

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 методом ВЕРХ супровідних
домішок у складі субстанції ніфуроксазиду»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1Б
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)

Лисенко Каріна Віталіївна

(прізвище та ініціали)

Керівник: к.мед.н, ас. Брезіцька Н.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: професор, д.фарм.н. Карпюк У.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2024-2025 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ НІТРОФУРАНІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови	10
1.2. Біологічна активність	15
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ НІТРОФУРАНІВ.....	21
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	21
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	26
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY.....	40

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

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

Hal – галоген

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

ВСТУП

Актуальність теми. Ніфуроксазид (за номенклатурою ІЮПАК 4-гідрокси-N'-[(5-нітрофуран-2-іл)метилен]бензогідразид відноситься до синтетичних антибіотиків, за хімічною класифікацією є представником класу нітрофуранів – п'ятичленних гетероциклів. Це антибіотик широкого спектра дії. Препарат проявляє бактерицидну, бактеріостатичну дію. Це залежить від концентрації препарату та виду збудника.

Механізм дії ніфуроксазиду ґрунтується на гальмуванні активності дегідрогеназ, пригніченні дихальних циклів мікробних клітин, що призводить до порушення синтезу білків у клітинах патогенних бактерій.

Збудниками, які чутливі до ніфуроксазиду є: стафілококи, стрептококи, *Escherichiacoli*, *Enterobacter spp.*, сальмонели, клостридії, шигели, ерсинії, *Vibrio cholerae*, *Proteus spp.*. До ніфуроксазиду нечутливі бактерії роду *Pseudomonas*, *Proteus inconstans*, *Providencia alcalifaciens*. Якщо вживати терапевтичні дози, то препарат не порушує нормальної мікрофлори кишки. Препарат запобігає розвитку бактеріальної суперінфекції при вірусних інфекціях кишки.

Ніфуроксазид практично не всмоктується з шлунково-кишкового тракту, а створює високі концентрації виключно в просвіті кишки. В інших органах та рідинах препарат не визначається (рис. 1) [1-5].

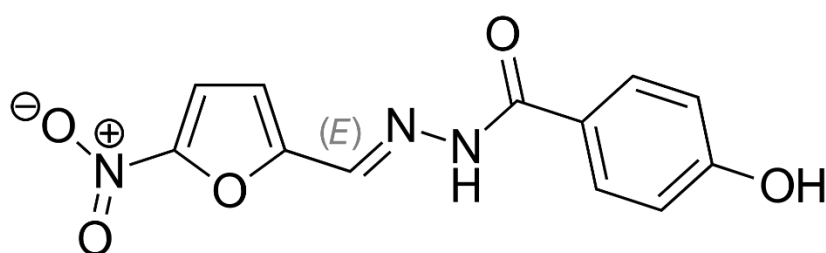


Рисунок 1. Хімічна формула Ніфуроксазиду.

Для адаптації до умов із низьким вмістом кисню в середовищі організму хазяїна, більшість паразитів не використовують кисень, скоріше використовують анаеробні метаболічні шляхи своєї системи для генерації АТФ.

Відомо, що нітробензиліденгідразида – ніфуроксазид, виявляють активність при скринінгу проти *L. donovani*. Аналоги трифлураліну – антилейшманіозні агенти продемонструвала ефективність *in vitro* проти промастигот як *L. infantum* (IC50 = 2,2 мкМ). Сполука є потужною у внутрішньоклітинному аналізі (IC50 = 1,8 мкМ), але не є активною проти промастигот. Трифлуралін ефективний при шкірній формі лейшманіозу у вигляді мазі [5-10].

ДФУ не регламентує аналіз Ніфуроксазиду. Європейська Фармакопея регламентує аналіз цього лікарського засобу. Супровідні речовини (специфіковані та неспецифіковані домішки) аналізують методом рідинної хроматографії (2.2.29). Детектування виконують УФ-спектрофотометрично при 280 нм.

До специфікованих домішок відносять домішки А, В, С, D, Е. Домішка А – 4-гідроксибензогідразид (*n*-гідроксибензогідразид), домішка В – метил-4-гідроксибензоат (метилпарагідроксибензоат), домішка С – (5-нітрофуран-2-іл)метилідендіацетат, домішка D – (Е,Е)-N,N'-біс[(5-нітрофуран-2-іл)метиліден]гідразин (5-нітрофурфуролазин), домішка Е – (Z)-4-гідрокси-N'-[(5-нітрофуран -2-іл)метиліден]- бензогідразид.

Крім того, молекула ніфуроксазиду є оптично активною, тому в субстанції цієї речовини можлива присутність її ізомерів.

Таким чином, субстанція для виготовлення фармацевтичної композиції із ніфуроксазидом у складі вимагає ретельної аналітичної процедури з метою підтвердження її чистоти, оскільки вона може містити не тільки супровідні

речовини, але й оптично активні ізомери ніфуроксазиду. Використовуючі рекомендації Євр. Фарм. для хроматографування випробовуваної субстанції методом рідинної хроматографії необхідно адаптувати їх для аналізу цієї речовини методом ВЕРХ як більш сучасного та ефективного методу. Молекули речовини, також, можуть підлягати хімічній деградації під впливом різних чинників (розчинники, реагенти, температурний режим) та утворювати молекули іншої структури.

