

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ

О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ

(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Ідентифікація та кількісне визначення дутастериду і
бутилгідрокситолуолу 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)

Челик Андрій Володимирович

(прізвище та ініціали)

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

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: **проф., д.м.н. Ніженковська І.В.**

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ СТЕРОЇДІВ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови	10
1.2. Біологічна активність	15
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ СТЕРОЇДІВ.....	19
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	19
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	25
 ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
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. Дутастерид — лікарський засіб, азастероїдний інгібітор 5 α -Редуктази I, II и III типа. Дутастерид використовується для лікування доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ) у чоловіків, для лікування алопеції за чоловічим типом, акне, при трансгендерній терапії в комплексі зі спіронолкатоном та естрогеном. Перед призначенням препарату важливе провести додаткове обстеження, оскільки інгібітори 5 α -редуктази можуть приховувати симптоми злоякісних новоутворень передміхурової залози. При алопеції за чоловічим типом дутастерид призначають у дозі 0,5 мг на добу. Дутастерид і Фінастерид – є одними з найефективніших засобів для боротьби з алопецією за чоловічим типом. Більш висока ефективність дутастериду порівняно з фінастеридом пояснюється тим, що інгібування 5 α -редуктази та зниження вироблення дигідротестостерону (ДГТ) у волосяних фолікулах відбувається при використанні дутастериду.

Дутастерид використовується для лікування випадання волосся за жіночим типом та гірустизму у жінок, як компонент гормональної терапії при трансгендерному переході разом із спіронолактоном та естрогеном. Дутастерид відноситься до хімічного класу 4-азастероїдів (4-azasteroid). Це синтетична органічна сполука, яка має структурну схожість з природними стероїдами. Його відносять до інгібіторів 5-альфа-редуктази: основний механізм дії, який полягає в блокуванні перетворення тестостерону на дигідротестостерон (ДГТ); до засобів для лікування доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ).

Бутилгідрокситолуол (ВНТ) є допоміжною речовиною і входить до складу лікарських засобів, які містять дутастерид. У препаратах «Дутастерид-Віста» або «Дутастерид/Тамсулозин-Віста», бутилгідрокситолуол (E 321) використовується як допоміжна речовина (антиоксидант) [1-8].

Розлади випадіння волосся, андрогенетична алопеція (AGA) та вогнищева алопеція (AA), є одними з найпоширеніших дерматологічних захворювань. Ці розлади можуть бути наслідком генетичної схильності, аутоімунних реакцій, гормонального дисбалансу, стресових факторів навколишнього середовища. Випадіння волосся вважається косметичною проблемою, воно може впливати на самооцінку, психічне здоров'я та загальну якість життя. Сучасні терапевтичні можливості залишаються обмеженими за ефективністю та обсягом застосування.

Існуючі фармакологічні методи лікування – міноксидил (відкриває калієві канали) та фінастерид (інгібітор 5α -редуктази), продемонстрували частковий успіх в уповільненні випадіння волосся. Однак їхній вплив тимчасовий. Багато пацієнтів відчують неадекватну відповідь або небажані побічні ефекти. В останні роки досягнення в регенеративній медицині та розробці цільових ліків проклали шлях для нових терапевтичних стратегій.

Розуміння ключових молекулярних шляхів, що регулюють цикли росту волоссяних фолікулів, активність стовбурових клітин та імунні реакції, має велике значення для розробки ефективних та персоналізованих методів лікування у випадках порушень випадіння волосся. Досліджуються нові підходи до розробки ліків від випадіння волосся, нових низькомолекулярних інгібіторів, біологічних препаратів та терапії на основі стовбурових клітин [9-12].

Міноксидил – це засіб, що відкриває калієві канали, що сприяє вазодилатації. Він продовжує анагенову фазу циклу росту волосся, стимулює активність дермальних клітин. Схвалений FDA у 1988 році для чоловіків і жінок, які піддаються лікуванню анафілактичними захворюваннями (AGA), міноксидил доступний у вигляді розчину або піни для місцевого застосування. Його точний молекулярний механізм залишається лише частково вивченим. Повідомлялося, що уражена ділянка зменшилася у 561 з 904 учасників

дослідження (62,0%). Густота волосся збільшується приблизно на 10–30%, а товщина волосся покращується при лікуванні міноксидилом. Припинення прийому призводить до відновлення випадіння волосся. Поширені побічні ефекти включають подразнення шкіри голови, свербіж та небажаний ріст волосся на обличчі або гіпертрихоз. Низькі дози міноксидилу перорально стають альтернативою місцевому застосуванню. Дослідження показують, що він забезпечує краще дотримання пацієнтами режиму лікування. Повідомлялося про побічні ефекти – низький кров'яний тиск, набряки та надмірний ріст волосся в небажаних ділянках [9-15].

Волосяні фолікули шкіри голови демонструють високий рівень експресії AR. Тестостерон та ДГТ зв'язуються з рецепторами, запускаючи молекулярні сигнали. Вони скорочують цикл росту волосся. ДГТ скорочує фазу анагену. Це означає, що волосся перестає рости та швидше випадає. З часом волоссяні фолікули виробляють лише пушкове волосся. ДГТ посилює запалення та сприяє фіброзу у волоссяних фолікулах. Це ускладнює відновлення фолікулів, прискорюючи постійну втрату волосся.

Інастерид та дутастерид пригнічують ферменти 5 α -редуктази. Вони блокують перетворення тестостерону на дигідротестостерон (ДГТ) — важливий медіатор у мініатюризації волоссяних фолікулів. Знижуючи рівень ДГТ у шкірі голови, препарати уповільнюють прогресування випадіння волосся та сприяти повторному росту. Дослідження показують, що 5 α -редуктази 1 та 3 типу (SRD5A1 та SRD5A3) експресуються у кератиноцитах волосся. Активація ДГТ рецептора AR у ДПК запускає мініатюризацію волосся [16-18].

Під час синтезу субстанції Дутастериду можливе утворення побічних продуктів синтезу, а під час очистки субстанції часто залишаються специфічні і неспецифічні домішки. Бутилгідрокситолуол, також може містити домішки, що негативно впливає на якість лікарських засобів.

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанції Дутастериду. Дутастериду можна проаналізувати за монографією 01/2017:2641 Європейської Фармакопеї. Супровідні речовини (специфіковані і неспецифіковані домішки) визначають методом рідинної хроматографії (РХ). Ідентифікацію виконують методом ІЧ-спектрофотометрії [27, 28]. Бутилгідрокситолуол визначають за ДФУ. Супровідні домішки у складі цієї субстанції визначають методом ТШХ.

Таким чином, виходячи із наявності методик дослідження лікарського засобу Дутастериду, який виконується методом РХ, в Європейській Фармакопеї, постає завдання осучаснити методи аналізу субстанції, адаптувати умови та методики дослідження більш ефективним методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в умовах аналізу двохкомпонентної суміші 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.

Актуальним завданням експериментальної роботи є впровадження високоселективного методу ВЕРХ для ідентифікації у досліджуваній двохкомпонентної суміші субстанцій Дутастериду та допоміжної речовини Бутилгідрокситолуол та визначення їх чистоти.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є ідентифікація та визначення чистоти методом ВЕРХ двохкомпонентної суміші субстанцій АФІ Дутастериду та допоміжної речовини Бутилгідрокситолуол, адаптація умов хроматографування випробовуваної суміші субстанцій.

Завдання експериментального дослідження:

- ідентифікувати методом ВЕРХ АФІ Дутастерид та допоміжну речовину Бутилгідрокситолуол у складі двохкомпонентної суміші субстанцій;
- визначити чистоту досліджуваної двохкомпонентної суміші субстанцій хроматографічним методом (ВЕРХ) (присутність супровідних речовин);
- адаптувати методики дослідження та розробити умови дослідження, які дозволять захистити структуру молекули речовин від хімічної деградації.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1200 з DAD детектором, колонка – ZORBAX SB-CN, 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 АФІ Дутастерид та допоміжну речовину Бутилгідрокситолуол у складі двохкомпонентної суміші субстанцій, розробити умови, які дозволять зберегти хімічну структуру від хімічної деградації.

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

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

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 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

Дутастерид відноситься до хімічного класу 4-азастероїдів (4-azasteroid) та має назву за міжнародною номенклатурою 1S,3aS,3bS,5aR,9aR,9bS,11aS)-*N*-[2,5-ди(трифторметил)феніл]-9a,11a-диметил-7-оксо-1,2,3,3a,3b,4,5,5a,6,9b,10,11-додекагідроендено[5,4-*f*]хінолін-1-карбоксомід (рис. 1.1.1).

