

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 за УФ-спектром та кількісне визначення гідрохлортіазиду і раміприлу у складі субстанції лікарського засобу методом ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 6 курсу, групи 1082А
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)

Зубенко Влада Вячеславівна

(прізвище та ініціали)

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

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: **к.б.н. Мелешко Р.А.**

(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 ПІРОЛУ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови	9
1.2. Біологічна активність	16
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ.....	19
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	19
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	24
 ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

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

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. Раміприл або (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-{{(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl}amino}propanoyl]-octahydrocyclopenta[b]pyrrole-2-carboxylic acid використовується для лікування гіпертензії, серцевої недостатності, для лікування захворювань нирок (нефропатії). Лікарський засіб призначається для профілактики інфаркту міокарда, інсульту, ішемії, при застійній серцевій недостатності у складі комбінованої терапії. Показаннями для застосування препарату є, також, початкова діабетична та недіабетична нефропатія, виражена діабетична та недіабетична нефропатія з протеїнурією.

Раміприл разом із гідрохлортіазидом входять до складу комбінованих препаратів інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ). Наприклад, лікарський засіб Рамазід Н містить АФІ Раміприл та Гідрохлортіазид. Препарат має антигіпертензивну і сечогінну властивість. Антигіпертензивні ефекти обох сполук є взаємодоповнювальними, оскільки ефекти зі зниження артеріального тиску при сумісному застосуванні, сильніші, ніж у кожного компонента при монотерапії. Застосування раміприлу спричиняє виражене зниження периферичного опору артерій. Раптова відміна раміприлу не спричиняє швидкого зворотного підвищення артеріального тиску [1-9].

Хімічна структура раміприлу – це складна біциклічна кільцева система піролу з бічними ланцюгами. Повна хімічна назва —(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-{{(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл}аміно}пропаноїл]-октагідроциклопента[b]пірол-2-карбонова кислота. Основна структура-скаффолд молекули - це кільце піролу конденсоване з іншими циклісними фрагментами.

До побічних ефектів препарату відносять:

- сухий кашель, виникає, коли раміприл пригнічує розпад брадикініну, субстрату АПФ, у тканинах легень,
- постуральна гіпотензія: може спостерігатися постуральна гіпотензія, яка збільшує ризик падінь, травм голови та переломів кісток, запаморочення та легке запаморочення,
- підвищений рівень креатиніну в сироватці крові,
- гіперкаліємія,
- симптоми, подібні до тривоги,
- ангіоедем тощо.

Хімічна структура гідрохлортіазиду – 6-хлор-1,1-діоксо-3,4-дигідро-2Н-1,2,4-бензотіадіазин-7-сульфонамід. Це синтетичний препарат та належить до групи тіазидних діуретиків. Він є похідним бензотіазидину з сульфонамідною групою у складі. Гідрохлортіазид застосовується для лікування артеріальної гіпертензії в монотерапії та у комбінації з іншими лікарськими засобами – інгібіторами АПФ та інгібіторами рецепторів ангіотензину-II, Гідрохлортіазид застосовується для лікування набрякового синдрому, нецукрового діабету [10-15].

Під час синтезу субстанцій завжди можливе утворення побічних продуктів синтезу. Під час очистки кожної субстанції часто залишаються специфічні і неспецифічні домішки. Домішки негативно впливає на якість лікарських засобів.

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанцій Раміприлу. За ДФУ можна проаналізувати субстанцію Гідрохлортіазиду. Раміприл та Гідрохлортіазид можна проаналізувати за монографіями Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [27, 28].

Таким чином, використовуючи валідовані методики дослідження окремих субстанцій Раміприл та Гідрохлортіазид, які виконуються методом РХ, в Європейській Фармакопеї, постає завдання осучаснити їх методи аналізу, адаптувати хроматографічні умови та методики дослідження більш ефективним методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в умовах аналізу двохкомпонентної суміші цих субстанцій. Це дозволить розширити коло інструментальних методів дослідження субстанції та запропонувати нові методики дослідження.

Під час розробки та адаптування умов хроматографування субстанцій важливі відтворювані умови дослідження, оскільки під час проведення хроматографічних досліджень можлива хімічна деградація молекул, яка може привести до збільшення кількості домішок та продуктів розпаду.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ВЕРХ у комбінації із методом УФ-спектрофотометрії для ідентифікації та кількісного визначення, визначення їх чистоти АФІ, субстанцій Раміприл та Гідрохлортіазид у складі двохкомпонентної суміші субстанцій.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація, визначення чистоти та кількісного вмісту методами ВЕРХ-УФ двохкомпонентної суміші субстанцій АФІ Раміприл та Гідрохлортіазид, адаптація умов хроматографування випробовуваної суміші.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати та визначити кількісний вміст методами ВЕРХ-УФ АФІ Раміприл та Гідрохлортіазид у складі двохкомпонентної суміші субстанцій;
- визначити чистоту досліджуваної двохкомпонентної суміші субстанцій Раміприл та Гідрохлортіазид хроматографічним методом (ВЕРХ) та

- методом УФ-спектрофотометрії (присутність супровідних речовин);
- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекул речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1200 з УФ детектором, колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (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 для ідентифікації, визначення чистоти та кількісного вмісту двохкомпонентної суміші субстанцій АФІ Раміприл та Гідрохлортіазид, адаптація умов хроматографування випробовуваної суміші.

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 – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ

1.1. Особливості хімічної будови

Молекула раміприлу – це складна біциклічна кільцева система піролу з бічними ланцюгами. Повна хімічна назва —(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-{[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно}пропаноїл]-октагідроциклопента[b]пірол-2-карбонова кислота [17-22] (рис. 1.1.1).

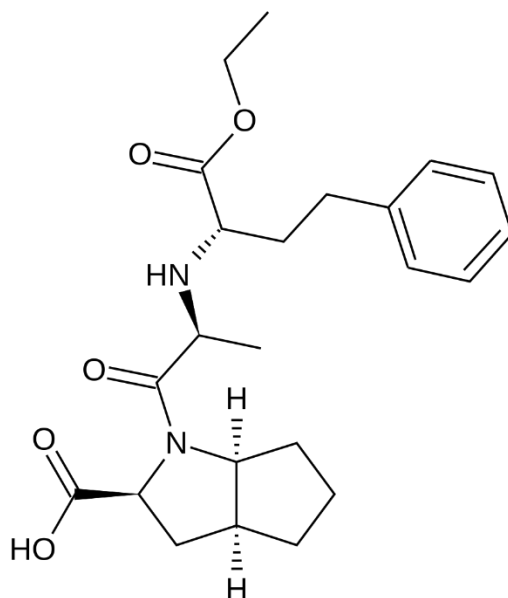


Рисунок 1.1.1. Раміприл, хімічна формула.

Молекула гідрохлортіазиду має хімічну назву – 6-хлор-1,1-діоксо-3,4-дигідро-2Н-1,2,4-бензотіадіазин-7-сульфонамід (рис. 1.1.2).

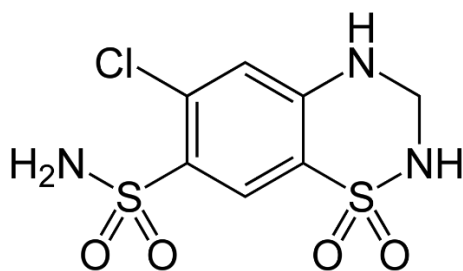


Рисунок 1.1.2. Гідрохлортіазид, хімічна формула.

Інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту - раміприл широко використовуються пацієнтами. Ретроспективні клінічні спостереження свідчать про те, що впливає на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему. Однак існує кілька досліджень на тваринах, що вивчають вплив лікування інгібіторами АПФ перед експериментально індукованим сепсисом. При цьому використовуються випадки сепсису, індукованого LiPS.

Описано проблеми з моделями на основі ліпополісахаридів (ЛПС). Вони можуть не відображати ситуацію у людей. Важливо дослідити як попереднє лікування мишей раміприлом може впливати на структуру та функцію нирок у використовуваній моделі сепсису у мишей.

Фіктивна операція та хірургічне втручання CLP. Використовували самців мишей дикого типу C57BL/6 J), віком 12–16 тижнів, вагою 20–25 г. Вони отримували стандартний корм для гризунів та мали вільний доступ до водопровідної води. Тварин утримували з регулярними циклами світло/темрява. Миші отримували 10 мг/кг маси тіла раміприлу або плацебо (фізіологічний розчин) шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції. Це відбувалося перед фіктивною операцією (SOP) або хірургічним втручанням CLP.

