

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Визначення методом газової хроматографії залишкових
кількостей розчинників у складі субстанції золедронової кислоти»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи ФЗА
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)
Копиця Євфалія Вікторівна
(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 ЗОЛЕДРОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови	9
1.2. Біологічна активність	15
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЗОЛЕДРОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	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. Золедронова кислота — лікарський засіб, бісфосфонат. Номенклатурна назва 1-Гідрокси-2(1Н-імідазол-1-іл)етіліден]біс[фосфонова кислота. Має вибірккову дію на кісткову тканину, пригнічує активність остеокластів. Застосовується для лікування остеопорозу. Не чинить небажаного впливу на формування, мінералізацію та механічні властивості кісткової тканини. Селективна дія на кісткову тканину заснована на високій спорідненості з мінералізованою кістковою тканиною. Точний молекулярний механізм, що забезпечує інгібування активності остеокластів, досі залишається нез'ясованим. Має протипухлинні властивості, що забезпечують додаткову ефективність при кісткових метастазах.

Золедронову кислоту використовують для лікування:

- Проблем з кістками, пов'язані з раком, запобігає переломам, компресії хребта, множинна мієлома або метастази в кістках.
- Гіперкальціємії при злоякісних новоутвореннях: знижує небезпечно високий рівень кальцію в крові.
- Остеопорозу: лікує остеопороз у чоловіків, жінок у тих, хто приймає стероїди (глюкокортикоїди) для запобігання переломам та витончення кісток.
- Хвороби Педжета: стан, при якому кістки м'які, слабкі та легко ламаються [1-8].

Аналіз золедронової кислоти регулюється основними міжнародними та національними фармакопеями, які встановлюють стандарти її чистоти, ідентифікації та кількісного визначення.

Станом на 2025 рік основними документами є:

- Європейська фармакопея (Ph. Eur. / EP): Містить офіційну монографію (аналіз золедренової кислоти моногідрату), яка визначає методи контролю якості для використання в Європі.

- Фармакопея США (USP): стандарти (USP-NF). Видання 2025 року містить актуальні методики аналізу та вимоги до референтних стандартів.

- Британська фармакопея (BP): BP 2025 включає стандарти для британських фармацевтичних субстанцій та лікарських засобів, гармонізовані з європейськими нормами.

Національні стандарти України

- Державна фармакопея України (ДФУ): аналіз проводиться згідно з ДФУ, яка значною мірою гармонізована з Європейською фармакопеєю.

Типова монографія включає такі обов'язкові перевірки:

1. Ідентифікація: ІЧ-спектроскопія, ЯМР або РХ.
2. Чистота: Контроль супутніх домішок, вмісту води та залишків розчинників.
3. Кількісне визначення: Визначення вмісту діючої речовини методами титрування або рідинної хроматографії (РХ).
4. Специфічні тести: Для інфузійних форм — стерильність, бактеріальні ендотоксини та рН

Монографія на золедренову кислоту в ДФУ – Том 2 другого видання (ДФУ 2.0). Монографія на фармацевтичну субстанцію. Гармонізована з 8-м виданням Європейської Фармакопеї.

Основні характеристики монографії:

- **Об'єкт:** Субстанція золедренової кислоти (у формі моногідрату).

- **Зміст:** Опис (безбарвний кристалічний порошок), ідентифікація (РХ, ІЧ-спектроскопія), чистота (супутні печовини) та кількісне визначення [27, 28].

Таким чином, виходячи із наявності методик дослідження лікарського засобу Золедренової кислоти, який виконується методом РХ, в ДФУ та Європейській Фармакопеї, постає завдання осучаснити методи аналізу субстанції, адаптувати умови та методики дослідження ефективним методом газової хроматографії (ГХ) випробовуваної субстанцій. Це дозволить розширити коло інструментальних методів дослідження субстанції та запропонувати нові методики дослідження.

Під час розробки або адаптування умов хроматографування субстанції важливі відтворювані умови дослідження. Це важливо, оскільки під час проведення хроматографічних досліджень можлива хімічна деградація субстанції, яка може привести до збільшення кількості домішок або залишку розчинників, які використовувалися під час синтезу.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ГХ для ідентифікації у досліджуваній субстанції Золедренової кислоти, визначення її чистоти.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація та визначення чистоти методом ГХ субстанції АФІ Золедренової кислоти, адаптація умов хроматографування методом ГХ субстанції.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати методом ГХ АФІ Золедренову кислоту у складі випробовуваної субстанції;
- визначити чистоту досліджуваної субстанції хроматографічним методом (ГХ) (присутність супровідних речовин та слідових кількостей

розчинників);

- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекули речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. Газова хроматографія, газовий хроматограф Agilent 6890A з полум'я-іонізаційним детектором (FID); колонка – HP-FFAP (нітротерефталевою кислотою модифікований поліетиленгліколь), 50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм; колонка підключена до заднього полум'я-іонізаційного детектора (FID); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у впровадженні у фармацевтичний аналіз методу ГХ АФІ Золедренова кислота для виявлення її чистоти та супровідних речовин у складі випробовуваної субстанції, 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 – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ СТЕРОЇДІВ

1.1. Особливості хімічної будови

Золедронова кислота або 1-Гідрокси-2(1Н-імідазол-1-іл)етіліден]біс[фосфонова кислота є АФІ у складі лікарських засобів (рис. 1.1.1).

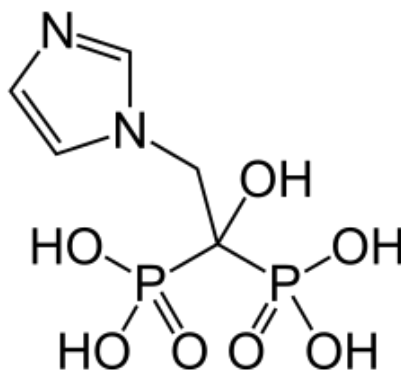


Рисунок 1.1.1. Золедронова кислота, хімічна формула.

Остеопороз – поширене захворювання скелета. Воно характеризується зниженням кісткової маси та порушенням мікроархітектури кісткової тканини. Це призводить до підвищеної крихкості кісток, до підвищеного ризику переломів. 32 мільйони людей старше 50 років у Європі мають остеопороз. Остеопороз спричиняє понад 8,9 мільйона переломів на рік.

Очікується, що до 2050 року захворюваність на переломи стегна зросте на 310% у чоловіків, на 240% у жінок.

Серед людей похилого віку переломи призводять до фізичної інвалідності, зниження якості життя та підвищеного ризику подальших переломів. Остеопороз є важливою глобальною проблемою громадського здоров'я, суттєво впливає на суспільство та економіку. Для лікування

остеопорозу поширеними методами лікування є бісфосфонати (БФ).

БФ – це синтетичні сполуки зі спільними фосфор-вуглець-фосфорними зв'язками, мають високу спорідненість до кальцій-гідроксиапатиту кісток. Серед них азотовмісні БФ – це високоефективні в пригніченні резорбції кісток. Вони пригнічують фермент остеокластів фарнезилдифосфатсинтазу (ФФПС), знижують його активність.

Пероральні БФ ефективні в лікуванні остеопорозу. Недотримання режиму знижує ефективність лікування та збільшує витрати на охорону здоров'я. Золедренова кислота, БФ, можна вводити внутрішньовенно, вводиться з тривалими інтервалами, має потенціал покращити дотримання пацієнтами режиму терапії БФ.

Внутрішньовенне введення золедренової кислоти зменшує обмін кісткової тканини та покращує мінеральну щільність кісткової тканини (МЩК). Однак, безпека та ефективність золедренової кислоти в лікуванні остеопорозу є суперечливими [9-13].

Метааналіз проводили відповідно до методологічних рекомендацій Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) 2020. Огляд зареєстровано в Міжнародному проспективному реєстрі систематичних оглядів (PROSPERO; номер посилання CRD42023411779).

Проведено пошук у базах даних PubMed, Embase, Web of Science з використанням «золедренова кислота» та «остеопороз» з дати створення до 26 грудня 2022 року.

Критерії включення до дослідження: пацієнти з діагнозом остеопорозу; пацієнти в групі втручання. Вони отримували золедренову кислоту. Пацієнти контрольної групи отримували плацебо; результат: МЩК, карбокси-термінальний телопептид колагену 1 типу (CTX), кістково-специфічна лужна фосфатаза (BSAP), N-пропептид проколагену 1 типу (P1NP), рівень склеростину в сироватці крові, оцінка за аналоговою шкалою (BAAH), індекс інвалідності Освестрі (ODI), частота переломів та побічних ефектів; РКД.

Критерії включення до дослідження були наступними: пацієнти з діагнозом остеопорозу; пацієнти в групі втручання, які отримували золедронову кислоту. Пацієнти контрольної групи отримували плацебо; результат: МЩК, карбокси-термінальний телопептид колагену (CTX), кістково-специфічна лужна фосфатаза (BSAP), N-пропептид проколагену (P1NP), рівень склеростину в сироватці крові, оцінка за аналоговою шкалою (ВАШ), індекс інвалідності Освестрі (ODI), частота переломів та побічних ефектів; РКД.

