

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 гідрохлортіазиду,
амлодипіну і валсартану в субстанції лікарського засобу методом
ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи Ф1А
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)

Булавин Лілія Петрівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: **ас., к.б.н. Мелешко Р.А.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: **проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ТЕТРАЗОЛУ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови	9
1.2. Біологічна активність	15
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ ТЕТРАЗОЛУ.....	20
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	20
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	25
 ВИСНОВКИ.....	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	38
SUMMARY	41
ДОДАТОК 1.....	42

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

°C – градуси Цельсія

Hal – галоген

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

MOR – μ -opioid receptor

ВСТУП

Актуальність теми. З точки зору хімічної класифікації, валсартан є синтетичною органічною сполукою, яка має хімічну назву N-(1-Оксопентил)-N-[[2'-(1H-тетразол-5-іл)[1,1'-біфеніл]-4-іл]метил]-l-валін. Містить у своїй структурі біфенілову групу, тетразол, монокарбонову амідну та карбонову кислоти. Його хімічна структура визначає належність до класу біфенілілтетразолів. Валсартан – це рецептурний препарат. Він схвалений Управлінням з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами США (FDA) у 1996 році для лікування високого кров'яного тиску, гіпертонії та серцевих захворювань. Сотні партій рецептурного препарату були забруднені NDMA (N-нітрозодиметиламін) - агентом, що викликає рак. Виявлення цієї домішки призвело до відкликання продукції з ринку по всьому світу.

Відкликання валсартану, який доступний під різними назвами, розпочалося у 2018 році. Широке використання препаратів валсартану призвело до значної кількості судових позовів [1-8]. Однак, валсартан як АФІ входить до складу комбінованих препаратів. Наприклад, до складу препарату Комбісарт входять три антигіпертензивних засоби з доповнюючими один одного механізмами для контролю АТ у пацієнтів з есенціальною АГ Це: амлодипін — антагоніст кальцію, валсартан — антагоніст ангіотензину (АРА) II, гідрохлоротіазид — тiazидні діуретики. Комбінація трьох компонентів характеризується взаємодоповнювальною антигіпертензивною дією. Амлодипін інгібує трансмембранний вхід іонів кальцію у м'язи серця та гладкі м'язи судин. Дія амлодипіну здійснюється шляхом прямої релаксивної дії на гладкі м'язи судин. Амлодипін у терапевтичних дозах у пацієнтів з АГ спричиняє вазодилатацію. Це призводить до зниження АТ. Валсартан є активним при пероральному застосуванні, потужним і специфічним АРА II. Валсартан діє селективно на підтип АТ₁-рецепторів. Прийом валсартану сприяє зниженню АТ без впливу на швидкість пульсу.

Гідрохлоротіазид. Місцем дії тіазидних діуретиків є переважно дистальні звивисті каналці нирок. Механізм дії тіазидів полягає в інгібіції переносників Na^+Cl^- шляхом конкуренції за центри Cl^- . Це у свою чергу діє на механізми реабсорбції електролітів з подальшим підвищенням активності реніну у плазмі крові, виведенням калію із сечею, зниженням рівня калію у плазмі крові. Кумулятивна залежність доза–відповідь спостерігалася при базальноклітинній карциномі і при плоскоклітинній карциномі. **Подвійна блокада ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС)**. Проведено два рандомізовані контрольовані дослідження ONTARGET та VA NEPHRON-D, в яких вивчалася супутнє застосування інгібітору АПФ з антагоністом рецепторів ангіотензину II. Дослідження ONTARGET - за участю пацієнтів, які мали в анамнезі серцево-судинні, цереброваскулярні захворювання, цукровий діабет 2 типу. Дослідження VA NEPHRON-D - за участю пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, діабетичною нефропатією. Дослідження не виявили суттєвої сприятливої дії на функції нирок та/або серцево-судинної системи і рівень смертності. Був відзначений підвищений ризик гіперкаліємії, гострого ушкодження нирок, гіпотензії. Не рекомендується одночасне застосування інгібіторів АПФ і АРА II у пацієнтів з діабетичною нефропатією. Летальний наслідок з причини серцево-судинних захворювань. Інсульт набагато частіше відзначалися в групі терапії з додаванням аліскірену, ніж у групі плацебо [9-12]. До побічних реакцій при прийомі цього препарату відносяться: анорексія, гіперкальціємія, гіпокаліємія, порушення координації, запаморочення, сонливість, летаргія тощо [9-15]. Всі вказані три АФІ містить, також комбінований лікарський засіб Тіара Тріо: амлодипіну бесилату в перерахуванні на амлодипін 5 мг, гідрохлортіазиду 12,5 мг, валсартану 160 мг. Лікарський засіб відноситься до блокаторів рецепторів ангіотензину II, інші комбінації. Код АТХ C09D X01 [16-18].

Під час синтезу субстанцій амлодипіну, валсартану та гідрохлоротіазиду можливе утворення побічних продуктів синтезу або

продуктів розпаду, а під час очистки субстанції часто залишаються специфічні і неспецифічні домішки.

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанцій валсартану та амлодипіну. Однак ДФУ регламентує аналіз чистоти субстанції гідрохлортіазиду методом РХ з УФ-детектуванням. Субстанції Амлодипіну (у формі гідрохлориду дигідрату) та Валсартану можна проаналізувати за монографіями Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [24, 25]. Таким чином, виходячи із наявності методик дослідження субстанцій АФІ валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду методом РХ в ДФУ та Європейській Фармакопеї, постає завдання осучаснити аналіз трьохкомпонентної суміші субстанцій шляхом впровадження більш ефективного методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та адаптувати умови хроматографування і методики дослідження. Це дозволить розширити коло інструментальних методів дослідження субстанції та запропонувати нові методики дослідження. Під час розробки або адаптування умов хроматографування субстанції важливі коректні умови дослідження, оскільки під час проведення хроматографічних досліджень можлива хімічна деградація субстанції, яка збільшить кількість домішок.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ВЕРХ для ідентифікації трьох АФІ – валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду у досліджуваній суміші субстанцій та можливих домішок/продуктів деградації молекул з використанням валідованих методик та умов проведення дослідження.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація та визначення чистоти методом ВЕРХ трьох АФІ – валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду у досліджуваній суміші

субстанцій, адаптування умов хроматографування та модифікація методик дослідження на основі валідованих методик та умов проведення дослідження.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати методом ВЕРХ трьох АФІ – валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду у досліджуваній суміші субстанцій;
- визначити чистоту трьох АФІ – валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду у досліджуваній суміші субстанцій хроматографічним методом (ВЕРХ) (присутність супровідних речовин);
- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекули субстанцій від хімічної деградації.

Методи дослідження. Високоефективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1200 з DAD детектором, колонка – Hypersil BDS-C18, 125×4,0x5 мм (або аналогічна); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у осучасненні фармацевтичного аналізу шляхом впровадження високоселективного хроматографічного методу ВЕРХ у аналіз трьох АФІ – валсартану, амлодипіну, гідрохлортіазиду у досліджуваній суміші субстанцій, розробити умови, які дозволять зберегти хімічну структуру від хімічної деградації.

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

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

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 42, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 25.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ТЕТРАЗОЛУ

1.1. Особливості хімічної будови

За хімічною класифікацією валсартан є синтетичною органічною сполукою. Він має хімічну назву N-(1-Оксопентил)-N-[[2'-(1H-тетразол-5-іл)[1,1'-біфеніл]-4-іл]метил]-l-валін. Молекула містить у своїй структурі біфенілову групу, тетразол, монокарбонову амідну та карбонову кислоти. За хімічною структурою Валсатан відноситься до класу біфенілілтетразолів. Валсартан — синтетичний лікарський засіб. Він належить до групи антагоністів рецепторів ангіотензину-II. Механізм дії полягає у блокуванні зв'язування ангіотензину-II з рецепторами ангіотензину-I. Це що приводить до вазоділятації, зниженні виділення альдостерону (рис. 1.1.1).

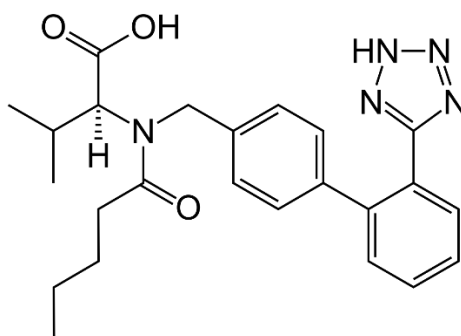


Рисунок 1.1.1. Валсартан, хімічна формула.

Валсартан є похідним тетразолу. Тетразол — органічна гетероциклічна сполука. Вона має 5-членне кільце та чотири атоми азоту. Його формула CH_2N_4 . Тетразол утворює три ізомери.

Існують три ізомери вихідного тетразолу. Вони відрізняються положенням подвійних зв'язків: 1H-, 2H- і 5H-тетразол.

1*H*- і 2*H*-ізомери є таутомерами. У газовій фазі домінує 2*H*-тетразол. Ці ізомери можна вважати ароматичними з 6 π -елекtrонами, тоді як 5*H*-ізомер неароматичний (1.1.2).

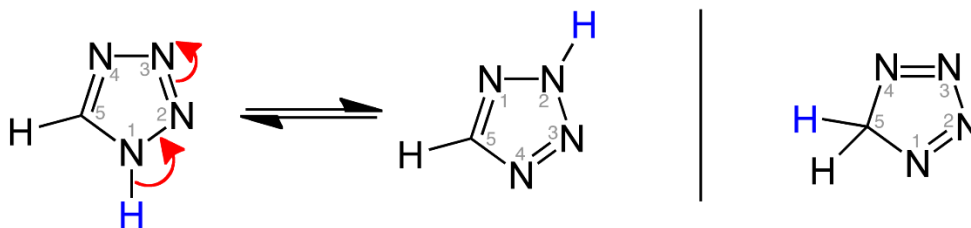


Рисунок 1.1.2. Ізомери тетразолу, хімічна формула.

Тетразоли використовуються в органічному синтезі хімічних сполук, як компоненти в деяких медичних препаратах (антибіотики, тедизолід, вони містять тетразолове кільце) [17-19].