Використовували самців відповідного віку, яких рандомізували на експериментальні групи наступним чином: (a) група SOP; (b) миші, оброблені CLP (група CLP); (c) група раміприлу + SOP, (d) група раміприлу + CLP. Тварин анестезували та виконували серединну лапаротомію з подальшим

лігуванням сліпої кишки. Щоб викликати забруднення крові бактеріями, дві краплі видаляли з рани в черевній порожнині. Мишей SOP анестезували та виконували серединну лапаротомію. Інфузійну реанімацію проводили кожні 6 годин до кінця експериментальної процедури шляхом внутрішньочеревного введення 0,9% NaCl.

Клінічний стан тварин оцінювали за допомогою шкали клінічної тяжкості (ШКТ). Шкала використовує параметри спонтанної активності та реакції на екзогенні подразники. Після операції SOP або CLP мишей глибоко анестезували ізофлураном та умиротворяли. Для аналізу параметрів плазми крові збирали зразки крові. Ізольовані зразки плазми зберігали замороженими при температурі -80°C до дослідження.

Аналіз структури та функції нирок. Для оцінки пошкодження нирок проведено забарвлення періодичною кислотою-Шиффом (PAS) на парафінових зрізах нирок з використанням набору для забарвлення PAS. Пошкодження каналців оцінювали за системою оцінювання. Нульовий бал означав відсутність пошкодження, а п'ять відповідали пошкодженню каналців понад 90%.

Рівні креатиніну плазми та азоту сечовини крові (BUN) аналізували на клінічному хімічному аналізаторі за допомогою колориметричних чіп-тестів. Визначення концентрації ліпокаліну у плазмі проводили за допомогою NGAL-специфічного імуноферментного аналізу. Концентрації NGAL представлені в мкг/мл.

Імуногістологія. Для імуногістологічного аналізу використовували парафінові зрізи нирок з термоопосередкованим отриманням антигену з подальшою інактивацією ендогенної пероксидазної активності за допомогою 3% H_2O_2 . Зрізи блокували 5% BSA при кімнатній температурі та додавали первинні антитіла на ніч при 4°C . Використані первинні антитіла: антитіло

проти CD3 (розведення 1:100), виявлення активованої каспази-3 проводили за допомогою антитіла проти розщепленої каспази-3.

Антитіло проти HIF2 α отримано від R&D Systems та використано у розведенні 1:200. Вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому або кон'юговані з лужною фосфатазою придбані у KPL (США).

Ядра контрафарбували гематоксином. Мікроскопічний аналіз проводили на мікроскопі AxioPlan з програмним забезпеченням AxioVision Rel. Досліджували шість тварин у кожній експериментальній групі. Стандартно зроблено п'ять зображень, що не перекриваються. Для забарвлення розщепленої каспази-3 підраховували та графічно представляли кількість позитивних каналців на поле в області кори.

Статистичний аналіз. Результати оцінені за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу Краскела-Уолліса, за допомогою рангового сумарного тесту Манна-Вітні для аналізу відмінностей. Визначені двосторонні значення p t -критерію.

Процедури попарного множинного порівняння виконані методом Данна або Холма-Сідака. Дані графічно представлені у вигляді коробкової діаграми. Значення балу клінічної тяжкості представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього (SEM).

Вплив раміприлу на експресію мРНК реніну в нирках. Для перевірки отримання твариною раміприлу у дозі для пригнічення РААС використали дослідження ПЛР для визначення експресії реніну в цілих лізатах нирок. Попередня обробка раміприлом індукувала транскрипти реніну у мишей SOP і у мишей CLP.

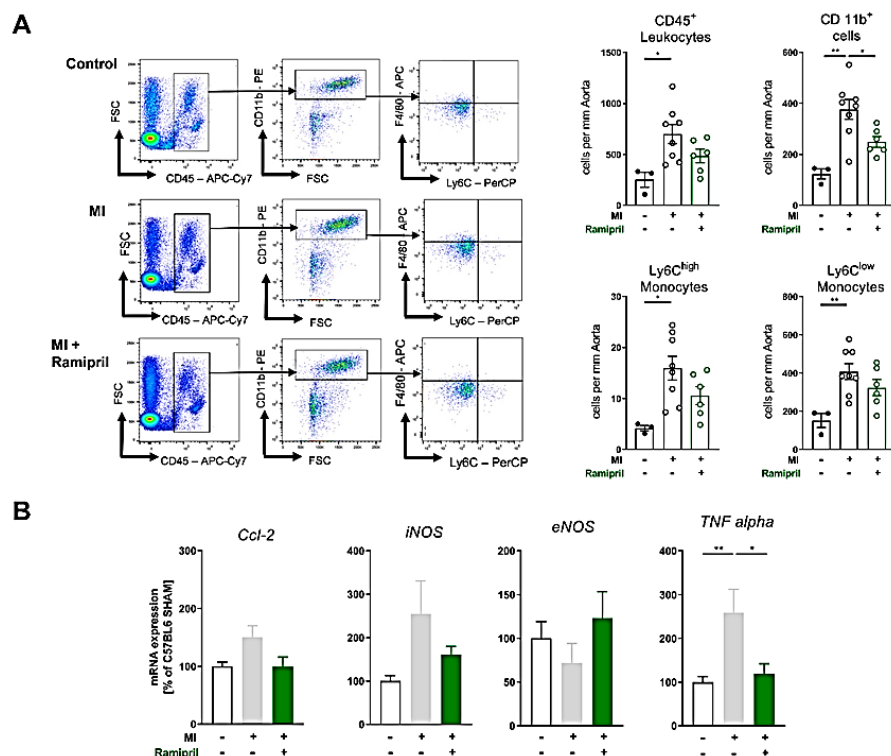
У групі SOP спостерігалася незначна числова та статистично незначна різниця в експресії мРНК реніну між SOP та CLP.

Інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) призначають пацієнтам з діабетом як нефропротекторний препарат, для лікування гіпертензії. Вони безпечні для клінічної практики, але зв'язок між препаратами та ангіоневротичним набряком відомий. Точний механізм ангіоневротичного набряку як наслідку впливу інгібіторів АПФ є предметом обговорення. Клінічний випадок: випадок з 11-річною історією діабету 1 типу, пацієнт регулярно перебувала під наглядом у відділенні діабету та використовувала 0,98 ОД/кг/день людського інсуліну. У пацієнта виникла алергічна реакція через 24 години після застосування раміприлу. Препарат був призначений для лікування діабетичної нефропатії. В анамнезі не було алергії.

Пацієнт припинив прийом раміприлу та призначено пероральний антигістамінний препарат і місцевий кортикостероїд. Проведено біопсію шкіри, яка підтвердила клінічну гіпотезу фармакодермії. Оцінка поліморфізму АПФ вказала на генотип DD. Після відміни раміприлу пацієнту призначено блокатор рецепторів ангіотензину II (БРА) лозартан як нефропротектор. Не спостерігалось побічних реакцій. Ангіодентний набряк, викликаний інгібіторами АПФ, є рідкісним явищем. Клінічна картина варіабельна з найчастіше ураженням губ, язика, ротоглотки та гортані. Наявність ангіоневротичного набряку вимагає негайного припинення лікування через ризик тяжких ускладнень. У випадку спостерігалися помірні симптоми з розвитком раннього набряку. Генотип ACE DD був пов'язаний з ангіоневротичним набряком, який викликаний інгібіторами АПФ. У пацієнтів з ангіоневротичним набряком, пов'язаним з інгібіторами АПФ, блокатори рецепторів ангіотензину II застосовують дуже обережно. У описаному випадку призначення лозартану як нефропротектора не призвело до жодних рецидивуючих побічних ефектів. Інгібітор АПФ знижує смертність, захворюваність із серцевою недостатністю після гострого інфаркту міокарда (ГІМ). Рандомізовані дані про довгострокові переваги інгібітора АПФ для виживання обмежені. В дослідженні ефективності раміприлу при гострому

інфаркти (AIRE) пацієнти з ГІМ та клінічною серцевою недостатністю були розподілені на групи, що приймали раміприл або плацебо. Тривалість маскованого дослідження становила 12,4 та 13,4 місяця для раміприлу (n=302) та плацебо (n=301) відповідно. Оцінена тривалість життя, його продовження залежно від тривалості спостереження (діапазон 0–29,6 років).

