

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 «Визначення супровідних домішок прогестерону в субстанції лікарського засобу методом ВЕРХ»

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)

Чипутович Артем Олександрович

(прізвище та ініціали)

Керівник: к.мед.н. ас. Брезіцька Н.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: проф. 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 СТЕРОЇДІВ.....	12
1.1. Особливості хімічної будови	12
1.2. Біологічна активність	17
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ СТЕРОЇДІВ.....	22
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	22
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
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 – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

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

iNOS – inducible nitric oxide synthase

IRS-1 – insulin receptor substrate-1

LIDO - lidocaine

MS – multiple sclerosis

PD – Parkinson's disease

SMT – S-methylisothiourea sulfate

STAT – signal transducer and activator of transcription

TXA – tranexamic acid

ВСТУП

Актуальність теми. Прогестерон (або прегн-4-ен-3,20-діон) - це статевий гормон хребетних тварин та людини. Прогестерон за хімічною класифікацією відноситься до стероїдів. Скаффолдом прогестерону є циклічна молекула прегненолону з ядром холестерину. Прогестерон є проміжним продуктом та напівпродуктом при синтезі всіх гормонів стероїдного типу. Прогестерон синтезується в яєчниках. Разом із естрадіолом прогестерон регулює естральний цикл у ссавців. Прогестерон пригнічує активність гладенької мускулатури матки, чим запобігає можливості перерваної вагітності. Кількість прогестерону росте впродовж вагітності, часто перевищуючи рівень в крові до початка вагітності [1-6] (рис. 1).

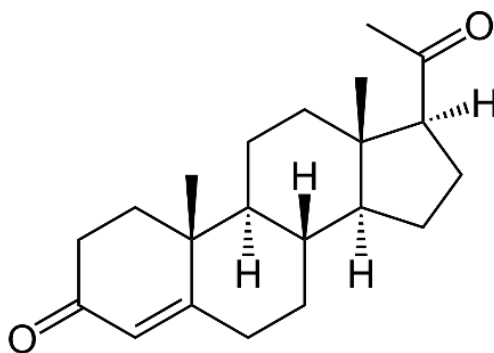


Рисунок 1. Структура прогестерона.

Прогестерон є гормоном гестагенів. Гестагени є статевими гормонами, вони впливають на статевий розвиток під час статевого дозрівання та беруть участь у відтворенні.

Гормони – це малі молекули, які виробляються залозами і надходять через кровотоки до відповідного органу, клітини якого мають певні рецептори для гормона (для прогестерона це матка, шийка матки, груди, мозок, кровоносні судини).

Частина прогестерону виробляється наднирковими залозами. Під час вагітності плацента виробляє прогестерон. Функції прогестерону: зупинка накопичення ендометрію, зменшення утворення цервікального слизу, гальмування овуляцію при високих рівнях, підготовка ендометрію до можливої імплантації заплідненої яйцеклітини, підтримка ранньої вагітності, розвиток молочні залози під час вагітності, зменшення скорочення матки, щоб запобігти скороченням під час вагітності, зменшення активності кишечника.

На початку менструального циклу рівень прогестерону низький (рис. 2). Прогестерон відноситься до домінуючих гормонів після овуляції (лютеїнова фаза). Прогестерон виробляється жовтим тілом яєчника, утвореним зруйнованим фолікулом. Рівень прогестерону досягає піку в середині лютеїнової фази. Якщо зачаття не відбувається, жовте тіло починає руйнуватися через 9-10 днів після овуляції.

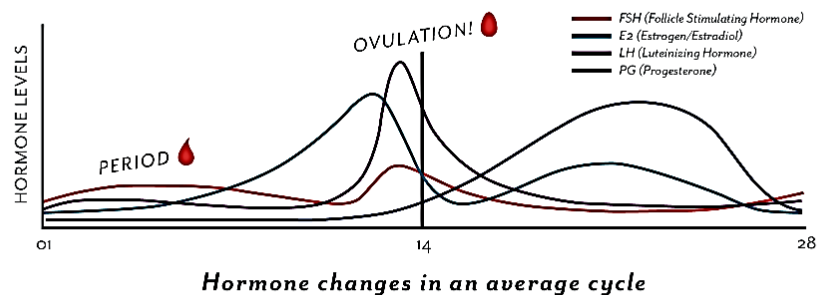


Рисунок 2. Рівень прогестерона.