Резистентність до антибіотиків це одна з найважливіших загроз здоров'ю сьогодення. Ситуація погіршується через брак ефективних нових антимікробних молекул, неналежне використання доступних антибіотиків.

Можна розділити механізми резистентності на дві категорії: внутрішні та набуті. Механізми внутрішньої резистентності пов'язані з хромосомним кодуванням. Механізми включають неспецифічні ефлюксні насоси, ферменти. Вони блокують дію антибактеріальних речовин, що відповідають за зниження проникності антибіотика. Генетична структура бактеріального організму відповідає за створення таких механізмів. Низький рівень резистентності до антибіотиків спостерігається, якщо домінує внутрішній механізм. Патогени, що містять внутрішні механізми, можуть розвинути сильну стійкість до антибіотиків. Набута резистентність виникає в результаті горизонтального переносу генів. Він включає процес плазмідного кодування специфічних насосів виведення та ферментів. Цей тип механізму резистентності становить набагато більшу загрозу для інфікованих осіб. Можна використовувати

альтернативну класифікацію механізмів резистентності до антимікробних препаратів. Це: активний для виведення препарату, інактивація препарату, модифікація мішені препарату.

Зростання захворюваності пов'язане з обмеженою кількістю терапевтичних варіантів, стійкими до антибіотиків. Це призводить до необхідності тривалішого лікування, тривалого перебування в стаціонарі. Інфекції, спричинені золотистим стафілококом, можуть бути найбільшим занепокоєнням. Смертність, спричинена цими штамами, залишається на рівні приблизно 20–40%. Стафілококи виробили ефективні механізми резистентності до антибіотиків. Велика потреба в розробці нових молекул, активних проти бактеріальних штамів, є незаперечною [19-23].

У попередні роки дослідження присвячені пошуку нових сполук на основі тетразолу з антимікробною активністю. Клініцисти використовують антимікробні препарати, похідні від тетразолу - цефамандол, цефтезол. Обидва вони цефалоспоринові антибіотики широкого спектру дії другого покоління. Важливим є антибіотик класу оксазолідинонів тадалізолід. Модифікація структури тетразолу сполук посилює антибактеріальні властивості. Розроблено гібридні структури іміду-тетразолу для оцінки антимікробної дії.

Досліджено низку імідів та їх похідних, повідомляючи про різноманітну структурну та біологічну активність. Похідні тіосечовини двох імідів з антимікробною активністю були використані як субстрати для синтезу гібридів тетразол-іміду. Дослідження показали, що введення тетразольної структури в похідні тіосечовини призводить до підвищення антимікробної активності [19-23].

Антибактеріальна активність. Для одинадцяти синтезованих сполук було передбачено активність проти грампозитивних та грамнегативних бактерій. Виявлено, що група може бути активною проти штамів *S. aureus*,

Bacillus subtilis та *Mycobacterium smegmatis*. Для сполук було виявлено цікаві показники ймовірності:

- 3 (значення 0,1880), 9 (значення 0,2211) та 12 (значення 0,1718) для активності проти штаму *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MW2, резистентного до нього.

- 2 (значення 0,1431) та 7 (значення 0,2540) для активності проти штаму *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.

- 2 (впевненість 0,1158), 7 (впевненість 0,1011) та 9 (впевненість 0,1511) для активності проти штаму *Mycobacterium smegmatis*.

Для оцінки токсикологічних параметрів *in silico* використано програмне забезпечення pkCSM. Дві синтезовані сполуки мали позитивний результат у тесті AMES. Їх слід визнати канцерогенними. Обидві сполуки містили замісник -NO₂, приєднаний до фенільного кільця.

Відомо, що цей фрагмент може призводити до утворення сполук з високою токсичністю. Виявлено, що всі похідні, містять інгібітор людського Ether-à-go-go-Related Gene (hERG II). Він є основною причиною розвитку синдрому подовженого інтервалу QT.

Результати узгоджуються з точки зору тесту на сенсibilізацію шкіри. Сполуки не повинні розвивати цей ефект. Сполуки можуть підвищувати гепатотоксичність. Максимально рекомендовану дозу (MRTD) для всієї групи слід вважати низькою [23].

Одинадцять нових похідних 1H-тетразол-5-аміну синтезовано за відомою процедурою. Використано два типи похідних тіосечовини. Вони мають імідну структуру 4,5,6,7-тетраметил-3a,4,7,7a-тетрагідро-1H-4,7-метаноізоіндол-1,3(2H)-діону або 4-ізопропіл-7-метил-3a,4,7,7a-тетрагідро-

1H-4,7-етаноізоіндол-1,3(2H)-діону. Отримано результати фізико-хімічних та біологічних оцінок сполук.

Основною метою було замінити тіосечовину на тетразольний каркас. Для цього використовували окислювальну десульфуризацію тіосечовинових субстратів з циклізацією, використовуючи азид натрію як нуклеофіл. Агент десульфуризації - хлорид ртуті (II). Структурна модифікація може призвести до покращення антимікробної активності (рис. 1.1.3).

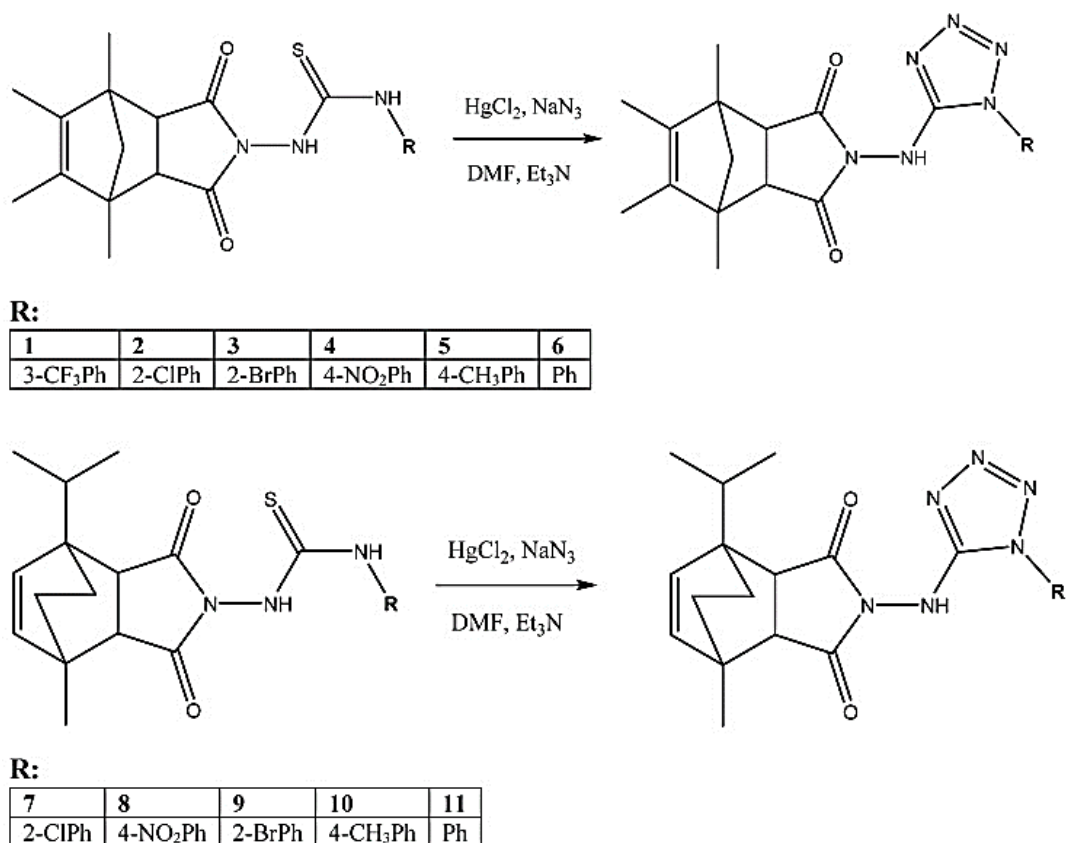


Рисунок 1.1.3. Структурні модифікації молекул.

Дослідження антибактеріальної активності *in vitro*. Синтезовані сполуки протестовані *in vitro* проти бактерій, включаючи репрезентативні стандартні грампозитивні та грамнегативні палички. Сполуки перевірені на їх мінімальні інгібуючі концентрації (МІК). 4 з 11 досліджених сполук продемонстрували

помірну антимікробну активність проти стандартних штамів бактерій зі значеннями МІК від 32 до 256 мкг/мл.

Решта протестованих сполук демонстрували високий та широкий спектр активності в діапазоні 0,1–32 мкг/мл. Серед цієї групи три сполуки показали чудові антимікробні профілі проти стандартних грампозитивних стафілококів (діапазон 0,1–3,2 мкг/мл). Вони були ефективнішими, ніж референтний ципрофлоксацин. Три сполуки виявилися добрими інгібіторами росту грамнегативних паличок: *E. coli* та *P. Aeruginosa* (діапазон 0,4–25,6 мкг/мл). Це вказує, що сполуки є найбільш перспективними з усіх синтезованих похідних.

Експеримент показав, що похідні 1,5-дизаміщених тетразолімідів з 4,5,6,7-тетраметильним фрагментом демонструють кращі антимікробні властивості, ніж з 4-ізопропіл-7-метилімідним каркасом.

Незалежно від типу імідного фрагмента, присутність електроноакцепторного нітрозамісника у сполуках демонструє подібні антимікробні властивості проти грампозитивних бактеріальних штамів. Зазвичай нітрозамісник викликає токсичність сполуки та може підвищувати антимікробну активність. Введення хлорного замісника в орто-положення до фенільного кільця у сполуках призводило до підвищення антимікробної активності – у тетразолімідів з 4,5,6,7-тетраметильним фрагментом. Заміна хлорного замісника на бромний замісник в орто-положенні фенільного кільця покращила пригнічення росту бактеріальних штамів. Завдяки значній електронегативності трифторметильного замісника у фенільному кільці, сполука проявляє високу антимікробну активність проти всіх протестованих штамів.

1.2. Біологічна активність

Похідні із сильними (-CF₃) та слабкими (-Br, -Cl) деактивуючими електроноакцепторними замісниками в бензольному кільці виявили найвищим антимікробним потенціалом серед протестованих сполук проти стандартних та клінічних штамів бактерій. Загалом електронодонорні групи (EDG) приєднані до фенільного кільця або відсутність замісника були відповідальними за зниження антибактеріальної активності.