Результати. Смерть від усіх причин сталася у 88,4% пацієнтів у групі плацебо та 91,1% пацієнтів у групі раміприлу. Подовження життя між групами раміприлу та плацебо становило 14,5 місяців. Раміприл більше збільшував тривалість життя у пацієнтів з діабетом, з перенесеним гострим інфарктом міокарда в анамнезі (20,1 проти 4,9 місяців), серцевою недостатністю в анамнезі (19,5 проти 4,9 місяців). Враховуючи потенційну зміну лікування, справжній абсолютний ефект лікування може бути недооцінений на 28%. Для пацієнтів з серцевою недостатністю після гострого інфаркту міокарда раміприл призводить до стійкого покращення виживання та пов'язаний з продовженням життя [22-26] (рис. 1.1.3).



Рисунк 1.1.3. Раміприл обмежує запалення судин при хронічній ішемічній серцевій недостатності, зменшуючи інфільтрацію мієлоїдних клітин. (A) Кількісне визначення тканини аорти за допомогою проточної цитометрії після інфаркту міокарда (IM) порівняно з контрольною групою; репрезентативні графіки FACS, кількісне визначення лейкоцитів ($CD45^+$), мієлоїдних клітин ($CD45^+CD11b^+$) та моноцитів ($CD45^+CD11b^+Ly6G-Ly6Ch^{high/low}$).

При ішемічній серцевій недостатності раннє лікування інгібіторами АПФ покращує функцію судинного ендотелію (рис.1.1.4)

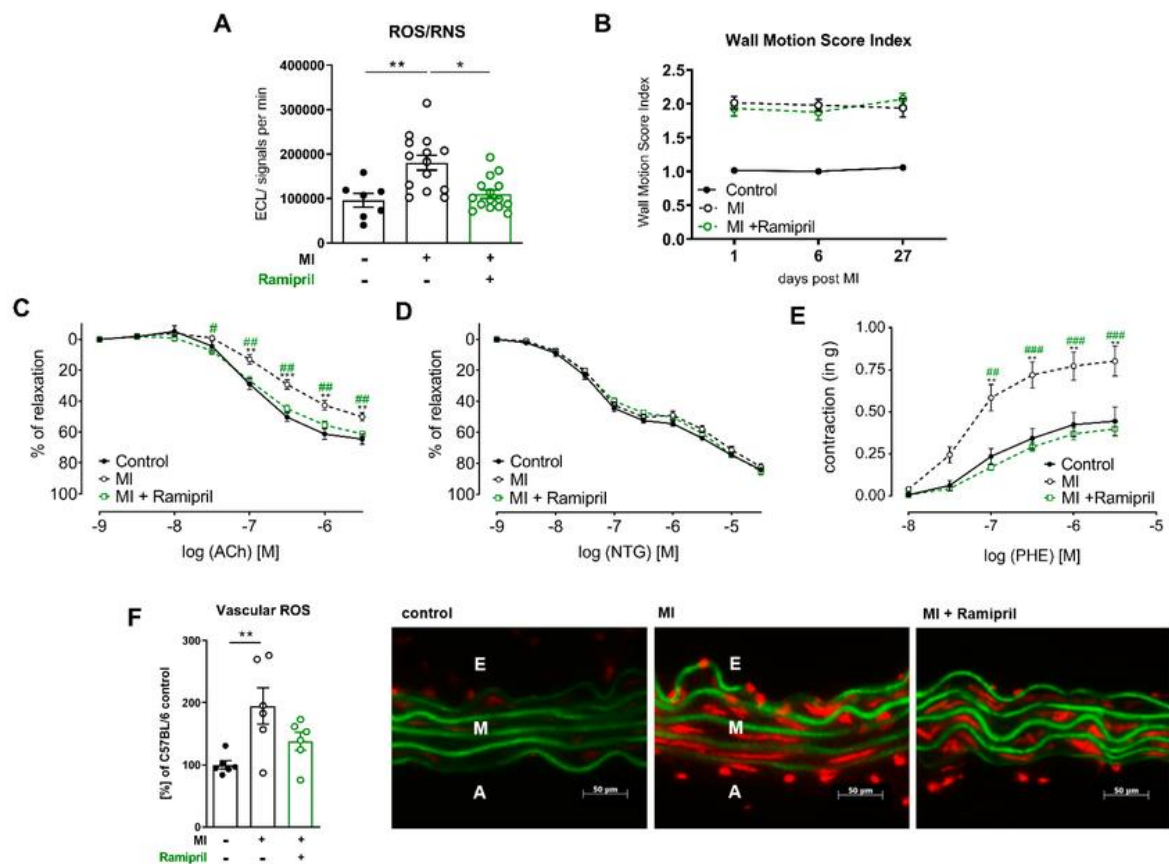


Рисунок 1.1.4. Утворення супероксиду в цільній крові, виміряне за допомогою посиленої хемілюмінесценції після стимуляції PDBu після інфаркту міокарда, $n = 7-15$ мишей на групу; Високочастотна ультразвукова ехокардіографія з вимірюванням індексу руху стінки (WMSI) після інфаркту міокарда.

1.2. Біологічна активність

У рандомізованому, подвійному сліпому, плацебо-контрольованому дослідженні пацієнти були розподілені на групи лікування раміприлом 2,5 мг один раз на день (n=68) або плацебо (n=67). Первинними результатами були концентрації асиметричного диметиларгініну в сироватці крові, маркера ендотеліальної дисфункції, hs-CRP, маркера запалення.

Вторинними результатами були зміни рівня IL-6 (інтерлейкін-6), TNF- α (фактор некрозу пухлини-альфа), систолічного та діастолічного артеріального тиску. Серед параметрів безпеки - зміни рівня калію та частота гіперкаліємії.

Раміприл значно знизив рівень асиметричного диметиларгініну в сироватці крові, hs-CRP (-46,5%; $P < 0,001$), IL-6 (-27,1%; $P < 0,001$) та TNF- α (-51,7%; $P < 0,001$). Систолічний та діастолічний артеріальний тиск були значно знижені в обох групах. Зниження було більшим у пацієнтів, які отримували раміприл (медіанна різниця між групами -12,0. Зміни асиметричного диметиларгініну, hs-CRP, IL-6 або TNF- α в групі раміприлу не корелювали зі зниженням артеріального тиску.

Розрахунок розміру вибірки проведено для прогнозованих змін рівнів ADMA. Припущено, що раміприл призведе до зниження рівня ADMA на 0,39 мкмоль/л після терапії з відповідним стандартним відхиленням 0,24. Для отримання статистичної потужності 90% з похибкою 1 типу 0,05 потрібен був розмір вибірки з 9 пацієнтів на групу.

Використовували оцінку ко-первинного результату запального маркера TNF- α . Для виявлення 30% зміни рівнів TNF- α в кожній групі було потрібно 47 пацієнтів зі статистичною потужністю 80%. Припускаючи рівень вибуття 40%, у дослідження включено загалом 135 пацієнтів.

Статистичний аналіз. Аналіз кінцевих точок ефективності та безпеки

проведено на популяції пацієнтів, які мали намір брати участь у дослідженні. (Intention-to-Treat). 180 пацієнтів з 2 центрів-учасників оцінено на предмет відповідності критеріям.

Виключено 45 пацієнтів. 135 пацієнтів були розподілені на групи з раміприлом (n=68) або плацебо (n=67) та включені до аналізу з наміром брати участь у дослідженні (рис.1.2.1).