Два дослідники (JS та WX) переглянули знайдену літературу, яку відповідну літературу включити до цього дослідження. Остаточну придатність для включення текстів статей оцінювали окремо двома дослідниками. Розбіжності вирішували шляхом обговорення з третім рецензентом (MR).

Для відбору досліджень два дослідники провели початкову оцінку РКД. Два дослідники вивчили анотації всіх статей, які пройшли попередній скринінг, оцінили, щоб визначити їх придатність для включення. Два дослідники перевірили повні тексти статей, що відповідали вимогам.

Два дослідники (JS та WX) вилучили всю відповідну інформацію, пов'язану з характеристиками дослідження. Вирішення суперечок було доручено третьому досліднику (MR). Два дослідники використовували стандартизовану форму для отримання даних з включеної літератури. Основними характеристиками вилучення даних були перший автор, рік публікації, країна автора, розмір вибірки, стать, діагноз, середній вік тощо.

Якість літератури оцінювали за допомогою інструменту Кокрейна. Процес виконували два дослідники незалежно. Розбіжності вирішували шляхом консультації з третім дослідником. Оцінка якості включає сім аспектів: генерацію випадкових послідовностей, засліплення оцінювачів результатів, неповні дані про результати, приховування розподілу,

засліплення пацієнтів та дослідників випробувань, вибіркове звітування та інші систематичні помилки.

Дослідження оцінювали та класифікували як «низький ризик», «високий ризик» або «неясний ризик». Для оцінки якості та потенційної систематичної помилки досліджень використовували програму Review Manager, яка допомогла візуально представити ризик систематичної помилки.

Дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Stata 15.1. Проведено метааналіз зі статистичним аналізом Мантеля-Хензеля для оцінки ефективності та безпеки золедронової кислоти. Відношення шансів (ВШ) використовувалося для вираження дихотомічних результатів.

Стандартизована середня різниця (ССР) використовувалася для вираження безперервних результатів. Статистика I² використовувалася для оцінки гетерогенності. Для I² < 50 % використовувалася модель фіксованих ефектів для визначення різниці між групами. Для I² ≥ 50 % використовувалася модель випадкових ефектів, де P < 0,05 вказує на статистично значущу різницю.

Після виявлення гетерогенності проводився аналіз чутливості шляхом виключення дослідження за один раз. Упередженість публікацій оцінювалася за допомогою тесту Еггера [14-18].

Проведено комплексний та систематичний пошук літератури щодо золедронової кислоти для лікування остеопорозу в базах: PubMed (n = 1627), Embase (n = 6610), Cochrane (n = 594), Web of Science (n = 3126). Знайдено 11 957 літературних записів. Отримані дослідження перевірені у відповідності до критеріїв включення та виключення, для гарантії, що результати ґрунтуються на доступних доказах.

Після попереднього скринінгу 57 досліджень відібрано для подальшої

оцінки шляхом повнотекстового огляду. 29 досліджень було виключено з таких причин, як невідповідність досліджуваної популяції або дизайн дослідження. Для решти 28 досліджень проведено вилучення даних. 6 досліджень згодом виключено через неповні дані про результати. 22 дослідження визнано придатними для кількісного аналізу. Процес скринінгу літератури (рис. 1.1.2).

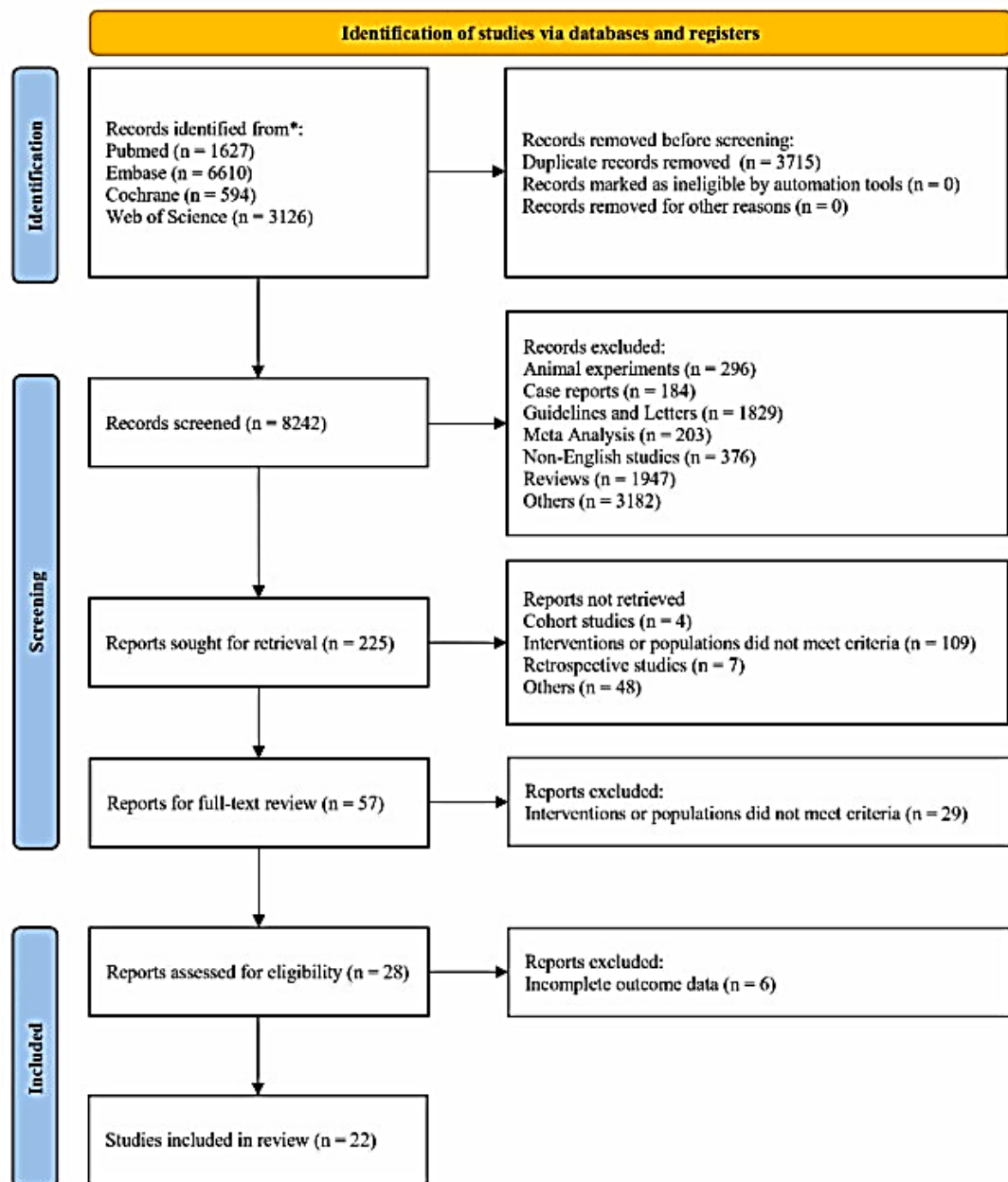


Рисунок 1.1.2. Блок-схема PRISMA для кількісного аналізу золедронові кИСЛОТИ.

Вплив золедронової кислоти на МЩК. Дослідження повідомили про дані щодо МЩК поперекового відділу хребта.

Між дослідженнями спостерігалася статистично значуща гетерогенність ($I^2 = 64,1 \%$, $P = 0,010$). Мета-аналіз з використанням моделі випадкових ефектів показав, що золедронові кислота сприяла значному збільшенню МЩК поперекового відділу хребта порівняно з плацебо. Статистично значуща різниця [$SMD = 0,53$, 95 % ДІ (0,26, 0,81), $P = 0$] (рис. 1.1.3).

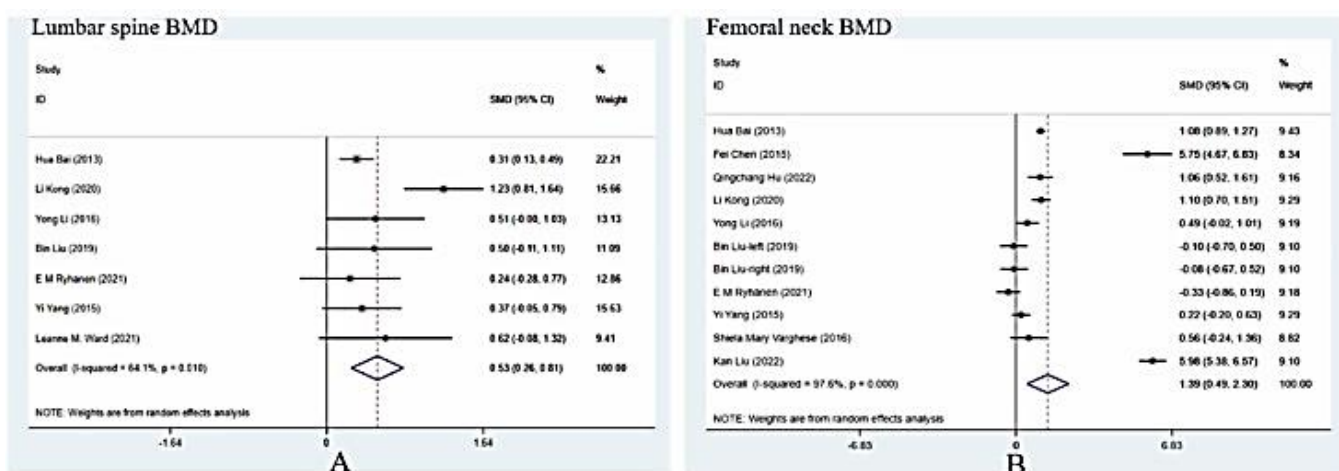


Рисунок 1.1.3. Діаграма - показує вплив золедронової кислоти на МЩК поперекового відділу хребта, МЩК шийки стегнової кістки.