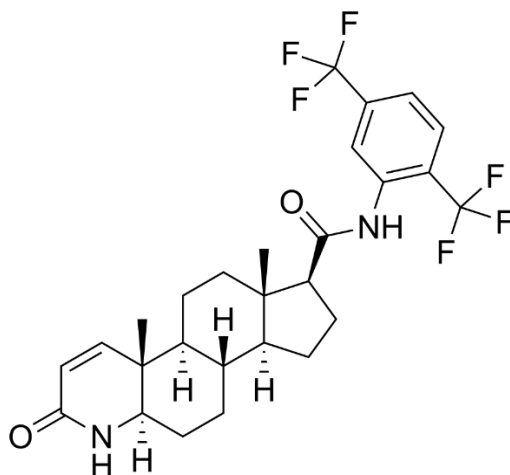


Рисунок 1.1.1. Дутастерид, хімічна формула.

Андрогенна алопеція є найпоширенішою причиною системного випадіння волосся у схильних до цього чоловіків. Це багатфакторне та полігенетичне захворювання, яке характеризується поступовим зменшенням анагенової фази та збільшенням телегенетичної фази. Це призводить до прогресуючої мініатюризації фолікулів. Термінальне волосся перетворюється на пушкове волосся. З цим пов'язане різноманітне поєднання генетичних факторів, ендокринних аномалій, циркулюючих андрогенів, ліків, дієти та мікрозапалення. Андрогени є основними модуляторами чоловічої АГА. Їхня

специфічна дія на жіночу АГА є не відомою. Циркулюючий тестостерон перетворюється 5 α -редуктазою на 5 α -дигідротестостерон. Це призводить до зменшення фази анагену та передбачає перехід до фази катагену в складному процесі - апоптоз, мікрозапалення.

У лікуванні АГА використовується мезотерапія з інгібіторами 5 α -редуктази дутастеридом. Дутастерид, інгібітор 5 α -редуктази другого покоління, є потужнішим за фінастерид. Ефективність та безпека мезотерапії волосся дутастеридом були зареєстровані різними групами. Найкращі результати були досягнуті, коли ця сполука використовувалася в поєднанні з іншими речовинами. Результат можна пояснити багатофакторною патофізіологією АГА. Вона включає чутливість волосяних фолікулів до DHT та мікрозапалення. Мультитерапевтичний підхід здається більш ефективним у лікуванні АГА [17-19] (рис. 1.1.2).

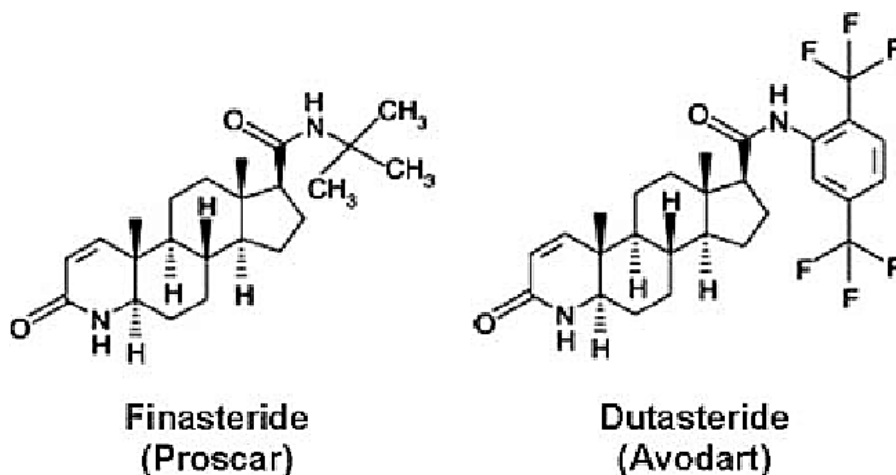


Рисунок 1.1.2. Хімічні формули Дутастериду та Фенастериду.

Канцерогенез передміхурової залози пов'язаний зі змінами андрогенних рецепторів (AR). Це перетворює її з паракринної залежності від стромальної сигналізації на аутокринну сигналізацію для проліферації, виживання клітин раку передміхурової залози.

Злоякісна конверсія зумовлена змінами функції. В них AR активує нові геномні та негеномні сигнальні шляхи, які відсутні в нормальних

епітеліальних клітинах передміхурової залози.

Під час прогресування відбуваються молекулярні зміни, які дозволяють активувати унікальні сигнальні шляхи андроген-рецепторів (AR) у середовищі з низьким рівнем лігандів андрогенів після терапії андрогенної абляції.

Сигнальні шляхи є результатом поєднання AR з низкою геномних (транскрипційні коактиватори) або негеномних (кіназа коактиватора стероїдних рецепторів) сигнальних молекул.

Для запобігання смерті після невдалого результату стандартної терапії андрогенної абляції необхідна комбінаторна терапія. Вона спрямована на андрогенні рецептори (CART-терапія) та пригнічує кілька точок у каскаді сигналізації AR.

Для розробки такої CART-терапії використовують серію агентів, спрямованих на певні точки каскаду AR у поєднанні зі стандартною абляційною терапією андрогенами.

Це необхідно для визначення найменшої кількості агентів для досягнення максимального терапевтичного ефекту проти раку простати. Різноманітні нові агенти можна поєднувати з аналогами лютеїнізуючого гормону-рилізінг-гормону:

- інгібітори 5-альфа-редуктази для пригнічення перетворення тестостерону у потужний андроген, дигідротестостерон;
- аналоги гелданаміцину для зниження регуляції білка AR,
- «об'ємні» стероїдні аналоги для зв'язування з AR, запобігання взаємодії з іншими коактиваторами молекулами,
- інгібітори кіназ низьких молекул для пригнічення MEK [19-23] (рис. 1.1.3, 1.1.4).

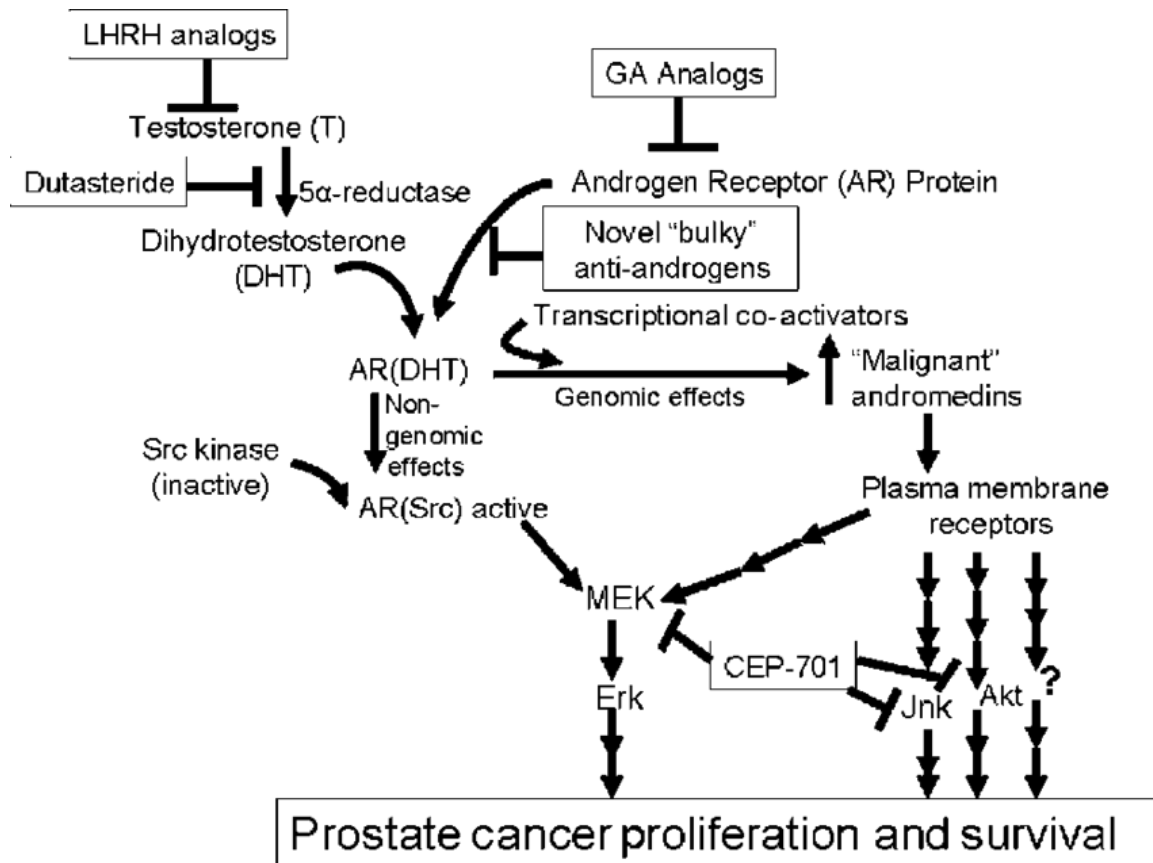


Рисунок 1.1.3. Шляхи рецепторів андрогенів у клітинах раку передміхурової залози, позначення місць дії для специфічних терапевтичних інгібіторів низьких молекул.