Визначено найкращий імідний фрагмент (4,5,6,7-тетраметил у сполуках або 4-ізопропіл-7-метил фрагмент. Похідні з 4,5,6,7-тетраметильний фрагментом показали значні антимікробні результати. Перехід від субстрату імід-тіосечовини до похідних імід-тетразолу призводить до збільшення антимікробних властивостей.

Більшість субстратів неактивні проти стандартних штамів бактерій. Такий синтетичний перехід зображено нижче (рис. 1.2.1).

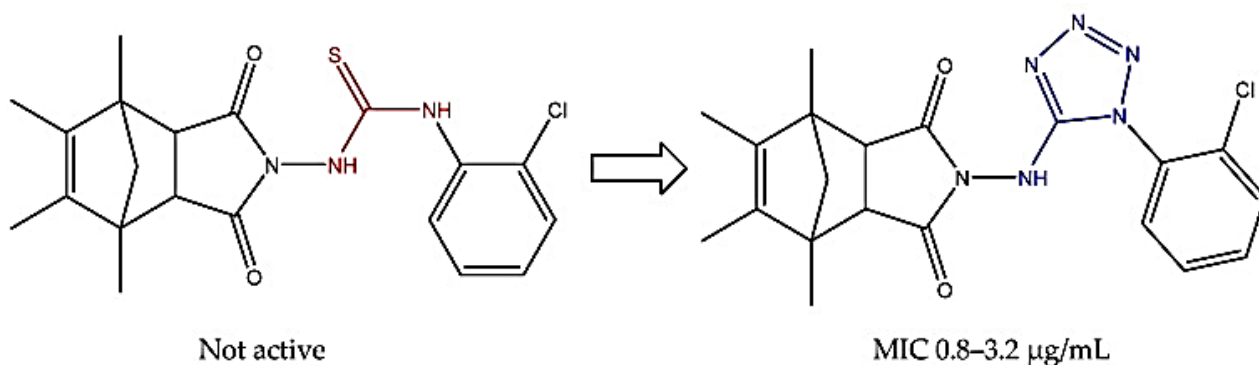


Рисунок 1.2.1. Активні та неактивні субстрати.

Первинне пошкодження міокарда є основною причиною серцевої недостатності. Частота ознак та симптомів СН після гострого інфаркту міокарда становить близько 25%. Близько 40% інфаркту міокарда (ІМ)

супроводжується систолічною дисфункцією лівого шлуночка. Частота СН у спостереженні за пацієнтами з ГІМ становить 24–41%.

Дослідження серця Фремінгема показало, що 30-денна частота СН після ІМ зросла з 10 до 23,1% протягом двох десятиліть. Частота СН у пацієнтів з інфарктом міокарда з підйомом сегмента ST (ІМпST) є найпоширенішою. Дослідження BRIGHT виявило, що частота виникнення серцевої недостатності при госпіталізації становила 14,3% пацієнтів з гострим інфарктом міокарда, яким було проведено екстрене перкутанне коронарне втручання. СН є поширеним ускладненням ІМ з реперфузійною терапією.

Рівень медичної допомоги при інфаркті міокарда покращився. Рівень смертності від нього щорічно знижується. Розвиток серцевої недостатності під час госпіталізації є серйозним ускладненням. Виникнення та прогресування СН після інфаркту міокарда втричі збільшує ризик загальної смертності. Поєднання двох захворювань впливає на побічні ефекти, оскільки збільшує ризик повторного інфаркту, інсульту, шлуночкової аритмії. Зменшення розміру інфаркту, покращення загальної функції шлуночків після реперфузії міокарда має прогностичні наслідки.

У перспективі найкращим методом лікування серцевої недостатності після інфаркту міокарда є нейрогормональна блокада. Сакубітрил-валсартан – це інгібітор рецепторів ангіотензину-неприлізину. Він діє шляхом пригнічення модуляції нейрогормональної осі рецепторами ангіотензину неприлізином та енкефаліназою. Він покращує нейрогормональний баланс. Він призводить до блокування лише ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС).

У масштабному дослідженні PARADIGM-HF сакубітрил-валсартан зменшив кількість госпіталізацій, знизив смертність у пацієнтів із хронічною HFrEF порівняно із інгібіторами АПФ/блокаторами рецепторів ангіотензину II.

РКД (PARADISE-MI) показало, що сакубітрил-валсартан порівняно з раміприлом не знижує частоту серцевої недостатності. Існує достатня кількість контрольованих досліджень. Вони демонструють ефективність сакубітрил-валсартану в лікуванні інфаркту міокарда із серцевою недостатністю. Жодне дослідження не проводило систематичного огляду. Тому проведено метааналіз для порівняння клінічних результатів сакубітрил-валсартану у пацієнтів із серцевою недостатністю після гострого інфаркту міокарда. Протокол дослідження було зареєстровано в PROSPERO (CRD42022322901), виконано відповідно до рекомендацій PRISMA.

Відбір досліджень. Дослідження включені, якщо вони відповідали наступним критеріям: Гемодинамічно стабільні пацієнти після гострого інфаркту міокарда: Тип дизайну дослідження включав рандомізоване контрольоване дослідження (РКД), нерандомізоване контрольоване дослідження (неРКД): Пацієнти отримували традиційне лікування. Контрольна група залишалася незмінною та отримувала лікування інгібітором ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ)/блокатором рецепторів ангіотензину (БРА). Експериментальна група отримувала таблетки сакубітрилу/валсартану.

Критерії виключення: спостереження, когортне, випадок-контроль, якісні дослідження, неконтрольовані дослідження та лабораторні дослідження; дослідження були дубльованими публікаціями; дослідження без корисних даних; педіатричні, тваринні або клітинні дослідження.

Основні результати: Параметри ремоделювання лівого міокарда та серйозні несприятливі серцево-судинні події (СНСП).

До СНСП належать смерть від серцевої недостатності, госпіталізація з приводу рецидивуючої серцевої недостатності, рецидивуючий інфаркт міокарда.

Вторинні результати: N-кінцевий промозковий натрійуретичний пептид (NT-proBNP) та 6-хвилинна ходьба (6MWD). Результати безпеки - несприятливі події (гіпотензія, неврологічний набряк, дисфункція печінки та нирок). Ризик упередженості оцінювався за допомогою інструменту оцінки ризику упередженості РКД. Зміст оцінки включає: метод рандомізації, приховування розподілу, сліпе впровадження суб'єктів, сліпе впровадження оцінки результатів, повнота даних, вибіркове звітування та інші джерела упередженості. Залежно від впливу упередженостей, ризик упередженості потім оцінювався як низький, високий або нечіткий. Статистичний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення RevMan5.3 та Stata14.0. MD (середня різниця) використовувалася як статистичний показник аналізу ефектів, а SMD (стандартна середня різниця) використовувалася, якщо використовувалися різні методи; RR (співвідношення ризиків) використовувався як статистичний показник аналізу ефектів для дихотомічних змінних показників. Кожен розмір ефекту забезпечував свій 95% ДІ.

Гетерогенність результатів досліджень аналізувалася за допомогою χ^2 -тесту ($\alpha = 0,1$), а розмір гетерогенності кількісно оцінювався за допомогою I^2 . Гетерогенність результатів кожного дослідження була невеликою ($P \geq 0,1$ та $I^2 \leq 50\%$). Використовувалася модель з фіксованими ефектами. В іншому випадку ($P < 0,1$ або $I^2 > 50\%$) для мета-аналізу використовувалася модель з випадковими ефектами. Якщо кількість досліджень була ≥ 10 , то для оцінки можливості упередженості публікацій будували воронкоподібні діаграми. Воронкоподібні діаграми з асиметричним розподілом вказують на високий потенціал упередженості. Тест Еггера аналізував можливість упередженості публікацій. $P > 0,1$ вказував на те, що ймовірність упередженості була незначною (рис. 1.2.2).