Дослідження повідомили про дані щодо МЩК шийки стегнової кістки. Між ними існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 97,6 \%$, $P = 0$). Для аналізу даних було використано модель випадкових ефектів.

Мета-аналіз показав, що золедронові кислота була пов'язана зі значним збільшенням МЩК шийки стегнової кістки у пацієнтів, зі статистично значущою різницею [$SMD = 1,39$, 95 % ДІ (0,49, 2,30) $P = 0,003$].

Три дослідження повідомили про дані щодо МЩК великого рожна. Між ними існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 87,3 \%$, $P = 0$). Була використана модель випадкових ефектів. Мета-аналіз показав, що золедронові кислота

кислота корелювала зі значним збільшенням МЩК великого рожа зі статистично значущою різницею [SMD = 0,93, 95 % ДІ (0,26; 1,59), P = 0,006].

Вплив золедронової кислоти на рівень склеростину в сироватці крові. Три дослідження повідомили про дані склеростину в сироватці крові. Між ними не було статистичної гетерогенності ($I^2 = 0\%$, P = 0,676). Була прийнята модель фіксованих ефектів. Мета-аналіз показав, що золедренова кислота була пов'язана з підвищенням рівня склеростину в сироватці крові зі статистично значущою різницею [SMD = 0,35, 95 % ДІ (0,01, 0,70), P = 0,046].

Вплив золедронової кислоти на CTX, BSAP та P1NP. Дванадцять досліджень повідомили про дані щодо CTX. Між ними існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 96,6\%$, P = 0). Була використана модель випадкових ефектів. Мета-аналіз показав, що введення золедронової кислоти сприяло значному зниженню CTX зі статистично значущою різницею [SMD = -2,24, 95% ДІ (-2,94, -1,54), P = 0]. Через високу гетерогенність серед досліджень ($I^2 > 50\%$) проведено аналіз чутливості для дослідження потенційних джерел гетерогенності.

П'ять досліджень повідомили про дані щодо BSAP. Між ними існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 91,0\%$, P = 0). Для аналізу даних використано модель випадкових ефектів. Мета-аналіз показав, що золедренова кислота корелювала зі значним зниженням BSAP, різниця була статистично значущою [SMD = -0,75, 95 % ДІ (-1,24, -0,27), P = 0,002].

Вісім досліджень повідомили про дані щодо P1NP. Між ними існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 93,1\%$, P = 0) та було використано модель випадкових ефектів [19- 23].

1.2. Біологічна активність

Вплив золедронової кислоти на показник VAS. Між дослідженнями існувала статистична гетерогенність ($I^2 = 96,4\%$, P = 0). Була використана модель випадкових ефектів.

Мета-аналіз показав, що золедренова кислота корелює із зниженням показника VAS порівняно з плацебо. Статистична значуща різниця [SMD = -2,21, 95 % ДІ (-3,05, -1,36), P = 0].

Вплив золедренової кислоти на ODI. Проведено 3 дослідження щодо ODI. Через статистичну гетерогенність між дослідженнями ($I^2 = 79,3\%$, P = 0,008) застосована модель випадкових ефектів.

Мета-аналіз показав, що золедренова кислота мала кореляцію із зниженням ODI порівняно з плацебо. Існувала статистично значуща різниця, SMD = -0,83, 95% ДІ (-1,25, -0,41), P = 0.

Вплив золедренової кислоти на побічний ефект. П'ять досліджень проведено щодо побічних ефектів. Більшість побічних ефектів – це пірексія, міалгія, грипоподібні симптоми, головний біль та артралгія.

Серйозні побічні ефекти - остеонекроз щелепи, порушення функції нирок та гіпокальціємія, атипові переломи стегнової кістки, фібриляція передсердь. Не було виявлено статистичної гетерогенності ($I^2 = 0\%$, P = 0,944). Була використана модель фіксованих ефектів.

Мета-аналіз показав, що частота побічних ефектів була вищою у пацієнтів, які отримували золедренову кислоту. Різниця була статистично значущою [RR = 1,02, 95 % ДІ (1,01, 1,03), P = 0].

Частота серйозних побічних ефектів не показала статистично значущої різниці між двома групами [RR = 1,00, 95 % ДІ (0,81, 1,25), P = 0,965] (рис. 1.2.1).

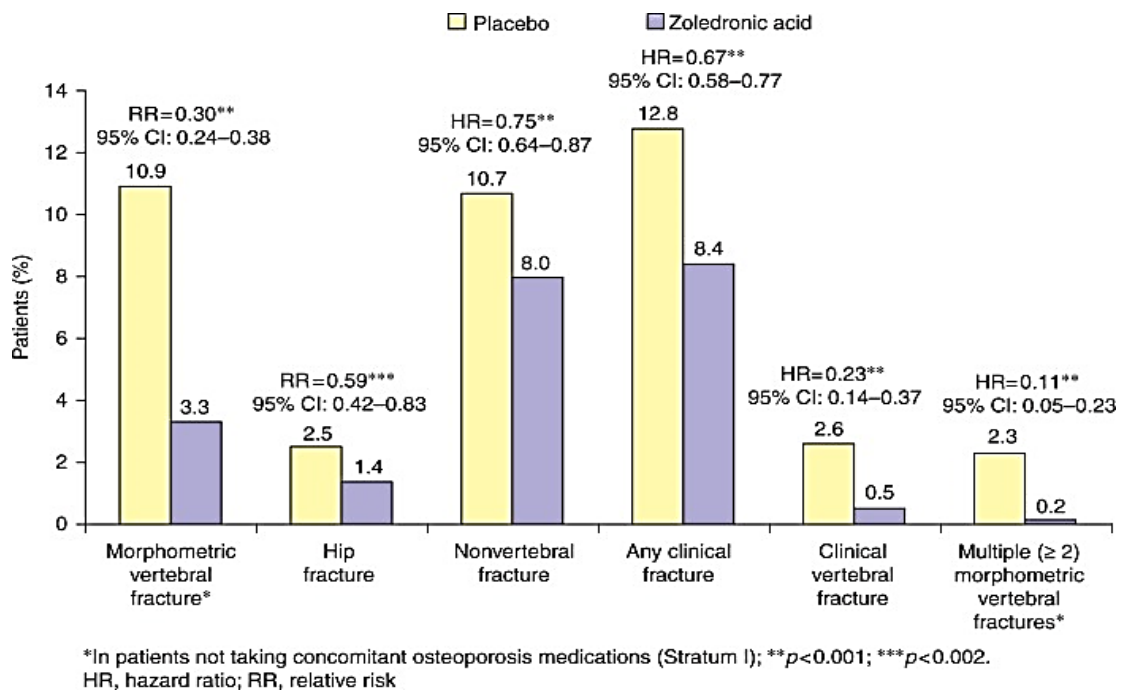


Рисунок 1.2.1. Відносний ризик виникнення переломів у дослідженні одноразового щорічного застосування золедронової кислоти [5 мг] порівняно з плацебо у жінок з постменопаузальним остеопорозом (HORIZON-PFT) [Black et al. 2007].

Зі старінням населення світу поширеність остеопорозу зростає. Вона порівнянна або перевищує частоту, спричинену різними хронічними неінфекційними захворюваннями. БФ є найбільш широко використовуваними препаратами для лікування остеопорозу.

Сильні сторони дослідження очевидні у всебічному включенні суттєвих досліджень та інноваційній оцінці ефективності золедронової кислоти. Вона поєднує маркери кісткового обміну та функціональні показники з МЩК (мінеральна щільність кісток). Оцінка профілю безпеки золедронової кислоти посилює докази її клінічне застосування.

Метааналіз пропонує оцінку клінічної ефективності та безпеки золедронової кислоти у пацієнтів з остеопорозом, охоплює інтеграцію МЩК, маркерів кісткового обміну, функціональних показників.