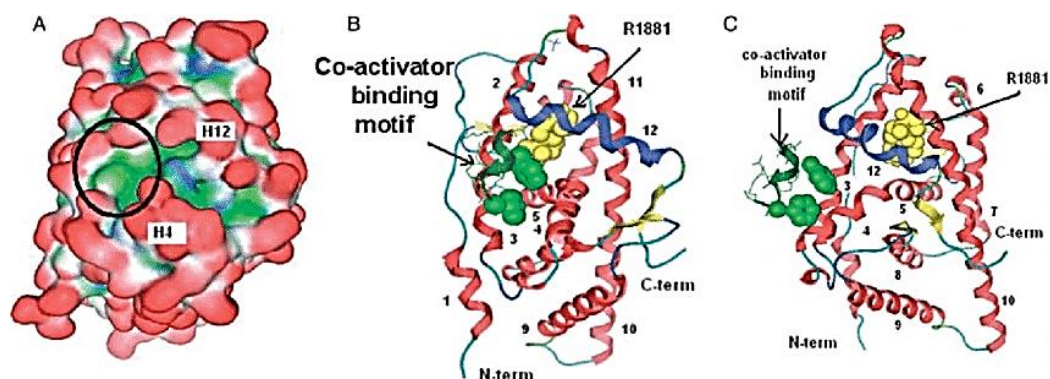


Рисунок 1.1.4. Діаграма заповнення простору AR LBD зі зв'язаним R1881. Розташування спіралей 12 та 4. Канавка зв'язування коактиватора AF-2 розташована в області всередині кола. Стрічкова діаграма AR–LBD. Зв'язаний

ліганд R1881. В, тільки повернуте на 90°. С-термін, карбокси-кінець; N-термін, аміно-кінець.

Дутастерид використовується для лікування випадіння волосся у чоловіків, які не реагують на фінастерид. Він схвалений FDA для лікування доброякісної гіпертрофії передміхурової залози.

Він діє шляхом пригнічення ферменту 5-альфа-редуктази I і II типу. Він приблизно в 3 рази потужніший за фінастерид і може знизити рівень ДГТ у сироватці крові. Він має значно довший період напіввиведення, ніж фінастерид. Його слід розглядати лише для чоловіків. Як і фінастерид, він є тератогенним для жінок [23- 26].

Зі старінням аномальне доброякісне зростання передміхурової залози призводить до доброякісної гіперплазії передміхурової залози. Передміхурова залоза є тканиною-мішенню для андрогенів, перетворює тестостерон на 5 α -дигідротестостерон (5 α -ДГТ), потужний андроген. Через активність 5 α -редуктази (5 α -Р) пригнічення ключової метаболічної реакції визначено мішень для розробки ліків для лікування симптомів ДГПЗ. Фінастерид і дутастерид розроблені як специфічні інгібітори 5 α -редуктази (5 α -РІ), були схвалені Управлінням з контролю за продуктами і ліками США для лікування симптомів ДГПЗ. Засоби довели свою корисність у зменшенні затримки сечі, мінімізації хірургічного втручання у пацієнтів із симптомами ДГПЗ.

Ізоформи 5 α -РІ широко поширені в багатьох тканинах (ЦНС). Пригнічення цих ферментів призводить до блокування синтезу ключових гормонів та нейроактивних стероїдів. Це спричиняє низку побічних ефектів – втрату або зниження лібідо, еректильну дисфункцію, оргастичну дисфункцію, збільшення випадків раку простати (високого ступеня за шкалою Глісона), серцеву недостатність, депресію. Відзначено значні та серйозні побічні ефекти 5 α -РІ, фінастериду та дутастериду, на сексуальне здоров'я, судинне здоров'я, психологічне здоров'я.

1.2.Біологічна активність

Фінастерид схвалений FDA для лікування чоловічого облісіння AGA та призначається перорально. У пацієнтів чоловічої статі з AGA спостерігається значне відновлення росту волосся. Фінастерид неефективний при аутоімунному випадінні волосся. Фінастерид збільшив густоту волосся. У більшості пацієнтів спостерігалось збільшення товщини волоссяного стрижня. Понад 80% чоловіків зберегли своє існуюче волосся. Фінастерид ефективніший за міноксидил для запобігання випадінню волосся.

Дослідження показують, що поєднання фінастериду та міноксидилу забезпечує кращі результати.

Доза фінастериду 1 мг є оптимальною для лікування чоловічого облісіння. Побічні ефекти - еректильна дисфункція, зниження лібідо та гінекомастія виникають у деяких чоловіків. Дутастерид (0,5 мг) був ефективнішим за фінастерид (1 мг) у збільшенні кількості волосся (до 1,5 разів).

Фінастерид пригнічує лише 5- α -редуктазу II типу. Дутастерид пригнічує 5- α -редуктазу I і II типу. Це робить його більш ефективним у зниженні рівня дигідротестостерону. Завдяки тривалішому періоду напіввиведення, дутастерид забезпечує тривалий ефект.

Алопеція – це аутоімунне захворювання, при якому імунна система помилково атакує волоссяні фолікули. Це призводить до раптового випадіння волосся. Такий стан викликає круглі або овальні лисини на шкірі голови. У важких випадках може призвести до повної втрати волосся (тотальна алопеція), повної втрати волосся на тілі (універсальна алопеція).

Інгібітори JAK блокують активність ферментів Янус-кінази, перериваючи запальні сигнальні шляхи. Вони сприяють мініатюризації та випадінню волоссяних фолікулів.

Клінічні випробування показали, що барицитиніб може призвести до значного відновлення росту волосся. Деякі пацієнти досягли щонайменше 50% покращення порівняно з плацебо. Деуруксолітиніб, селективний інгібітор JAK1/JAK2, був схвалений FDA для лікування тяжкого atopічного аорти (АА) у дорослих.

Значне відновлення росту волосся на шкірі голови спостерігалось приблизно у 65–70% пацієнтів, які отримували деуруксолітиніб. На відміну від JAK1, який експресується в багатьох тканинах, експресія JAK3 значною мірою обмежується гемопоетичними клітинами. Селективне пригнічення сигналізації JAK3 за допомогою ритлецитинібу є достатнім для запобігання та зворотного розвитку АА.

65–70% пацієнтів у клінічних випробуваннях досягли 50% відновлення росту волосся на шкірі голови. Було відзначено покращення стану брів та вій [26]. Розробляють інгібітори JAK як засоби лікування АА.

Анаболічні андрогенні стероїди (ААС), «стероїдні андрогени», – це категорія сполук, що включає синтетичні похідні і ендогенно вироблені андрогени. Вони використовуються як речовини, що підвищують продуктивність. Їхній короткостроковий вплив на фізіологію м'язів добре задокументований. Ключовим висновком є порушення вироблення гормонів, що призводить до оборотних та незворотних змін. Існують дискусії щодо поширеності побічних ефектів. Дослідження вказують на спектр соматичних та психіатричних наслідків. ААС не тільки впливають на структуру м'язів, але й впливають на настрій, поведінку та сприйняття тіла.

Зміни печінки викликають занепокоєння, зокрема, оксидативний стрес пов'язаний з гепатотоксичністю. Репродуктивні ускладнення - атрофія гонад та безпліддя є поширеними. Серцево-судинні ефекти викликають особливе занепокоєння: ААС пов'язані з гіпертензією, дисліпідемією та підвищеним ризиком тромбозів. Це сприяє серцево-судинній захворюваності та смертності. ААС підвищують ризик раку, потенційно прискорюючи

канцерогенез у тканин. Наголошується на необхідності комплексних ініціатив у сфері охорони здоров'я для зменшення шкоди, регулярні цілеспрямовані втручання для користувачів ААС.