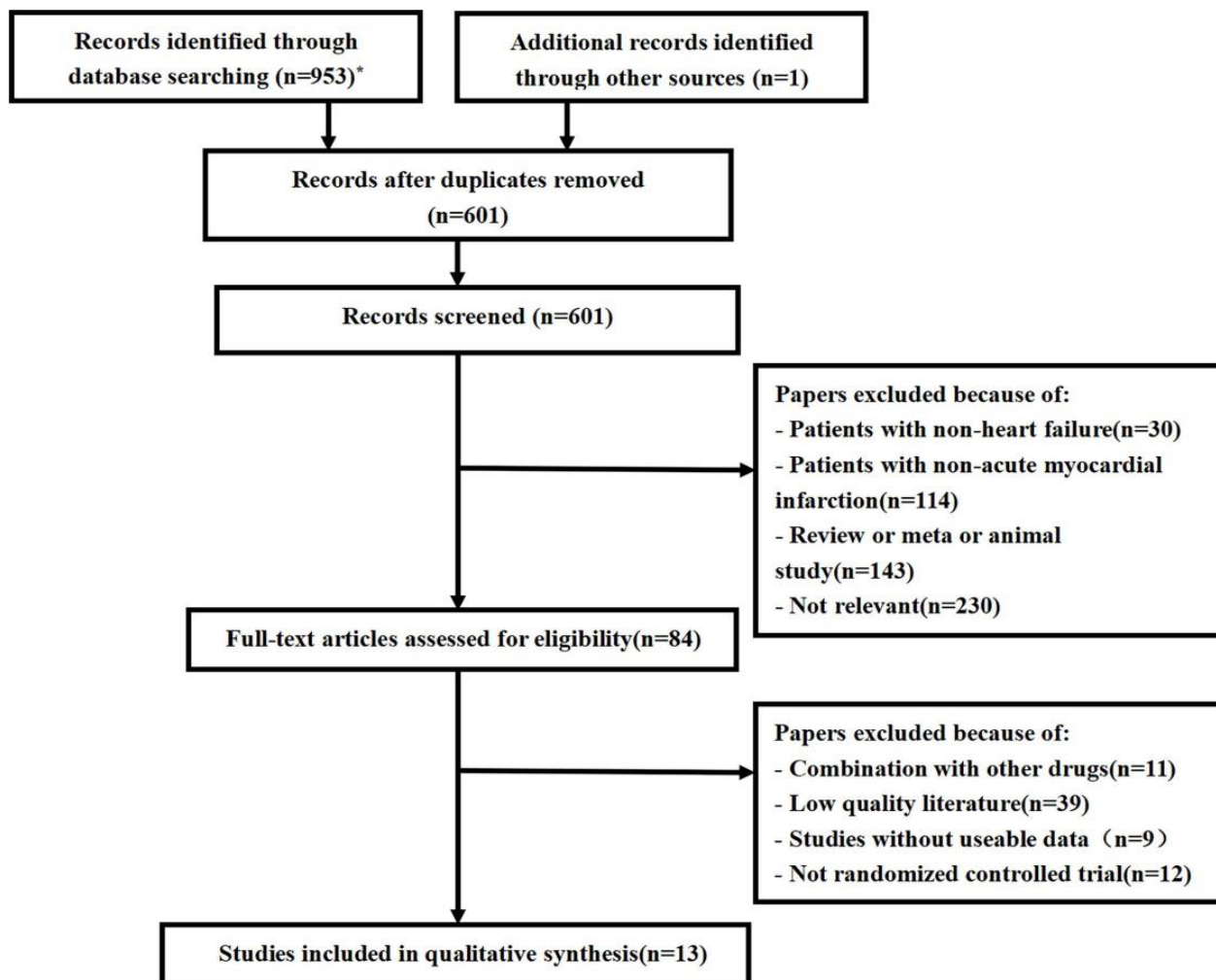


Рисунок 1.2.2. Блок-схема для скринінгу літератури (PRISMA Flow Diagram).

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ ТЕТРАЗОЛУ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Антимікробні аналізи проводили з використанням референсних штамів бактерій з міжнародних колекцій мікробів: Американської колекції типових культур (ATCC) та Національної колекції типових культур (NCTC). Були використані стандартні штами бактерій: грампозитивні — *Staphylococcus aureus* NCTC 4163, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, грамнегативні: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Клінічні штами бактерій: грампозитивні: *Staphylococcus epidermidis* 5253, *Staphylococcus epidermidis* 4243, *Staphylococcus aureus* T5592, *Staphylococcus aureus* T5591 та грамнегативні: *Escherichia coli* 520, *Escherichia coli* 600, *Klebsiella pneumoniae* 510, *Pseudomonas aeruginosa*. 659. Вони були отримані з колекції кафедри фармацевтичної мікробіології Варшавського медичного університету, Польща.

Антимікробну активність досліджували методом мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) за стандартними процедурами, наданими CLSI.

МІК визначали методом двократного серійного мікророзведення бульйону з використанням бульйонного середовища Mueller-Hinton II (США). Кінцевий інокулят досліджуваних бактерій становив 10⁶ КУО/мл.

Маточний розчин тестованих сполук готували в диметилсульфоксиді (ДМСО), розводили стерильним середовищем до вмісту розчинника 1%.

Зафіксоване значення МІК визначається як найнижча концентрація тестованих антимікробних засобів.

Процедура молекулярного докінгу. Структури лігандів були згенеровані за допомогою сервера Automated Topology Builder (АТВ версії 2.2). Розрахунки докінгу та аналіз даних виконані за допомогою AutoDock4 (4.2) та AutoDockTools4.

Для комплексу рецептор-ліганд виконано 1000 незалежних циклів докінгу. Це призвело до отримання 1000 конформерів з найнижчою енергією зв'язування. Було використано структурну кластеризацію для визначення найбільш бажаних режимів зв'язування. Центральну структуру найбільшого кластера обрано як остаточну структуру, зв'язану з лігандом, для кожного комплексу.

Валсартан – це потужний, активний блокатор рецепторів ангіотензину II. Він широко використовується для лікування гіпертензії та хронічної серцевої недостатності. Описано підхід до безперервного синтезу попередника валсартану, що складається з трьох етапів. Застосований синтетичний шлях включає N-ацилювання, перехресне сполучення за Сузукі-Міяура, гідроліз метилового естеру. Після оптимізації окремих етапів, їх було успішно перенесено на процеси безперервного потоку з використанням різних конструкцій реакторів.

Перший етап синтетичного шляху (N-ацилювання) та третій етап (гідроліз метилового естеру) виконуються в установках змішувального реактора.

Ключовий етап реакційного каскаду (сполучення Сузукі-Міяури) каталізується гетерогенним паладій-заміщеним оксидом церію-олова.

Частинки каталізатора впроваджуються у розроблений реактор з ущільненим шаром. Він має колонку ВЕРХ як нерухомий шар. Поєднання окремих реакційних модулів сприяє послідовному виконанню реакційних етапів. Використовуючи розроблену багатоступеневу установку безперервної дії, цільовий попередник валсартану отримано із виходом до 96% (рис. 2.1.1).

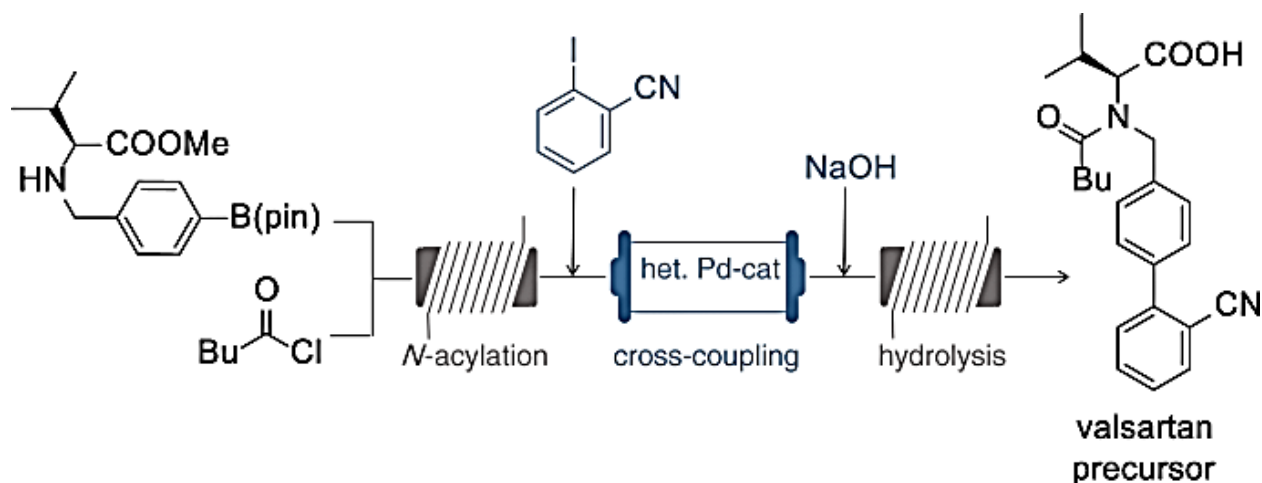


Рисунок 2.1.1. Трьохступеневий синтез валсартану.

Валсартан–Діован. Продемонстровано різні підходи до його синтезу. Метиліві або бензилові естери L-валіну алкілували біфенілбромметилнітрилом для отримання амінів. Проводили ацилювання валероїлхлоридом для отримання N-валерильних похідних. Отриманий продукт кип'ятили зі зворотним холодильником у ксилолі з азидом трибутилолова. Утворювалися похідні трибутилолова теразолу, які гідролізували до похідних теразолу шляхом когерентного використання основи та кислоти. У випадку метилового естеру, він піддавався гідролізу в основних умовах. У випадку бензилового естеру, його гідрували над паладієвим каталізатором для отримання бажаного валсартану.

Інший метод розпочинався з того ж біфенілбромметилнітрилу, який поетапно перетворювали на ацетат. Його гідролізували до бензилового спирту, який піддавався окисленню за методом Сверна з оксалілхлоридом в ДМСО, у присутності триетиламіну з утворенням альдегіду.

Відновне амінування його з амінокомпонентом L-валін метиловим естером та гідруючим агентом ціаноборгідридом натрію дало біфенілнітрил. Він за тією ж послідовністю реакцій давав бажаний валсартан (рис. 2.1.2).

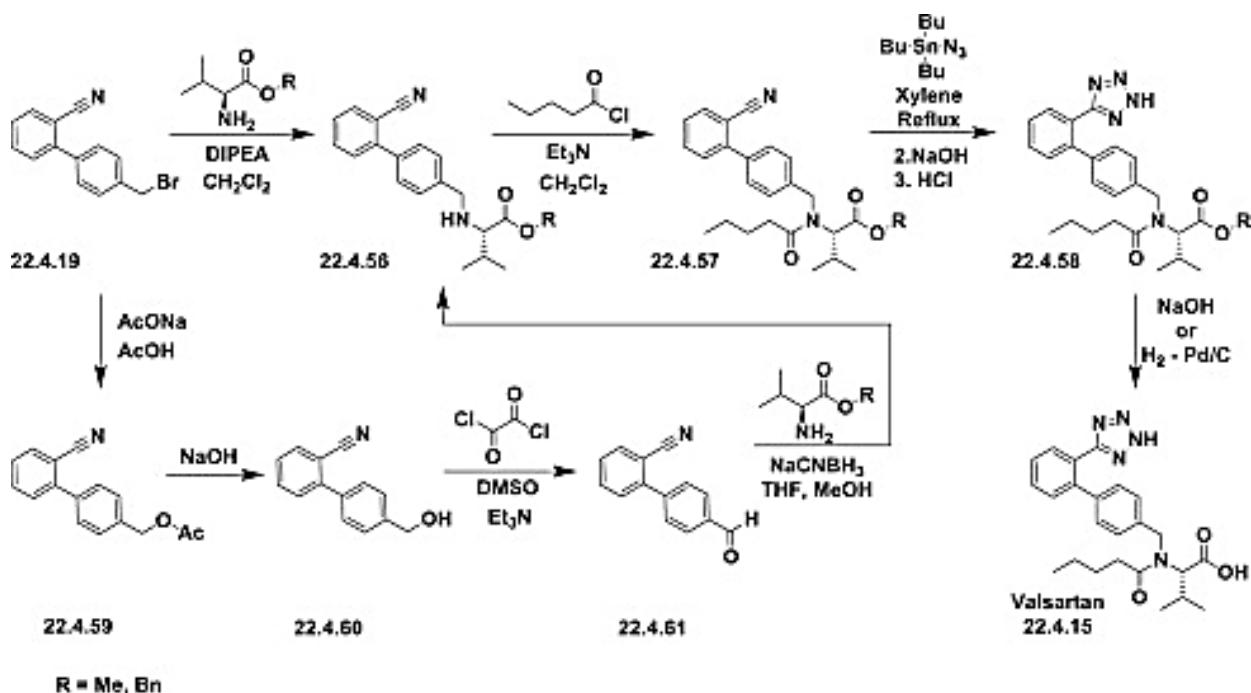


Рисунок 2.1.2. Синтез на основі метилових або бензилових естерів L-валіну.