Результати показують, що у пацієнтів з остеопорозом при лікуванні золедроновією кислотою, спостерігається збільшення МЩК, що підтверджує ефективність препарату у збільшенні МЩК. Повідомили про незначне збільшення МЩК шийки стегнової кістки у пацієнтів групи золедроновієї кислоти. Ця різниця не була статистично значущою ($p = 0,485 > 0,05$). Спостерігали збільшення МЩК загального кульшового суглоба в групі золедроновієї кислоти. Різниця не була статистично значущою ($p = 0,88, > 0,05$). Розміри вибірки відповідних досліджень були відносно невеликими, з 43 та 54 учасниками. Відсутність суттєвих відмінностей між групами в цих дослідженнях потенційно можна пояснити обмеженими розмірами вибірки.

Оцінка маркерів кісткового обміну CTX, BSAP та P1NP, у групі золедроновієї кислоти виявила помітне зниження маркерів кісткового обміну. Ці результати узгоджуються з результатами попередніх досліджень. Оцінена за допомогою CTX резорбція кісткової тканини в групі золедроновієї кислоти знизилася через 12 та 24 місяці ($P < 0,05$). У групі плацебо вона зросла через 12 та 24 місяці (0,068 та 0,070 нмоль/л) ($P < 0,05$).

Маркер кісткоутворення P1NP показав зниження на 21,9 та 20,4 мкг/л у групі лікування ($P < 0,01$). Також спостерігали значне зниження всіх трьох біохімічних маркерів кісткового обміну в групі золедроновієї кислоти.

На момент оцінювання рівні CTX, BSAP та P1NP у групі золедроновієї кислоти знизилися на 59%, 30% та 58% (95% ДІ, від 55 до 60) відповідно.

CTX служить маркером резорбції кісткової тканини. BSAP та P1NP є показниками формування кісткової тканини.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЗОЛЕДРОНОВОЇ КИСЛОТИ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Метод синтезу ЗОЛЕДРОНОВОЇ КИСЛОТИ:

Синтез золедронової кислоти Z включає реакцію похідної кислоти або її солі із селективним р-реагентом фосфорною кислотою (H_3PO_4), фосфористою

кислотою (H_3PO_3), трихлоридом фосфору (PCl_3), оксихлоридом фосфору (POCl_3), трифосгеном, мезилхлоридом у присутності відповідного розчинника або за відсутності. Після фосфорилування, реакційну суміш гідролізували шляхом кип'ятіння зі зворотним холодильником у воді або розчині HCl , а подальші процеси обробки привели до виділення Z.

Класичний метод: Використовує PCl та H_3PO_4 з імідазол-1-іл-оцтовою кислотою (IAA) у розчинниках - сульфолан, часто стикаючись з проблемами очищення та токсичності розчинника. Більш екологічні розчинники: діетилкарбонат (DEC), метансульфонову кислоту (MSA) або PEG-400 для підвищення екологічності.

Спрощення процесу: відмова від проблемних розчинників (хлорбензол) та розробка простіших методів виділення липкої суміші продуктів. Дослідження, опубліковані на ScienceDirect, SpringerLink та NCBI, детально описують конкретні вдосконалення процесів та підходи до зеленої хімії (рис. 2.1.1).

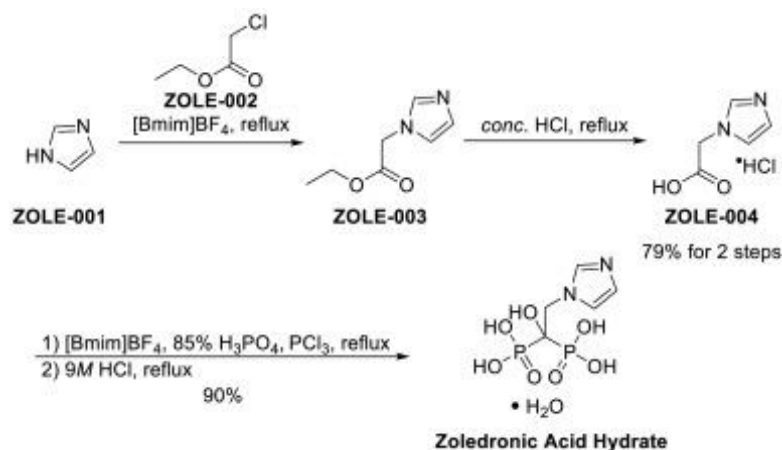
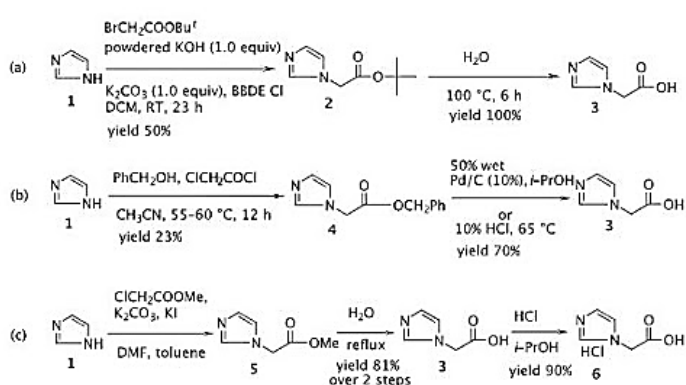


Рисунок 2.1.1. Синтез гідрату золедронової кислоти.

Бісфосфонати (БФ) – аналоги пірофосфату. Кисень у Р–О–Р замінено вуглецем, що призводить до метаболічно стабільної структури Р–С–Р. Памідронат - БФ другого покоління, став відправною точкою для масштабних досліджень SAR. Зміни структури памідронату призводять до помітного покращення потенціалу пригнічення резорбції остеокластів. Золедронова кислота, найпотужніша похідна, має ED50 0,07 мг/кг в аналізі TPTX in vivo. Вона демонструє найвище терапевтичне співвідношення при порівнянні пригнічення резорбції з пригніченням мінералізації кісток, чудову ниркову переносимість (рис. 2.1.2).



Scheme 1: Reported methods for the synthesis of imidazol-1-yl-acetic acid (3) [8-10].

Рисунок 2.1.2. Синтез золедронової кислоти.

Описано однореакторний синтез золедронової кислоти (рис. 2.1.3, 2.1.4).

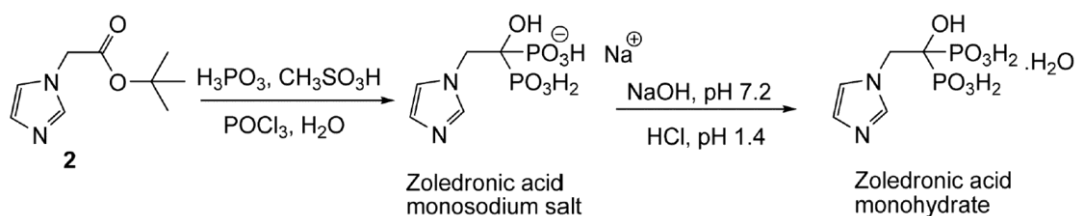


Рисунок 2.1.3. Синтез моногідрату золедронової кислоти.

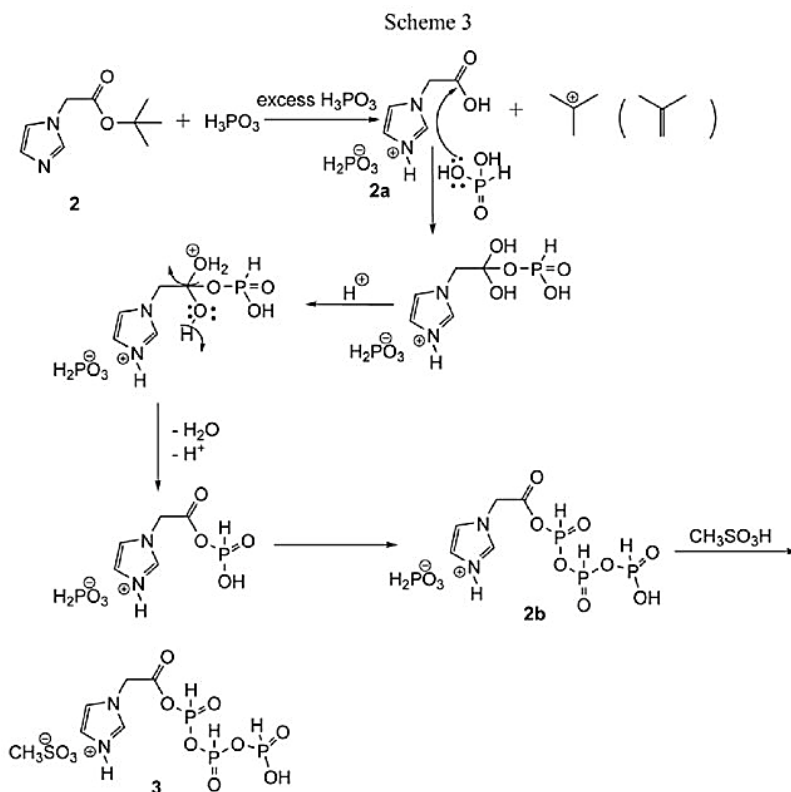


Рисунок 2.1.4. Синтез золедронової кислоти.