Розуміння складної взаємодії біологічних механізмів та системних ефектів має вирішальне значення для інформування про клінічне лікування та профілактичні заходи (рис. 1.2.1)

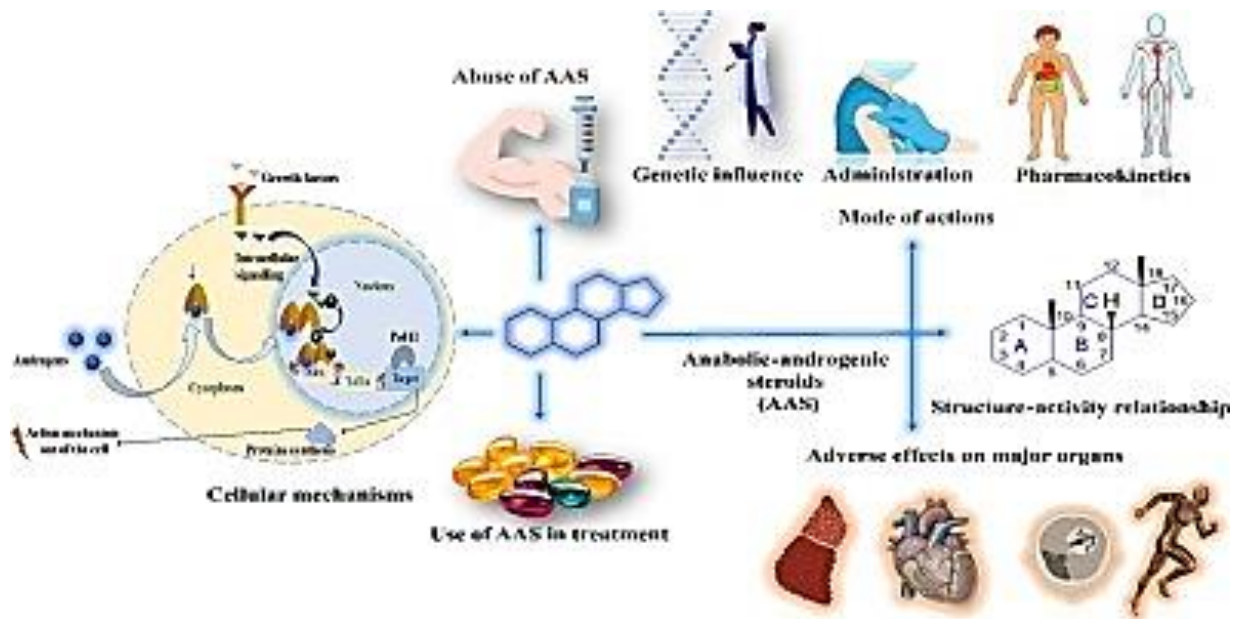


Рисунок 1.2.1. Вплив ААС.

Вживання ААС широко поширене. Близько 10 мільйонів користувачів приймають ААС. Поширеність найвища на Близькому Сході – вживають 21,7% людей. Серед розвинених країн найвищі показники поширеності мають Сполучені Штати, Британія, Скандинавія.

Максимальний інклюзивний рівень захворюваності на вживання ААС встановлений серед спортсменів-любителів (18,4%). Далі йдуть спортсмени (13,4%), ув'язнені (12,4%). Найнижчий рівень поширеності матиме населення, яке не займається спортом – 1%.

Точну кількість споживачів ААС важко з'ясувати. Вважається, що поширеність у всьому світі становить від 1% до 5%. Важко встановити справжню поширеність вживання ААС через недостатнє повідомлення. Невелика кількість запитів також показує, що більшість користувачів ААС є професійними спортсменами.

При використанні в медичних цілях ААС безпечні. При зловживанні вони можуть спричинити захворювання, які впливають на багато різних систем - на опорно-рухову, ендокринну, імунологічну, ниркову та нейропсихіатричну.

Користувачі ААС описують різні демографічні показники та моделі вживання. Вживання ААС без рецепта є основним фокусом.

Дослідження показали, що вживання нелегальних ААС підлітками знижується завдяки ефективності освіти.

ААС складаються з кількох модифікованих синтетичних аналогів тестостерону, щоб мати більше анаболічних, ніж андрогенних результатів. Професійні спортсмени використовують ААС для покращення своєї фізичної форми або продуктивності. Співвідношення анаболічних та андрогенних стероїдів збільшується разом із силою анаболічної дії ААС.

Природні і синтетичні гормони називаються на основі хімічної структури та біологічної дії. Анаболічні андрогенні стероїди є одними з них.

В ААС анаболічна частина вказує на властивості нарощування скелетних м'язів. Андрогенна частина означає підтримку чоловічих вторинних статевих ознак.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ПОХІДНИХ СТЕРОЇДІВ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Метод синтезу Дутастериду:

(5 α ,17 β)-N-[2,5-біс(трифторметил)феніл]-3-оксо-4-аза-андростан карбоксамід обробляють бензоїлхлоридом у присутності 4-диметиламінопіридину, отримували похідну N-бензоїлдигідродутастериду. Силілували амідної групи N-бензоїлдигідродутастериду з використанням N,O-біс(триметилсиліл)-трифторацетаміду, отримували енол, відбувалася реакція вуглецю C-2 силільованої сполуки з 2,3-дихлор-5,6-диціано-1,4-бензохіноном, утворювався проміжний комплекс (рис. 2.1.1).

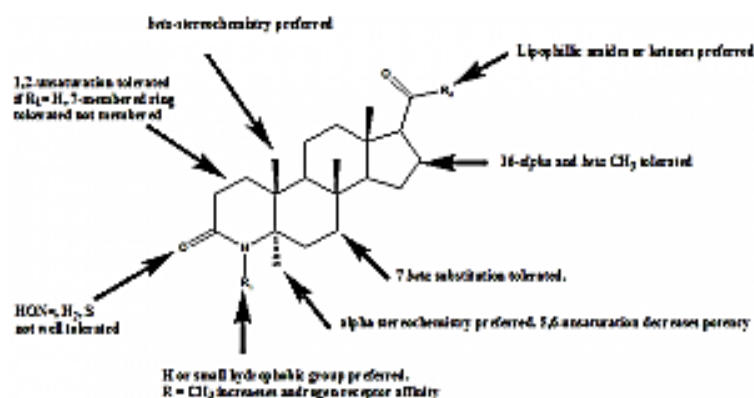


Рисунок 2.1.1. Схема впливу реагентів на стероїдний каркас.

Проміжний комплекс розкладають під час термічної обробки. Це призводить до дегідрування, утворюючи похідні N-бензоїлдутастериду. Гідроліз бензоїльної групи гідразином призводить до утворення дутастериду (рис. 2.1.2).

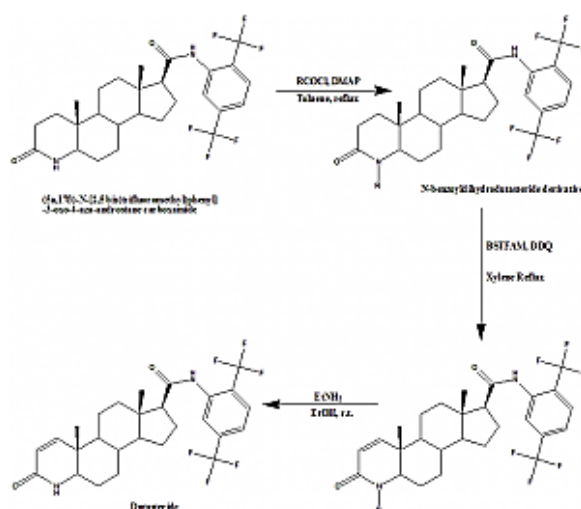


Рисунок 2.1.2. Схема синтезу Дутастериду.

Дутастерид або 4-азастероїд, близький аналог фінастериду. Трет-бутил амідна група замінена на біс(трифторметил)фенільну групу. Він інгібує 5 α -редуктази 1-го, 2-го типу. Вихідний синтон 2,4-біс(трифторметил)-анілін отриманий шляхом трифторметилування дийодбензолу з подальшим нітруванням та відновленням (рис. 2.1.3).

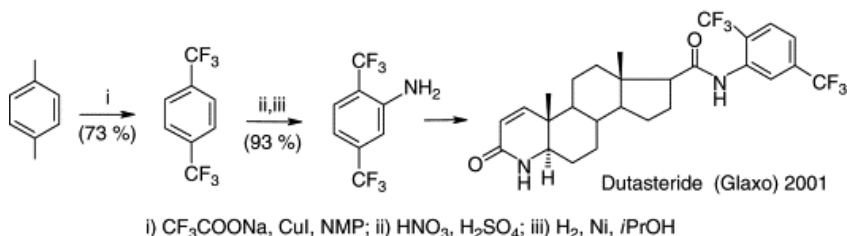
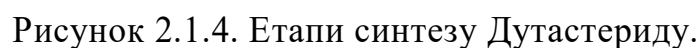


Рисунок 2.1.3. Схема синтезу Дутастериду.

Перший метод синтезу дутастериду включає чотири етапи, що й для синтезу фінастериду. Вони включають окислення 3-оксо-4-андростен-17 β -карбонової кислоти, перетворення на похідну 5-оксо-а-нор-3,5-секоандростан-3-ової кислоти та на 4-аза-андрост-5-ен-3-он, який після гідратування утворює 4-аза-5 α -андростан-3-он.