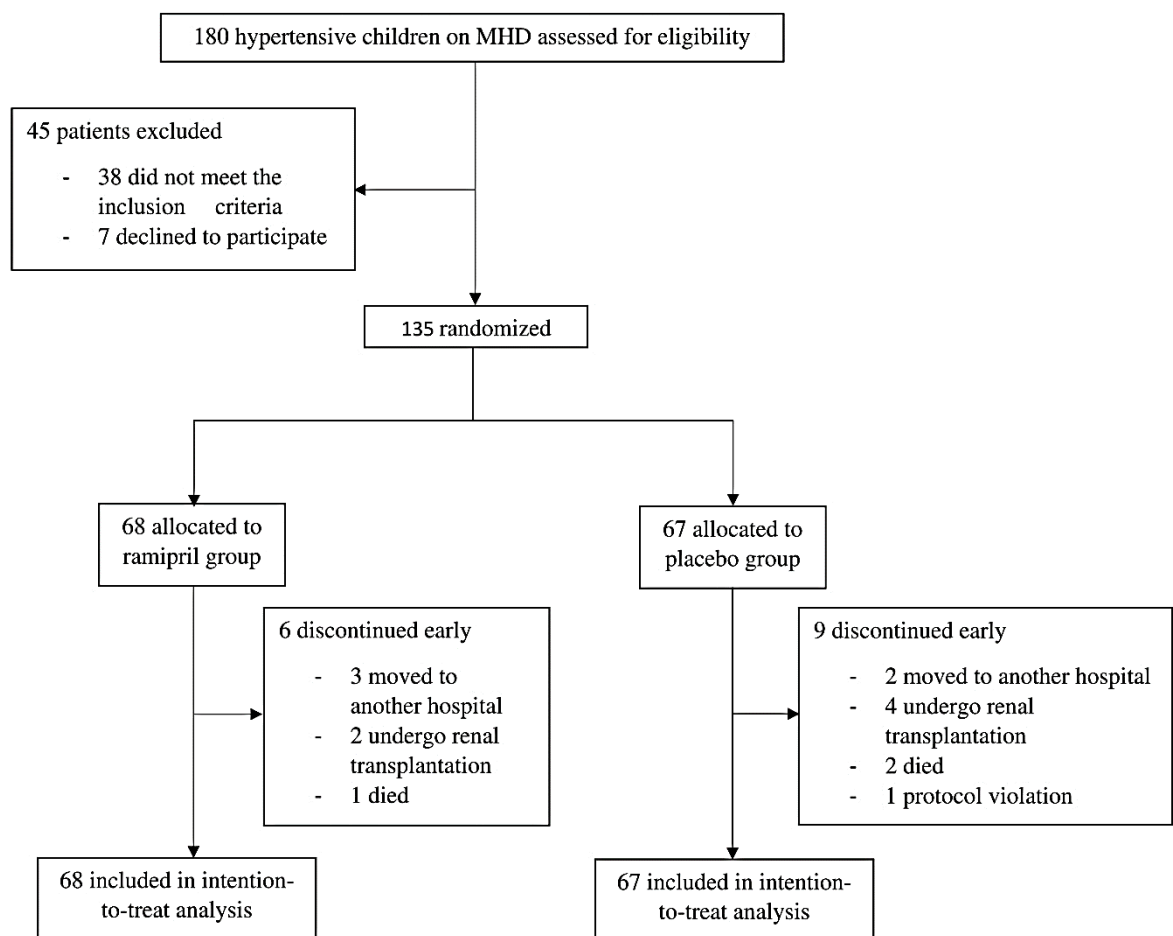


Рисунок 1.2.1. Профіль дослідження популяції пацієнтів, які планують лікувати.

2 групи були порівнянні на початку дослідження. Демографічні дані пацієнтів не показали суттєвої різниці щодо віку, статі, індексу маси тіла,

клінічних характеристик. Гіпоплазія/дисплазія нирок була найчастішою причиною ниркової недостатності в обох групах (23,5% у групі раміприлу, 20,9% у групі плацебо). Приблизно третина пацієнтів отримували інгібітор АПФ або блокатор рецепторів ангіотензину.

Після рандомізації 10 пацієнтів у групі раміприлу та 13 пацієнтів у групі плацебо використовували інші антигіпертензивні препарати - бета-блокатори ($n=7/n=9$), блокатори кальцієвих каналів ($n=5/n=8$), тіазидні та петльові діуретики ($n=5/n=4$).

Середня кількість антигіпертензивних препаратів, що використовувалися на початку дослідження, становила $0,3 \pm 0,7$. Зі 135 рандомізованих пацієнтів 15 пацієнтів не завершили дослідження. 6 пацієнтів у групі раміприлу та 9 пацієнтів у групі плацебо.

Виявлено, що раміприл є ефективною, добре переносимою та безпечною терапією з гіпертензією, які отримують МГД. Лікування раміприлом у дозі 2,5 мг один раз на день покращило біомаркери ендотеліальної дисфункції та запалення. Лікування покращило контроль артеріального тиску у вразливій групі населення.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Раміприл – це інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ). Враховуючи структуру раміприлу, синтетична проблема полягає в отриманні хіральної конденсованої пролінової субодиниці. Описано шлях синтезу для отримання цієї субодиниці із 10 кроків. Він включав розділення за допомогою стехіометричного хірального реагенту, що призводило до низької ефективності та утворення великої кількості відходів.

Для підвищення ефективності синтезу розроблено метод, який використовує асиметричне гідрування легкодоступного енамиду.

Завдяки каталітичній системі Rh/DuanPhos (S/C = 80 000) реакція гідрування протікала легко, забезпечує отримання хірального аміноестеру у повній конверсії з >99%.

Після гідролізу HCl, подальшого гідрування над Pd/C, хіральна конденсована пролінова субодиниця раміприлу була доступна за допомогою цієї послідовності. Хімічний процес є найекономічнішим способом виробництва активної фармацевтичної компоненти раміприлу. Наразі Chiral Quest виробляє 10 тонн проміжного продукту раміприлу на рік, використовуючи цей хімічний процес (рис.2.1.1 2.1.2).

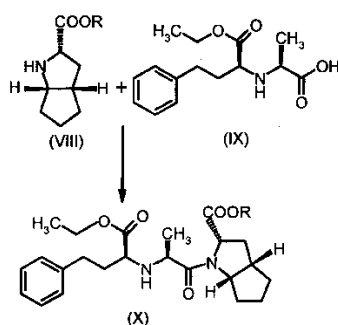


Рисунок 2.1.1. Синтез Раміприлу.

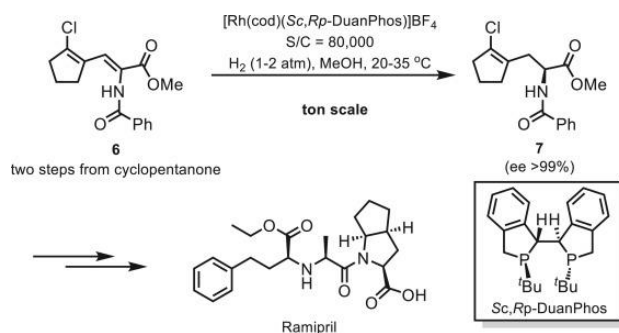


Рисунок 2.1.2. Синтез Раміприлу.

Описано спосіб отримання раміприлу, який включає реакцію солей (S,S,S)-азабіцикло[3.3.0]-октан-3-карбоксилату з N-[1-(S)-етоксикарбоніл)-3-фенілпропіл]-L-аланіном у присутності дициклогексилкарбодіміду (DCC), 1-гідроксибензотриазолу (НОВТ) у відповідному розчиннику (рис. 2.1.3).

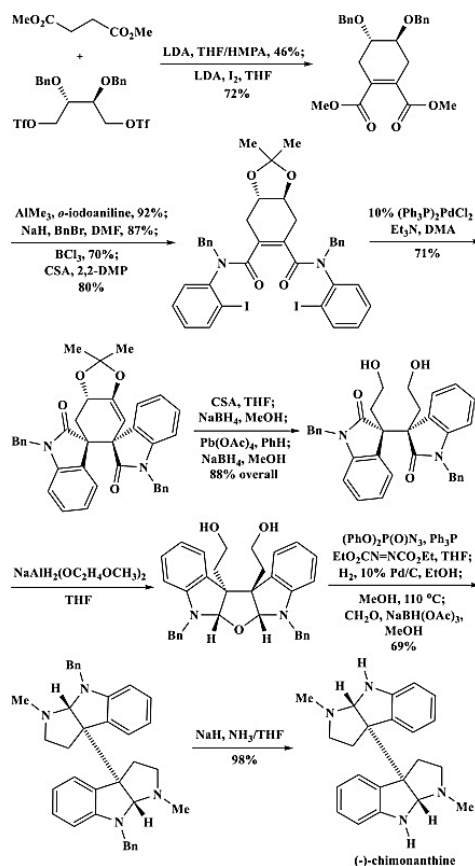
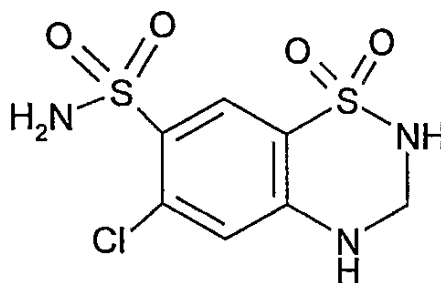


Рисунок 2.1.3. Синтез Раміприлу.