Усі бісфосфонати мають фосфат-вуглець-фосфатну структуру з бічними ланцюгами. Бічні ланцюги надають різні властивості, які впливають на здатність резорбувати кістку з широким діапазоном потенцій. Порівняно з етидронатом, алендронат у 100 разів потужніший. Золедронова кислота – у 10 000 разів. Сполуки відрізняються щільністю зв'язування з гідроксиапатитом і зв'язуванням з ферментами в остеокластах.

Перші розроблені бісфосфонати, етидронат і клондронат, поглинаються остеокластами та метаболізуються в нефункціональні аналоги АТФ. Вони порушують кілька клітинних процесів, що призводить до апоптозу

остеокластів.

Етидронат пригнічує мінералізацію з подібною ефективністю до пірофосфату. При застосуванні довше 6 місяців він викликає остеомаліцію, і більше не використовується в клінічній практиці.

Азотвмісні бісфосфонати мають інший механізм дії. Вони зв'язуються з кістковим гідроксиапатитом. Чим міцніше вони зв'язуються, тим довше залишаються в кістці. Золедронат зв'язується з найвищою спорідненістю. Потім за ним йдуть алендронат, ібандронат, ризедронат, етидронат і клодронат. Бісфосфонати залишаються в скелеті протягом багатьох років. Період напіввиведення алендронату становить понад 10 років.

Оскільки препарати зв'язуються з кальцієм, остеокласти є основними клітинами, які піддаються впливу препаратів. Бісфосфонати потрапляють у клітину шляхом рідкофазного ендоцитозу.

Азотвмісні бісфосфонати ефективні в дозах, на кілька порядків нижчих за ті, що потрібні для етидронату. Вони не пригнічують мінералізацію до такої міри, що розвивається остеомаліція.

У великих рандомізованих клінічних дослідженнях частота остеопоротичних переломів знижується на 50% у пацієнтів, які отримують бісфосфонати. У цих дослідженнях спостерігається значне збільшення МЩК, більше покращення в хребті, ніж у стегні або променевій кістці.

Ці препарати знижують швидкість резорбції кісток шляхом прямого пригнічення остеокластів. Ці препарати запобігають переломам, оскільки вони запобігають погіршенню мікроархітектури при нелікованому остеопорозі. У біопсіях кісток мікро-КТ-аналіз показав стабільну структуру кістки у пацієнтів, які отримували ризедронат. Погіршення у пацієнтів було, які отримували плацебо. Вони послідовно збільшують щільність кісткової

тканини, зміна об'єму кісткової тканини не є суттєвою в більшості досліджень. Збільшення щільності кісткової тканини переважно зумовлене подальшою мінералізацією кісткового матриксу. Більше молекул води заміщується мінералами.

Остеобласти не пригнічуються, і кістка продовжує заповнювати порожнини резорбції, які були присутні на початку прийому препарату. Таким чином незначно збільшуючи об'єм кістки. Коли резорбція кістки припиняється, формування нових груп остеобластів зрештою зупиняється. В біоптатах пацієнтів, які отримували бісфосфонати, формування кісткової тканини на 90% нижче, ніж до терапії.

Біохімічні маркери резорбції кісток (С-телопептид та N-телопептид) знижуються після початку прийому бісфосфонатів. Маркери формування кісткової тканини (кісткова лужна фосфатаза, P1NP) знижуються протягом 6 місяців, досягають низького рівня. Дані свідчать про те, що початкове збільшення об'єму кісток було б більшим, якби початковий об'єм порожнин резорбції був високим. Це відмічалось у пацієнтів з остеопорозом з покращенням щільності кісток - більше у тих, хто мав або високі показники обміну кісток, підвищену втрату щільності кісток до лікування. Біохімічні тести показують підвищену жорсткість та збільшення зусилля, що виникає при переломі. Дослідження показало покращену міцність, виміряну за допомогою триточкового згинання. У овець з остеопорозом, спричиненим метаболічним ацидозом, золедронові кислота зменшила межу текучості, збільшила мінералізацію на поверхні кістки. Вона не змінила мережу зшивання колагену або кристалічність, виміряну за допомогою FRIR. У пацієнтів з остеопорозом та первертлюжними переломами стегна рандомізоване дослідження алендронату показало, що через 3 місяці спостерігалось дворазове збільшення крутного моменту екстракції штифтів [15-26].

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Станом на 2025 рік основними документами для аналізу золедронової кислоти є:

- Європейська фармакопея (Ph. Eur. / EP): Містить офіційну монографію (аналіз золедронової кислоти моногідрату), яка визначає методи контролю якості для використання в Європі.

- Фармакопея США (USP): стандарти (USP-NF). Видання 2025 року містить актуальні методики аналізу та вимоги до референтних стандартів.

- Британська фармакопея (BP): BP 2025 включає стандарти для британських фармацевтичних субстанцій та лікарських засобів, гармонізовані з європейськими нормами.

Національні стандарти України:

- Державна фармакопея України (ДФУ): аналіз проводиться згідно з ДФУ, яка значною мірою гармонізована з Європейською фармакопеєю.

Монографія включає такі обов'язкові перевірки:

- Ідентифікація: ІЧ-спектроскопія, ЯМР або РХ.
- Чистота: Контроль супутніх домішок, вмісту води та залишків розчинників.
- Кількісне визначення: Визначення вмісту діючої речовини методами титрування або рідинної хроматографії (РХ).
- Специфічні тести: Для інфузійних форм — стерильність, бактеріальні ендотоксини та рН

Монографія на золедронову кислоту в ДФУ – Том 2 другого видання (ДФУ 2.0). Монографія на фармацевтичну субстанцію. Гармонізована з 8-м виданням Європейської Фармакопеї [27, 28].

Для визначення концентрації та чистоти золедронової кислоти використовують фармакопейні методи:

- 1). Обернено-фазова ВЕРХ з іон-парними реагентами (RP-HPLC). Використовуються колонки C8 або C18 та рухомі фази з додаванням тетрабутиламоній броміду або триетиламіну. Детекція проводиться за допомогою УФ-детектора (при 210–220 нм).
- 2). Іонна хроматографія (IC): для прямого визначення ЗК та супутніх іонів (фосфатів, фосфітів) в ін'єкційних розчинах без складних добавок.
- 3). ВЕРХ з випарювальним детектором світлорозсіювання (ELSD): для виявлення домішок, які не поглинають УФ-світло.
- 4). HILIC (Гідрофільна хроматографія): для розділення полярних бісфосфонатів без дериватизації.
- 5). Мас-спектрометричні методи (Біоаналіз) - для виявлення наднизьких концентрацій ЗК у крові, сечі або кістковій тканині:
 - РХ-МС/МС (LC-MS/MS): з найвищою чутливістю (межа виявлення до 0,1 нг/мл).
 - Дериватизація: ЗК часто модифікують за допомогою TMS-DAM (триметилсилілдіазометану) для кращого розділення на хроматографічній колонці.
- 6). Електрохімічні та спектрофотометричні методи:
 - Вольтамперометрія: Циклічна, квадратно-хвильова та диференціальна імпульсна вольтамперометрія, визначення ЗК на основі її електрохімічної активності.
 - Диференціальна імпульсна вольтамперометрія (DPV) найбільш точна серед них для аналізу лікарських форм.

7). Спектрофотометрія з використанням комплексів: методи на основі зміни кольору метало-комплексних індикаторів (з Fe(III) та куркуміном), що дозволяє проводити візуальне або фотометричне визначення.

8). Клінічний аналіз.

- Контроль ниркової функції: вимірювання рівня креатиніну перед кожною інфузією (препарат не призначають при кліренсі <35 мл/хв).

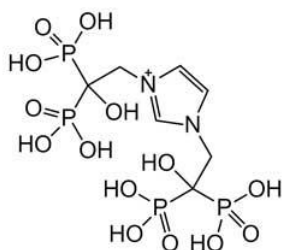
- Електролітний аналіз: Моніторинг рівнів кальцію, фосфору та магнію в сироватці крові для запобігання гіпокальціємії

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування: .



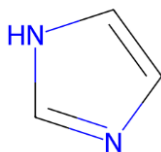
Домішка А

2-(1-(2-hydroxy-2,2-diphosphonoethyl)-
1H-imidazol-3-ium-3-yl)acetate



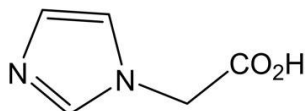
Домішка В

1H-Imidazolium, 1,3-bis(2-hydroxy-2,2-
diphosphonoethyl)



Домішка С

1H-imidazole



Домішка D

1H-imidazol-1-yl acetic acid

Рисунок 3.1. Специфіковані домішки.

Нами виконано хроматографічне дослідження методом ГХ для ідентифікації субстанції Золедренової кислоти та визначення її чистоти на вміст залишкових кількостей розчинників.

Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували газовий хроматограф: Agilent 6890A з полум'я-іонізаційним детектором (FID).