Етерифікація 4-аза-5 α -андростан-3-ону метанолом з використанням сірчаної кислоти призводить до естеру (рис. 2.1.4).



Перевагами цієї роботи є: (1) Реакція дегідрування проводиться на передостанній стадії, отримані проміжні продукти можна очистити кристалізацією з метанолу, (2) Зняття захисної групи бензоїльної групи досягається за допомогою реагентів 70% водного розчину етиламіну та за м'яких умов реакції для отримання чистого дутастериду. (5 α ,17 β)-N-[2,5-біс(трифторметил)феніл]-3-оксо-4-аза-андростан карбоксамід обробляли бензоїлхлоридом або заміщеним бензоїлхлоридом у присутності 4-диметиламінопіридину. Отримували похідні N-бензоїлдигідродутастериду. Структури похідних N-бензоїлдигідродутастериду були охарактеризовані за допомогою ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР та мас-спектрометрії. Виділення чистих похідних N-бензоїлдутастериду, отриманих шляхом кристалізації з метанолу. Домішки, пов'язані з дутастеридом, включаючи фармакоепіальні домішки,

видаляються з метанольного фільтрату. Дутастерид було отримано після зняття захисної групи лактамної N-бензоїльної групи сполук. Це забезпечує новий метод захисту та зняття захисної групи лактамної NH-групи похідних азаандростану.

Дутастерид або N-[2,5-біс(трифторметил)феніл]-3-оксо-4-аза-5 α -андрост-1-ен-17 β -карбоксамід є наступним після фінастериду 4-аза-стероїдним препаратом, який інгібує людську 5 α -редуктазу. Фінастерид та дутастерид є N-заміщеними похідними 3-оксо-4-аза-5 α -андрост-1-ен-17 β -карбоксаміду з 1,1-диметилетил (трет-бутил) та 2,5-біс(трифторметил)фенільним замісником біля атома N21 відповідно. Терапевтична ефективність препаратів вважається дуже схожою. Контрольні дослідження продемонстрували, що дутастерид, як інгібітор 5 α -редуктази 1, 2 та 3 типів, ефективніше знижує концентрацію активного ДГТ. Проведено рентгенівський дифракційний аналіз монокристалів (SCXRD). Для віднесення смуг поглинання в ІЧ-спектрах синтезованих сольватів гідрохлориду дутастериду та для спрощення порівняння з існуючими даними синтезовано дві модельні сполуки - дигідрофінастерид та дигідродутастерид. Вимірювання їх інфрачервоних спектрів у поєднанні з теоретичним моделюванням ІЧ-спектра форми I дутастериду (має одну молекулу дутастериду в асиметричній ланці) має призвести до віднесення окремих смуг поглинання до відповідних коливань.

Стандартну калібрувальну криву побудували шляхом побудови графіка залежності поглинання від концентрації. УФ-спектр поглинання записували при 240 нм. Отримано оптичні характеристики. Узгодженість із законом Бера була очевидною. Діапазон концентрацій кінцевого розведення 5-50 мкг/мл з уявною молярною поглинальністю та чутливістю Санделла $1,0122 \times 10^{-4}$ л/моль/см⁻¹ та 0,0522 мкг/мл/0,001 Å.

Аналіз ANOVA показав, що немає суттєвої різниці (значення $F_{stat} <$ табличне значення F при $p = 0,05$) між результатами аналізу. Не виявлено жодної інтенсивності перешкод у УФ-спектрах через допоміжні речовини. Дутастерид був стабільний протягом усієї процедури. Запропонований метод є простим, селективним та швидким. Його можна використовувати для рутинних вимірювань контролю якості. Цей метод застосовний для аналізу дутастериду в нерозфасованих ліках та фармацевтичних продуктах. Цей метод має перевагу у використанні недорогого та легкодоступного реагенту; не вимагає утворення кольорового комплексу, який спричиняє зміну інтенсивності кольору з часом (рис. 2.1.5).

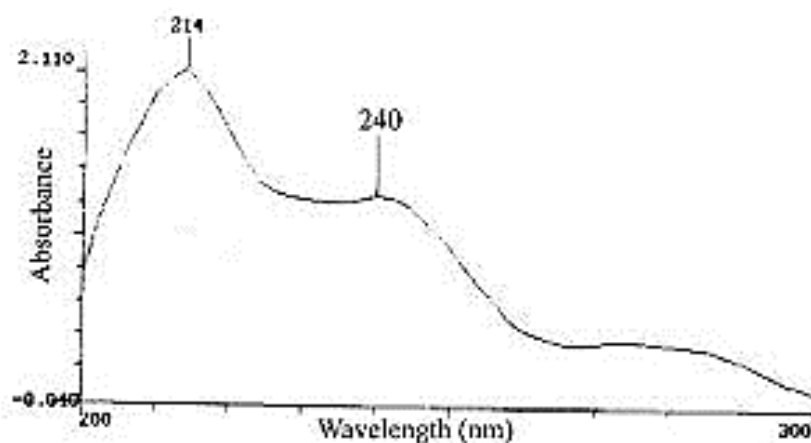


Рисунок 2.1.5. УФ-спектр Дутастериду.

Запропоновано простий колориметричний метод, заснований на використанні наночастинок золота (AuNPs) з використанням локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (LSPR). Метод розроблено для одночасного визначення тамсулозину (TAM) та дутастериду (DTS). Агрегація AuNPs, покритих цитратом, спостерігалася у присутності TAM та DTS. Це призводило до зміни кольору з червоного на сірий. Поглинання зміщувалося з 524 до 674 нм.

Формування та розмір синтезованих AuNPs до та після агрегації оцінювали за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії (TEM),

динамічного розсіювання світла (DLS). Вони становили 11,49 та 122,1 нм відповідно. Колориметричний метод було валідовано в діапазоні концентрацій 50–200 мкг/л. Він виявив хорошу лінійність ($R^2 = 0,9958$ для ТАМ та $R^2 = 0,9912$ для ДТС). Межа виявлення (LOD) та межа кількісного визначення (LOQ) становили 21,08, 21,82 мкг/л та 63,90, 66,12 мкг/л для ТАМ та ДТС.

Для одночасної оцінки компонентів цей підхід поєднував радіально-базисну нейронну мережу (RBF-NN) та систему нечіткого висновку (FIS). Середній відсоток відновлення моделі RBF був вищим за 99,99%, а значення середньоквадратичної помилки (RMSE) становили $3,69 \times 10^{-13}$ та $1,75 \times 10^{-13}$ для ТАМ та ДТС. У моделі FIS середнє відновлення становило 99,15% та 101,76% для ТАМ та ДТС. RMSE була нижчою за 3,2. Ці методи порівнювали з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA). Колориметричний метод може бути відповідним вибором для визначення вмісту ліків у фармацевтичних та біологічних зразках (рис 2.1.6).

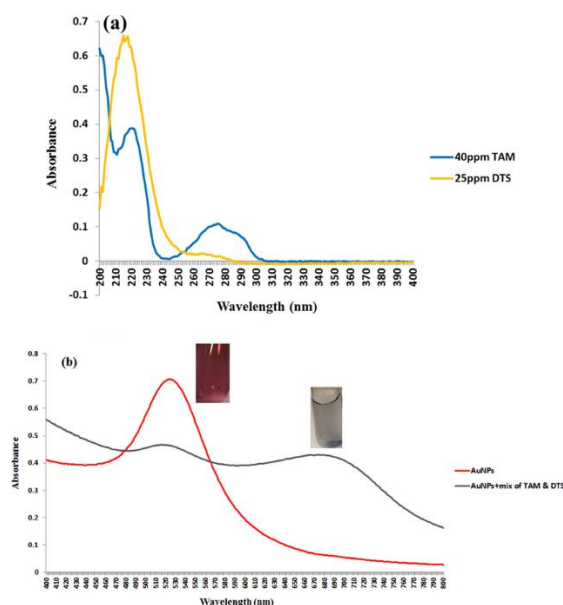


Рисунок 2.1.6. Аналіз Дутастериду колориметрією.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз субстанції Дутастериду. Дутастериду можна проаналізувати за монографією 01/2017:2641 Європейської Фармакопеї. Специфіковані і неспецифіковані домішки визначають методом рідинної хроматографії [27, 28]. Бутилгідрокситолуол визначають за ДФУ. Супровідні домішки у складі цієї субстанції визначають методом ТШХ.

Питоме оптичне обертання визначають методом (2.2.7): від +33,0 до +39,0 (безводна речовина). 0,100 г розчиняють у етанолі Р, доводять об'єм розчину розчинником до 20,0 мл. Споріднені речовини А.

Рідинна хроматографія (2.2.29).

Суміш розчинників: вода для хроматографії Р, ацетонітрил Р1 (40:60 об./об.).