Крім того, представлено схему синтезу валсартану, виходячи із ароматичних амінів та похідних карбонових кислот (рис. 2.1.3).

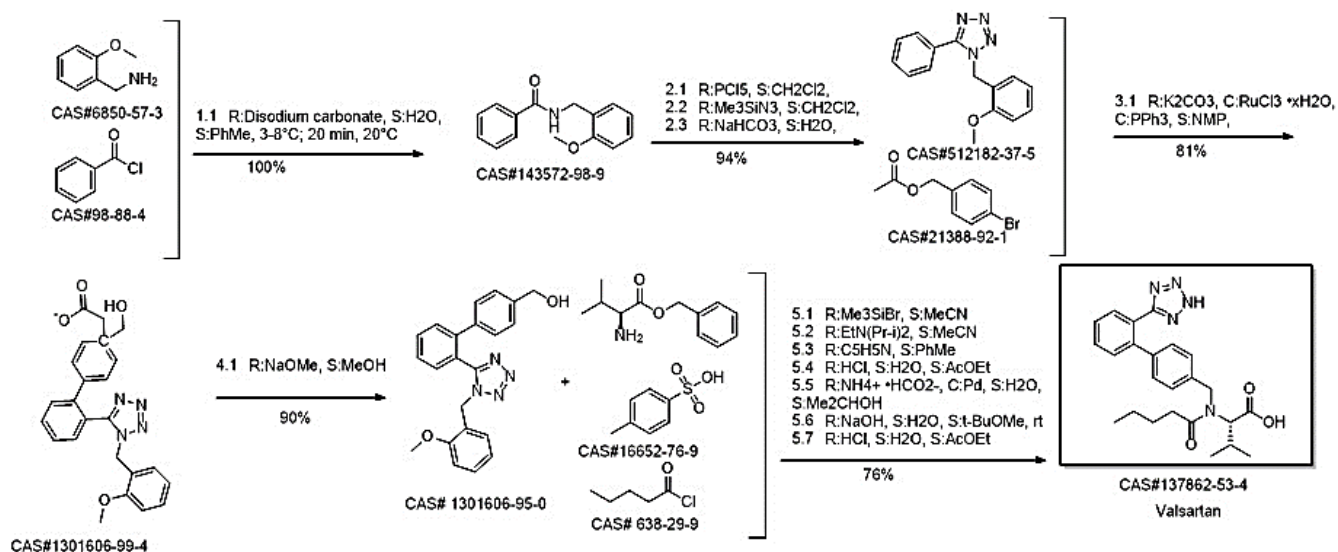


Рисунок 2.1.3. Синтез валсартану.

Представлено ефективний синтез валсартану (Diovan). Оцінено два шляхи. Обидва з використанням вдосконаленої версії декарбоксилуючого з'єднання для побудови біарильного фрагмента.

Синтез валсартану з використанням 1-бром(4-диметоксиметил)бензолу завершений у чотири етапи з виходом 39%. Новий метод має економічні та екологічні переваги порівняно з описаним у літературі. Він є більш лаконічним та дозволяє уникнути стехіометричної кількості металоорганічних реагентів (рис. 2.1.4).

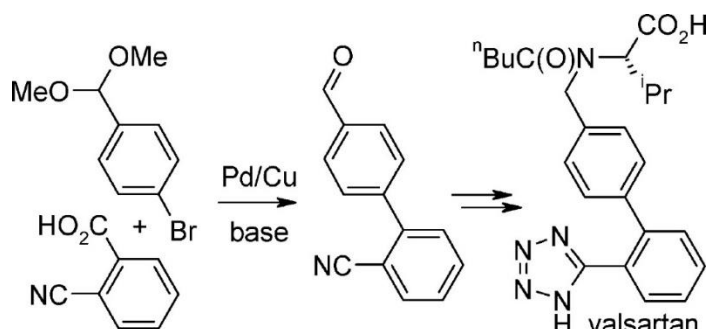


Рисунок 2.1.4. Синтез валсартану.

Ключовий етап - каталіз паладієм з'єднання Сузукі. Цей метод долає багато недоліків. Він є більш придатним для промислового виробництва (рис. 2.1.5).

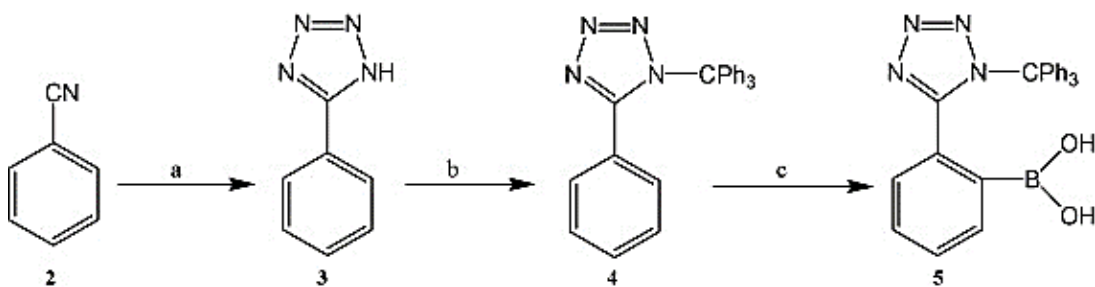


Рисунок 2.1.5. Синтез валсартану.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанцій валсартану та амлодипіну.

Однак ДФУ регламентує аналіз чистоти субстанції гідрохлортіазиду методом РХ з УФ-детектуванням. Субстанції Амлодипіну (у формі гідрохлориду дигідрату) та Валсартану можна проаналізувати за монографіями Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [24, 25].

Дигідрат амлодипіну гідрохлориду. Монографія 04/2019:0651.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Розчин А. 2,76 г моногідрату натрію дигідрофосфату R у 850 мл води для хроматографії R, рН до 3,0 фосфорною кислотою R, об'єм води для хроматографії R до 1000 мл.

Випробовуваний розчин. 20 мг досліджуваної речовини в 1 мл метанолу R, об'єм розчином А до 10,0 мл.

Розчин порівняння (а). 2 мг CRS домішки амлориду А у 0,5 мл метанолу R, 0,5 мл випробовуваного розчину, об'єм розчином А до 10 мл.

Розчин порівняння (b). 4 мг CRS амлориду для ідентифікації піку (містить домішку С) у 0,5 мл метанолу R, об'єм розчином А до 2 мл.

Розчин порівняння (с). 1,0 мл досліджуваного розчину до 100,0 мл розчином А. 1,0 мл розчину розводять до 10,0 мл розчином А.

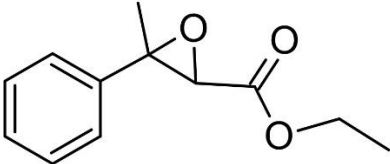
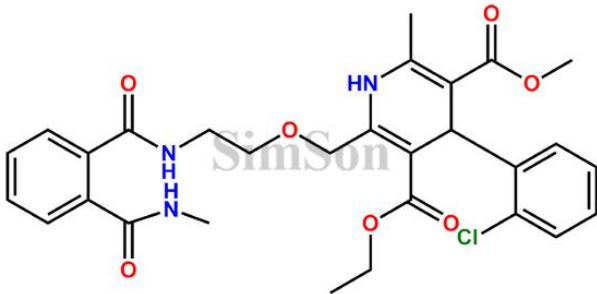
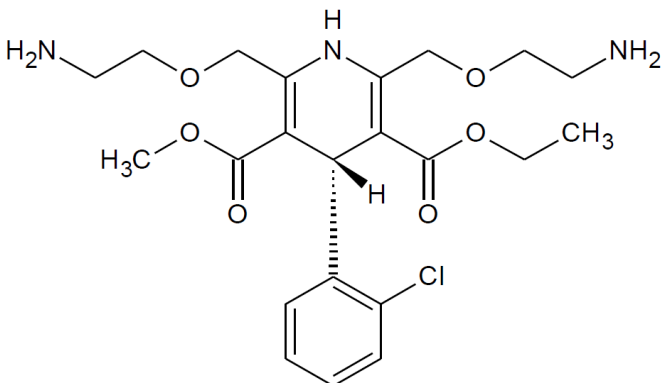
Рухома фаза: 0,8 г моногідрату гексансульфонату натрію R у суміші 80 мл ацетонітрилу R1 та 920 мл розчину А.

Швидкість потоку: 1,5 мл/хв.

Виявлення: спектрофотометр при 210 нм.

Контролюють домішку: С. Контроль домішок у речовинах для

фармацевтичного застосування): А, В.

	А. метил 3,5-діаміно-6-хлорпіразин-2-карбоксилат
	В.3,5-діаміно-6-хлорпіразин-2-карбонова кислота
	С.3-аміно-6-хлор-N-(діамінометиліден)-5-гідроксипіразин-2-карбоксамід

Валсартан. Монографія 04/2021:2423.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробуваний розчин. 50 мг досліджуваної речовини в рухомій фазі, об'єм рухомою фазою до 100,0 мл.

Розчин порівняння (а). 1,0 мл випробовуваного розчину доводять до 100,0 мл рухомою фазою. 1,0 мл розчину розводять до 10,0 мл рухомою фазою.