Умови хроматографування:

- колонка — HP-FFAP (нітротерефталевою кислотою модифікований поліетиленгліколь), 50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм; колонка була підключена до заднього полум'я-іонізаційного детектора (FID)
- газ-носії — азот, подача в режимі постійного потоку 2,0 мл/хв.
- Контроль режиму потоку здійснювався у режимі постійного потоку.

Температурна програма хроматографічного аналізу:

- початкова температура: 40 °C (утримання 3 хв),
- нагрівання зі швидкістю 30 °C/хв до 220 °C (утримання 3 хв),
- кінцева температура: 220 °C.
- температура інжектора — 150 °C.
- інжекція здійснювалась у режимі з діленням потоку зі співвідношенням 5:1. Об'єм ін'єкції складав 1 мкл.

Температура детектора FID — 250 °C. Детектор працював із потоком:

- водню 30 мл/хв;
- повітря 350 мл/хв;
- нітрогену 25 мл/хв.

Передній детектор ECD був вимкнений.

- час хроматографування — 12 хв

Ідентифікацію сполук проводили за часом утримування з порівнянням до стандартів.

У якості внутрішнього стандарту використовували бутанол.

Обчислення концентрацій виконували за площею піків у хроматограмах.

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для проведення досліджень методом ГХ використовували реактиви:

вода (чистоти для ГХ),

бутанол (чистоти для ГХ).

Отримані результати.

На рисунках 3.1-3.3 представлено отримані хроматограми.

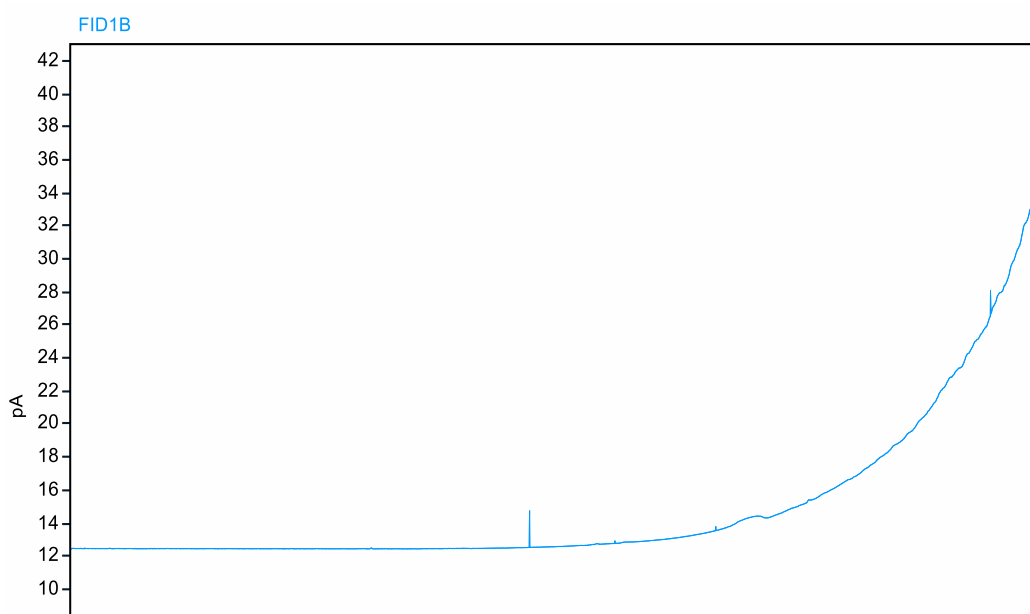


Рисунок 3.1. Хроматограма бланку.

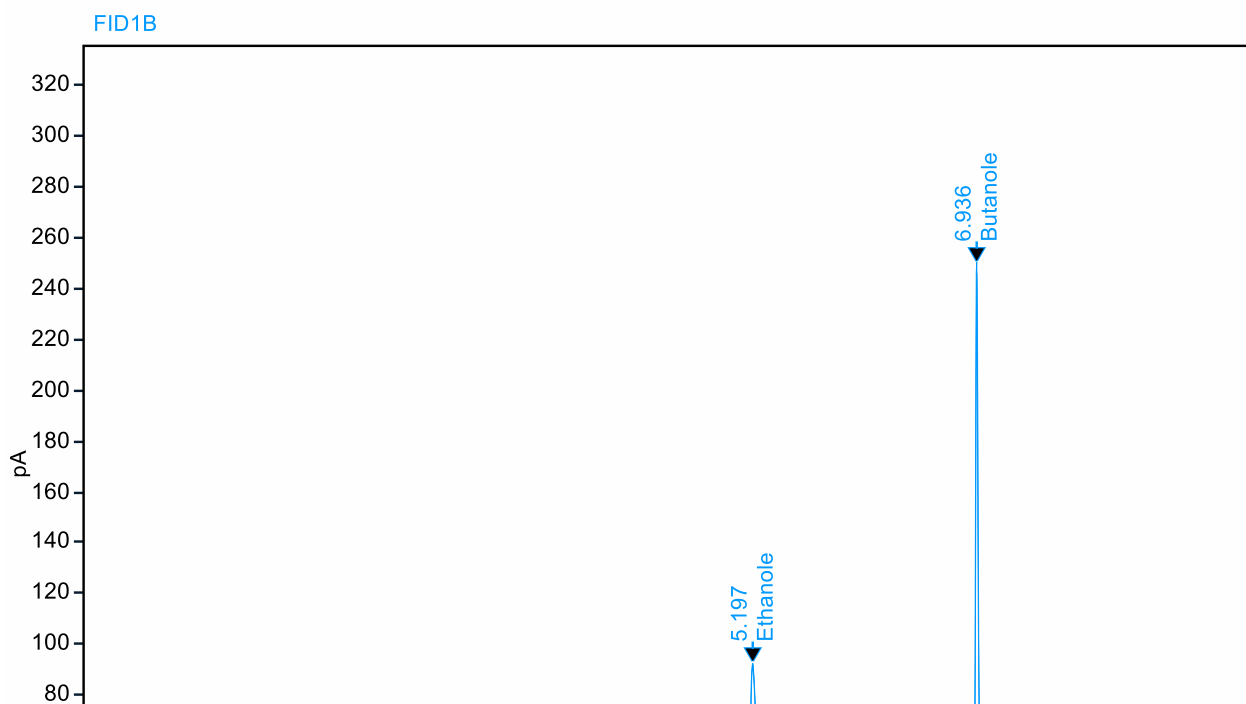


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину стандартного зразку.

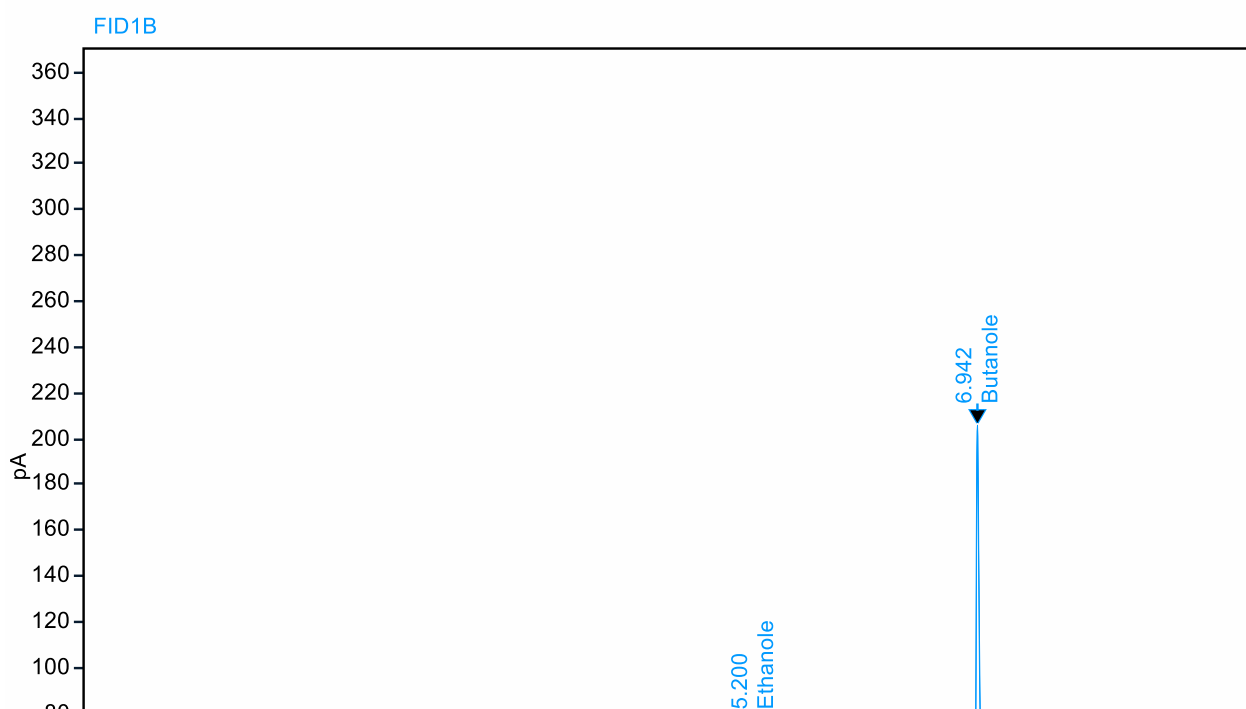


Рисунок 3.3. Хроматограма розчину випробовуваного зразку золедронової кислоти субстанції: залишкові кількості розчинників – етанол $R_t=5.7200$ хв, бутанол $R_t=6.942$ хв, пропіленгліколь $R_t=9.294$ хв.

