,690
SD	0,093	1,083	0,070	0,909
RSD(≤2.0%)	0,38%	1,80%	0,30%	1,45%

Розчини стандартні:

Бринзоламін, стандарт (а):

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 5,634-5,700 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 5,687 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268;
- SD Rt 0.093;
- SD Ar 1.083;
- RSD Rt (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%.

Бринзоламін, зразок:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 5,677-5,697 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 5,692 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62,690;
- SD Rt 0.070;
- SD Ar 0.909;
- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Хроматограма розчину зразку представлена на рисунку 3.1.

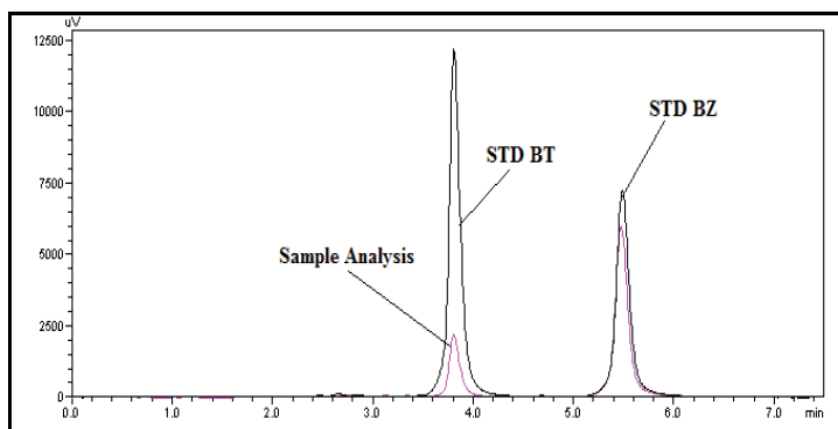


Рисунок 3.1. Хроматограма р-ну бринзоламіну ($R_t=5,677$ хв), супровідна речовина ($R_t=3,878$ хв) - *Рухома фаза*: фосфатний буфер, 50 мл (рН 7)-метанол-ацетонітрил (45:40:15, V/V/V).

Таким чином, при використанні *Рухомої фази*: метанол і ацетонітрил - не відбувалося елюювання Бринзоламину. Якщо використовувалася *Рухома фаза А*: ацетонітрил-вода (50 : 50, V/V) + метанол, час утримування Бринзоламину складав ($R_t=7,001$ хв).

Найкращі оптимізовані результати отримані при використанні комбінації *Рухома фаза*: фосфатний буфер, 50 мл (рН 7)-метанол-ацетонітрил (45:40:15, V/V/V). За цих умов елюювані піки були вузькими, розділеними та вільними від залишків.

При рН 6.6 та детектуванні 254 нм:

- швидкість потоку змінювалася з 0,8-1,2 мл/хв,
- час утримування ВЗ зменшувався з 4,825-4,6 хв.

При збільшенні об'єму ацетонітрилу з 10 до 20 мл зменшувався час утримування ВЗ з 4,825 до 4,1 хв.

Відсотковий внесок факторів у виявленні ВЗ показав, що швидкість потоку мав більший вплив, в результаті чого відсотковий внесок склав 95,27% (R_t для ВЗ), 40,73% (% відновлення для ВЗ).

Таким чином, встановленні показники швидкості потоку (0,9-1,1 мл/хв) та об'єму ацетонітрилу (12,5-17,5 мл) у *рухомій фазі* є оптимальними для субстанції Бринзоламину ($R_t=5,7\pm 0,345$ хв) при УФ-детектування 254 нм).

З метою дослідження змін у ІЧ-спектрі досліджуваної Бринзоламину субстанції, яка містить супровідну речовину ($R_t=3,878$ хв) у своєму складі, методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80) отримано ІЧ-спектр досліджуваної субстанції. ІЧ-спектри зразків готували у вигляді таблеток з KBr.

ІЧ-спектр Бринзоламину характеризується основними піками поглинання функціональних груп при:

721 cm^{-1} (асоц $-\text{CH}_2-$); 1014 cm^{-1} ($-\text{C}-\text{O}$ етерна); 1465 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$); 1528 cm^{-1} ($-\text{NH}$ -вторинний амін); 1607 cm^{-1} ($-\text{NH}$ -первинний амін); 1335, 1354 cm^{-1} (сульфон); 3095 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$ аром.); 3313 cm^{-1} ($-\text{NH}$ -первинний амін) (рис. 3.2).