Випробовуваний розчин. 50,0 мг досліджуваної речовини у суміші розчинників, доводять об'єм сумішню розчинників до 100,0 мл.

Розчин порівняння (а). 1,0 мл випробовуваного розчину розводять до 100,0 мл сумішню розчинників. 1,0 мл розчину розводять до 10,0 мл сумішню розчинників.

Розчин порівняння (b). 5 мг дутастериду для перевірки придатності системи (що містить домішки А, В, С, Е, F, G, Н та I) у суміші розчинників та доводять об'єм сумішню розчинників до 10 мл.

Розчин порівняння (с). 50,0 мг дутастериду CRS розчиняють у суміші розчинників, доводять об'єм сумішню розчинників до 100,0 мл. Температура: 35 °С.

Рухома фаза: 0,25 об'ємів трифтороцтової кислоти R, 480 об'ємів води для хроматографії R, 520 об'ємів ацетонітрилу R1.

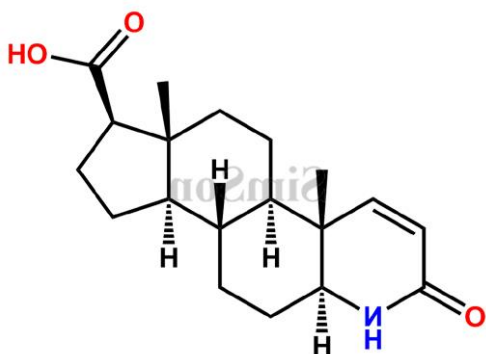
Швидкість потоку: 1,0 мл/хв. Виявлення: спектрофотометрично при 220 нм.

Введення: 20 мкл досліджуваного розчину та розчинів порівняння (а) та (b). Відносне утримування відносно дутастериду (час утримування = близько 36 хв). Розрахунок відсоткового вмісту: – поправочні коефіцієнти: помножити площі піків наступних домішок на відповідний поправочний коефіцієнт: домішка В = 0,7; домішка F = 3,0.

Рідинна хроматографія (2.2.29), як описано у випробуванні А для споріднених речовин, з модифікаціями. Колонка: – розмір: l = 0,15 м, Ø = 4,6 мм. Рухома фаза: вода для хроматографії R, ацетонітрил R1 (20:80 об./об.). Введення: 10 мкл випробовуваного розчину та розчинів порівняння (а) та (b).

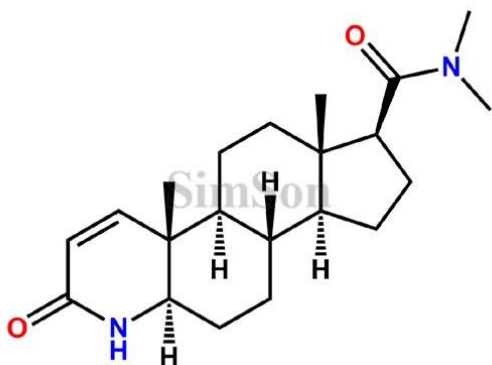
Рідинна хроматографія (2.2.29) використовується для кількісного визначення. Визначають домішки: А, В, С, Е, F, G, Н, І.

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування: D.



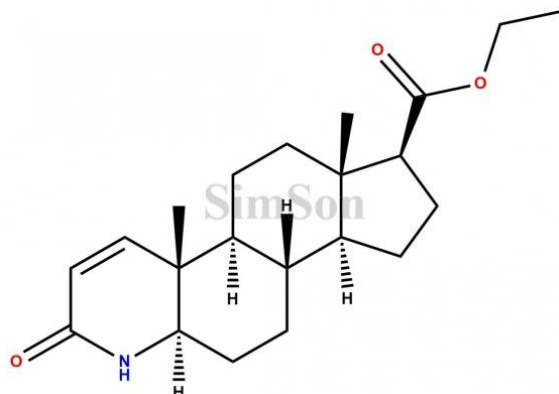
Домішка А

(4aR,4bS,6aS,7S,9aS,9bS,11aR)-
2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-
tetradecahydro-4a,6a-dimethyl-2-oxo-
1H-indeno[5,4-f]quinoline-7-carboxylic
Acid; (5alpha,17beta)-3-oxo-4-
Azaandrost-1-ene-17-carboxylic Acid; 3-
Oxo-4-aza-5a-androst-1-ene-17b-
carboxylic Acid



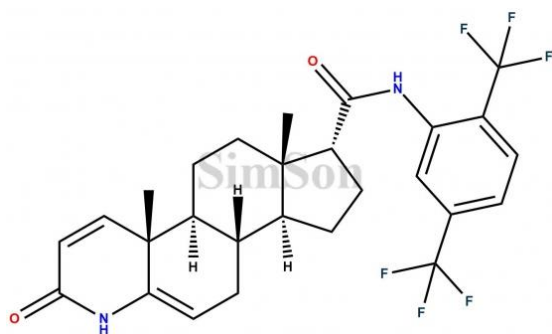
Домішка В

(4aR,4bS,6aS,7S,9aS,9bS,11aR)-
N,N,4a,6a-Tetramethyl-2-oxo-
2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-
tetradecahydro-1H-indeno[5,4-
f]quinoline-7-carboxamide



Домішка С

Dutasteride EP Impurity C; Ethyl 3-oxo-4-
aza-5α-androst-1-ene-17β-
carboxylate



Домішка D

5,6-Dehydro-17α-Dutasteride N-[2,5-
Bis(trifluoromethyl)phenyl]-3-oxo-4-
azaandrost-1,5-diene-17α-carboxamide

Рисунок 3.1. Специфіковані домішки.

Наприклад, Домішка D – має низький ризик тимчасового підвищення рівня печінкових ферментів і викликає клінічно очевидне ураження печінки.

Нами виконано хроматографічне дослідження методом ВЕРХ для ідентифікації у досліджуваній двокомпонентної суміші субстанцій Дутастериду та допоміжної речовини Бутилгідрокситолуол та визначення їх чистоти 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 SB-CN, 150x4,6x5 (або аналогічна)
- час хроматографування 35 хв
- потік – 1,0 мл/хв
- детектування – УФ при 210 нм
- об'єм інжекції – 20 мкл
- температура колонки – 50°C
- Рухома фаза А – розчиняли 2,8 г динатрію гідрофосфату в 1000 мл води, доводили рН до $5,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти, змішували отриманий буфер та ацетонітрил у співвідношенні 80:20
- Рухома фаза В – змішували воду та ацетонітрил у співвідношенні 10:90.

Гرادієнт представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Градієнт.

Час	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0	35	65
15	35	65
25	0	100
30	35	65
35	35	65

Використовували розчин субстанції з кінцевою концентрацією дутастериду 0,05 мг/мл та бутилгідрокситолуолу 0,01875 мг/мл в ацетонітрилі.

У якості стандарту використовували фармакопейний стандартний зразок ДФУ дутастериду та бутилгідрокситолуолу з концентрацією 0,05 мг/мл та 0,01875 мг/мл в ацетонітрилі відповідно.

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

- коефіцієнт симетрії дутастериду та бутилгідрокситолуолу (тейлінг) не має бути більшим 2,0;
- відносне стандартне відхилення площі піків дутастериду та бутилгідрокситолуолу 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:
динатрію гідрофосфат (чистоти для ВЕРХ),
ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ)
ортофосфорна кислота (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати.

На рисунках 3.2, 3.3 представлено отримані хроматограми.