Отримані результати представлено в таблицях 3.1, 3.2:

	стандартний розчин											
	етанол S1		S1/S2	R ($\geq 2,0$)	бутанол S2				пропіленгліколь S3		S3/S2	R ($\geq 2,0$)
	час	площа			час	площа	T	N (≥ 2000)	час	площа		
	5,197	414,559	1,140	23,6	6,936	363,494	1,6	562966	9,292	371,443	1,022	70,8
	5,193	423,911	1,145	22,9	6,939	370,381	1,7	537086	9,292	373,710	1,009	70,0
	5,195	409,426	1,144	22,2	6,939	357,838	1,9	459944	9,293	367,881	1,028	66,4
	5,196	398,865	1,146	21,3	6,937	348,074	1,8	448275	9,293	352,290	1,012	66,0
	5,196	372,700	1,151	22,7	6,934	323,788	1,8	450359	9,292	305,139	0,942	66,4
Среднее	5,195	403,892	1,145	22,5	6,937	352,715	1,8	491726	9,2924	354,093	1,003	67,9
SD			0,004									
RSD% (≤ 1.19)			0,33%									

	випробуваний розчин								
	етанол S1		S1/S2	бутанол S2		пропіленгліколь S3		S1/S2	
	час	площа		час	площа	час	площа		
	5,198	429,713	1,090	6,945	394,180	9,294	399,783	1,014	
	5,198	361,109	1,089	6,939	331,534	9,294	322,747	0,973	
	5,196	362,131	1,088	6,939	332,992	9,294	316,200	0,950	
Среднее	5,197	384,318	1,089	6,941	352,902	9,294	346,243	0,979	

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)

Внутрішній стандарт (бутанол) використовується в цьому ГХ-аналізі залишкових розчинників (етанолу та пропіленгліколю) для компенсації варіацій у пробопідготовці, інжекції та детектуванні, забезпечуючи точне кількісне визначення без потреби в абсолютних калібруваннях.

Аналіз співвідношень площ піків ($R = A_{\text{аналіту}} / A_{\text{бутанолу}}$) показує, що для етанолу та пропіленгліколю в випробувальному розчині (тесті) значення R менші, ніж у стандартному розчині з мінімальною концентрацією.

Це свідчить про те, що концентрації аналізованих речовин у тесті не перевищують встановлений ліміт ($R_{\text{тест}} \leq R_{\text{стандарт}}$, з урахуванням похибки $<1\%$ RSD).

Аналіз базується на методі внутрішнього стандарту (бутанол), де концентрація аналіту (C) пропорційна співвідношенню площ піків (R), припускаючи відносний фактор відповіді детектора ≈ 1 для подібних сполук (спиртів/гліколів) у FID.

Стандартний розчин містить мінімальну допустиму концентрацію етанолу та пропіленгліколю ($C_{\text{станд}}$), тому для відповідності препарату нормі необхідно: $R_{\text{тест}} \leq R_{\text{станд}}$.

Формула розрахунку співвідношення площ (R):

$$R = A_{\text{аналіту}} / A_{\text{бутанолу}},$$

де $A_{\text{аналіту}}$ — площа піку етанолу (S1) або пропіленгліколю (S3),

$A_{\text{бутанолу}}$ — площа піку бутанолу (S2).

Середнє R обчислюється як арифметичне середнє з n повторів (n=5 для стандарту, n=3 для тесту).

В результаті проведених досліджень встановлено, що співвідношення площ піків ($R = A_{\text{аналіту}} / A_{\text{бутанолу}}$) для етанолу та пропіленгліколю в випробувальному розчині та значення R менші, ніж у стандартному розчині з мінімальною концентрацією.

Це свідчить про те, що концентрації аналізованих речовин у тесті не перевищують встановлений ліміт ($R_{\text{тест}} \leq R_{\text{стандарт}}$, з урахуванням похибки $<1\%$ RSD). Умови хроматографування субстанції золедренової кислоти для її ідентифікації та визначення залишкових кількостей розчинників методом ГХ адаптовано для практичного використання у фармацевтичний аналіз.

Золедронова кислота

(Eur.Ph.)

Для виявлення залишкових кількостей органічних розчинників згідно з провідними фармакопеями (ДФУ, EP, USP) використовують методи:

Метод ГХ.

ДФУ 2.4.24 або USP 467.

Метод введення проби: Найчастіше використовується парофазний аналіз (Headspace). Він дозволяє аналізувати леткі розчинники, не вводячи саму речовину (золедронову кислоту) в колонку, що запобігає її забрудненню.

Детекція: полум'яно-іонізаційний детектор (FID), який є чутливим до більшості органічних сполук.

Розчинники для підготовки проби: золедронова кислота та її солі можуть мати різну розчинність, використовують воду (для водорозчинних речовин) або органічні розчинники, такі як

Золедронова кислота, субстанція

Метод ГХ

Газовий хроматограф: Agilent 6890A з полум'я-іонізаційним детектором (FID).

Колонка — HP-FFAP (нітротерефталевою кислотою модифікований поліетиленгліколь), 50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм; колонка була підключена до заднього полум'я-іонізаційного детектора (FID).

Інжекція здійснювалась у режимі з діленням потоку зі співвідношенням 5:1.

Концентрації аналізованих речовин у тесті етанол (з низьким токсичним потенціалом) та пропіленгліколь (важколеткий розчинник) не перевищують встановлений ліміт ($R_{\text{тест}} \leq R_{\text{стандарт}}$, з урахуванням похибки <1% RSD).

Внутрішній стандарт (бутанол) використовується в ГХ-аналізі залишкових розчинників (етанолу та

диметилсульфоксид (DMSO) або диметилформамід (DMF).

Класифікація розчинників:
проводяться відповідно до токсикологічної класифікації розчинників (згідно з настановою ІСН Q3С):

Клас 1: Розчинники, яких слід уникати (бензен). *Клас*

2: Розчинники, вміст яких має бути обмежений (метанол, ацетонітрил).

Клас 3: Розчинники з низьким токсичним потенціалом (етанол, ацетон).

Альтернативні методи

У специфічних випадках, коли стандартна газова хроматографія не є ефективною (для важколетких розчинників - етиленгліколь або формамід), можуть застосовуватися:

Спеціальні умови ГХ із прямим введенням проби.

Важливо: Перелік розчинників, що перевіряються, залежить від технологічного процесу виробництва конкретного

пропіленгліколю) для компенсації варіацій у пробопідготовці, інжекції та детектуванні, забезпечуючи точне кількісне визначення без потреби в абсолютних калібруваннях.

виробника субстанції золедронової кислоти. Якщо в процесі синтезу розчинники не використовувалися (зустрічається в деяких патентах на синтез золедронової кислоти), випробування на залишкові розчинники може не проводитися за умови відповідного обґрунтування.