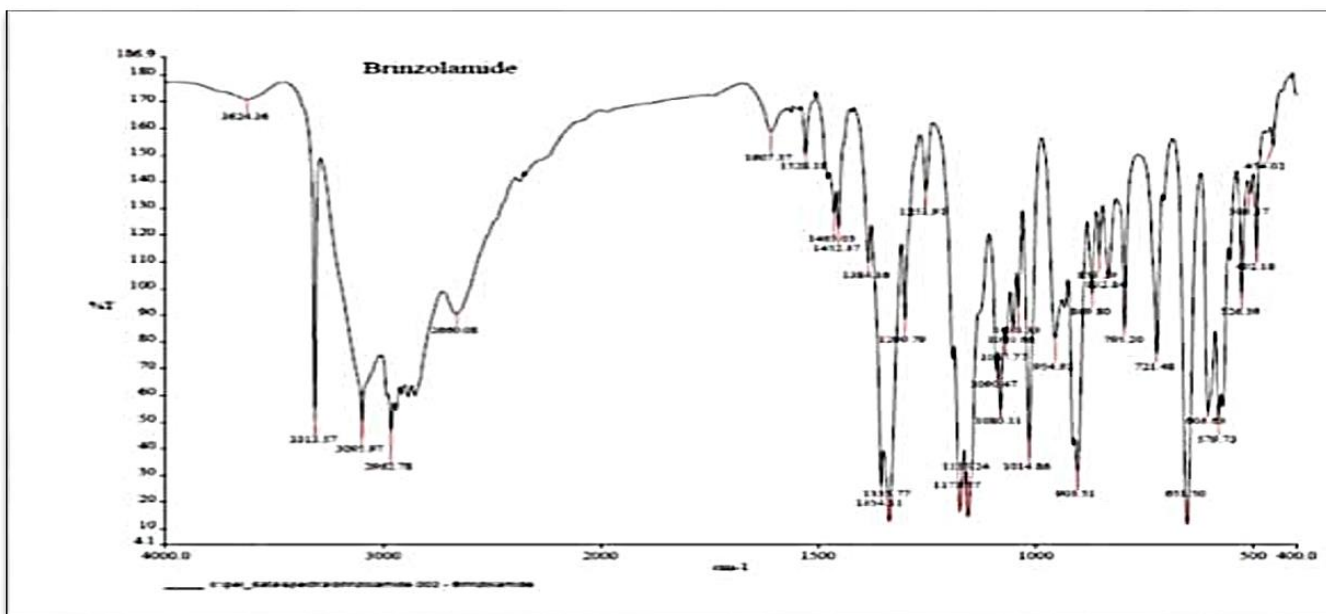


Рисунок 3.2. ІЧ-спектр Бринзоламину.

Записаний ІЧ-спектр підтвержує структуру бринзоламину при порівнянні зі спектром стандартної речовини бринзоламину.

В таблиці 3.2 представлена порівняльна характеристика відношення сигналів функціональних груп молекули Бринзоламину (стандарт) та досліджуваного зразку Бринзоламину.

Таблиця 3.3. Відношення сигналів ІЧ-спектрів стандарту та зразку Бринзоламіну субстанції.

ІЧ-спектр Бринзоламін (стандарт), см ⁻¹ , δNH, Ph, Alk, νNH, Ph, Alk	Функціональна група	ІЧ-спектр Бринзоламін (зразок), см ⁻¹ , δNH, Ph, Alk, νNH, Ph, Alk
1375-1465 Середня інтенсивність	Alk	721,0
1000-1275 Максимальна інтенсивність	С-О (етерна група)	1014,0
1585-1600 Середня інтенсивність	Н, Ph	3095,0
1580-1625 Середня інтенсивність	-NH- (вторинний амін)	1528,0

Таким чином, можна спостерігати зміщення валентних коливань функціональних груп δNH, Ph, Alk, νNH, C=O, Ph, Alk, що пов'язано із наявністю у субстанції неприпустимої домішки. Деформаційні коливання σNH у вторинному аміні дають нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності в області 1580-1625 см⁻¹, в той час, як у зразку деформаційні коливання σNH розташовуються в області 1528,0 см⁻¹.