Симптоми при порушенні рівню прогестерону:

Низький прогестерон - овуляція не відбувається регулярно, якщо тіло не може створити достатню кількість прогестерону: довгі або рясні місячні, мажучі виділення перед менструацією, нерегулярні менструальні цикли, короткі менструальні цикли через коротку лютеїнову фазу.

«Дефект лютеїнової фази» - це опису стану, який виникає, коли організм не виробляє достатньо природного прогестерону для підтримки нормальної функції ендометрію. Це ще називається недостатністю лютеїнової фази. Діагностувати дефект лютеїнової фази складно, і не існує єдиного узгодженого тесту. Коли невідома причина низького прогестерону, немає чітких вказівок як його лікувати.

Низький прогестерон і викидень. Низький рівень прогестерону може бути причиною безпліддя або викидня. Низький рівень прогестерону під час лютеїнової фази не пов'язаний із підвищеним ризиком викидня. Рівень прогестерону під час лютеїнової фази був подібним для людей, у яких були ранні викидні. Інше дослідження показало, що низький рівень прогестерону під час лютеїнової фази не передбачав, хто продовжить мати інший викидень.

Низький рівень прогестерону на ранніх термінах вагітності може бути симптомом нежиттєздатної вагітності. Дослідження показало, що люди, у яких була кровотеча на ранніх термінах вагітності, мали нижчий рівень прогестерону і мали більшу ймовірність викидня. Для людей, у яких були численні викидні лікування прогестагеном може допомогти запобігти викидню.

Високий прогестерон. Підвищення прогестерону є рідкісним явищем, але це може бути ознакою захворювань: вроджена гіперплазія надниркових залоз, тип аномальної вагітності, який називається гідатидіформною родимкою, кісти яєчників, еякі пухлини яєчників.

Рівень прогестерону може відрізнитися від людини до людини, а також від циклу до циклу. Відмінності в лабораторних процедурах, популяції, техніці тестування можуть вплинути на результати. Тому лабораторні результати завжди слід інтерпретувати з використанням контрольних значень лабораторії.

Прогестини - це синтетичні гормони, створені з прогестерону або тестостерону, з прогестероновими ефектами. Прогестини використовуються у гормональній контрацепції і в деяких гормональних препаратах менопаузи.

Їх хімічна структура відрізняється від власного прогестерону в організмі. Вони не ідеально підходять для рецепторів прогестерону. Прогестини можуть приєднуватися до рецепторів прогестерону в організмі та можуть зв'язуватися з рецепторами андрогенів і естрогенів. Вони викликають побічні ефекти, пов'язані з цими гормонами, залежно від того, прогестин активує або блокує рецептор.

Прогестини, які активують рецептори андрогенів, призводять до побічних ефектів - акне або гірсутизм у людей, коли протизаплідні засоби мають низький рівень або відсутність естрогену. Гормональний протизаплідний засіб можна використовувати для лікування акне та гірсутизму. Реакція не в усіх буде однаковою. Для деяких людей конкретна формула та тип прогестину мають значення [7-11].

ДФУ не регламентує аналіз лікарського засобу Прогестерон. Європейська Фармакопея регламентує аналіз Прогестерону. Супровідні речовини (специфіковані та неспецифіковані домішки) аналізують методом рідинної хроматографії.

Специфіковані домішки: А, В, С, D, Е, G, H, I, J, K, L, M.

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного використання:

Домішка А. прегна-4,14-дієн-3,20-діон,

Домішка В. (20S)-20-гідроксипрегн-4-єн-. 3-он,

Домішка С. (20R)-20-гідроксипрегн-4-єн-3-он,

Домішка D. (20S)-3-оксопрегн-4-єн-20-іл ацетат,

Домішка Е. (20R)-3-оксопрегн-4-ен-20 -ілацетат,

Домішка G. 21-(циклогексиліден)прегн-4-ен-3,20-діон,

Домішка Н. прегна-4,6-дієн-3,20-діон (Δ6-прогестерон),

Домішка І. (20RS)-20-метил-3- оксопрегн-4-ен-21-аль,

Домішка J. прегна-1,4-дієн-3,20-діон,

Домішка К. прегна-4,9(11)-дієн-3,20-діон, L. 20-метиліден-3-оксопрегн-4-ен-21-аль,

Домішка М. (17α)-прегн-4-ен-3,20-діон.