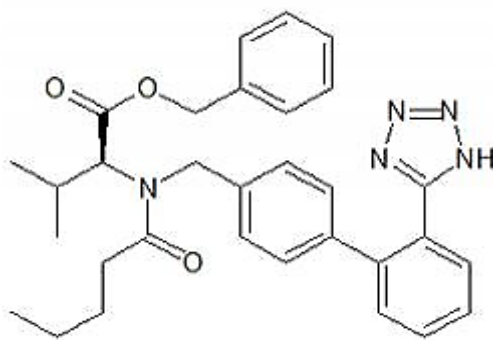
Розчин порівняння (b). вміст флакона з валсартаном для перевірки придатності системи CRS (містить домішку С) в 1 мл рухомої фази.

Рухома фаза: льодяна оцтова кислота R, ацетонітрил R1, вода для хроматографії R (1:500:500 V/V/V).

Виявлення: спектрофотометр при 225 нм.

Введення: 10 мкл. Відносне утримування відносно валсартану (час утримування = близько 5 хв): домішка С = близько 0,8.

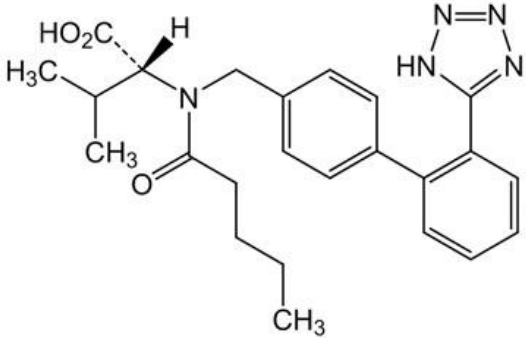
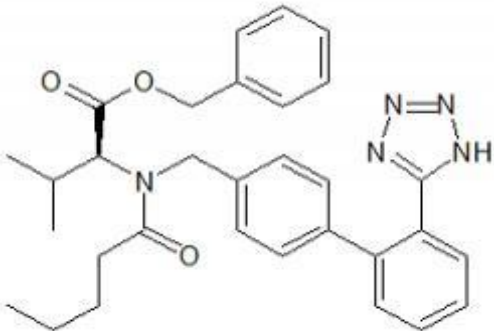
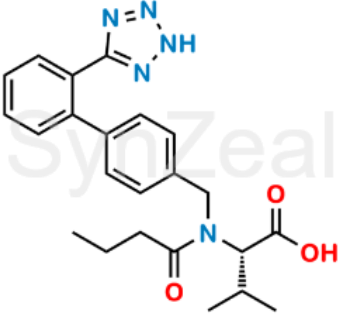
Визначені домішки: А, С. Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): В.



А. (2R)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутанова кислота,

В. бензил (2S)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутаноат,

С. (2S)-2-[бутаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]-3-метилбутанова кислота.

	А. (2R)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутанова кислота
	В. бензил (2S)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутаноат
	С. (2S)-2-[бутаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]-3-метилбутанова кислота.

Гідрохлортіазид аналізують за ДФУ методом РХ (2.2.29). Суміш розчинників: ацетонітрил Р1-метанол Р2-фосфатний буфер, рН 3.2 Р1.

Детектування УФ при 224 нм.

Контролюють специфіковані домішки А, В, С.

Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1200 з DAD детектором.

Виконували кількісне визначення АФІ валсартан, амлодипін,

гідрохлортіазид у складі суміші субстанцій.

Умови хроматографування:

- колонка – Hypersil BDS-C18, 125×4,0x5 мм (або аналогічна);
- потік – 0,63 мл/хв;
- детектування – УФ при 237 нм (амлодипін);
– УФ при 275 нм (гідрохлортіазид та валсартан);-
- об'єм інжекції – 10 мкл;
- температура колонки – 30°C;
- буфер А – 1,36 г калію дигідрофосфату розчинити у 1000 мл води, додати 1 мл трифтороцтової кислоти та довести рН до $2,5 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти;
- буфер В – ацетонітрил;

Суміш розчинників – ацетонітрил та вода Р у співвідношенні 1:1.

Час хроматографування: 15 хв.

Гradient представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Gradient.

Час	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0	80	20
4	65	35
10	40	60
12	80	20
15	80	20

Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 25 мкг/мл, амлодипіну 10 мкг/мл та валсартану 32 мкг/мл в розчиннику.

У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ гідрохлортіазиду, амлодипіну та валсартану з концентрацією 25 мкг/мл, 10 мкг/мл та 32 мкг/мл відповідно в розчиннику.

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для проведення досліджень методом ВЕРХ використовували реактиви:

калію дигідрофосфат (чистоти для ВЕРХ),

трифтороцтова кислота (чистоти для ВЕРХ),

ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),

ортофосфорна кислота (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати.

На рисунках 3.1, 3.2 представлено отримані хроматограми.

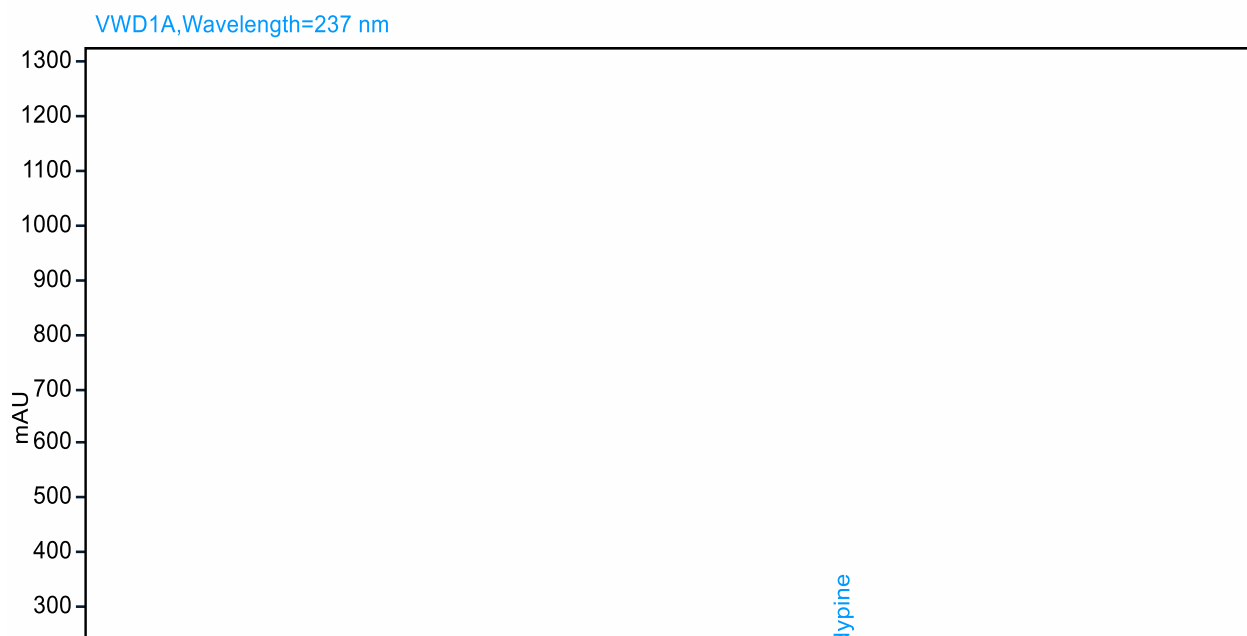


Рисунок 3.1. Хроматограма розчину стандартного зразку ДФУ амлодипіну
Rt=7.223 хв.

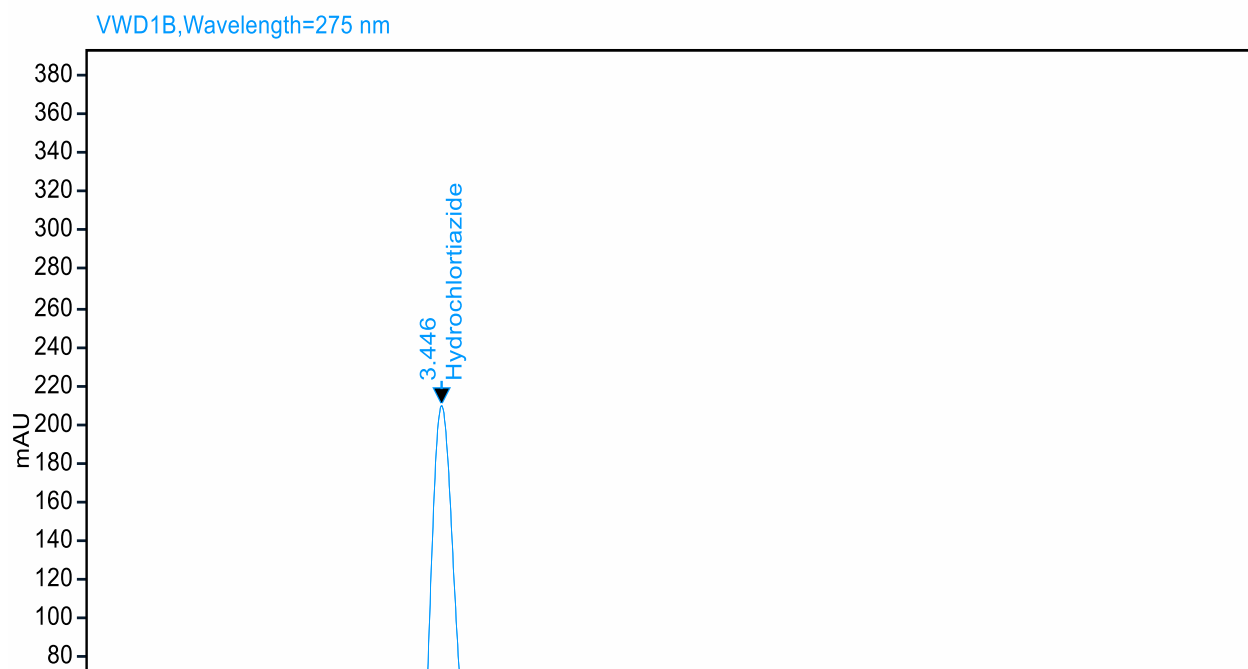


Рисунок 3.2. Хроматограма розчинів стандартних зразків ДФУ гідрохлортіазиду $R_t=3.446$ хв, валсартану $R_t=11.742$ хв.