Бринзоламін (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Бринзоламін, <i>стандарт</i> :	Бринзоламін, <i>зразок</i> :
значення R_t знаходиться в інтервалі 5,634-5,700 хв ; середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 5,687 хв ; площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500 ; середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268 ; SD R_t 0.093; SD Ar 1.083; RSD R_t (<2.0%) 0.38%; RSD Ar (<2.0%) 1.80%.	значення R_t знаходиться в інтервалі 5,677-5,697 хв ; середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 5,692 хв ; площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333 ; середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62,690 ; SD R_t 0.070; SD Ar 0.909; RSD R_t (<2.0%) 0.30%; RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження та методики приготування зразків за методом ВЕРХ субстанції Бринзоламіну з метою визначення її чистоти: *Рухома фаза*: фосфатний буфер, 50 мл (рН 7)-метанол-ацетонітрил (45:40:15, V/V/V), методику спектрального дослідження методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області субстанції (спектрометр Spеcord M-80), в результаті чого порівняно спектри стандартного та досліджуваного зразків.
2. Знайдено, що *при рН 6.6 та детектуванні 254 нм*: швидкість потоку змінювалася з 0,8-1,2 мл/хв, час утримування ВZ зменшувався з 4,825-4,6 хв, а при збільшенні об'єму ацетонітрилу з 10 до 20 мл зменшувався час утримування ВZ з 4,825 до 4,1 хв.
3. Встановлено показники швидкості потоку (0,9-1,1 мл/хв) та об'єму ацетонітрилу (12,5-17,5 мл) у *рухомій фазі* є оптимальними для субстанції Бринзоламіну ($R_t=5,7\pm 0,345$ хв) при УФ-детектування 254 нм), а також знайдено у складі досліджуваного зразку супровідну речовину ($R_t=3,878$ хв).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Grenni, P.; Patrolecco, L.; Rauseo, J.; Spataro, F.; Di Lenola, M.; Aimola, G.; Zacchini, M.; Pietrini, F.; Di Vaccio, D.; Stanton, I.C.; et al. Sulfamethoxazole persistence in a river water ecosystem and its effects on the natural microbial community and *Lemna minor* plant. *Microchem. J.* **2019**, *149*, 103999.
2. Dudley, S.; Sun, C.; Jiang, J.; Gan, J. Metabolism of sulfamethoxazole in *Arabidopsis thaliana* cells and cucumber seedlings. *Environ. Pollut.* **2018**, *242*, 1748–1757.
3. Caban, J.R.; Kuppusamy, S.; Kim, J.H.; Yoon, Y.E.; Kim, S.Y.; Lee, Y.B. Hairy Vetch Incorporated as Green Manure Inhibits Sulfathiazole Uptake by Lettuce in Soil. *Water. Air. Soil Pollut.* **2018**, *229*, 104.
4. Pufal, G.; Memmert, J.; Leonhardt, S.D.; Minden, V. Negative bottom-up effects of sulfadiazine, but not penicillin and tetracycline, in soil substitute on plants and higher trophic levels. *Environ. Pollut.* **2019**, *245*, 531–544.
5. Sharma, N.; Arrigoni, G.; Ebinezer, L.B.; Trentin, A.R.; Franchin, C.; Giaretta, S.; Carletti, P.; Thiele-Bruhn, S.; Ghisi, R.; Masi, A. A proteomic and biochemical investigation on the effects of sulfadiazine in *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *178*, 146–158.
6. Mi Sun Cheong, Kyung Hye Seo, Hadjer Chohra, Young Eun Yoon et al. Influence of Sulfonamide Contamination Derived from Veterinary Antibiotics on Plant Growth and Development. *Antibiotics* 2020, *9*(8), 456; <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080456>
7. "Brinzolamide ophthalmic (Azopt) Use During Pregnancy". *Drugs.com*. 16 May 2019. Retrieved 17 August 2020.
8. "First Generic Drug Approvals". U.S. Food and Drug Administration (FDA). Retrieved 13 February 2021.