Серед різних сечогінних засобів для лікування гіпертонії тіазидний клас сечогінних препаратів є найчастіше вживаною діуретичною речовиною. Він діє, пригнічуючи здатність нирок утримувати воду, впливає на нирки, зменшуючи реабсорбцію натрію (Na) у дистальних звивистих каналцях.

Це знижує осмотичний тиск у нирках і призводить до меншої реабсорбції води збірними протоками. Гідрохлортіазід використовується в комбінації з більшістю антигіпертензивних препаратів - лозартан калію, телмісартан, епросартан мезилат, фозиноприл натрію, беназеприлу гідрохлорид, бісопрололу фумарат, каптоприл, лізиноприл.



Описано низку методів синтезу гідрохлортіазиду. Всі ці методи загалом мають проблему низької чистоти.

Патент США № 3164588 описує метод отримання гідрохлортіазиду шляхом відновлення хлортіазиду (6-хлор-7-сульфаміл-1,2,4-бензотіадіазин-1,1-діоксиду) в етанолі у присутності гідроксиду натрію, формальдегіду, хлоридної кислоти та аміаку. Отриманий продукт є білою кристалічною твердою речовиною. Заявлений вихід становить 62,3 - 79%.

У патенті США № 3 043 840 описано процес очищення неочищеного гідрохлортіазиду аміаком або водорозчинним первинним чи вторинним аміном, кристалізацією продукту з основного водного середовища. Чистота становить 97-98%.

Патент № 142144 ІА розкриває процес очищення гідрохлортіазиду, описує досягнення 99% чистоти шляхом кристалізації неочищеного гідрохлортіазиду в системі розчинників - луг та органічний розчинник.

Загальна кількість домішок становить менше 1%. Окрема кількість домішок – менше 0,5%. Навіть така чистота не є прийнятною згідно з рекомендаціями ICH та USFDA.

Вищезазначені процеси призводять до утворення двох відомих домішок: 4-аміно-6-хлор-1,3-бензолсульфонамід та хлоротіазиду, невідомої повторюваної домішки, яка є аддуктом гідрохлоротіазиду-формальдегіду 2:1 з вихідною лікарською речовиною. Домішки гідрохлоротіазиду викликають серйозне занепокоєння у дослідників. Вплив домішок на організм людини не був вивчений глибоко, а токсичність також невідома досі. Дуже важливо контролювати якість, покращувати чистоту та зменшувати вміст домішок. Було знижено загальний вміст домішок нижче 0,15% та вміст окремих домішок нижче 0,1%.

Знайдено новий процес отримання та очищення гідрохлоротіазиду з чистотою 99,9%, що підтверджено рідинною хроматографією високого тиску (ВЕРХ), та загальним виходом 86% (рис. 2.1.4).

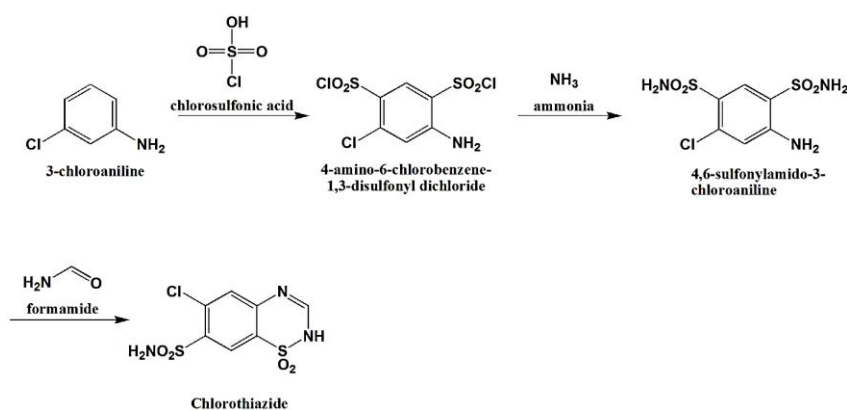


Рисунок 2.1.4. Синтез Гідрохлортіазид.

Хлортіазид.

- Атом водню в положенні 2-N є найбільш кислотним через наявність електроноакцепторної групи.
- Сульфонамідна група в положенні C-7 забезпечує кислотність препарату.

- Нагрівання вищезгаданої сполуки з формаїдом призводить до утворення хлоротіазиду (рис. 2.1.5).

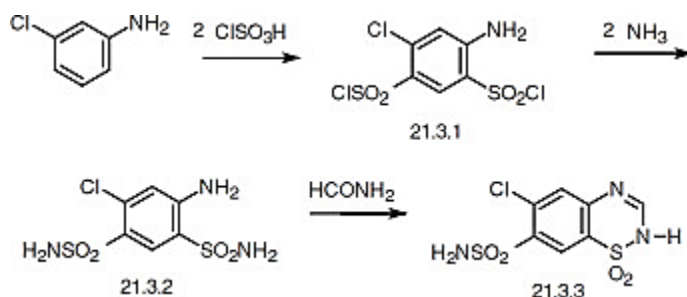


Рисунок 2.1.5. Синтез Гідрохлортіазид.

УФ-спектр раміприлу представлено на рисунку 2.1.6.

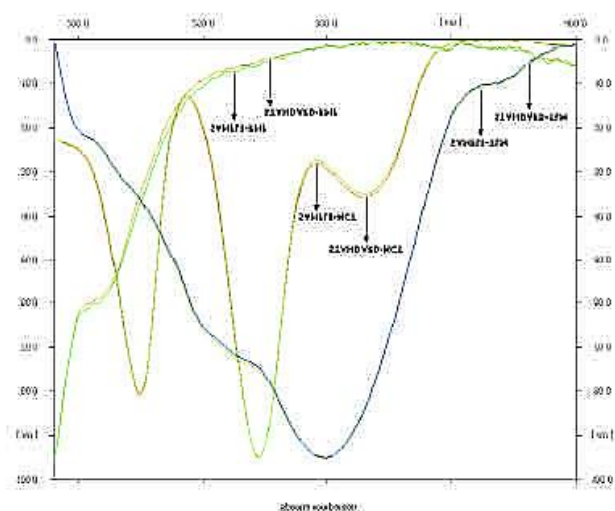


Рисунок 2.1.6. УФ-спектри стандарту та зразка раміприлу, гідрохлоротіазиду та телмісартану. Валідаційні дослідження. Реакція препарату була лінійною ($r^2 = 0,995$ для RMP, $0,995$ НСТ та $0,996$ для TLM) у діапазоні концентрацій від 100 до 400 нг·спот⁻¹ для RMP, 250-1000 нг·спот⁻¹ НСТ та 800-3200 нг·спот⁻¹ для TLM.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанції Раміприлу. За ДФУ можна проаналізувати субстанцію Гідрохлортіазиду. Раміприл та Гідрохлортіазид можна проаналізувати за монографіями 07/2021:1368 та 01/2013:0394 Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29) [27, 28].

07/2021:1368. Раміприл.

Споріднені речовини. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробуваний розчин. 20 мг досліджуваної речовини в рухомій фазі А, доводять до 20,0 мл рухомою фазою А.

Розчин порівняння (а). 2 мг домішки раміприлу А CRS, 2 мг домішки раміприлу В CRS, 2 мг домішки раміприлу С CRS та 2 мг домішки раміприлу D CRS у рухомій фазі А, доводять до 25 мл рухомою фазою А.

Розчин порівняння (b). 5,0 мл розводять до 100,0 мл рухомою фазою В.

Розчин порівняння (с). Розведять 1,0 мл розчину порівняння (b) до 10,0 мл рухомою фазою В.

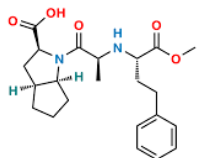
Рухома фаза: – рухома фаза А: 2,0 г перхлорату натрію R у суміші 0,5 мл триетиламіну R та 800 мл води для хроматографії R; рН до 3,6 за допомогою фосфорної кислоти R, 200 мл ацетонітрилу R1;

– рухома фаза В: 2,0 г перхлорату натрію R у суміші 0,5 мл триетиламіну R та 300 мл води для хроматографії R; рН до 2,6 за допомогою фосфорної кислоти R, 700 мл ацетонітрилу R1;

Швидкість потоку: 1,0 мл/хв.