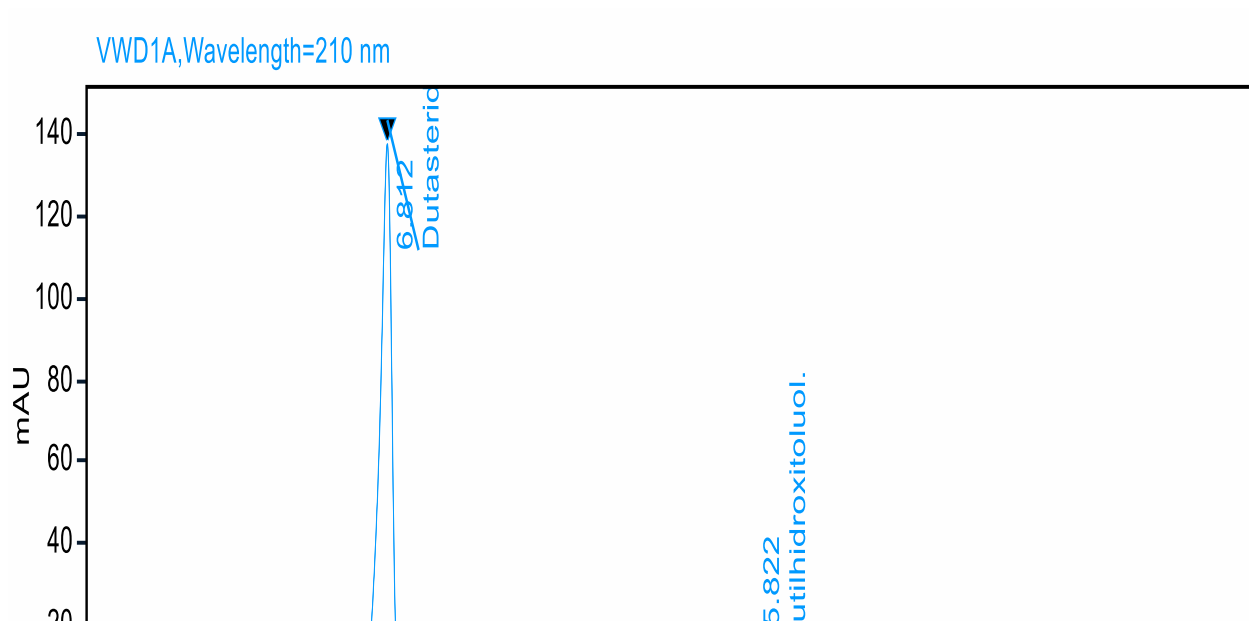


Рисунок 3.2. Хроматограма розчину стандартного зразку ДФУ.

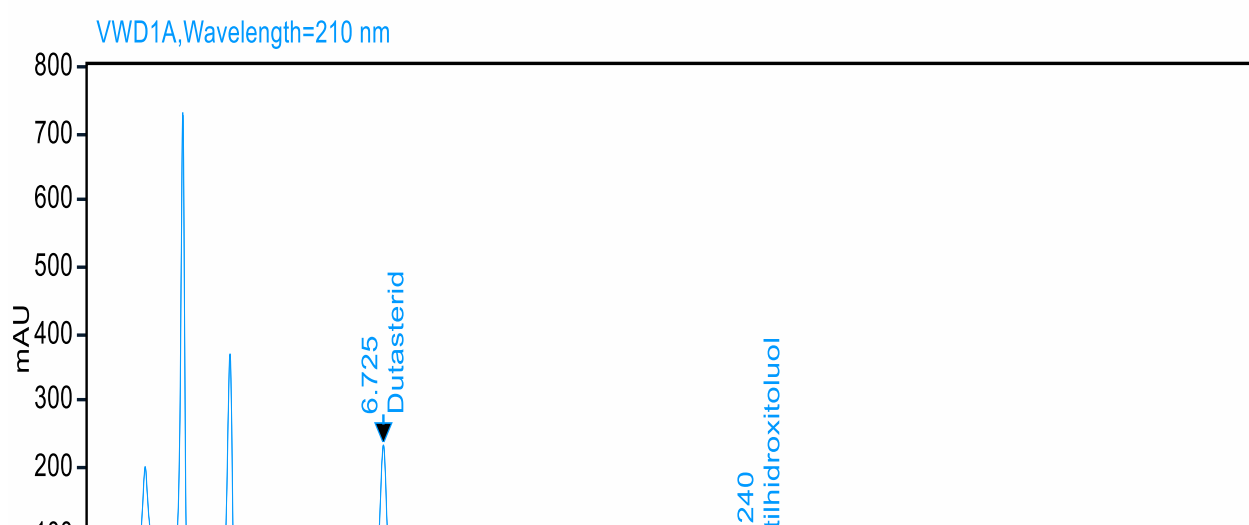


Рисунок 3.3. Хроматограма розчину випробовуваного зразку суміші субстанцій дутастериду $R_t=6.725$ хв та бутилгідрокситолуолу $R_t=15.240$ хв.

Отримані результати представлено в таблицях 3.2, 3.3:

Стандарт						
	<i>Дутастерид</i>			<i>Бутилгідрокситолуол</i>		
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i>
	6,812	2704,883	0,7	15,822	246,002	0,7
	6,879	2703,881	0,7	15,962	245,581	0,7
	6,474	2704,289	0,8	15,579	245,316	0,7
	6,962	2705,824	0,7	16,177	241,496	0,7
	6,894	2708,165	0,7	15,833	247,076	0,7
	6,951	2708,423	0,7	15,945	246,626	0,7
Середнє	6,829	2705,911	0,7	15,886	245,350	0,7
SD		1,960			1,997	
RSD(≤1,0%)		0,07%			0,81%	

	Зразок			
	<i>Дутастерид</i>		<i>Бутилгідрокситолуол</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	5,789	2729,920	14,401	204,530
	5,511	2699,660	13,795	208,054
	5,570	2744,087	13,692	207,908
Середнє	5,623	2724,556	13,963	206,831

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 дутастериду:

$$C_d(\%) = \frac{A_{test} \times m_{st}}{A_{st} \times m_{test}} \times R(\%)$$

де:

- A_{test} – площа піку дутастериду на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку дутастериду на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- m_{st} – наважка стандарту, мг
- m_{test} – наважка тесту, мг
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку дутастериду, (99,6)%

$$C_d(\%) = \mathbf{100,29\%}$$

Розрахунок вмісту **бутилгідрокситолуолу**:

$$C_b(\%) = \frac{A_{test} \times m_{st}}{A_{st} \times m_{test}} \times R(\%)$$

де:

- A_{test} – площа піку бутилгідрокситолуолу на хроматограмі випробуваного розчину;
- A_{st} – площа піку бутилгідрокситолуолу на хроматограмі стандартного розчину розчину;
- m_{st} – наважка стандарту, мг
- m_{test} – наважка тесту, мг
- $R(\%)$ – вміст основної речовини в стандартному зразку бутилгідрокситолуолу, (99,5)%

$$C_b(\%) = \mathbf{99,8\%}$$

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження субстанції ідентифіковано дутастерид, бутилгідрокситолуол, суміш не містить домішок, а компоненти відповідають регламентованому кількісному вмісту. Не виявлено продуктів хімічної деградації, а умови хроматографування суміші субстанцій методом ВЕРХ адаптовано для практичного використання у фармацевтичний аналіз.

Дутастерид

(Eur.Ph.)

Метод РХ

Дутастерид, субстанція +

бутилгідрокситолуол, субстанція

Метод ВЕРХ

Рідинна хроматографія (2.2.29).

Суміш розчинників: вода для хроматографії Р, ацетонітрил Р1 (40:60 об./об.).

Випробовуваний розчин. 50,0 мг досліджуваної речовини у суміші розчинників, доводять об'єм сумішню розчинників до 100,0 мл.

Розчин порівняння (а). 1,0 мл випробовуваного розчину розводять до 100,0 мл сумішню розчинників. 1,0 мл розчину розводять до 10,0 мл сумішню розчинників.

Розчин порівняння (b). 5 мг дутастериду для перевірки придатності системи (що містить домішки А, В, С, Е, F, G, Н та I) у суміші розчинників та доводять об'єм сумішню розчинників до 10 мл.

- Рухома фаза А – розчиняли 2,8 г динатрію гідрофосфату в 1000 мл води, доводили рН до $5,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти, змішували отриманий буфер та ацетонітрил у співвідношенні 80:20
- Рухома фаза В – змішували воду та ацетонітрил у співвідношенні 10:90.

Розчин порівняння (с). 50,0 мг дутастериду CRS розчиняють у суміші розчинників, доводять об'єм сумішню розчинників до 100,0 мл.

Рухома фаза: 0,25 об'ємів трифтороцтової кислоти R, 480 об'ємів води для хроматографії R, 520 об'ємів ацетонітрилу R1.

Домішки: Не виявлено

A, B, C, E, F, G, H, I.

Контроль домішок у речовинах для фармацевтичного застосування): D.

Детектування DAD 220 нм	Детектування діодно-матричним детектором при 210 нм
-------------------------	---

Температура колонки 35°C	Температура колонки 50°C
--------------------------	--------------------------

Бутилгідрокситолуол, субстанція	Бутилгідрокситолуол, субстанція
Метод ТШХ (2.2.27) (ДФУ).	Метод ВЕРХ
Силікагель GR. Проявник: Калію фериціанід р-н Р - заліза (III) хлорид р-н Р1 - вода Р (10:20:70).	