9. Croxtall JD, Scott LJ (2009). "Brinzolamide/timolol: in open-angle glaucoma and ocular hypertension". *Drugs & Aging*. **26** (5): 437–46. doi:10.2165/00002512-200926050-00007. PMID 19552495.
10. "Simbrinza EPAR". European Medicines Agency. Retrieved 11 June 2020.
11. "Simbrinza-brinzolamide/brimonidine tartrate suspension/drops". DailyMed. 9 September 2019. Retrieved 11 June 2020.
12. Paul Evans, Kimberly Geoghegan. Six-membered Rings with Two Heteroatoms, and their Fused Carbocyclic Derivatives. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*. Volume 8, 2022, Pages 530-582.
13. Ahmed H. Bakheit, Ahmed M. Alomar, Hany Darwish, Hamad M. Alkahtani. Chapter One – Brimonidine. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 2023.
14. N. Lolak *et al.* Synthesis, characterization, inhibition effects, and molecular docking studies as acetylcholinesterase, α -glycosidase, and carbonic anhydrase inhibitors of novel benzenesulfonamides incorporating 1, 3, 5-triazine structural motifs. *Bioorg. Chem.* (2020).
15. T. Artunc *et al.* Synthesis and antioxidant activities of phenol derivatives from 1, 6-bis (dimethoxyphenyl) hexane-1, 6-dione. *Bioorg. Chem.*(2020).
16. A. Karimov *et al.* Novel functionally substituted esters based on sodium diethyldithiocarbamate derivatives: synthesis, characterization, biological activity and molecular docking studies. *Bioorg. Chem.* (2020).
17. A. Günsel *et al.* Synthesis of water soluble tetra-substituted phthalocyanines: investigation of DNA cleavage, cytotoxic effects and metabolic enzyme inhibition. *J. Mol. Struct.* (2020).
18. S. Ghorai *et al.* Structure-activity relationship of human carbonic anhydrase-II inhibitors: detailed insight for future development as anti-glaucoma agents. *Bioorg. Chem.* (2020).

- 19.A. Nocentini *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline-based aromatic sulfamates with potent carbonic anhydrase isoforms II, IV and IX inhibitory efficacy. *Bioorg. Chem.* (2018).
- 20.D. Moi *et al.* Structure-activity relationship with pyrazoline-based aromatic sulfamates as carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII inhibitors: synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* (2019).
21. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 100-103.
22. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 2015-2017.

SUMMARY

Shevchenko Myroslava
STUDY OF BRINZOLAMIDE CARBO ANHYDRASE INHIBITOR SUBSTANCE
FOR THE CONTENT OF UNACCEPTABLE IMPURITIES USING THE HPLC
METHOD

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharmaceutical sciences Welchinska O.V.

Keywords: brinzolamide, sulfonamide, HPLC, admixture.

Introduction. Brinzolamide belongs to carbonic anhydrase inhibitors, for example, carbonic anhydrase II. Carbonic anhydrase is found in erythrocytes, in other tissues, including the eye. It exists in the form of isozymes. The most active of them is carbonic anhydrase II (CA-II). Brinzolamide is used to treat glaucoma, an elevated intraocular pressure that occurs as a result of excessive formation of aqueous humor or inadequate drainage of moisture. The task of pharmaceutical analysis of the Brinzolamide substance remains the qualitative detection and quantitative determination of specified and unspecified impurities by expanding the range of modern instrumental methods that are not described in Pharmacopoeias. It is important to introduce new methods into pharmaceutical practice to improve the quality of analysis. The actual task of this experimental study is the development of chromatographic conditions for the study of the Brinzolamide substance by HPLC, confirmation of the purity of the substance by spectral methods, methods of sample preparation, which will allow us to draw correct conclusions about its quality.

Materials and methods. Research object are brinzoleamide, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of brinzolamide. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; spectral method –IR-absorbption spectrophotometry (Specord M-80); computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. The conditions of chromatographic research and methods of preparation of samples using the HPLC method of Brinzolamine substance were developed in order to determine its purity: Mobile phase: phosphate buffer, 50 ml (pH 7)-methanol-acetonitrile (45:40:15, V/V/V), the method of spectral research by the method of absorption spectrophotometry in the IR region of the substance (spectrometer Specord M-80), as a result of which the spectra of the standard and tested samples were compared.

Conclusions. It was found that at pH 6.6 and detection at 254 nm: the flow rate varied from 0.8-1.2 ml/min, the retention time of BZ decreased from 4.825-4.6 min, and when the volume of acetonitrile increased from 10 to 20 ml decreased BZ retention time from 4.825 to 4.1 min. The set indicators of the flow rate (0.9-1.1 ml/min) and the volume of acetonitrile (12.5-17.5 ml) in the mobile phase are optimal for the substance Brinzolamine ($R_t=5.7\pm 0.345$ min) with UV detection at 254 nm), and an accompanying substance was also found in the composition of the studied sample ($R_t=3.878$ min).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

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



FIP Symposium, Digital Event

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