Під час синтезу кожної із субстанцій можливе утворення побічних продуктів синтезу, а під час очистки досліджуваних субстанцій часто залишаються специфічні і неспецифічні домішки. Всі ці фактори можуть призвести до зниження якості та чистоти випробовуваної субстанції.

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанції або лікарського засобу ніфуроксазиду. Субстанцію ніфуроксазиду можна проаналізувати за відповідною монографією Європейської Фармакопеї.

Як відомо, супровідні речовини у складі субстанцій ніфуроксазиду визначають методом рідинної хроматографії (РХ). Визначають чистоту субстанцій на присутність енантіомерів, оскільки вона має асиметричні атоми Карбону у складі молекули.

Виходячи із наявності описаних в Фармакопеях методик дослідження субстанції ніфуроксазиду методом РХ постає завдання розробити умови хроматографічного дослідження та модифікувати методики дослідження чистоти субстанції ніфуроксазиду сучасним методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Це дозволить розширити коло інструментальних методів дослідження та впровадити метод ВЕРХ у фармацевтичний аналіз лікарських засобів та субстанцій – похідних нітрофурану.

Під час розробки або адаптування умов хроматографування випробовуваної субстанції ніфуроксазиду важливі коректні умови хроматографування, оскільки вони повинні забезпечити виявлення одночасно АФІ – ніфуроксазид, специфіковані та неспецифіковані домішки, ізомери ніфуроксазиду, їх кількісне визначення та запобігти хімічній деградації компонентів субстанції.

Актуальним завданням експериментальної роботи є ідентифікація з подальшим кількісним визначенням специфікованих або неспецифікованих домішок субстанції ніфуроксазиду хроматографічним методом (ВЕРХ) з УФ-детектуванням при модифікації довжин хвиль.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація ніфуроксазиду у випробовуваній субстанції з метою визначення її чистоти, кількісного визначення домішок за допомогою хроматографічного (ВЕРХ) методу з УФ-детектуванням при модифікації довжини хвилі шляхом адаптації умов та методик дослідження, які дозволять захистити структуру молекул від хімічної деградації.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація АФІ – ніфуроксазиду з подальшим визначенням чистоти субстанції ніфуроксазиду, кількісним визначенням домішок хроматографічним методом (ВЕРХ) з УФ-детектуванням при модифікації умов дослідження та довжин хвиль.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати АФІ – ніфуроксазид у складі випробовуваної субстанції та визначити її чистоту методом ВЕРХ;
- провести кількісне визначення домішок у складі досліджуваної суміші хроматографічним методом (ВЕРХ) (присутність супровідних речовин);

- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекул від хімічної деградації;
- провести інструментальні дослідження випробовуваних зразків у порівнянні зі стандартними та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія, хроматограф Agilent 1260 з УФ-детектором, колонка – Symmetry300 C18, 250x4,6x5; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS, розрахунковий метод.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у ідентифікації та кількісному визначенні АФІ ніфуроксазиду та домішок у складі випробовуваної субстанції високотехнологічним методом ВЕРХ в умовах, які дозволять зберегти хімічну структуру досліджуваних АФІ від хімічної деградації.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації тези доповіді на V Науково-практичної конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА» в онлайн форматі 28-29 січня 2025 р., м. Київ, Україна.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 40, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 31.

SUMMARY

Lysenko Karina
CHROMATOGRAPHIC STUDY BY HPLC OF ACCOMPANING IMPURITIES IN THE COMPOSITION OF NIFUROXAZIDE SUBSTANCE

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: PhD (Med), as. Brizytska N.V.

Keywords: nitrofuran, nifuroxazide, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Nifuroxazide (according to the IUPAC nomenclature, 4-hydroxy-N'-[(5-nitrofuranyl)methylene]benzohydrazide belongs to synthetic antibiotics, according to chemical classification it is a representative of the class of nitrofurans - five-membered heterocycles. It is a broad-spectrum antibiotic. The drug It has a bactericidal, bacteriostatic effect, depending on the concentration of the drug and the type of pathogen. SPU does not regulate the analysis of Nifuroxazid. The European Pharmacopoeia regulates the analysis of this medicinal product. Accompanying substances (specified and unspecified impurities) are analyzed by liquid chromatography (2.2.29). Detection is performed UV-spectrophotometrically at 280 nm.

Materials and methods. Objects of research are substance of nifuroxazide and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of nifuroxazide substances. Methods: HPLC (Agilent 1260 with UV detector, Symmetry300 C18 column, 250x4.6x5); computer analysis using the OpenLab CDS program, calculation method.

Results. Using the HPLC method, identification (by retention time) of API - Nifuroxazid as part of the tested substance was carried out. The conditions of chromatography by the HPLC method of nifuroxazide of the substance were adapted for the purpose of identification and quantitative determination of impurities (a solution of the substance with a final concentration of nifuroxazide of 0.1 mg/ml in the solvent) using a standard sample of DFU of nifuroxazide with a concentration of 0.0002 mg/ml in the solvent, and for the system suitability solution of the pharmacopoeial standard sample DFU of nifuroxazid with concentration 0.1 mg/ml in solvent.

Conclusions. Using the HPLC method and the calculation method, the content of the specified impurity E, which does not exceed the established values, is quantified.