ВИСНОВКИ

1. Впроваджено метод ВЕРХ у аналіз суміші субстанцій - АФІ Дутастерид та допоміжної речовини Бутилгідрокситолуол у складі двохкомпонентної суміші субстанцій.
2. В результаті проведених досліджень чистоти суміші субстанції встановлено, що в наданих на дослідження зразках не містяться специфіковані та неспецифіковані домішки, а також, продукти хімічної деградації. Вміст дутастериду 100,29%, бутилгідрокситолуолу 99,8%, що відповідає фармакопейним вимогам.
3. Адаптовано методики дослідження та умови хроматографування методом ВЕРХ, які дозволяють захистити структуру молекули субстанції від хімічної деградації, а саме, запропоновано: *рухому фазу А* – 2,8 г динатрію гідрофосфату в 1000 мл води, рН до $5,0 \pm 0,05$ за допомогою фосфорної кислоти, отриманий буфер + ацетонітрил (80:20); *рухому фазу В* – вода-ацетонітрил (10:90); детектування діодно-матричним детектором при 210 нм.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. Penha, M.A.; Miot, H.A.; Kasprzak, M.; Muller Ramos, P. Oral Minoxidil vs Topical Minoxidil for Male Androgenetic Alopecia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 2024, 160, 600–605.
3. 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.
4. Chen, L.; Zhang, J.; Wang, L.; Wang, H.; Chen, B. The Efficacy and Safety of Finasteride Combined with Topical Minoxidil for Androgenetic Alopecia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Aesthetic Plast. Surg.* 2020, 44, 962–970.
5. Diviccaro, S.; Melcangi, R.C.; Giatti, S. Post-finasteride syndrome: An emerging clinical problem. *Neurobiol. Stress.* 2020, 12, 100209.
6. Safety update: Psychiatric and sexual adverse effects with finasteride. *Drug Ther. Bull.* 2024, 62, 101.
7. Almudimeegh, A.; AlMutairi, H.; AlTassan, F.; AlQuraishi, Y.; Nagshabandi, K.N. Comparison between dutasteride and finasteride in hair regrowth and reversal of miniaturization in male and female androgenetic alopecia: A systematic review. *Dermatol. Rep.* 2024, 16, 9909.
8. Herz-Ruelas, M.E.; Alvarez-Villalobos, N.A.; Millan-Alanis, J.M.; de Leon-Gutierrez, H.; Ocampo-Garza, S.S.; Gomez-Flores, M.; Grimalt, R. Efficacy of Intralesional and Oral Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia: A Systematic Review. *Skin. Appendage Disord.* 2020, 6, 338–345.

9. Yale, K.; Pourang, A.; Plikus, M.V.; Mesinkovska, N.A. At the crossroads of 2 alopecias: Androgenetic alopecia pattern of hair regrowth in patients with alopecia areata treated with oral Janus kinase inhibitors. *JAAD Case Rep.* 2020, 6, 444–446.
10. 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.
11. Xing, L.; Dai, Z.; Jabbari, A.; Cerise, J.E.; Higgins, C.A.; Gong, W.; de Jong, A.; Harel, S.; DeStefano, G.M.; Rothman, L.; et al. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat. Med.* 2014, 20, 1043–1049.
12. Kwon, O.; Senna, M.M.; Sinclair, R.; Ito, T.; Dutronc, Y.; Lin, C.Y.; Yu, G.; Chiasserini, C.; McCollam, J.; Wu, W.S.; et al. Efficacy and Safety of Baricitinib in Patients with Severe Alopecia Areata over 52 Weeks of Continuous Therapy in Two Phase III Trials (BRAVE-AA1 and BRAVE-AA2). *Am. J. Clin. Dermatol.* 2023, 24, 443–451.
13. Sun Pharmaceutical Industries. U.S. FDA Approves LEQSELVI™ (deuruxolitinib), an Oral JAK Inhibitor for the Treatment of Severe Alopecia Areata. SUN PHARMA. 2024.
14. King, B.; Senna, M.M.; Mesinkovska, N.A.; Lynde, C.; Zirwas, M.; Maari, C.; Prajapati, V.H.; Sapra, S.; Brzewski, P.; Osman, L.; et al. Efficacy and safety of deuruxolitinib, an oral selective Janus kinase inhibitor, in adults with alopecia areata: Results from the Phase 3 randomized, controlled trial (THRIVE-AA1). *J. Am. Acad. Dermatol.* 2024, 91, 880–888.
15. Dai, Z.; Chen, J.; Chang, Y.; Christiano, A.M. Selective inhibition of JAK3 signaling is sufficient to reverse alopecia areata. *JCI Insight* 2021, 6, e142205.
16. 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.
17. Wang, Y.; Huh, Y.; Lejeune, A. Population exposure-response analysis of the effect of ritlecitinib on eyebrow assessment and eyelash assessment in patients with alopecia areata. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 2025, 14, 389–402.
 18. 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.
 19. Gentile, P.; Garcovich, S. Advances in Regenerative Stem Cell Therapy in Androgenic Alopecia and Hair Loss: Wnt pathway, Growth-Factor, and Mesenchymal Stem Cell Signaling Impact Analysis on Cell Growth and Hair Follicle Development. *Cells* 2019, 8, 466.
 20. Al-Refu, K. Stem cells and alopecia: A review of pathogenesis. *Br. J. Dermatol.* 2012, 167, 479–484.
 21. Harries, M.J.; Paus, R. The pathogenesis of primary cicatricial alopecias. *Am. J. Pathol.* 2010, 177, 2152–2162.
 22. Miao, Y.J.; Jing, J.; Du, X.F.; Mao, M.Q.; Yang, X.S.; Lv, Z.F. Frontal fibrosing alopecia: A review of disease pathogenesis. *Front. Med.* 2022, 9, 911944.
 23. Charoensuksira, S.; Tantiwong, S.; Pongklaokam, J.; Hanvivattanakul, S.; Surinlert, P.; Krajarng, A.; Thanasarnaksorn, W.; Hongeng, S.; Ponnikorn, S. Disturbance of Immune Microenvironment in Androgenetic Alopecia through Spatial Transcriptomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 9031.
 24. Martinez-Jacobo, L.; Villarreal-Villarreal, C.D.; Ortiz-Lopez, R.; Ocampo-Candiani, J.; Rojas-Martinez, A. Genetic and molecular aspects of

- androgenetic alopecia. Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2018, 84, 263–268.
25. Wang, E.C.E.; Christiano, A.M. The Changing Landscape of Alopecia Areata: The Translational Landscape. Adv. Ther. 2017, 34, 1586–1593.
26. Cosmo Pharmaceuticals, Inc. Cosmo Announces the Beginning of the Phase III Trials in Males for the Treatment of Androgenetic Alopecia. 2023. Available online: <https://www.cosmopharma.com/news/cosmo-announces-the-beginning-of-the-phase-iii-trials-in-males-for-the-treatment-of-androgenetic-alopecia> (accessed on 10 February 2025).
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

Chelyk Andrii

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF DUTASTERIDE AND BUTYLHYDROXYTOLUENE IN THE COMPOSITION OF THE DRUG SUBSTANCE BY HPLC METHOD

The department of medicinal chemistry and toxicology

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

Keywords: dutasteride, butylhydroxytoluene, substance, medicinal product, HPLC, impurities, scaffold.

Introduction. Dutasteride is a drug, an azasteroid inhibitor of 5 α -Reductase I, II and III types. Dutasteride is used for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) in men, for the treatment of male-pattern alopecia, acne, and for transgender therapy in combination with spironolactone and estrogen. The State Pharmacopoeia of Ukraine does not regulate the analysis of the substance Dutasteride. Dutasteride can be analyzed according to monograph 01/2017:2641 of the European Pharmacopoeia. Specified and unspecified impurities are determined by liquid chromatography. Butylated hydroxytoluene is determined by HPC.

Materials and methods. Objects of research are substance of dutasteride and butylhydroxytoluene and its standard samples. Research subject: development of conditions for HPLC study of pharmaceutical analysis of dutasteride, butylhydroxytoluene substance. Methods: HPLC & UV-spectrum (Agilent 1200 with a diode-matrix detector, column – ZORBAX SB-CN, 150x4.6x5 (or similar), - chromatography time 35 min, - flow – 1.0 ml/min, - detection – UV at 210 nm; OpenLab CDS program.

Results. The HPLC method was introduced into the analysis of a mixture of substances - API Dutasteride and excipient Butylhydroxytoluene in a two-component mixture of substances. As a result of the studies of the purity of the substance mixture, it was established that the samples provided for research do not contain specified and unspecified impurities, as well as chemical degradation products. The content of dutasteride is 100.29%, butylated hydroxytoluene is 99.8%, which meets pharmacopoeial requirements.

Conclusions. The research methods and conditions of HPLC chromatography were adapted, which allow protecting the structure of the substance molecule from chemical degradation, namely, the following were proposed: mobile phase A – 2.8 g of disodium hydrogen phosphate in 1000 ml of water, pH to 5.0 $\pm$ 0.05 using phosphoric acid, resulting in buffer + acetonitrile (80:20); mobile phase B – water-acetonitrile (10:90); detection with a diode array detector at 210 nm.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



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

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

Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК