

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 «Ідентифікація та кількісне визначення сульбактаму та
цефтриаксону методом ВЕРХ у суміші субстанцій»

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)

Похила Олена Сергіївна

(прізвище та ініціали)

Керівники: д.мед.н, професор Ніженковська І.В., ас., к.пед.н. Бут І.О.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

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

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2024-2025 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	12
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ БІЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК.....	12
1.1. Особливості хімічної будови	12
1.2. Біологічна активність	16
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ БІЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК.....	21
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	21
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	27
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

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

Ach – acetylcholine

AD – Alzheimer's disease

AMPK – adenosine monophosphate protein kinase

CAP – cholinergic anti-inflammatory pathway

ChAT – choline acetyltransferase

CO-OPERA – Citicoline Oral Plus Endovascular Recanalization for Acute Ischemic Stroke

CRP – C-reactive protein

CTP – cytidine triphosphate

GPx – glutathione peroxidase

GSH – glutathione

ICH – intracerebral hemorrhage

IRS-1 – insulin receptor substrate-1

MS – multiple sclerosis

PD – Parkinson's disease

SMT – S-methylisothiurea sulfate

STAT – signal transducer and activator of transcription

ВСТУП

Актуальність теми. Сульбактам - (2S, 5R)-3,3-диметил-7-оксо-4-тіо-1-азабіцикло[3.2.0]гептане-2-карбонової кислоти 4,4-діоксид — синтетичний препарат з бета-лактамною структурою. Подібний до антибіотиків групи пеніциліну. Є інгібітором бета-лактамаз бактерій, застосовується з антибіотиками груп пенициліну або цефалоспорину перорально та парентерально (рис. 1).

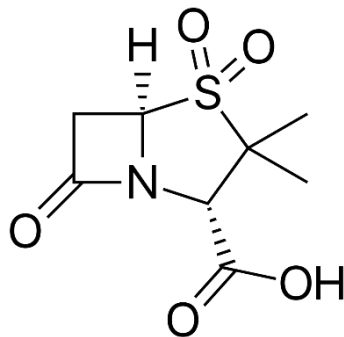


Рисунок 1. Структура сульбактаму.

За механізмом дії сульбактам належить до так званих «суїцидних» інгібіторів β -лактамаз. За хімічною структурою сульбактам є похідним пеніциланової кислоти. Препарат має антибактеріальну активність проти *Acinetobacter spp.* роду *Bacteroides*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Сульбактам проникає в бактеріальну клітину та викликає інактивацію бактеріальних ферментів. Це відбувається шляхом утворення необоротного зв'язку із β -лактамазами бактерій та призводить до ацетилювання і наступного гідролізу утвореного комплексу. Антибіотик досягає своєї мішені в бактеріальній клітині.

Сульбактам інгібує хромосомальні бета-лактамази класів А, С та D, за виключенням бета-лактамаз та хромосомальних β -лактамаз класу С.

Сульбактам інгібує ферменти грамнегативних бактерій — *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, інгібує β-лактамази *Staphylococcus aureus*.

Сульбактам має вищу стійкість до зміни рН розчину, що забезпечує вищу здатність проникати у тканини при інфекційному процесі. Для перорального застосування сульбактам випускається у вигляді сульбактаму півоксилу.

Цефтріаксон, (6R,7R)-7-{[(2Z)-2-(аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-(метоксиіміно)ацетил]аміно}-3-{[(2-метил-5,6-діоксо-1,2,5,6-тетрагідро-1,2,4-триазін-3-іл)-тіо]метил}-8-оксо-5-тіо-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота – це напівсинтетичний антибіотик III покоління із групи цефалоспоринів.

Це препарат для парентерального введення широкого спектра дії. Цефтріаксон синтезовано у лабораторії швейцарської компанії Hoffmann-La Roche.

Цефтріаксон використовується у клінічній практиці з 1982 року та вважається найуспішнішим із цефалоспоринів III покоління (рис.2).

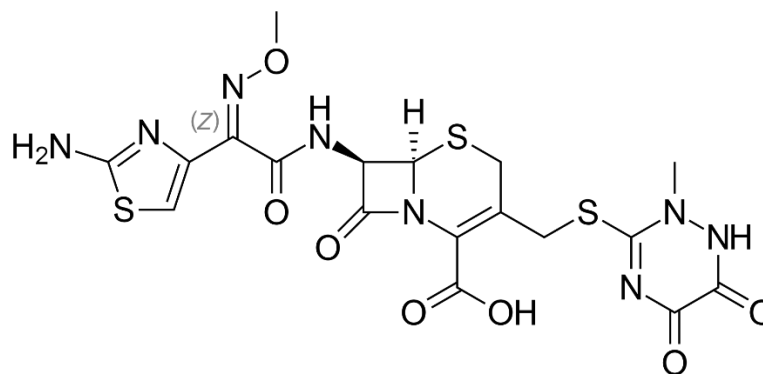


Рисунок 2. Структура цефтріаксону.

Цефтріаксон — бактерицид, який порушує синтез клітинної стінки бактерій і має широкий спектр антимікробної дії.

Він проявляє високу активність до таких збудників: грампозитивні аероби — стафілококи, стрептококи; аероби — *Moraxella*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichiacoli*, *Shigella*, *нейсерії*, *сальмонелли*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *клебсієли*, *ерсінії*, *Acinetobacter*; *спірохети* — *Borrelia burgdorferi* і *бліда спірохета*; анаероби — *Bacteroides*, *кlostридії*, *фузобактерії*, *пептококи*, *пептострептококи*. Нечутливими до цефтріаксону є *лістерія*, *ентерококи*, *легіонелли*, *Clostridium difficile*, *туберкульозна паличка* [1-11].

Існує потреба в антибіотиках для лікування інфекцій, спричинених резистентним до карбапенему комплексом *Acinetobacter baumannii–calcoaceticus* (ABC). Сульбактам-дурлобактам є комбінацією інгібіторів β-лактам-β-лактамаз. Він має активність проти *Acinetobacter*, включаючи мультирезистентні штами. На III фазі рандомізованого контрольованого дослідження щодо патогенів провели порівняння ефективності і безпеки сульбактаму-дурлобактаму проти колістину, у комбінації з імпенемом-циластатином у пацієнтів із серйозними інфекціями, спричиненими резистентним до карбапенему ABC [12-18].

ДФУ не регламентує аналіз Сульбактаму та регламентує аналіз Цефтріаксону у формі натрієвої солі. Європейська Фармакопея регламентують аналіз Сульбактаму натрію та Цефтріаксону. Супровідні речовини (специфіковані та неспецифіковані домішки) аналізують методом рідинної хроматографії.

До специфікованих та неспецифікованих домішок Цефтріаксону (за Євр. Фарм.) відносяться домішки А, В, С, Е.

A. (6R,7R)-7-[[[(2E)-(2-амінотіазол-4-іл)(метоксиіміно)ацетил]аміно]-3-[[[(2-метил-5,6-діоксо-1),2,5,6-тетрагідро-1,2,4-триазин-3-іл)сульфаніл]метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота ((E)-ізомер),

B. (5aR,6R)-6-[[[(2Z)-(2-амінотіазол-4-іл)(метоксиіміно)ацетил]аміно]-5a,6-дигідро-3H,7H-азето-[2,1-b] фуоро[3,4-d][1,3]тіазин-1,7(4H)-діон,

C. 2-метил-3-сульфаніл-1,2-дигідро-1,2,4-триазин-5,6-діон, D. S-бензотіазол-2-іл (2Z)-(2-амінотіазол-4-іл) (метоксиіміно)тіоацетат,

E. (6R,7R)-7-аміно-3-[[[(2-метил-5,6-діоксо-1,2,5,6-тетрагідро-1,2,4-триазин-3-іл)сульфаніл]метил]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота.

До специфікованих та неспецифікованих домішок Сульбактаму (за Євр. Фарм.) відносяться домішки А, В, С, D, Е, F, G. Контроль домішок: за домішкою G.

A. (2S)-2-аміно-3-метил-3-сульфінобутанова кислота,

B. (2S,5R,6R)-6-аміно-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6-амінопеніциланова кислота),

C. (2S,5R,6R)-6-бром-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонової кислоти 4,4-діоксид (6-бромпеніциланової кислоти сульфон),

D. (2S,5R,6R)-6-бром-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6-бромпеніциланова кислота),

E. 4,4-діоксид (2S,5R)-6,6-дибром-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонової кислоти (6, сульфон 6-дибромпеніциланової кислоти),

F. (2S,5R)-6,6-дибром-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота (6,6-дибромпеніциланова кислота),

G.(2S)-2-[[(2E)-2-карбоксиетеніл]аміно]-3-метил-3-сульфінобутанова кислота.

Інші домішки можуть бути присутні на достатньому рівні та їх вміст обмежений за критеріями прийнятності для невизначених домішок.

Таким чином, двокомпонентна субстанція для виготовлення фармацевтичної композиції із АФІ сульбактам і цефтриаксон у складі вимагає ретельного дослідження та умов хроматографування, які будуть забезпечувати розділення компонентів суміші та їх ідентифікацію, чистоту та присутність супровідних речовин.

Використовуючі рекомендації Європейської Фармакопеї для хроматографування двох різних субстанцій – сульбактаму і цефтриаксону методом рідинної хроматографії необхідно адаптувати умови хроматографування цієї двокомпонентної суміші методом ВЕРХ як більш сучасного та ефективного методу. Молекули речовини можуть підлягати хімічній деградації під впливом різних чинників та утворювати молекули іншої структури. Під час синтезу кожної субстанції можливе утворення її побічних продуктів. Під час очистки кожної досліджуваної субстанції залишаються специфіковані і неспецифіковані домішки. Всі ці фактори можуть призвести до зниження якості та чистоти випробовуваної субстанції.

Як відомо, супровідні речовини у складі кожної субстанції – сульбактаму і цефтриаксону визначають методом рідинної хроматографії (РХ), а також, визначають чистоту субстанцій на присутність енантіомерів.

Постає завдання розробити або модифікувати умови хроматографічного дослідження та методики дослідження чистоти двокомпонентної суміші із субстанцій методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Це

дозволить впровадити метод ВЕРХ у фармацевтичний аналіз суміші субстанцій сульбактаму і цефтриаксону.

Під час розробки або адаптування умов хроматографування випробовуваної двокомпонентної суміші важливо розробити коректні умови хроматографування. Вони повинні забезпечити виявлення одночасно два АФІ – сульбактам і цефтриаксон, специфіковані та неспецифіковані домішки, ізомери, їх кількісне визначення та запобігти хімічній деградації всіх компонентів.

Актуальним завданням експериментальної роботи є ідентифікація з подальшим кількісним визначенням АФІ, специфікованих або неспецифікованих домішок двокомпонентної суміші для приготування фармацевтичних препаратів хроматографічним методом (ВЕРХ) з УФ-детектуванням при модифікації довжин хвиль.

Метою експериментального дослідження є ідентифікація АФІ – сульбактаму і цефтриаксону у випробовуваній суміші з метою визначення її чистоти, кількісного визначення та її чистоти 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.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати АФІ двокомпонентної суміші – сульбактам і цефтриаксон, супровідні речовини у складі випробовуваної субстанції та визначити її чистоту методом ВЕРХ;
- 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 Infinity II з УФ детектором, колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у ідентифікації та визначенні чистоти АФІ двокомпонентної суміші, яка складається із Сульбактаму і Цефтриаксону, супровідних речовин, кількісного визначення 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 – 26.

SUMMARY

Pokhila Olena

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SULBACTAM AND CEFTRIAXONE BY HPLC IN A MIXTURE OF SUBSTANCES

The department of medicinal chemistry and toxicology

**Scientific supervisors: prof., doctor of med. sc. Nizhenkovska I.V.,
as., PhD (Ped) But I.O.**

Keywords: sulbactam, ceftriaxone, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Sulbactam is a synthetic drug with a beta-lactam structure. Similar to antibiotics of the penicillin group. It is an inhibitor of beta-lactamase bacteria, it is used with penicillin or cephalosporin antibiotics orally and parenterally. Ceftriaxone is a semi-synthetic antibiotic of the III generation from the group of cephalosporins. SPU does not regulate the analysis of Sulbactam and regulates the analysis of Ceftriaxone in the form of sodium salt. The European Pharmacopoeia regulates the analysis of Sulbactam sodium and Ceftriaxone. Accompanying substances (specified and unspecified impurities) are analyzed by liquid chromatography. The purpose of the experimental study is to identify APIs - Sulbactam and Ceftriaxone in a two-component mixture of substances. Tests are performed to identify APIs and determine their purity, quantify APIs and impurities using a chromatographic (HPLC) method with UV detection with wavelength modification.

Materials and methods. Objects of research are substance of sulbactam & ceftriaxone and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of mixture of sulbactam, ceftriaxone substances. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector, column ZORBAX Eclipse Plus C18); computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. Identification (by retention time) and investigation of the purity of the two-component mixture of API substances Sulbactam and Ceftriaxone under alternative chromatography conditions by the HPLC method with a higher identification capacity at UV detection at 220 nm. Adapted conditions for HPLC chromatography of a two-component mixture of API substances Sulbactam and Ceftriaxone.

Conclusions. Chromatography conditions were selected to separate the peaks of two API sulbactam and ceftriaxone during simultaneous analysis and it was established that the mixture of substances provided for the study contains sulbactam with a concentration of 35.0 mg in 1.0 g of the substance and ceftriaxone with a concentration of 59.3 mg in 1.0 g of substance.