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

Таким чином, субстанція для виготовлення фармацевтичної композиції із Прогестерону у складі вимагає підтвердження її чистоти більш ефективним інструментальним методом, оскільки вона може містити супровідні речовини – неприпустимі домішки.

Використовуючі рекомендації Європейської Фармакопеї для хроматографування випробовуваної субстанції методом РХ необхідно адаптувати для аналізу випробовуваного зразку з АФІ Прогестерону методом ВЕРХ як більш сучасного та ефективного методу. Молекули субстанції часто можуть підлягати хімічній деградації під впливом різних чинників та утворювати молекули іншої структури.

Під час її синтезу можливе утворення її побічних продуктів. Під час очистки досліджуваної залишаються специфіковані і неспецифіковані домішки. Всі ці фактори можуть призвести до зниження якості та чистоти випробовуваної субстанції.

Як відомо, супровідні речовини у складі субстанцій Прогестерону визначають методом рідинної хроматографії (РХ). Визначають чистоту субстанцій на присутність енантіомерів.

Виходячи із наявності фармакопейних методів дослідження лікарського засобу Прогестерону методом РХ постає завдання розробити або модифікувати умови хроматографування та дослідження чистоти субстанції цього препарату методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Це дозволить впровадити метод ВЕРХ у фармацевтичний аналіз субстанції ТХА.

Під час розробки або адаптування умов хроматографування випробовуваної субстанції Прогестерону важливо розробити коректні умови хроматографування, які повинні забезпечити виявлення одночасно АФІ – Прогестерон, специфіковані та неспецифіковані домішки, оптичні ізомери, їх визначення та запобігти хімічній деградації компонентів субстанції.

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

Метою експериментального дослідження є ідентифікація АФІ – Прогестерон у випробовуваній субстанції з метою визначення її чистоти, 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.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати АФІ – Прогестерон та 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 1200 з діодно-матричним детектором, колонка – AQUASIL C18, 50x4,6x5; комп’ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у ідентифікації та визначенні чистоти АФІ Прогестерон та супровідних речовин у складі випробовуваної субстанції високотехнологічним методом ВЕРХ в умовах, які дозволять зберегти хімічну структуру досліджуваних компонентів 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 – 27.

SUMMARY

Chiputovych Artem
DETERMINATION OF ACCOMPANING IMPURITIES OF PROGESTERONE IN THE DRUG SUBSTANCES BY HPLC

The department of medicinal chemistry and toxicology

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

Keywords: progesterone, steroides, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Progesterone (or pregn-4-ene-3,20-dione) is a sex hormone of vertebrates and humans. According to the chemical classification, progesterone belongs to steroids. The progesterone scaffold is a cyclic pregnenolone molecule with a cholesterol core. Progesterone is an intermediate and semi-product in the synthesis of all steroid-type hormones. Progesterone is synthesized in the ovaries. Together with estradiol, progesterone regulates the estrous cycle in mammals. When developing or adapting the chromatography conditions of the tested Progesterone substance, it is important to develop the correct chromatography conditions, which should ensure the simultaneous detection of API - Progesterone, specified and unspecified impurities, optical isomers, their determination and prevent chemical degradation of the substance's components.

Materials and methods. Objects of research are substance of Progesterone and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of Progesterone substances. Methods: HPLC (Agilent 1200 with diode-matrix detector, column - AQUASIL C18, 50x4.6x5); computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. A study of the purity of the substance Progesterone was conducted: its identification (by retention time) under alternative conditions of chromatography by the HPLC method with a higher identification capacity with UV detection at 241 nm. The conditions of HPLC chromatography of Progesterone substance were adapted (UV detection only at 241 nm, mobile phase: mobile phase A – water for chromatography P, mobile phase B – acetonitrile P).

Conclusions. Using the HPLC method, it was found that the studied Progesterone substance contains the specified impurity C and the unidentified impurity 1, which confirms the need for its additional purification.