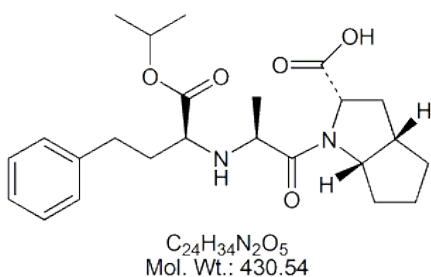
Виявлення: спектрофотометр при 210 нм.

Супровідні речовини: А, В, С, D. Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): Е, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O.



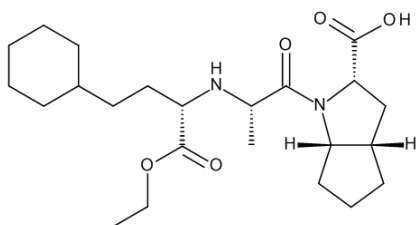
Домішка А

(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-метокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота (раміприл метиловий естер)



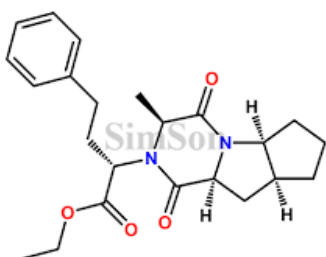
Домішка В

(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-оксо-4-феніл-1-[(пропан2-іл)окси]бутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]пірол-2-карбонова кислота (ізопропіловий естер раміприлу)



Домішка С

(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-4-циклогексил-1-етокси-1-оксобутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота (гексагідораміприл)



Домішка D

етил (2S)-2-[(3S,5aS,8aS,9aS)-3-метил-1,4-діоксодекагідро-2H-циклопента[4,5]піроло[1,2-а]піразин-2-іл]-4-фенілбутаноат (раміприл дикетопиперазин)

Е.(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-карбокси-3-фенілпропіл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]пірол-2-карбонова кислота (раміприлат),

Ф.(2S)-2-[[[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропанова кислота, Г. метилбензол (толуол), Н. (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2R)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота ((R,S,S,S,S)-епімер раміприлу),

І.(2S,3aS,6aS)-1-[(2R)-2-[[[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота ((S,R,S,S,S)-епімер раміприлу),

Ж.(2R,3aR,6aR)-1-[(2R)-2-[[[(2R)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота (енантіомер раміприлу),

К.(2S)-2-[(3S,5aS,8aS,9aS)-3-метил-1,4-діоксодекагідро-2H-циклопента[4,5]піроло[1,2-а]піразин-2-іл]-4-фенілбутанова кислота (раміприлатдикетопіперазин)

Л.етил (2S)-2-[(3S,5aS,8aS,9aS)-9a-гідрокси-3-метил-1,4-діоксодекагідро-2H-циклопента[4,5]піроло[1,2-а]-піразин-2-іл]-4-фенілбутаноат (раміприл гідроксидикетопіперазин), М. (2R,3R)-2,3-біс(бензоїлокси)бутандіова кислота (дибензоїлвинна кислота), N. (2R,3aR,6aR)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]октагідроциклопента[b]-пірол-2-карбонова кислота ((S,S,R,R,R)-ізомер раміприлу), О. діетил (2E,2'E)-2,2'-[(2E,5E)-2,5-диметил-3,6-діоксопіперазин-1,4-дііл]біс(4-фенілбутаноат).

Гідрохлортіазид аналізують методом РХ.

Визначають споріднені речовини: А, В, С.

Детектування спектрофотометричне при 224 нм.

Рухома фаза: фаза А: фосфатний буферний розчин (рН 3.2)-метанол-ТГФ; фаза В: метанол- фосфатний буферний розчин (рН 3.2)-ТГФ.

Нами виконано хроматографічне дослідження методом ВЕРХ для ідентифікації у досліджуваних двохкомпонентної суміші субстанцій Раміприлу та Гідрохлортіазиду, визначення їх чистоти та кількісного вмісту з використанням базових умов хроматографування і методик дослідження, які описано в Європейській Фармакопеї для дослідження методом РХ.

Матеріали та методи.

Хроматограф Agilent 1200 з DAD детектором.

Умови хроматографування:

- колонка – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4,6x5 (або аналогічна);
- час хроматографування 17 хв
- потік – 2,5 мл/хв
- детектування – УФ при 210 нм
- об'єм інжекції – 10 мкл
- температура колонки – 50°C

Градiєнт:

Час	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0	90	10
2	90	10
8	40	60
10	40	60
12	90	10
17	90	10

Буферний розчин 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;

Буферний розчин В – ацетонітрил;

Суміш розчинників – суміш ацетонітрилу та буферу А у співвідношенні 1:1.

Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та раміприлу 10 мкг/мл в розчиннику.

У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ гідрохлортіазиду та раміприлу з концентрацією 50 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно в розчиннику.

Придатність хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною тоді, якщо виконуються наступні умови:

- ефективність хроматографічної колонки для гідрохлортіазиду та раміприлу повинна бути не менше 3000 теоретичних тарілок
- коефіцієнт симетрії гідрохлортіазиду та раміприлу (тейлінг) не має бути більшим 2,0;
- відносне стандартне відхилення площі піків гідрохлортіазиду та раміприлу після 6 послідовних введень стандартного розчину має становити не більше 2,0%;

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.

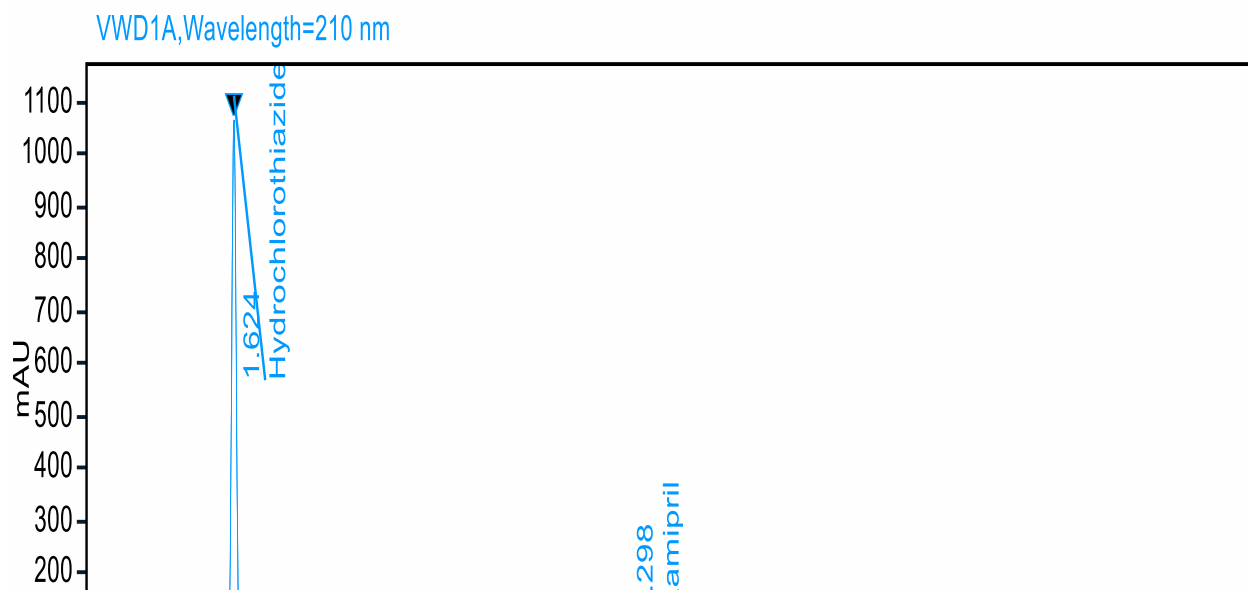


Рисунок 3.1. Хроматограма розчину стандартного зразку ДФУ.