Хроматограми випробовуваних субстанцій (рис. 3.3, 3.4):

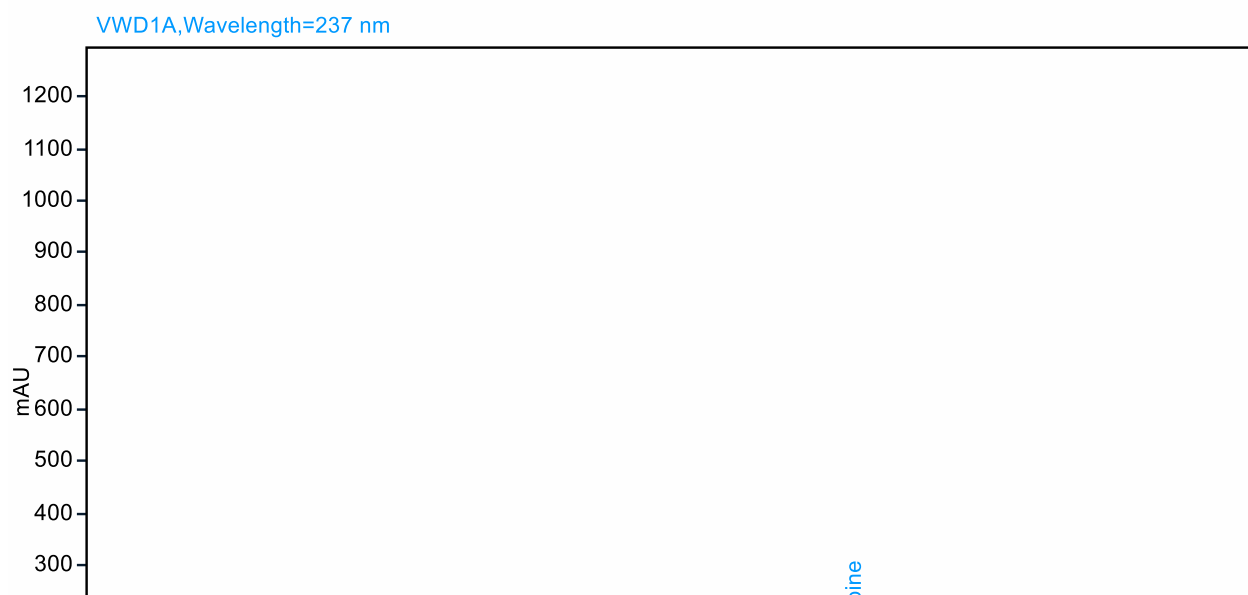


Рисунок 3.3. Хроматограма розчину випробовуваного зразку амлодипіну $R_t=7.322$ хв.

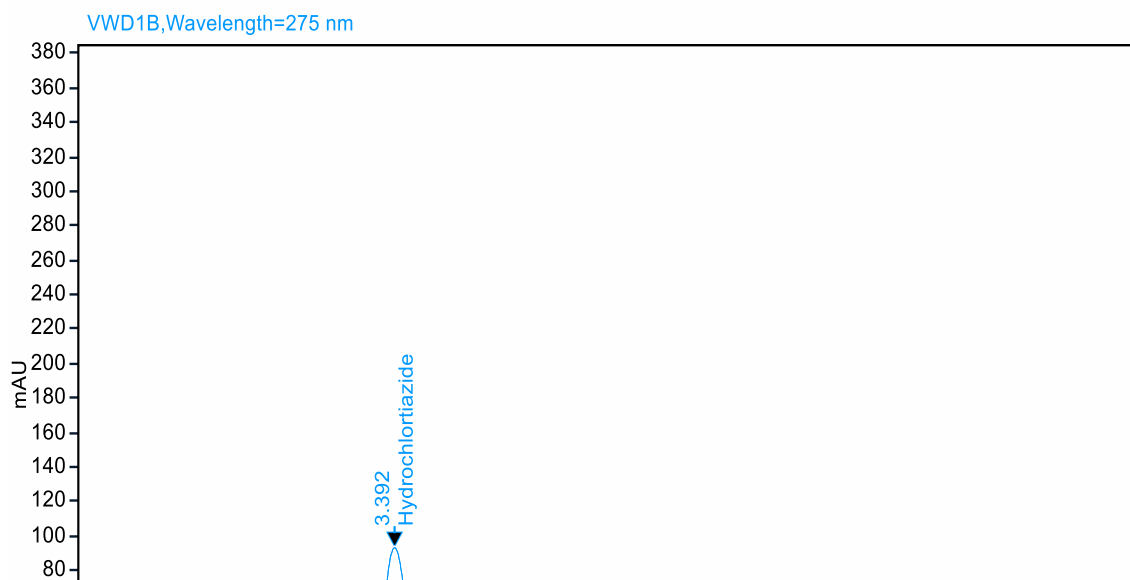


Рисунок 3.4. Хроматограма розчинів випробовуваних зразків гідрохлортіазиду $R_t=3.392$ хв, валсартану $R_t=11.633$ хв.

Отримані результати представлено в таблицях 3.2, 3.3:

	Стандартний розчин											
	Гідрохлортіазид				Амлодипін				Валсартан			
	RT	Area	T	N	RT	Area	T	N	RT	Area	T	N
	3,446	3437,650	1,3	1056	7,223	1017,498	1,4	10086	11,742	4118,870	1,2	26428
	3,444	3440,751	1,3	1060	7,235	1018,025	1,4	10088	11,731	4126,612	1,2	26220
	3,438	3443,128	1,3	1056	7,248	1018,033	1,4	10166	11,723	4124,297	1,2	25940
	3,433	3452,719	1,3	1040	7,256	1021,774	1,4	10091	11,712	4137,943	1,3	25744
	3,430	3460,090	1,3	1034	7,264	1022,658	1,4	10048	11,701	4145,921	1,2	25377
	3,424	3458,812	1,4	1032	7,275	1022,478	1,4	10019	11,695	4145,383	1,3	25235
Середнє	3,436	3448,858	1,3	1047	7,229	1017,762	1,4	10087	11,737	4122,741	1,2	26324
SD	0,008	9,637			0,008	2,464			0,008	11,496		
RSD(≤2.0%)	0,25%	0,28%			0,12%	0,24%			0,07%	0,28%		

	Тест					
	Гідрохлортіазид		Амлодипін		Валсартан	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
	3,392	1739,342	7,322	513,106	11,633	4187,277
	3,391	1740,036	7,333	512,645	11,626	4189,350
	3,385	1731,751	7,340	510,625	11,620	4171,209
	3,385	1739,665	7,346	512,759	11,617	4190,710
	3,379	1739,214	7,356	511,829	11,610	4189,123
	3,378	1737,678	7,364	510,953	11,609	4186,351
Середнє	3,385	1737,948	7,339	512,193	11,621	4185,534

В таблицях:

T - тейлінг (форма піку, часто буває менше 2),

N – кількість теоретичних тарілок (чим більше теоретичних тарілок, тим вища ефективність розділення компонентів у колонці),

RSD - відносне стандартне відхилення, згідно Фармакопеї, має бути менше 2),

SD –стандартне відхилення, використовується для визначення RSD)

Розрахунок вмісту гідрохлортиазиду:

$$C_H(\%) = \frac{A_{test} \times C_{st} \times R}{A_{st} \times C_{test}}$$

де:

- A_{test} – площа піку гідрохлортиазиду на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку гідрохлортиазиду у на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- C_{st} – концентрація стандарту, мкг/мл
- C_{test} – концентрація тесту, мкг/мл
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку гідрохлортиазиду, (98,3)%

$$C_H(\%) = 97,1\%$$

За ДФУ 97-101%

Розрахунок вмісту амлодипіну:

$$C_a(\%) = \frac{A_{test} \times C_{st} \times R}{A_{st} \times C_{test}}$$

де:

- A_{test} – площа піку амлодипіну на хроматограмі випробуваного розчину;

- A_{st} – площа піку амлодипіну на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- C_{st} – концентрація стандарту, мкг/мл
- C_{test} – концентрація тесту, мкг/мл
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку раміприлу, (96,8)%

$$C_a(\%) = 99,3\%$$

За Євр. Фарм. 98-101%

Розрахунок вмісту валсартану:

$$C_v(\%) = \frac{A_{test} \times C_{st} \times R}{A_{st} \times C_{test}}$$

де:

- A_{test} – площа піку валсартану на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку валсартану на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- C_{st} – концентрація стандарту, мкг/мл
- C_{test} – концентрація тесту, мкг/мл
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку раміприлу, (96,8)%

$$C_v(\%) = 99,3\%$$

За Євр. Фарм. 99-101%

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження субстанції містяться три АФІ гідрохлортіазид, амлодипін і валсартан. Не виявлено інших домішок, продуктів хімічної деградації та ізомерів досліджуваних АФІ.

Валсартан (Eur.Ph.) Метод РХ	Валсартан, у складі субстанції Метод ВЕРХ
Валсартан. <i>Рухома фаза:</i> льодяна оцтова кислота R, ацетонітрил R1, вода для хроматографії R (1:500:500 V/V/V). <i>Амлодипін.</i> <i>Розчин А.</i> 2,76 г моногідрату натрію дигідрофосфату R у 850 мл води для хроматографії R, рН до 3,0 фосфорною кислотою R, об'єм води для хроматографії R до 1000 мл. <i>Рухома фаза:</i> 0,8 г моногідрату гексансульфонату натрію R у суміші 80 мл ацетонітрилу R1 та 920 мл розчину А. <i>Гідрохлортіазид.</i> <i>Суміш розчинників:</i> ацетонітрил Р1-метанол Р2-фосфатний буфер, рН 3.2 Р1.	<i>Буферний розчин А</i> – 1,36 г калію дигідрофосфату розчинити у 1000 мл води, додати 1 мл трифтороцтової кислоти та довести рН до 2,5±0,05 за допомогою фосфорної кислоти; <i>Буферний розчин В</i> – ацетонітрил; <i>Суміш розчинників</i> – ацетонітрил та вода Р у співвідношенні 1:1. Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 25 мкг/мл, амлодипіну 10 мкг/мл та валсартану 32 мкг/мл в розчиннику. У якості стандарту використовували фармакопейні стандартні зразки ДФУ гідрохлортіазиду, амлодипіну та валсартану з концентрацією 25 мкг/мл, 10 мкг/мл та 32 мкг/мл відповідно в розчиннику.
Валсартан. Домішки А, В, С. Амлодипін. Домішки А, В, С. Гідрохлортіазид. Домішки А, В, С.	Не виявлено

Детектування УФ: Валсартан при 225 нм, Амлодипін при 210 нм, Гідрохлортіазид при 224 нм	Детектування діодно-матричним детектором детектування – при 237 нм (амлодипін); при 275 нм (гідрохлортіазид та валсартан)
Температура колонки 40°C	Температура колонки 30°C

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено у аналіз трьохкомпонентної суміші субстанцій АФІ - Валсартан, Амлодипін, Гідрохлортіазид метод ВЕРХ та ідентифіковано компоненти у випробовуваних зразках, а розрахований кількісний вміст АФІ відповідає фармакопейним вимогам: валсартан 99.3%, амлодипін 99.3%, гідрохлортіазид 97.1%.
2. В результаті проведених досліджень чистоти трьохкомпонентної суміші субстанцій АФІ - Валсартан, Амлодипін, Гідрохлортіазид встановлено, що у випробовуваних зразках не виявлено супровідних речовин, продуктів хімічної деградації та ізомерів субстанцій.
3. Адаптовано методики дослідження та умови хроматографування методом ВЕРХ трьохкомпонентної суміші субстанцій, які дозволяють захистити структуру молекули від хімічної деградації, а саме, запропоновано: *буферний розчин А* – 1,36 г калію дигідрофосфату у 1000 мл води, 1 мл трифтороцтової кислоти (рН до $2,5 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти); *буферний розчин В* – ацетонітрил; *Суміш розчинників* – ацетонітрил-вода Р (1:1). Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 25 мкг/мл, амлодипіну 10 мкг/мл та валсартану 32 мкг/мл в розчиннику. У якості стандарту використовували фармакопейні стандартні зразки ДФУ гідрохлортіазиду, амлодипіну та валсартану з концентрацією 25 мкг/мл, 10 мкг/мл та 32 мкг/мл відповідно в розчиннику. Детектування діодно-матричним детектором – при 237 нм (амлодипін); при 275 нм (гідрохлортіазид та валсартан).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Several drugs containing valsartan being recalled due to contamination with a potential carcinogen (Health Canada, Ottawa) modified July 10. Available: <https://www.healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2018/67202a-eng.php>. accessed 2021 June 18.
2. Expansion of recall of valsartan drugs to include additional lots, as a precaution (Health Canada, Ottawa) modified 2018 Dec 18. Available: https://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2018/67552a-eng.php?_ga=2.186111849.1130786600.1536540324-1989020253.1520525748. accessed 2021 June 18.
3. Farrukh MJ, Tariq MH, Malik O, et al. (2019) Valsartan recall: global regulatory overview and future challenges. *Ther Adv Drug Saf* **10**:2042098618823458.
4. Drug shortages homepage (Health Canada, Ottawa) Available: <https://www.drugshortagescanada.ca/>. accessed 2021 June 18.
5. Gillette M, Taylor A, Butulija D, et al. (2020) Reflections of the angiotensin receptor blocker recall by the FDA and repercussions on healthcare. *Cardiovasc Drugs Ther* **34**:579–84.
6. Byrd JB, Chertow GM, Bhalla V. (2019) Hypertension hot potato: anatomy of the angiotensin-receptor blocker recalls. *N Engl J Med* **380**:1589–91.
7. Schwartz KL, Chen C, Langford BJ, et al. (2019) Validating a popular outpatient antibiotic database to reliably identify high prescribing physicians for patients 65 years of age and older. *PLoS One* **14**:e0223097.
8. Tran Q., Warren JL, Barrett MJ, et al. (2020) An evaluation of the utility of big data to supplement cancer treatment information: linkage between IQVIA pharmacy database and the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2020**:72–81.

9. Black CD, McCarthy L, Gomes T, et al. (2018) Interprovincial variation of psychotropic prescriptions dispensed to older Canadian adults. *Can Geriatr J* **21**:269–73.
10. Xu Y, Gomes T, Mamdani MM, et al. (2019) Analysis of trends in insulin utilization and spending across Canada from 2010 to 2015. *Can J Diabetes* **43**:179–85e1.
11. Yılmaz I. (2019) Angiotensin-converting enzyme inhibitors induce cough. *Turk Thorac J* **20**:36–42.
12. Elbeddini A, Hooda N, Yang L (2020) Role of Canadian pharmacists in managing drug shortage concerns amid the COVID-19 pandemic. *Can Pharm J (Ott)* **153**:198–203.
13. Nural, Y.; Ozdemir, S.; Yalcin, M. S.; Demir, B.; Atabey, H.; Seferoglu, Z.; Ece, A. New Bis- and Tetrakis-1,2,3-Triazole Derivatives: Synthesis, DNA Cleavage, Molecular Docking, Antimicrobial, Antioxidant Activity and Acid Dissociation Constants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2022, 55, 128453. DOI: 10.1016/J.BMCL.2021.128453.
14. Abushaheen M.A., Muzahed, Fatani A.J., Alosaimi M., Mansy W., George M., Acharya S., Rathod S., Divakar D.D., Jhugroo C., et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis. Mon.* 2020;66:100971. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100971.
15. Jering KS, Claggett B, Pfeffer MA, Granger C, Køber L, Lewis EF, et al. Prospective ARNI vs. ACE inhibitor trial to determine superiority in reducing heart failure events after myocardial infarction (PARADISE-MI): Design and baseline characteristics. *Eur J Heart Fail.* (2021) 23:1040–8. doi: 10.1002/ejhf.2191.
16. Watkins R.R., Holubar M., David M.Z. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019;63:e01216–e01219. doi: 10.1128/AAC.01216-19.
17. Szulczyk D., Bielenica A., Głogowska A., Augustynowicz-Kopeć E., Dobrowolski M., Roszkowski P., Stępień K., Chrzanowska A., Struga M. Development of (4-Methoxyphenyl)-1H-Tetrazol-5-Amine Regioisomers as a New Class of Selective

- Antitubercular Agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2020;186:111882. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111882.
18. Szulczyk D., Bielenica A., Roszkowski P., Dobrowolski M.A., Olejarsz W., Napiórkowska M., Struga M. Cytotoxicity Evaluation of Novel Bis(2-aminoethyl)amine Derivatives. *Molecules*. 2020;25:2816. doi: 10.3390/molecules25122816.
19. Wang H, Fu X. Effects of sacubitril/valsartan on ventricular remodeling in patients with left ventricular systolic dysfunction following acute anterior wall myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* (2021) 32:418–26. doi: 10.1097/MCA.0000000000000932.
20. Szulczyk D., Bielenica A., Roszkowski P., Dobrowolski M.A., Olejarsz W., Kmiecik S., Podsiad M., Struga M. Synthetic Transition from Thiourea-Based Compounds to Tetrazole Derivatives: Structure and Biological Evaluation of Synthesized New N-(Furan-2-ylmethyl)-1H-tetrazol-5-amine Derivatives. *Molecules*. 2021;26:323. doi: 10.3390/molecules26020323.
21. Duan X, Wang S, Yan Y, Li N. Clinical effect of sakobactril valsartan sodium in the treatment of heart failure with reduced ejection fraction after acute myocardial infarction. *Chin Med.* (2020) 15:1827–30.
22. Lamichhane P, Tariq A, Akhtar AN, Raza M, Lamsal AB, Agrawal A. Risk of Parkinson's disease among users of alpha-adrenergic receptor antagonists: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med Surg (Lond)*. 2024; 86(6):3409–15. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000002117> PMID: 38846867.
23. Ma S, Yan B, Liu S, Du F, Su G. Clinical effect and safety of sacubitril and valsartan in the treatment of patients with acute myocardial infarction and heart failure. *J Pract Cardiovasc Cerebrovasc Dis.* (2021) 29:89–90.
24. 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. 155-157.
25. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.II: 1939-1940. V.III: 4351-4352.

SUMMARY

Bulavin Liliia **IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE, AMLODIPINE AND VALSARTAN IN THE DRUG SUBSTANCE BY HPLC**

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: PhD (Biol.) Meleshko R.A.

Keywords: hydrochlorothiazide, amlodipine, valsartan, substance, medicinal product, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. In terms of chemical classification, valsartan is a synthetic organic compound with the chemical name N-(1-Oxopentyl)-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-l-valine. It contains a biphenyl group, tetrazole, monocarboxylic amide and carboxylic acid in its structure. Its chemical structure determines its belonging to the class of biphenyltetrazoles. The State Pharmacopoeia of Ukraine does not regulate the analysis of the substances valsartan and amlodipine. However, the State Pharmacopoeia of Ukraine regulates the analysis of the purity of the substance hydrochlorothiazide by LC with UV detection. The substances Amlodipine (in the form of hydrochloride dihydrate) and Valsartan can be analyzed according to the monographs of the European Pharmacopoeia.

Materials and methods. Objects of research are substance of hydrochlorothiazide, amlodipine, valsartan and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of hydrochlorothiazide, amlodipine, valsartan substances. Methods: HPLC & UV-spectrum (Agilent 1200 with a diode-matrix detector, column – Hypersil BDS-C18, 125×4.0×5 mm (or similar); flow – 0.63 ml/min; detection – UV at 237 nm (amlodipine); UV at 275 nm (hydrochlorothiazide and valsartan); OpenLab CDS program.

Results. The HPLC method was introduced into the analysis of a three-component mixture of API substances - Valsartan, Amlodipine, Hydrochlorothiazide and the components were identified in the test samples, and the calculated quantitative content of the API meets the pharmacopoeial requirements: valsartan 99.3%, amlodipine 99.3%, hydrochlorothiazide 97.1%. As a result of the conducted studies of the purity of the three-component mixture of API substances - Valsartan, Amlodipine, Hydrochlorothiazide, it was established that no accompanying substances, chemical degradation products and isomers of substances were detected in the tested samples.

Conclusions. Research methods and conditions for HPLC chromatography of a three-component mixture of substances have been adapted, which allow protecting the molecular structure from chemical degradation,

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор



Юрій КУЧИН

В. а. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор

Уляна КАРПЮК



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор



Юрій КУЧИН

В. а. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор

Уляна КАРПЮК