ВИСНОВКИ

1. Адаптовано метод ГХ у аналіз субстанції золедренової кислоти з метою її ідентифікації та визначення залишкових кількостей розчинників, які використовувалися під час її синтезу та обробки.
2. В результаті проведених досліджень чистоти субстанції встановлено, що в наданих на дослідження зразках містяться розчинники етанол (з низьким токсичним потенціалом, клас 4) та пропіленгліколь (важколеткий розчинник, який потребує альтернативних методів аналізу). Внутрішній стандарт (бутанол) використовувався у ГХ-аналізі залишкових розчинників для компенсації варіацій у пробопідготовці, інжекції та детектуванні, забезпечуючи точне кількісне визначення без потреби в абсолютних калібруваннях.
3. Методики дослідження та умови хроматографування методом ГХ дозволяють виявити у випробовуваній субстанції одночасно леткий розчинник етанол та важколеткий розчинник пропіленгліколь (етанол $R_t=5.7200$ хв, бутанол (стандарт) $R_t=6.942$ хв, пропіленгліколь $R_t=9.294$ хв), який зазвичай ідентифікують альтернативними методами. Інжекції здійснювались у режимі з діленням потоку зі співвідношенням 5:1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. J.A. Kanis, N. Norton, N.C. Harvey, T. Jacobson, H. Johansson, M. Lorentzon, E.V. McCloskey, C. Willers, F. Borgström Scope 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe Arch. Osteoporosis, 16 (1) (2021), p. 82, 10.1007/s11657-020-00871-9.
2. S. Liu, Y. Tan, W. Huang, H. Luo, B. Pan, S. Wu. Cardiovascular safety of zoledronic acid in the treatment of primary osteoporosis: a meta-analysis and systematic review. Semin. Arthritis Rheum., 64 (2024), Article 152304, 10.1016/j.semarthrit.2023.152304.
3. Q. Hu, Q. Wang, F. Liu, L. Yao, L. Zhang, G. Chen. Combination of Calcitriol and zoledronic acid on PINP and β -CTX in Postoperative patients with Diabetic osteoporosis: a randomized controlled trial. Dis. Markers, 2022 (2022), Article 6053410, 10.1155/2022/6053410.
4. L. Kong, K. Zuo, L. Ma. Clinical effect of zoledronic acid in the treatment of senile osteoporosis. Pakistan J. Med. Sci., 36 (7) (2020), p. 1703, 10.12669/pjms.36.7.1964.
5. K. Lu, Y. Yin, C. Li, Y. Jin, H.Q. Shan. Efficacy of annual zoledronic acid in initial percutaneous kyphoplasty patients with osteoporotic vertebral compression fractures: a 3-year follow-up study. Osteoporos. Int., 32 (7) (2021), p. 1429, 10.1007/s00198-020-05816-z
6. E.M. Ryhänen, A.M. Koski, E. Löyttyniemi, M.J. Välimäki, U. Kiviniemi, C. Schalin-Jäntti. Postoperative zoledronic acid for osteoporosis in primary hyperparathyroidism: a randomized placebo-controlled study. Eur. J. Endocrinol., 185 (4) (2021), p. 515, 10.1530/eje-21-0322.
7. L.M. Ward, A. Choudhury, N. Alos, D.A. Cabral, C. Rodd, A.M. Sbrocchi, S. Taback, R. Padidela, N.J. Shaw, E. Hosszu, M. Kostik, E. Alexeeva, K. Thandrayen, N. Shenouda, J.L. Jaremko, G. Sunkara, S. Sayyed, R.P. Aftring, C.F. Munns. Zoledronic acid vs placebo in Pediatric glucocorticoid-induced

- osteoporosis: a randomized, double-blind, phase 3 trial. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 106 (12) (2021), Article e5222, 10.1210/clinem/dgab458.
8. B. Weng, C. Chen. Effects of bisphosphonate on osteocyte proliferation and bone formation in patients with diabetic osteoporosis. *Comput. Math. Methods Med.* (2022), 10.1155/2022/2368564.
 9. J. Zhang, L. Tan, M. Liu, T. Zhao, B. Qi. The effect of zoledronic acid combined with pkp in the treatment of osteoporotic vertebral body compression fractures. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 13 (11) (2020), p. 9073.
 10. K. Liu, G. Tan, W. Sun, Q. Lu, J. Tang, D. Yu. Percutaneous kyphoplasty combined with zoledronic acid for the treatment of primary osteoporotic vertebral compression fracture: a prospective, multicenter study. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* (2022), 10.1007/s00402-022-04557-4.
 11. De Vincentis AB, Bellelli G, Bravi M, et al. Management of Hip fracture in the older people: rationale and design of the Italian consensus on the orthogeriatric co-management. *Aging Clin Exp Res.* 2020;32(7):1393–1399. doi:10.1007/s40520-020-01574-4.
 12. Cecere AB, Toro G, De CA, et al. How to improve the outcomes of surgically treated proximal humeral osteoporotic fractures? A narrative review. *Orthop Rev.* 2020;12(2):8529. doi:10.4081/or.2020.8529.
 13. Lyu H, Yoshida K, Zhao SS, et al. Delayed denosumab injections and fracture risk among patients with osteoporosis: a population-based cohort study. *Ann Intern Med.* 2020;173(7):516–526. doi:10.7326/M20-0882
 14. Cruchelow KR, Peter ME, Chakrabarti A, et al. Denosumab treatment lapses, discontinuation, and off-treatment fracture risk: a retrospective study of patients with osteoporosis in a real-world clinical setting. *Bone.* 2023;177:116925. doi:10.1016/j.bone.2023.116925
 15. Everts-Graber J, Reichenbach S, Gahl B, et al. Risk factors for vertebral fractures and bone loss after denosumab discontinuation: a real-world

- observational study. *Bone*. 2021;144:115830.
doi:10.1016/j.bone.2020.115830
16. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Yavropoulou MP, et al. Comparative effect of zoledronate at 6 versus 18 months following denosumab discontinuation. *Calcif Tissue Int*. 2021;108. doi:10.1007/s00223-020-00785-1.
17. Kondo H, Okimoto N, Yoshioka T, et al. Zoledronic acid sequential therapy could avoid disadvantages due to the discontinuation of less than 3-year denosumab treatment. *J Bone Miner Metab*. 2020;38(6):894–902.
doi:10.1007/s00774-020-01126-w.
18. Everts-Graber J, Reichenbach S, Ziswiler HR, et al. A single infusion of zoledronate in postmenopausal women following denosumab discontinuation results in partial conservation of bone mass gains. *J Bone Miner Res*. 2020;35(7):1207–1215. doi:10.1002/jbmr.3962.
19. Solling AS, Harslof T, Langdahl B. Langdahl B. treatment with zoledronate subsequent to denosumab in osteoporosis: a randomized trial. *J Bone Miner Res*. 2020;35(10):1858–1870. doi:10.1002/jbmr.4098.
20. Makras P, Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. The duration of denosumab treatment and the efficacy of zoledronate to preserve bone mineral density after its discontinuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(10):e4155–e4162. doi:10.1210/clinem/dgab321.
21. Tutaworn T, Nieves JW, Wang Z, Levin JE, Yoo JE, Lane JM. Bone loss after denosumab discontinuation is prevented by alendronate and zoledronic acid but not risedronate: a retrospective study. *Osteoporos Int*. 2023;34(3):573–584. doi:10.1007/s00198-022-06648-9.
22. Kadaru T, Shibli-Rahhal A. Tarun Kadaru, Amal shibli-rahhal. zoledronic acid after treatment with denosumab is associated with bone loss within 1 year. *J Bone Metab*. 2021;28(1):51–58. doi:10.11005/jbm.2021.28.1.51.

- 23.Grassi G, Chiodini I, Palmieri S, et al. Bisphosphonates after denosumab withdrawal reduce the vertebral fractures incidence. *Eur J Endocrinol.* 2021;185(3):387–396. doi:10.1530/EJE-21-0157.
- 24.Anastasilakis AD, Makras P, Polyzos SA, Papapoulos SE. The five-year effect of a single zoledronate infusion on bone mineral density following denosumab discontinuation in women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2023;113(4):469–473. doi:10.1007/s00223-023-01119-7.
- 25.Everts-Graber J, Reichenbach S, Gahl B. Effects of zoledronate on bone mineral density and bone turnover after long-term denosumab therapy: observations in a real-world setting. *Bone.* 2022;163:116498. doi:10.1016/j.bone.2022.116498.
- 26.Everts-Graber J, Lehmann T. Bone Mass Gains After One Denosumab Injection Followed by Zoledronate. *J Clin Densitom.* 2022;25(3):293–298. doi:10.1016/j.jocd.2022.03.001.
- 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, стор. 106-107.
- 28.European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.1I: 2615-2616.

SUMMARY

Kopytsia Yevfaliia

DETERMINATION OF RESIDUAL AMOUNTS OF SOLVENTS IN THE COMPOSITION OF THE SUBSTANCE ZOLEDRONIC ACID BY GAS CHROMATOGRAPHY

The department of medicinal chemistry and toxicology

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

Keywords: zoledronic acid, substance, residual amounts of solvents. medicinal product, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Zoledronic acid is a drug, a bisphosphonate. The nomenclature name is 1-Hydroxy-2(1H-imidazol-1-yl)ethylidene]bis[phosphonic acid. It has a selective effect on bone tissue, inhibits the activity of osteoclasts. It is used to treat osteoporosis.

Materials and methods. Objects of research are substance of zoledronic acid and its standard samples. Research subject: development of conditions for GC study of pharmaceutical analysis of zoledronic acid substance. Methods: Agilent 6890A with flame ionization detector (FID), column – HP-FFAP (nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol), 50 m × 0.32 mm × 0.5 μm; the column was connected to the rear flame ionization detector (FID), carrier gas – nitrogen, constant flow rate 2.0 mL/min. Flow control was performed in constant flow mode; OpenLab CDS program.

Results. The GC method was adapted to the analysis of the substance zoledronic acid in order to identify it and determine the residual amounts of solvents used during its synthesis and processing. It was found that the samples submitted for analysis contained the solvents ethanol (with low toxic potential, class 3) and propylene glycol (a volatile solvent that requires alternative analysis methods).

Conclusions. The research methods and GC chromatography conditions were adapted, which allowed us to simultaneously detect the volatile solvent ethanol and the highly volatile solvent propylene glycol in the test substance (ethanol $R_t=5.7200$ min, butanol (standard) $R_t=6.942$ min, propylene glycol $R_t=9.294$ min), which is usually identified by alternative methods.

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