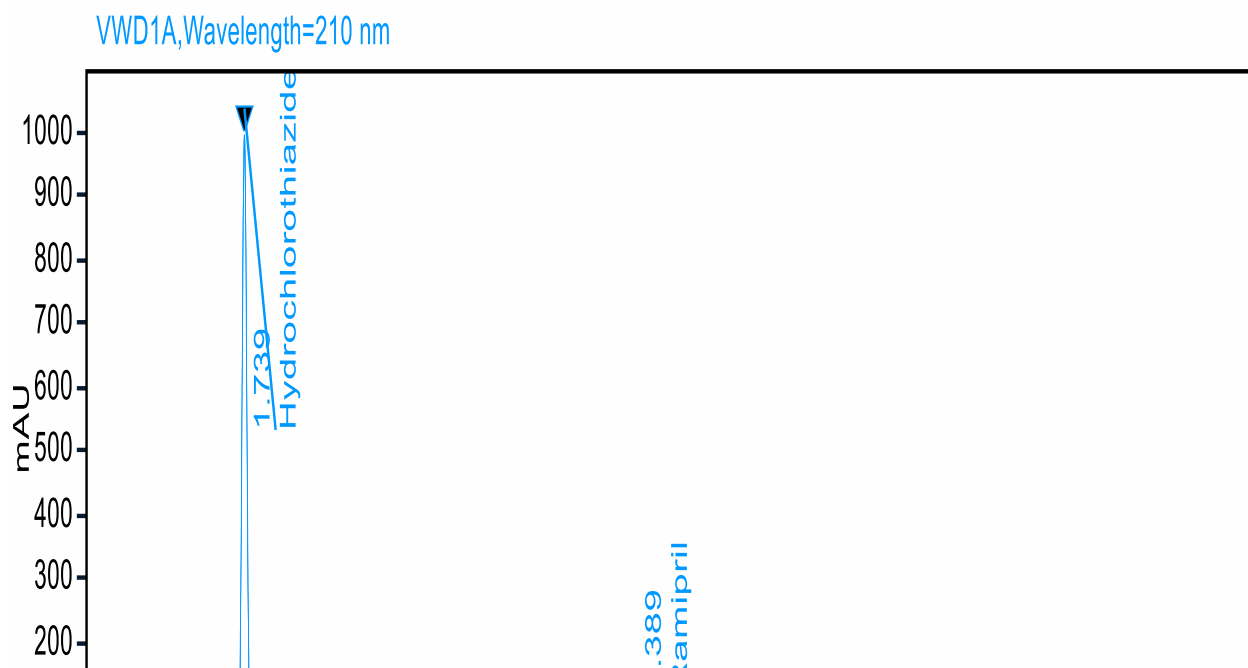


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину випробовуваного зразку суміші субстанцій *гідрохлортіазиду* $R_t=1.739$ хв та *раміпрілу* $R_t= 6.389$ хв.

Отримані результати представлено в таблицях 3.1, 3.2:

	<i>Стандартний розчин</i>							
	Гідрохлортіазид				Раміприл			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> ($\leq 2,0$)	<i>N</i> ≥ 3000	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> ($\leq 2,0$)	<i>N</i> ≥ 3000
	1,585	3829,239	1,0	4516	6,259	477,147	1,0	13620
	1,624	3837,518	1,0	4611	6,298	476,867	1,0	13946
	1,661	3846,552	1,0	4634	6,328	476,644	1,0	14016
	1,683	3852,602	1,0	4682	6,348	477,165	1,0	14166
	1,697	3850,763	1,0	4720	6,358	476,938	1,0	14205
	1,708	3850,579	1,0	4736	6,366	476,669	1,0	14199
Середнє	1,660	3844,542	1,0	4650	6,279	477,007	1,0	13783
SD		9,248			0,028	0,225		
RSD($\leq 2.0\%$)		0,24%			0,44%	0,05%		

	<i>Тест</i>			
	<i>Гідрохлортіазид</i>		<i>Раміприл</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	1,739	3782,820	6,389	488,612
	1,741	3793,649	6,391	489,122
	1,744	3798,682	6,393	489,222
	1,743	3797,739	6,394	490,191
	1,743	3799,849	6,395	489,314
	1,744	3803,411	6,394	490,373
Середнє	1,742	3796,025	6,393	489,472

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)%

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

За Євр. Фарм. – 97.5-102.0%

Розрахунок вмісту *раміприлу*:

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

де:

- A_{test} – площа піку раміприлу на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку раміприлу 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)%

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

За Євр. Фарм. – 98.0-101.0%

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження суміші субстанцій ідентифіковано *гідрохлортиазид та раміприл*, суміш не містить домішок, а їх кількісний вміст відповідає регламентованому кількісному вмісту. Не виявлено продуктів хімічної деградації, а умови хроматографування суміші субстанцій методом ВЕРХ адаптовано для практичного використання у фармацевтичний аналіз.

Раміприл (Eur.Ph.) Метод РХ	Раміприл, субстанція + гідрохлортіазид, субстанція Метод ВЕРХ
Рідинна хроматографія (2.2.29). Рухома фаза: – <i>рухома фаза А</i>: 2,0 г перхлорату натрію R у суміші 0,5 мл триетиламіну R та 800 мл води для хроматографії R; рН до 3,6 за допомогою фосфорної кислоти R, 200 мл ацетонітрилу R1; – <i>рухома фаза В</i>: 2,0 г перхлорату натрію R у суміші 0,5 мл триетиламіну R та 300 мл води для хроматографії R; рН до 2,6 за допомогою фосфорної кислоти R, 700 мл ацетонітрилу R1;	<i>Буферний розчин А</i> – 1,36 г калію дигідрофосфату у 1000 мл води, додати 1 мл трифтороцтової кислоти та довести рН до $2,5 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти; <i>Буферний розчин В</i> – ацетонітрил; <i>Суміш розчинників</i> – суміш ацетонітрилу та буферу А у співвідношенні 1:1. Використовували розчин субстанції з <i>кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та раміприлу 10 мкг/мл в розчиннику.</i> У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ гідрохлортіазиду та раміприлу з <i>концентрацією 50 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно в розчиннику.</i>
Супровідні речовини: А, В, С, D. Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): Е, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O.	Не виявлено
Кількісний вміст За Євр. Фарм. 98-101%	Кількісний вміст - 99,3%

Детектування – 210 нм	Детектування – 210 нм
Гідрохлортіазид	Гідрохлортіазид у суміші двохкомпонентної
Рухома фаза: фаза А: фосфатний буферний розчин (рН 3.2)-метанол-ТГФ; фаза В: метанол- фосфатний буферний розчин (рН 3.2)-ТГФ.	<i>Буферний розчин А</i> – 1,36 г калію дигідрофосфату у 1000 мл води, додати 1 мл трифтороцтової кислоти та довести рН до $2,5 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти; <i>Буферний розчин В</i> – ацетонітрил; <i>Суміш розчинників</i> – суміш ацетонітрилу та буферу А у співвідношенні 1:1. Використовували розчин субстанції з <i>кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та раміприлу 10 мкг/мл в розчиннику.</i> У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ гідрохлортіазиду та раміприлу з <i>концентрацією 50 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно в розчиннику.</i>
Детектування – 224 нм	Детектування – 210 нм
Кількісний вміст <i>За Євр. Фарм. 97.5-102%</i>	Кількісний вміст - 97,1%

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено метод ВЕРХ у аналіз АФІ Раміпили та Гідрохлортіазиду у складі двохкомпонентної суміші субстанцій, ідентифіковано АФІ та визначено їх кількісний вміст: вміст раміприлу відповідає регламентованому кількісному вмісту 99,3%, а вміст гідрохлортіазиду перевищує регламентований вміст 97,1%.
2. Визначено чистоту досліджуваної двохкомпонентної суміші субстанцій Раміпили та Гідрохлортіазиду хроматографічним методом (ВЕРХ): суміш не містить супровідних речовин та продуктів розпаду.
3. Адаптовано методики дослідження та розроблено хроматографічні умови дослідження, які дозволяють захистити структуру молекул речовин від хімічної деградації, а саме, запропоновано наступний склад: *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* – суміш ацетонітрилу та буферу А, 1:1. Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та раміприлу 10 мкг/мл в розчиннику. У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ гідрохлортіазиду та раміприлу з концентрацією 50 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно в розчиннику. Детектування УФ-спектрометричним методом при 210 нм.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, Deswal A, Drazner MH, Dunlay SM, Evers LR, Fang JC, Fedson SE, Fonarow GC, Hayek SS, Hernandez AF, Khazanie P, Kittleson MM, Lee CS, Link MS, Milano CA, Nnacheta LC, Sandhu AT, Stevenson LW, Vardeny O, Vest AR, Yancy CW., ACC/AHA Joint Committee Members. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2022 May 03;145(18):e895-e1032.
2. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, Jaffe AS, Jneid H, Kelly RF, Kontos MC, Levine GN, Liebson PR, Mukherjee D, Peterson ED, Sabatine MS, Smalling RW, Zieman SJ., ACC/AHA Task Force Members. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014 Dec 23;130(25):e344-426.
3. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Blood Pressure Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2021 Mar;99(3S):S1-S87.
4. Fountain JH, Kaur J, Lappin SL. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Mar 12, 2023. Physiology, Renin Angiotensin System.
5. Borghi C, Cicero AF, Agnoletti D, Fiorini G. Pathophysiology of cough with angiotensin-converting enzyme inhibitors: How to explain within-class differences? *Eur J Intern Med*. 2023 Apr;110:10-15.

6. Hermann R, Gundlach K, Seiler D. Mechanistic Considerations About an Unexpected Ramipril Drug-Drug Interaction in the Development of a Triple Fixed-Dose Combination Product Containing Ramipril, Amlodipine, and Atorvastatin. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2021 Nov;10(11):1307-1315.
7. Soboleva MS, Loskutova EE. Analysis of Preferences in the Use of Fixed-Doses Combinations Antihypertensive Drugs in the Regions of Far-Eastern Federal District. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2020;12:265-272.
8. Fischer K, Diec S. Once- Versus Twice-Daily Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors for Blood Pressure Control in Adult Patients With Hypertension. *Cureus*. 2021 Aug;13(8):e17331.
9. Buawangpong N, Teekachunhatean S, Koonrunsesomboon N. Adverse pregnancy outcomes associated with first-trimester exposure to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res Perspect*. 2020 Oct;8(5):e00644.
10. Hallberg P, Persson M, Axelsson T, Cavalli M, Norling P, Johansson HE, Yue QY, Magnusson PK, Wadelius C, Eriksson N, Wadelius M. Genetic variants associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: a genome-wide association study in a Swedish population. *Pharmacogenomics*. 2017 Feb;18(3):201-213.
11. Mu G, Xiang Q, Zhang Z, Liu C, Zhang H, Liu Z, Pang X, Jiang J, Xie Q, Zhou S, Wang Z, Hu K, Wang Z, Jiang S, Qin X, Cui Y. *PNPT1* and *PCGF3* variants associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: a nested case-control genome-wide study. *Pharmacogenomics*. 2020 Jun;21(9):601-614.
12. Krause AJ, Patel NB, Morgan J. An unusual presentation of ACE inhibitor-induced visceral angioedema. *BMJ Case Rep*. 2019 Sep 18;12(9).
13. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent

- and control antimicrobial resistance. [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240093461>.
- 14.D. Yahav, C.G. Giske, A. Grāmatniece, H. Abodakpi, V.H. Tam, L. Leibovici. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev*, 34 (1) (2020), pp. e00115-e00120.
 - 15.R. Soman, R. Sirsat, A. Sunavala, N. Punatar, J. Mehta, C. Rodrigues, B. Veraraghavan. Successful treatment of sino-pulmonary infection & skull base osteomyelitis caused by New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a renal transplant recipient by using an investigational antibiotic cefepime/zidebactam (WCK 5222). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2024), 10.1007/s10096-024-04791-1
 - 16.D. Dubey, M. Roy, T.H. Shah, N. Bano, V. Kulshrestha, S. Mitra, *et al.* Compassionate use of a novel β -lactam enhancer-based investigational antibiotic cefepime/zidebactam (WCK 5222) for the treatment of extensively-drug-resistant NDM-expressing *Pseudomonas aeruginosa* infection in an intra-abdominal infection-induced sepsis patient: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 22 (1) (2023), p. 55.
 - 17.P.D. Tamma, S.L. Aitken, R.A. Bonomo, A.J. Mathers, D. van Duin, C.J. Clancy. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin Infect Dis*, 72 (7) (2021), pp. e169-e183, 10.1093/cid/ciaa1478
 - 18.Y.L. Lee, W.C. Ko, P.R. Hsueh. Geographic patterns of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific Region: results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) Program,

- 2015–2019. *Antimicrob Agents Chemother*, 66 (2) (2022), pp. e02000-e02021 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02000-21>
19. Wockhardt Ltd; A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety, tolerability and pharmacokinetics of multiple escalating doses of intravenous zidebactam in healthy adult Human subjects; ClinicalTrials.gov identifier: NCT02674347; Updated : 2016; Accessed 02.10.24: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02674347?term=NCT02674347&rank=1>.
20. Wockhardt Ltd; A randomized, double-blind, double-dummy, placebo- and positive-controlled, crossover study to evaluate the effect of WCK 5222 on the QT/QTc interval in healthy volunteers; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03554304; 2018; Accessed 02.10.24: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03554304?term=NCT03554304&rank=1>.
21. Wockhardt Ltd; A phase 1, open-label, single-dose study to investigate the pharmacokinetics of intravenous WCK 5222 (FEP-ZID) in patients with renal impairment; ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02942810; 2018; Accessed 02.10.24; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02942810?intr=FEP-ZID&rank=3>.
22. Vahabi-Amlashi, S.; Layegh, P.; Kiafar, B.; Hoseininezhad, M.; Abbaspour, M.; Khaniki, S.H.; Forouzanfar, M.; Sabeti, V. A randomized clinical trial on therapeutic effects of 0.25 mg oral minoxidil tablets on treatment of female pattern hair loss. *Dermatol. Ther.* 2021, 34, e15131.
23. An, S.; Zheng, M.; Park, I.G.; Noh, M.; Sung, J.H. Differential expression of androgen receptor and 5-alpha reductase isoforms in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 2024, 317, 138.

- 24.Harel, S.; Higgins, C.A.; Cerise, J.E.; Dai, Z.; Chen, J.C.; Clynes, R.; Christiano, A.M. Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth. *Sci. Adv.* 2015, 1, e1500973.
- 25.Piliang, M.; Soung, J.; King, B.; Shapiro, J.; Rudnicka, L.; Farrant, P.; Magnolo, N.; Piraccini, B.M.; Luo, X.; Wolk, R.; et al. Efficacy and safety of the oral Janus kinase 3/tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma family kinase inhibitor ritlecitinib over 24 months: Integrated analysis of the ALLEGRO phase IIb/III and long-term phase III clinical studies in alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* 2025, 192, 215–227.
- 26.Zhu, H.; Jian, Z.; Zhong, Y.; Ye, Y.; Zhang, Y.; Hu, X.; Pu, B.; Gu, L.; Xiong, X. Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *Front. Immunol.* 2021, 12, 714943.
- 27.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.
- 28.European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.1I: 3019-3020. V. III: 3866-3868.

SUMMARY

Zubenko Vlada

IDENTIFICATION BY UV SPECTRUM AND QUANTIFICATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE AND RAMIPRIL IN THE COMPOSITION OF THE DRUG SUBSTANCE BY HPLC

The department of medicinal chemistry and toxicology

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

Keywords: hydrochlorothiazide, ramipril, Two-Component Substance, medicinal product, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Ramipril or (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl]amino}propanoyl]-octahydrocyclopenta[b] pyrrole-2-carboxylic acid is used to treat hypertension, heart failure, and kidney disease (nephropathy). The drug is prescribed for the prevention of myocardial infarction, stroke, ischemia, and congestive heart failure as part of combination therapy. The State Pharmacopoeia of Ukraine does not regulate the analysis of the substance Ramipril. The substance Hydrochlorothiazide can be analyzed according to the State Pharmacopoeia. Ramipril and Hydrochlorothiazide can be analyzed according to monographs 07/2021:1368 and 01/2013:0394 of the European Pharmacopoeia. Accompanying substances (specified and unspecified impurities) are determined by liquid chromatography (LC)

Materials and methods. Objects of research are substance of Hydrochlorothiazide and Ramipril, and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of the substance of Hydrochlorothiazide and Ramipril. Methods: HPLC & UV-spectrum (Agilent 1200 with a diode-matrix detector, column – ZORBAX Eclipse Plus C18, 150x4.6x5 (or similar);- chromatography time 17 min, - flow – 2.5 ml/min, - detection – UV at 210 nm, - injection volume – 10 µl, - column temperature – 50°C; OpenLab CDS program.

Results. The HPLC method was introduced into the analysis of the API Ramipril and Hydrochlorothiazide in a two-component mixture of substances, the APIs were identified and their quantitative content was determined: the content of ramipril corresponds to the regulated quantitative content of 99.3%, and the content of hydrochlorothiazide exceeds the regulated content of 97.1%.

Conclusions. The purity of the investigated two-component mixture of substances Ramipil and Hydrochlorothiazide was determined by chromatographic method (HPLC): the mixture does not contain accompanying substances and decomposition products. The research methods were adapted and the chromatographic research conditions were developed.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



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

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



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК