

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра медичної хімії**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ВИКОРИСТАННЯ ЦИФРОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ В РОЗРОБЦІ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ АНТИТРОМБОТИЧНОГО
ЗАСОБУ «КСАРЕЛТО»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи ФМ21(1,5з)-01а
спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Христина КОНДРАТЬЄВА

Керівник: асистент кафедри медичної хімії, к.фарм.н.
Ольга ВІСЛОУС

Рецензент: доцент закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії, к.фарм.н., доцент Наталія БЕВЗ

АНОТАЦІЯ

Розробка методики спектрофотометричного кількісного визначення ривароксабану в таблетках з використанням цифрових технологій. Змодельована методика спектрофотометричного визначення ривароксабану: вибраний барвник, рН середовища, екстрагент, довжина хвилі. Робота викладена на 57 сторінках, включає 3 таблиці, 8 рисунків, 3 схеми, 61 джерело літератури.

Ключові слова: антикоагулянти, ривароксабан, спектрофотометрія, субстанція, цифрові технології

ANNOTATION

Development of a technique for spectrophotometric quantitative determination of rivaroxaban in tablets using digital technologies. Simulated method of spectrophotometric determination of rivaroxaban: selected dye, medium pH, extractant, wavelength The work is laid out on 57 pages, includes 3 tables, 8 figures, 3 scheme, 61 literature sources.

Key words: anticoagulants, rivaroxaban, spectrophotometry, substance, digital technologies

ЗМІСТ

	С.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. «КСАРЕЛТО»: МЕТОДИ АНАЛІЗУ, ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ	6
1.1. Причини, симптоми і лікування тромбоемболії	6
1.2. Спектр фармакологічної активності «Ксарелто»	10
1.3. Методи синтезу, ідентифікації та кількісного визначення «Ксарелто»	17
Висновки до розділу 1	34
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	35
2.1. Об'єкти досліджень	35
2.2. Методи досліджень	39
Висновки до розділу 2	44
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ АНТИТРОМБОТИЧНОГО ЗАСОБУ «КСАРЕЛТО»	45
3.1. Моделювання спектрофотометричної методики з використанням цифрових технологій	45
3.2. Розробка методики кількісного визначення антитромботичного лікарського засобу «Ксарелто»	49
Висновки до розділу 3	53
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	56

ВСТУП

Актуальність теми. Тромб – це згусток крові, який змінився з рідкого на гелеподібний або напівтвердий стан. Згортання або коагуляція є необхідним процесом, який може запобігти втраті занадто великої кількості крові в певних випадках, наприклад, коли ви поранені або порізані. Коли тромб утворюється в одній із ваших вен, він не завжди розчиняється сам по собі. Це може бути дуже небезпечно і навіть небезпечно для життя ситуація. Існує багато типів згортання крові – тромбоз глибоких вен, емболія легеневої артерії, емболія коронарних судин і церебральна емболія. Отже, використовуються засоби для розрідження крові (антикоагулянти), це необхідно для лікування та профілактики різних станів тромбів *in vivo*. Для лікування згортання крові *in vivo* використовуються численні внутрішньовенні та пероральні антикоагулянти.

«Ксарелто» є потужним селективним пероральним прямим інгібітором Ха, що має низьку розчинність і високу проникність, який використовується як пероральний антикоагулянт для профілактики тромбоемболії [1]. Лікарський засіб «Ксарелто», що використовується при гострому коронарному синдромі, профілактика серцево-судинних захворювань, інфаркту міокарда та тромбозі [2]. Комп'ютерні технології мають потужні можливості у фармацевтичній галузі. Принаймні це стосується комп'ютерного моделювання хімічних процесів, що допомагає відтворити складні хімічні реакції.

Пріоритетним напрямком у розробці методів контролю якості є методи комп'ютерного моделювання засновані на застосуванні передових математико-статистичних алгоритмів, достовірність передбачень яких становить близько 80% [1-3].

Використання комп'ютерних технологій, надає змогу зменшити кількість експериментів за рахунок чого значно збільшується економічна ефективність та є вельми актуальним для фармацевтичної науки.

Мета дослідження. Розробка методики спектрофотометричного кількісного визначення ривароксабану в таблетках з використанням цифрових технологій.

Завдання дослідження:

- провести моніторинг вітчизняного ринку антикоагулянтів;
- вивчити та узагальнити дані літератури по фізико-хімічним властивостям, методом аналізу та фармакологічній активності
- розробити спектрофотометричний метод кількісного визначення ривароксабан з використання комп'ютерних технологій.

Матеріали даної роботи викладені у відповідності з поставленими задачами.

Об'єкт дослідження. Ривароксабан (S)-5-chloro-N-{{2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]oxazolidin-5-yl]methyl} thiophene-2-carboxamide

Предмет дослідження. Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення ривароксабан.

Методи дослідження. Спектральні методи (спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій області спектру), кількісне визначення, математичні розрахунки.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі досліджень було запропоновано методику контролю якості «Ксарелто».

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається із вступу, трьох розділів, загальних висновків та списку використаних літературних джерел, що має у своєму складі 61 джерел. Зміст роботи викладений на 57 сторінках машинописного тексту і містить 3 таблиці, 8 рисунків, 3 схеми.

РОЗДІЛ 1
«КСАРЕЛТО»:
МЕТОДИ АНАЛІЗУ, ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ
В МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ

1.1. Причини, симптоми і лікування тромбоемболії

У ХХ столітті очікувана тривалість життя подвоїлася, а населення світу зросло в чотири рази, оскільки відбувся глобальний зсув захворюваності та смертності від інфекційних причин до неінфекційних [1, 2]. Серцево-судинні захворювання стали основною причиною смерті, 80% з яких припадає на низькі та середні країни доходу [2]. Зокрема, за оцінками, у 2010 році тромбоемболічні стани були причиною 1 із 4 смертей у всьому світі, а разом узяті, тромбоз, як загальний основний механізм інфаркту міокарда, ішемічного інсульту та венозної тромбоемболії, є глобальною причиною смертності (порівняно з 1 з 5 смертей у 1990 році) [1, 3]. Крім того, хоча рейтинг 4 головних причин смерті та втрачених років життя не змінився, спостерігалось зменшення смертності від респіраторних інфекцій та збільшення смертності від ішемічної хвороби серця та ішемічного інсульту [2,5].

Як сімейство захворювань, тромбоз включає тромбози артерій і вен. Провідними формами артеріальних тромбозів (за показниками захворюваності та смертності) є ішемічна хвороба серця та ішемічний інсульт. Тромбоемболія включає тромбоз глибоких вен, який найчастіше вражає ноги, і емболію легеневої артерії [3,4].

Зарубіжні вчені відзначають, що частота виникнення тромбоемболії в Європі та Північній Америці складає 160 випадків тромбозів глибоких вен і 70 випадків тромбоемболій легеневої артерії та її гілок на рік на 100 000 мешканців [4,5]. Статистичні дані, опубліковані в США, свідчать про щорічну діагностику тієї або іншої форми тромбоемболії в 100 осіб на 100 000 населення [5].

В Україні кожен рік реєструють 50 тис. епізодів тромбоемболії з рівнем летальності 20-25% від загальнолікарняної [3,5]. За даними інших авторів, ймовірна частота тромбоемболії в Україні сягає 120 – 130 випадків на 100 тис. населення [4].

Більшість асортименту препаратів АКНД формується за рахунок препаратів іноземного виробництва. На їх частку припадає 61,5% (5 країн-виробників). Вітчизняні препарати займають на ринку 38,5% від досліджуваної номенклатури [1, 3, 4].

Причини розвитку тромбоемболії

Згустки крові утворюються природним чином у місцях травми, щоб запобігти кровотечі. Пошкодження вени призводить до того, що певні фактори у крові викликають активність ферментів тромбіну. Потім активний тромбін утворює довгі білкові нитки, які злипаються разом із тромбоцитами та еритроцитами, утворюючи згустки [6].

Найчастіше існує більше одного чинника ризику розвитку тромбоемболії [6, 7]:

- Не рухається протягом тривалих періодів часу, уповільнюється кровообіг через вени в руках і ногах, підвищуючи ймовірність тромбоемболії. Особливо в поєднанні з іншими факторами ризику, тромбоемболія може розвинутиися під час тривалого польоту (більше 4 годин) Імовірність розвитку тромбу найбільш висока у перші 3 місяці після операції та з часом знижується.

- Похилий вік;
- Генетичні фактори;
- Травма вени, часто спричинена: переломами, тяжка м'язова травма, або хірургічне втручання (особливо в області живота, тазу, стегна чи ніг);

- Повільний кровотік, часто викликаний: лежачий хворий (наприклад, через стан здоров'я або після операції); обмежений рух (наприклад, гіпс на нозі); параліч;

- Підвищений естроген: протизаплідні таблетки, гормональна замісна терапія, що іноді використовується після менопаузи, вагітність;
- Хронічні захворювання, такі як: хвороба серця, легень, нирок; рак та його лікування, запальне захворювання кишечника (хвороба Крона або виразковий коліт), порушення згортання крові; діабет, який підвищує можливість накопичення бляшок в артеріях, що може призвести до згустків крові; високий кров'яний тиск, який може пошкодити кровоносні судини; хвороба, яка полегшує потік крові;
- Ожиріння, що може призвести до запалення та пошкодження слизової оболонки кровоносних судин
- Інфекції, такі як SARS-CoV-2, вірус, що викликає COVID-19.

Пацієнти із захворюванням, пов'язаним з COVID-19, викликаним коронавірусом важким гострим респіраторним синдромом (SARS-CoV-2), піддаються підвищеному ризику тромбозу та його ускладнень. Ризик легеневої емболії та тромбозу глибоких вен особливо високий протягом 7 днів після позитивного тесту [7, 8]. Три основні фактори, які призводять до венозного тромбозу: ендотеліальне пошкодження, венозний застій та гіперкоагуляційний стан. Точні патофізіологічні механізми, що лежать в основі підвищених ризиків тромбозу при COVID-19, ще не повністю пояснено. Окрім загальних ризиків, пов'язаних зі зниженою рухливістю та потенційним зневодненням у госпіталізованих пацієнтів, інфекція SARS-CoV-2 може призвести до широко поширеного ендотеліального пошкодження та помітного збільшення виробництва протизапальних цитокінів, які можуть спричинити гіперкоагуляційний стан [8].

Симптоми тромбоемболії [8, 9]:

Близько половини людей із тромбоемболією взагалі не мають симптомів. Найбільш поширені симптоми тромбоемболії, які виникають:

- набряк;
- біль;

- Чутливість;
- Почервоніння шкіри.

Ознаки та симптоми тромбоемболії можуть включати [9]:

- Труднощі з диханням;
- Швидше, ніж звичайне чи нерегулярне серцебиття;
- Біль у грудях або дискомфорт, який зазвичай посилюється глибоким вдихом чи кашлем;
- Кашлем кров'ю
- Дуже низький кров'яний тиск, запаморочення або непритомність

Діагностика захворювання [7, 8, 9, 10]:

Дуплексне ультразвукове сканування – це візуальний тест, який використовує звукові хвилі для перегляду потоку крові у венах. Він може виявляти закупорки чи згустки крові у глибоких венах.

Аналіз крові D-димеру вимірює речовину у крові, яка вивільняється при руйнуванні згустку. Якщо тест D-димер негативний, це означає, що пацієнт, ймовірно, не має тромбу [8].

Контрастна венографія (легенева ангиографія) – це особливий тип рентгенівського випромінювання, при якому контрастний матеріал (фарба) вводиться у велику вену в стопі або кісточці, щоб лікар міг бачити глибокі вени в нозі та стегні [9].

Вентиляційно-перфузійне сканування – це спеціалізований тест, в якому використовується радіоактивна речовина, щоб показати частини легенів, які одержують кисень (вентиляційне сканування) та отримують кровотік (перфузійне сканування), щоб побачити, чи є частини легень з відмінностями між вентиляцією та перфузією. Наприклад, якщо в деяких кровоносних судинах у легенях є згустки, сканування може показати нормальну кількість кисню, але низький приплив крові до частин легень, що обслуговується згорнутими кровоносними судинами [10].

Лікування:

Антикоагулянти (так звані «розріджувачами крові») – це ліки, які найчастіше використовуються для лікування тромбоемболії. Хоча ці ліки називаються розріджувачами крові, насправді вони не розріджують кров. Вони знижують здатність крові до згустка і знижують ризик подальшого розвитку тромбів [11].

Ін'єкційні *антикоагулянти*, що найчастіше використовуються [12]:

- Нефракціонований гепарин (вводиться у вену);
- Низькомолекулярний гепарин та Fondaparinux (вводиться під шкіру).

Антикоагулянти, які приймаються перорально, включають [11, 12]:

- Варфарін;
- Дабігатран;
- Рівароксабан;
- Апіксабан;
- Едоксабан.

Тромболітики:

Тромболітики працюють шляхом розчинення згустку. Вони мають більш високий ризик виникнення кровотечі порівняно з антикоагулянтами, тому вони зарезервовані для тяжких випадків [12].

Тромбектомія / емболектомія

У окремих випадках може знадобитися хірургічна процедура видалення згустку. Тромбектомія включає видалення згустку у пацієнта. Емболектомія включає усунення закупорки легень, викликаної згустком у пацієнта [11, 12].

1.2. Спектр фармакологічної активності «Ксарелто»

Антикоагулянти широко використовуються для профілактики та лікування венозного та/або артеріального тромбозу. Антикоагулянти

складають хімічно неоднорідну групу препаратів, що діють на різних етапах у каскаді коагуляції. Гепарин і антикоагулянти на основі гепарину є непрямими антикоагулянтами, які пов'язують тоантитромбін і підвищують інгібуючий потенціал цього природного антикоагулянту. Однак ці препарати пов'язані з обмеженнями, такими як необхідність регулярного моніторингу коагуляції (АВК і НФГ) [14] або парентерального шляху введення (НФГ, низькомолекулярний гепарин і фондапаринукс) [15]. Ці обмеження спонукали до розробки цільових пероральних антикоагулянтів, які безпосередньо інгібують окремі ферменти на шляху згортання крові, такі як фактор Ха або тромбін. Два прямі інгібітори фактора Ха (ривароксабан Xarelto, Bayer Pharma AG і Janssen Pharmaceuticals, Inc.) та апіксабан (Eliquis, Bristol-Myers Squibb і Pfizer EEIG) і прямий інгібітор тромбіну (дабігатрану етексилат International GmbH) схвалені в багатьох країнах. У гонитві за ефективним лікуванням Bayer створив Rivaroxaban, зараз відомий під торговою маркою Ксарелто «Xarelto», який був схвалений FDA в 2011 році. До 2022 року кількість основних показань до препарату було збільшено у 10 разів, а також поширеність препарату в галузі лікування тромбозу [15].

«Ксарелто» – брендний препарат, що відпускається за рецептом. Його називають антикоагулянтом або розріджувачем крові [14, 15].

Зокрема, «Ксарелто» схвалено для використання у дорослих для:

Лікування тромбозу глибоких вен – це тромб, який утворюється у вені глибоко всередині вашого тіла. Зазвичай утворюються у вені на нозі, але вони також можуть утворюватися на руці [14].

Лікування тромбоемболії легеневої артерії – це тромб, який блокує приплив крові до легенів, розвиваються, коли ТГВ зміщується з вени та рухається кров'ю до легенів [15].

Запобігає утворенню тромбів у людей, які госпіталізовані з гострим захворюванням і мають ризик утворення тромбів.

Знизити ризик утворення тромбів та інсульту в людей з фібриляцією передсердь (A-fib), яка не спричинена проблемою серцевого клапана. А-фібра

– це тип нерегулярного серцебиття, який може порушити кровообіг у тілі. Цей стан підвищує ризик утворення тромбів, які можуть потрапити в інші частини тіла, наприклад до мозку. Кров'яні згустки, які потрапляють у мозок, можуть призвести до інсульту [15, 16].

Зменшує ризик утворення тромбів, які можуть спричинити серцевий напад, інсульт або смерть у людей з ішемічною хворобою серця (ІХС). При ІХС звужені артерії серця. Цей стан підвищує ризик утворення тромбів в артеріях, що може призвести до серцевого нападу, інсульту або смерті. З цією метою «Ксарелто» призначають разом із малими дозами аспірину, щоб запобігти утворенню тромбів [16].

Знижує ризик певних ускладнень від утворення тромбів у людей із захворюванням периферичних артерій (ЗПА). З ЗПА у звужені артерії на ногах. Цей стан підвищує ризик утворення тромбів в артеріях. Ці згустки можуть призвести до серцевого нападу, інсульту, відсутності кровотоку в кінцівках і можливої ампутації кінцівки. З цією метою «Ксарелто» призначають разом із малими дозами аспірину, щоб запобігти утворенню тромбів [17].

Фармакодинаміка

Ривароксабан є потужним, селективним, перорально активним прямим інгібітором активованого фактора X серинової протеази (FXa), який відіграє центральну роль у згортанні крові. Засіб діє в точці конвергенції внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання крові. FXa каталізує перетворення протромбіну в тромбін, що потім призводить до зменшення опосередкованої тромбіном активації коагуляції [18]. Таким чином, інгібування FXa вважається ефективною стратегією профілактики як артеріального, так і венозного тромбозу. Ривароксабан не впливав на вміст тромбіну в плазмі і не взаємодівав з антитромбіном. Це відповідає нормальному профілю активності прямого інгібітора FXa [19].

Фармакокінетика

Після перорального прийому 5-10 мг розчину ривароксабану абсорбція відбувається швидко, C_{max} досягається приблизно через 30 хв. Після прийому таблетки ривароксабану спостерігався більш плоский профіль із середніми піковими концентраціями через 2-4 години. Кінцевий період напіввиведення ривароксабану збільшується із збільшенням дози, що свідчить про обмежене всмоктування [15, 18].

Їжа (з високим вмістом жиру та висококалорійна їжа) не впливала на площу під кривою залежності концентрації в плазмі від часу і C_{max} для останньої таблетки 10 мг, але всмоктування сповільнювалося після прийому їжі, показуючи час затримки приблизно 0,5 години та затримка медіани t_{max} приблизно на 0,5 години. Виходячи з цього, пропорційна дозі експозиція, що спостерігається між 5 і 10 мг, і відсутність ефекту їжі для кінцевої форми 10 мг. Біодоступність становить приблизно 80% при дозі 10 мг у пацієнтів [8, 17].

Зв'язування ривароксабану з білками плазми у людини є високим, приблизно від 92% до 95% *in vitro*, при цьому сироватковий альбумін є основним компонентом зв'язування [16]. Через високий рівень зв'язування з білками плазми ривароксабан не підлягає діалізу. Зв'язування ривароксабану з білками плазми є повністю оборотним. Коефіцієнт розподілу плазми та крові людини становить 1,40. Об'єм розподілу в рівноважному стані (V_{ss}) становить приблизно 50 л (0,62 л/кг), що вказує на низьку спорідненість до тканин [2, 11, 14].

Ривароксабан був охарактеризований *in vitro* як субстрат для активних транспортних білків Р-глікопротеїну (P-gp) і BCRP («білок стійкості до раку молочної залози») [14].

Метаболізм і виведення

Ривароксабан виводиться трьома основними шляхами. Приблизно 36% дози виводиться нирками у незміненому вигляді за участю секреції, опосередкованої активним транспортером P-gp і BCRP. Далі приблизно 14% дози виводиться шляхом гідролізу амідних зв'язків і приблизно 32% дози виводиться шляхом окислювальних метаболічних шляхів. Ізоформи CYP3A4

та CYP3A5 відповідають за метаболізм приблизно 18%, а CYP2J2 – приблизно 14% дози [9, 15, 17].

Після внутрішньовенного введення ривароксабану середній системний кліренс становив 10,7 л/год. Нирковий кліренс становив 4,7 л/год. Середній термінальний період напіввиведення ривароксабану після внутрішньовенного введення становив 4,5 години. Після перорального прийому дози 10 мг елімінація стає обмеженою швидкістю всмоктування з кінцевим періодом напіввиведення в середньому від 7 до 11 годин [8, 12].

У людей похилого віку AUC була на 40-50% вищою. У суб'єктів із легким, помірним та тяжким порушенням функції нирок AUC ривароксабану збільшувалася на 44%, 52% та 64% відповідно, у той час як AUC фактора Ха збільшувалася на 50, 86 та 100%, а AUC PT збільшувалася на 33, 116 та 144 % відповідно порівняно з суб'єктами з нормальною функцією нирок [5, 8, 13].

Метаболізм ривароксабану оцінювали в мікросомах печінки та гепатоцитах, ідентифікуючи 18 метаболітів. Після перорального застосування ривароксабану 10 мг перорального розчину людям 66% дози виявлялося в сечі та 28% у фекаліях [16]. Загалом 89% введеної дози можна віднести до відомих структур. Незмінений препарат був основною сполукою в плазмі і становив 89% AUC(0-tn) загальної радіоактивності. Основних або активних циркулюючих метаболітів у плазмі не виявлено, а основний метаболіт у плазмі, M1, становить приблизно 3 % радіоактивності плазми [7, 13, 17].

Приблизно 36% дози виводилося з сечею в незміненому вигляді. Метаболіти M1 і M4 були виявлені в сечі як основні метаболіти і становили приблизно 13% і 8% дози відповідно. Основними компонентами фекальних екстрактів людини були незмінний препарат (7% дози) і метаболіт M1 (9% дози). Екскреція M7 із сечею та фекаліями становила 6,6 % дози. Інші метаболіти, M2, M5, M6, M8 і M9 кожен, становили менше 4% введеної дози [18].

Ривароксабану збільшується під впливом інгібіторів CYP3A4, P-gp і BCRP і знижується під дією індукторів CYP3A4 [19].

Немає ознак потенційного метаболічного перетворення S- на R-ривароксабан у людини.

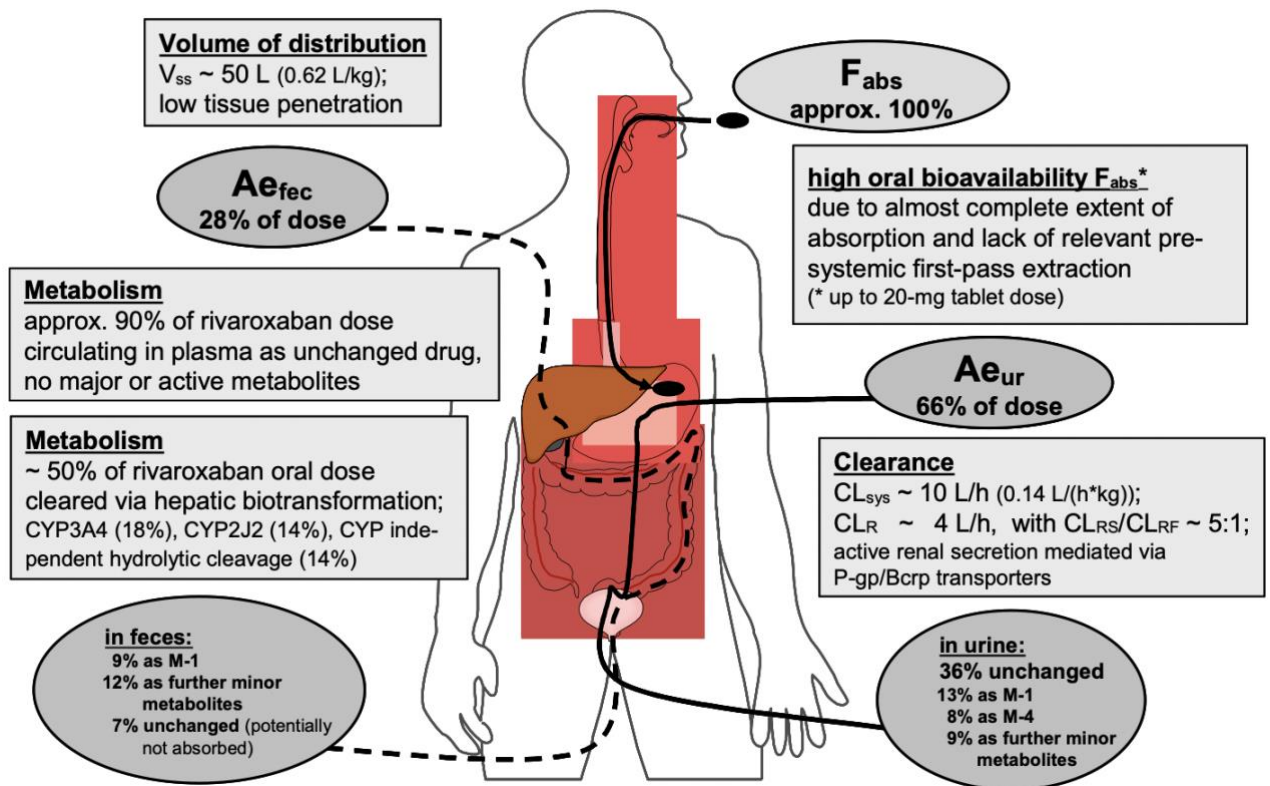


Рис. 1.1. Фармакодинаміка та фармакокінетика лікарського засобу «Ксарелто»

Побічні ефекти:

Цей препарат може викликати серйозну кровотечу, якщо він занадто сильно впливає на білки згортання крові. Негайно повідомте свого лікаря, якщо у вас є будь-які ознаки серйозної кровотечі, зокрема: носові кровотечі, які виникають часто або не зупиняються, незвичайна втома/слабкість, незвичайний біль / набряк / дискомфорт, незвичайні синці, тривала кровотеча з порізів або ясен, незвично сильна / тривала менструація, рожева / темна сеча, кров'яний кашель, блювота з кров'ю або схожа на кавову гущу, сильний головний біль, запаморочення / непритомність, утруднене ковтання [19, 20].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами:

Деякі лікарські засоби, які можуть взаємодіяти з цим препаратом, включають: міфепристон, інші препарати, які можуть спричинити кровотечу/синці (включаючи антитромбоцитарні препарати, такі як клопідогрель, «розріджувачі крові», такі як варфарин, еноксапарин), певні антидепресанти (включаючи СІЗЗС, такі як флуоксетин, SNRI, такі як десвенлафаксин/венлафаксин) [17, 19].

Інші ліки можуть впливати на виведення ривароксабану з організму, що може вплинути на роботу ривароксабану. Наприклад, кобіцистат, коніваптан, дронедазон, ритонавір, певні азольні протигрибкові препарати (ітраконазол, кетоконазол, позаконазол), інгібітори ВІЛ-протеази (такі як лопінавір), рифаміцини (такі як рифампін), звіробій, препарати для лікування судом (такі як карбамазепін, фенітоїн, фенобарбітал) [15, 20].

Аспірин може збільшити ризик кровотечі при застосуванні з цим препаратом [20].

«Ксарелто» містить діючу речовину ривароксабан. Випускається у вигляді таблеток, вкритих оболонкою, з негайним вивільненням, що містить 10 мг ривароксабану для перорального застосування [21].

Інші інгредієнти ядра таблетки включають целюлозу мікрокристалічну, натрію кроскармелозу, гіпромелозу, моногідрат лактози, стеарат магнію та лаурилсульфат натрію. Плівкове покриття містить оксид заліза червоний, гіпромелозу 15, макрогол 3350 і діоксид титану [20, 21].

Таблетки упаковані в термоформовані поліпропіленові або ПВХ/ПВДХ блістери з алюмінієвою фольгою [21].

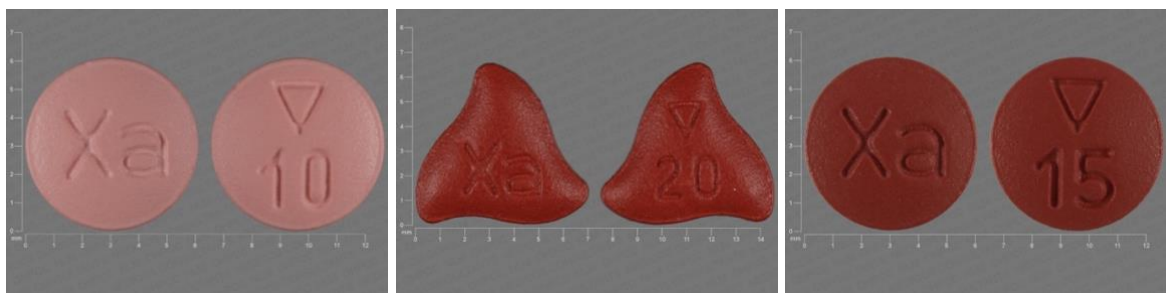


Рис. 1.2. Лікарська форма «Ксарелто»

1.3. Методи синтезу, ідентифікації та кількісного визначення «Ксарелто»

Синтез

Дослідження процесу та розробка ривароксабану в основному зосереджені на наступних трьох аспектах: (а) розробка покращеного та високопродуктивного процесу для виробництва 9, починаючи з 17, без використання хроматографічного очищення на колонці та уникнення небезпечних та небезпечних хімічних реагентів і розчинників, (b) розробити ефективний процес виробництва 1, починаючи з 9, який зменшує утворення домішок і забезпечує високий вихід реакції та (c) досягти кристалізації та виділення 1 з якістю ІСН і бажаною поліморфною формою (модифікація-I) [21] безпосередньо з реакційної маси з тієї ж ємності, не піддаючи неочищений продукт подальшому очищенню [41].

Ривароксабан синтезується за допомогою п'ятиетапного процесу синтезу з використанням 4-(4-нітрофеніл)-3-морфолінон як вихідний матеріал. Необхідно синтезувати три ключові проміжні продукти, які потім використовуються в реакції для утворення діючої речовини. Після повторної кристалізації сирого ривароксабану матеріал мікронізують [42].

Автори повідомили про перший синтез з використанням лінійного підходу, який передбачає конденсацію морфолін-3-ону (2) з фторнітробензолом (3) з використанням гідриду натрію як основи в N-метилпіролідоні (NMP) для отримати нітроморфолінон (4), нітрогрупу 4 відновлювали за допомогою паладію на вуглеці (Pd-C) і водню в тетрагідрофурані (THF) для отримання 4-(4-амінофеніл)-3-морфолінону (5), який потім конденсували з 2-[(2S)-2-оксиранілметил]-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діон (6) у суміші етанолу та води з утворенням аміноспирту 7. Циклізація 7 за допомогою N,N'-карбонілдіімідазолу (CDI) у присутності 4-диметиламінопіридину (DMAP) у ТГФ давали 2-[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксоморфолін-4-іл)феніл]-1,3-оксазолідин-5-іл]метил]-1H-ізоіндол-1,3(2H)-

діон (8). Зняття захисту з 8 за допомогою метиламіну в етанолі з подальшою конденсацією отриманого 9 з 5-хлортіофен-2-карбонілхлоридом (10) у піридині дає ривароксабан (1) із загальним виходом 4,5%, починаючи зі сполуки 2 (схема 1.1) [43].

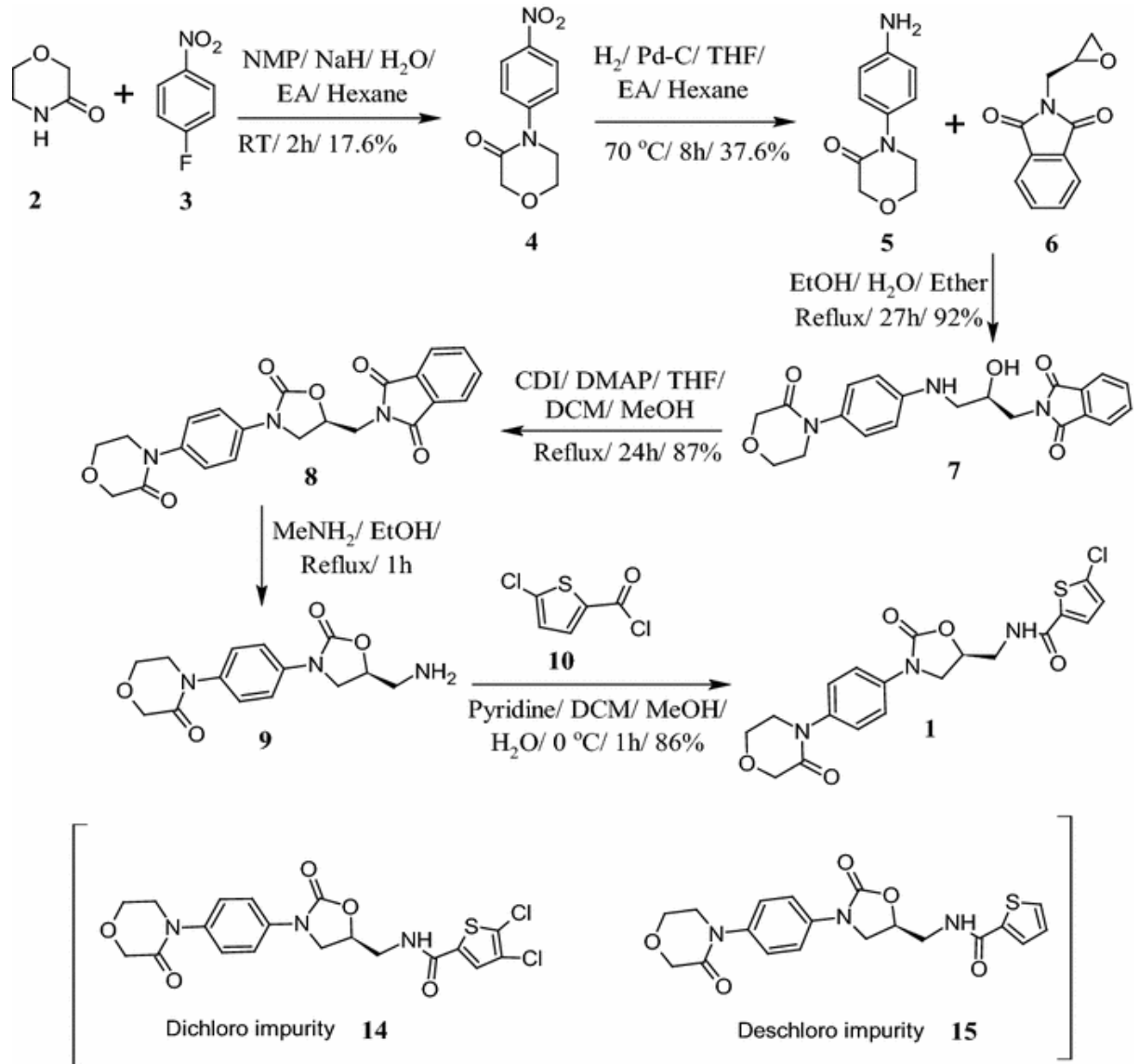


Схема 1.1. Синтез ривароксабан

Розкритий процес має декілька недоліків, таких як: (а) використання високопірофорного реагенту, такого як гідрид натрію, (b) надмірне завантаження дорогої основної сировини 6 та CDI, які створюють надмірну кількість побічного продукту імідазолу, що робить процес економічним та екологічним неефективний, (c) повторні фільтрації, задіяні для виділення 7, знижують продуктивність, (d) використання легкозаймистого розчинника,

такого як діетиловий ефір, для промивання сполуки 7, а також небезпечного та токсичного розчинника, такого як піридин, для реакції на стадії API робить процес небезпечно, (e) очищення 1, 4, 5 і 8 колонковою хроматографією робить процес тривалим і трудомістким, (f) неповне перетворення проміжних продуктів призводить до утворення багатьох домішок, пов'язаних з процесом, і (g) низький загальний вихід 4,5% починаючи з сполуки 2, що робить процес менш життєздатним для комерційного виробництва [44, 45].

Рафекас та ін. розкрили процес отримання ривароксабану (1) та його проміжних сполук (схема 1.2) із загальним виходом 5,93 з чистотою 98,4% за ВЕРХ. Сільво та ін. у 2011 році повідомили про очищення ривароксабану (1) за допомогою процесу кристалізації, опосередкованого розчинником [6], з використанням різних розчинників та/або комбінацій розчинників для забезпечення максимальної чистоти близько 99,70% за допомогою ВЕРХ із втратою приблизно 10–20% виходу, що робить процес дорогим. Кілька інших процесів, про які повідомляється в літературі, також мають недоліки, подібні до описаних вище, що робить процес непридатним для великомасштабного виробництва [37-45].

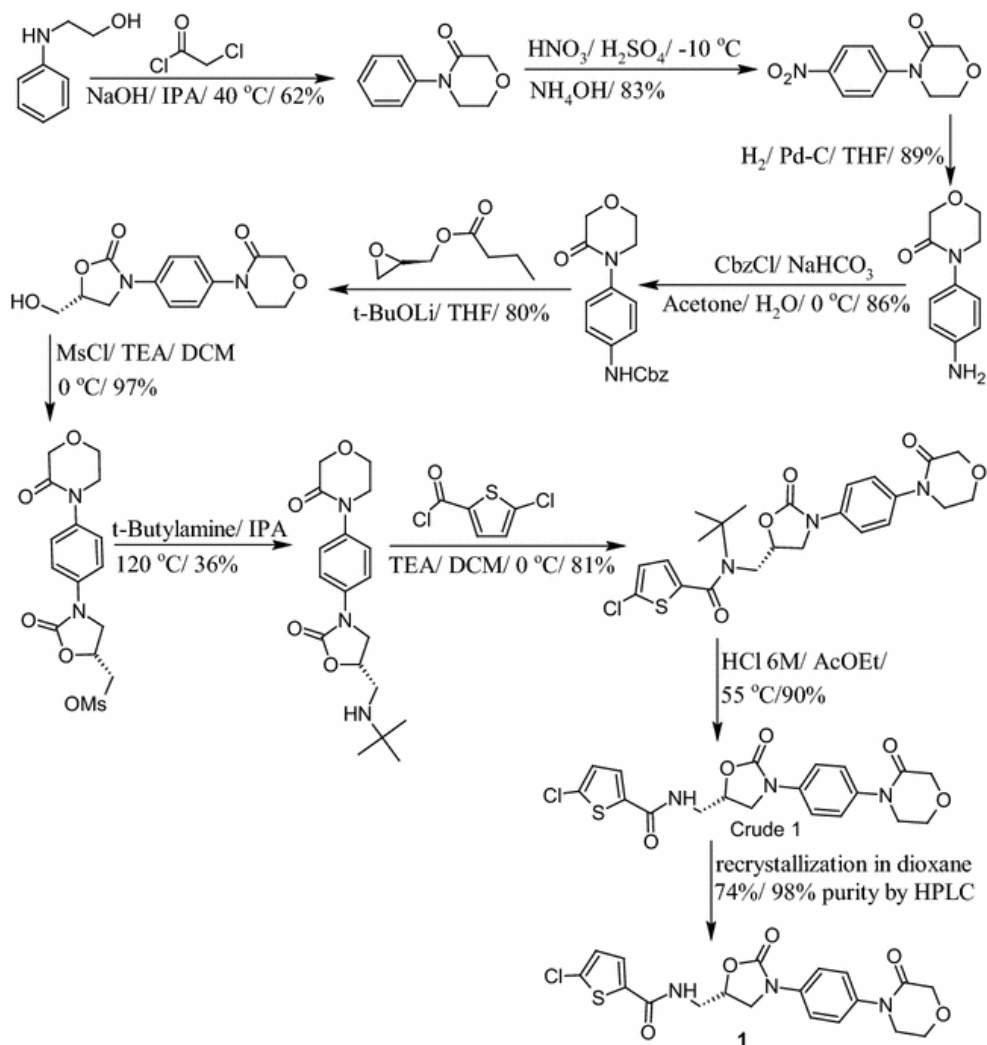


Схема 1.2. Синтез ривароксабану методом ВЕРХ

Цим ми повідомляємо про ефективний, економічний, масштабований, вільний від домішок і зручний для виробництва процес для синтезу ривароксабану (1), який дозволяє пряме виділення АФІ з реакційної маси без подальшого очищення, що відповідає якості ІСН [40] і бажаній поліморфній формі [41, 42]. Ривароксабан (1) було отримано з 17 за сім етапів із загальним виходом 22% і чистотою 99,85% за допомогою ВЕРХ з використанням комерційно доступної та менш дорогої сировини та реагентів [42].

Ефективний процес отримання сполуки. Критичний і витратний проміжний продукт 5 був отриманий [43] з використанням легкодоступного недорогого нітроаніліну (17) як вихідного матеріалу. Борна кислота каталізувала конденсацію 17 з 2-(2-хлоретокси)оцтовою кислотою в толуолі з

наступною циклізацією отриманого хлораміду 18 у гідроксиді натрію в присутності катализатора міжфазного перенесення тетрабутиламоній броміду (TBAB) з утворенням нітросполуки 19. Каталітичний відновлення 19 з використанням Pd–C як катализатора та газу H₂ або формиату амонію як джерела водню в метанолі забезпечило ключовий проміжний продукт 5 (схема 1.3). Однак іншу ключову проміжну сполуку 6 було отримано згідно з літературною процедурою з невеликими вдосконаленнями процесу [43, 44].

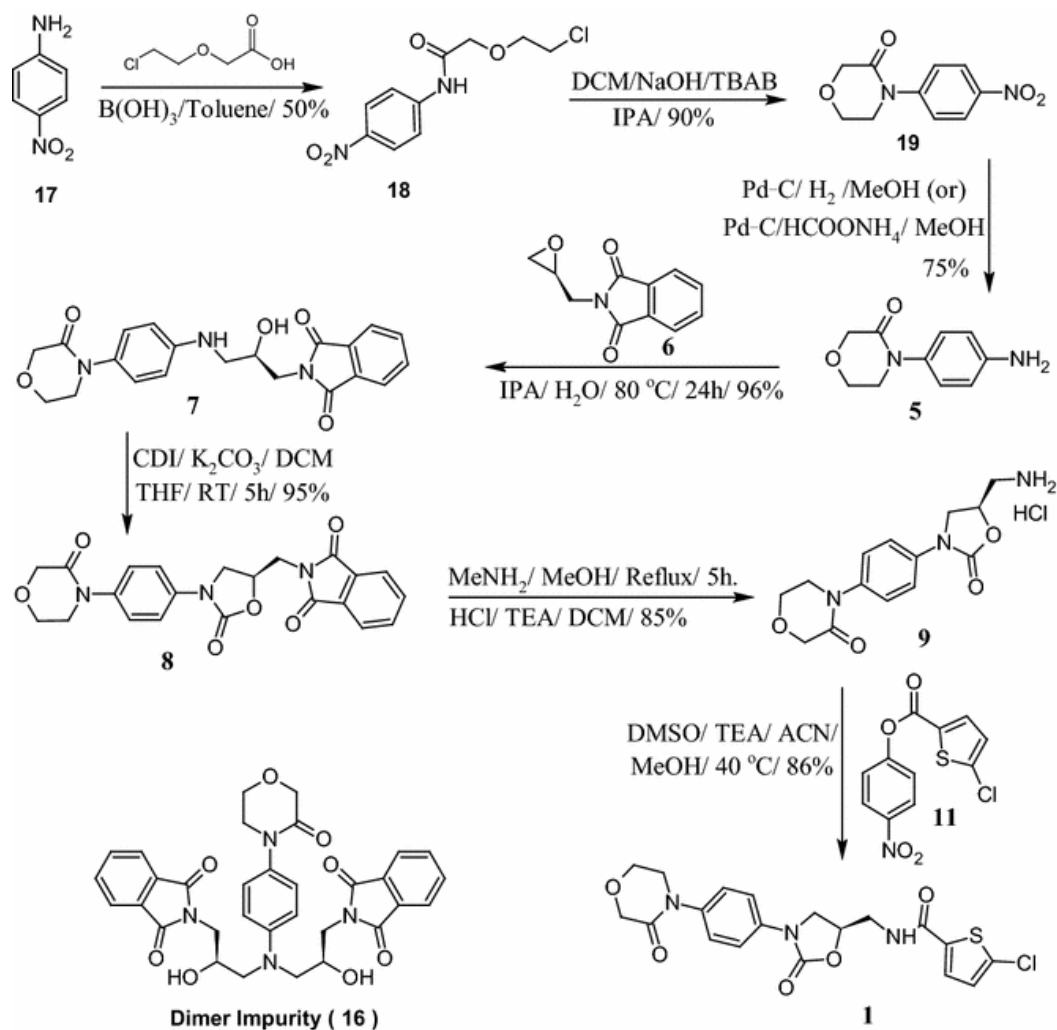


Схема 1.3. Синтез Ривароксабану з використанням легкодоступного недорогого нітроаніліну

Були спроби отримати аміноспирт **7** шляхом нуклеофільної атаки **5** на оксиран **6** з використанням різних розчинників. Серед кількох перевірених розчинників, таких як метанол, етанол, IPA, DMF, DMSO, толуол, вода,

ацетонітрил, етилацетат, ТГФ та їх суміші, суміш ІРА та води виявилася придатним розчинником для цієї реакції. Було помічено, що оксиран 6 зазнав деградації в інших розчинниках, окрім ІРА-води, що призвело до утворення непрореагованого 5 в реакції. Було також помічено, що надмірне використання оксирану 6 призводить до утворення димерної домішки 16 (визначено РХ-МС). Крім того, було також помічено, що оксиран 6 виявився стабільним у суміші ІРА-вода, тому реакція завершується з 1,05 моль еквівалентів оксирану 6 при 80 °С, щоб забезпечити 7 з незначними кількостями димеру 16. Осаджена сполука 7 виділяли шляхом фільтрування та сушіння продукту під вакуумом при 60–65 °С протягом 5–6 год з виходом 95% і чистотою 97,0% за ВЕРХ. Під час оптимізації питоме співвідношення ІРА та води (17:3) виявилось оптимальним для забезпечення якості [46].

Отриманий аміноспирт 7 потім обробляли СДІ для отримання оксазолідинону 8 без подальшого очищення. Реакцію досліджували в різних розчинниках (толуол, ТНФ, етилацетат, 2-Ме-ТНФ, DСМ та ацетонітрил) з використанням різних основ (K₂CO₃, Na₂CO₃, DIPEA, TEA та NaHCO₃). Під час скринінгових експериментів спостерігалось неповне перетворення 7 у різних розчинниках і різних основах після тривалого витримування при різних температурних умовах, що призвело до утворення багатьох побічних продуктів. Проте реакція в DСМ у присутності K₂CO₃ як основи при 25–30 °С протікала гладко зі зниженою кількістю домішок (~0,5% за ВЕРХ). Обробка включає фільтрування реакційної маси для відділення неорганічних твердих речовин, концентрування DСМ і очищення отриманого залишку в ТГФ для отримання 8 у вигляді білої кристалічної твердої речовини з 99,8% чистотою за ВЕРХ і 95% виходом [45, 46].

Синтез основного проміжного продукту 9 (схема 3) потім був досягнутий шляхом зняття захисту з 8 за допомогою 40% водного розчину метиламіну в метанолі при 60–65 °С. Після завершення реакції реакційну масу поступово охолоджують до 25–30 °С і конц. До маси повільно додавали HCl, щоб отримати сіль HCl 9 у вигляді білої кристалічної твердої речовини з

виходом 90% і чистотою 99,0% за ВЕРХ. Багато побічних продуктів і аналогічних домішок, що утворилися під час реакції зняття захисту, були ідентифіковані за допомогою РХ-МС в реакційній масі, а також в ізольованій твердій речовині (рис. 1). На основі розуміння домішок було встановлено очищення шляхом перекристалізації з використанням метанолу та DCM для усунення цих домішок. Сліди цих домішок, якщо вони залишаться на цій стадії, будуть переноситися з 9, щоб вплинути на чистоту ривароксабану (1), тому їх необхідно усунути на цьому етапі. Було також виявлено, що ці домішки важко видалити з продукту, і зрештою вони вимагають очищення колонковою хроматографією [46, 47].

Описано ефективний, економічний і зручний для виробництва процес отримання високочистого ривароксабану за допомогою альтернативного синтону (11). Реакція та ізоляція шляхом кристалізації були розроблені в одній ємності, уникаючи обробки, яка зазвичай включає екстракцію, дистиляцію, розділення тощо, щоб отримати ривароксабан (1), який відповідає якості ІСН та бажаній поліморфній формі із загальним виходом 22% починається з нітроаніліну (17) протягом семи стадій [47].

Ідентифіковано вісімнадцять технологічних домішок, що походять із вихідних матеріалів і процесу синтезу. Обговорено походження кожної домішки та описано структуру кожної домішки на основі даних спектрального аналізу (ЯМР та спектрометрії). На практиці лише 3 домішки (ацетоксамід, біс-оксамінсечовина та триамід) і енантіомерна чистота контролюються під час аналізу партії. Жодна структурно відома органічна домішка не обмежена межею максимально 0,15%, що вимагало б спеціальної токсикологічної кваліфікації [46].

Показано, що розчинники, що використовуються в синтезі, ефективно видаляються під час операцій очищення та сушіння, і були встановлені відповідні специфікації [45, 46].

Огляд літератури експрес-колориметричним методом, спектрофотометричними методами, методом ВЕРХ та біоаналітичним

методом для визначення ривароксабану [22]. Це дослідження було спрямоване на розробку відповідного аналізу для кількісної оцінки ривароксабану в його лікарській формі, валідації (відповідно до рекомендацій ІСН). Розроблений метод аналізу за допомогою ВЕРХ, а потім порівнюючи результат аналізу з одним існуючим методом [21, 22].

Було розроблено та підтверджено п'ять корисних мікрометодів для визначення ривароксабану. Методи прості та швидкі, займають не більше 20-25 хв. Ці спектрофотометричні методи більш чутливі, ніж існуючі методи УФ та ВЕРХ, і не містять таких експериментальних змінних, як етап нагрівання або екстракції [19, 22].

Результати, отримані методом 1, були зумовлені окислювально-відновною реакцією з наступним утворенням комплексу між антиоксидантом і хлоридом заліза та 2,2-біпіридином з утворенням оранжевого кольору розчину, який продемонстрував максимальне поглинання при 470 нм відносно відповідного холостого реагенту [22].

У методі 2 4-амінофеназон реагує з кетогрупою препарату, в результаті утворюється основа Шиффа. Сформована основа Шиффа демонструє поглинання при 450 нм [21, 22].

У методі 3 гематоксилін і хлорамін Т реагують один з одним в основних середовищах і утворюють сполуки гематин. Неподілена пара електронів на гетерогрупі сірки препарату формує спектри перенесення заряду під час реакції з гематином. В результаті розчин набуває кольору. Поглинання утвореного кольору вимірювали при 540 нм [22].

У методі 4 кетогрупа препарату реагує з ізонікотининовим гідразодом, утворюючи забарвлений гідразон за довжиною хвилі при 480 нм [21, 22].

Наявність іміногрупи препарату відповідає за розвиток забарвленого комплексу в методі нафти хінонсульфату. Іміногрупа препарату піддається нуклеофільному заміщенню на нафтахінонсульфат. Результати утворюють кольоровий комплекс. Поглинання утвореного кольорового комплексу вимірювали при 500 нм [22].

Встановлено, що діапазони лінійності ривароксабану становлять 2-12, 3-21 ppm, 30-90, 5-30 ppm, 15-90 ppm для методу 1 до методу 5 відповідно. Була виявлена лінійна кореляція між абсорбцією та концентрацією ривароксабану [22].

Таблиця 1.1

Діапазони лінійності ривароксабану

№	Параметри	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 4	Метод 5
1	λ_{\max}	420 нм	450 нм	540 нм	480 нм	500 нм
2	Діапазон концентрації	2-12	3-21	30-90	5-30	15-90
3	Коефіцієнт кореляції	0,9992	0,9991	0,9996	0,9997	0,9996
4	RSD	0,47	0,88	0,94	0,52	1,02
5	Період стабільності	130 мін.	210 мін	210 мін	120 мін	170 мін
6	LOD	0,03	0,15	9	0,15	1,5
7	LOQ	0,1	0,5	10	0,5	5
8	% вміст	98,17	98,58	98,53	99,3	99,25

Розроблено дві спектрофотометричні методики (А і В) для визначення ривароксабану в субстанції та у таблетках «Ксарелто». Метод А передбачає утворення забарвленого комплексу трис (1,10-фенантролін)-залізо (II) під час реакції ривароксабану з сумішшю заліза (III)-1,10-фенантроліну в кислому середовищі. Забарвлений комплекс вимірюють спектрофотометрично при 525 нм. Метод В включає взаємодію ривароксабану з ацетальдегідом з хлоранілом, щоб отримати кольорові вініламінозаміщені хінони. Кольоровий продукт демонструє максимуми поглинання при 655 нм. Закон Бугера-Ламберта-Бера, що корелює поглинання з концентрацією ривароксабану, дотримувався в діапазоні 5-62,5 мкг/мл і 10-100 мкг/мл для методів А і В відповідно. Межі виявлення та значення кількісного визначення становили 0,101 мкг/мл і 0,306 мкг/мл відповідно для методу А, а їх відповідні значення для методу В становили 0,116 мкг/мл і 0,351 мкг/мл. Запропонований метод був успішно застосований для кількісного визначення ривароксабану в таблетках «Ксарелто» [23].

Описано два прості спектрофотометричні методи (I та II) для визначення ривароксабану в масі та таблетках. Метод I заснований на взаємодії

ривароксабану з 4-хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом у лужному середовищі. Метод II включав реакцію ривароксабану з п-диметиламіноциннамальдегідом у кислому середовищі. Продукти реакції вимірювали при 405 нм і 545 нм для методів I і II відповідно. Закон Бера дотримувався в діапазонах концентрацій 2-20 мкг/мл і 25-125 мкг/мл з нижніми межами виявлення 0,110 мкг/мл і 0,483 мкг/мл для методів I і II відповідно. Відсоток відновлення ривароксабану для обох методів I і II був знайдений в діапазоні 99,74-100,51% з відносним стандартним відхиленням в діапазоні 0,621-0,900% [24].

Розроблено УФ-спектрофотометричний метод для визначення вмісту ривароксабану у фармацевтичних складах та кількості ривароксабану, що виділяється в дослідженнях розчинення таблеток. Дослідження розчинення таблеток ривароксабану проводилися з використанням ацетатного буфера рН 4,5, що містить 0,4% додецилсульфату натрію, як середовище розчинення. Зразки, отримані в результаті досліджень однорідності вмісту та розчинення, були проаналізовані за довжини хвилі 248 нм. Середній відсоток препарату, вивільненого протягом 60 хвилин, визначений пропонованим спектрофотометричним методом після розчинення таблеток *in vitro*, показано на малюнку 4. Протягом 15 хвилин – 78% ривароксабану [25].

Для кількісного визначення маси ривароксабану було розроблено новий, менш трудомісткий і економічно ефективний метод УФ-спектрофотометрії. Ривароксабан був оцінений при 270 нм у диметилсульфоксиді. Було встановлено, що діапазон лінійності становить 2–20 мкг/мл (рівняння регресії: абсорбція = $0,1086 \times \text{концентрація препарату в мкг мл}^{-1} + 0,0154$; $r = 0,9991$). Уявна молярна поглинаюча здатність і чутливість Санделла склали $4,825 \times 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ і $2,262 \times 10^{-3} \text{ мкг см}^{-2}$ відповідно. Метод був перевірений і валідований для різних параметрів відповідно до рекомендацій ІСН. Результати показали, що процедура є чутливою, вибірковою, точною і використовується для визначення ривароксабану в масових пробах [24].

Авторами оптимізовано процедуру RP-HPLC для завершення іншого підходу до оцінки ривароксабану в таблетованій лікарській формі. Визначення проводили за допомогою колонки C18 (Phenomenex 250 x 4,6 мм, 5 мкм, що підтримується при 35°C) при 251 нм з рухомою фазою (ацетонітрил-вода, 55-45 об./об.) і потоком 1,2 мл/хв. Час утримування становив приблизно 3,8 хвилини. Параметри перевірки виконано відповідно до вказівок ІСН і відповідає критеріям прийнятності. Встановлено, що лінійність методу прийнята для п'яти рівнів концентрації, тобто вивчається за допомогою калібрувальної кривої. Точність була виконана при трьох різних концентраціях, отримана кількість наближається до 100%. Значення % RSD, отримані для повторюваності, проміжної та відтворюваної точності, знаходяться в межах критеріїв прийнятності [25].

Для визначення ривароксабану було розроблено чотири чутливі та селективні методи визначення стабільності. Метод А представляв собою ізократичну ВЕРХ із оберганням, хороша роздільна здатність між піками, що відповідають деградації аналіту, була досягнута на колонці C18. Рухома фаза являє собою 1,2% (мас./об.) дигідрофосфату калію, рН $3,5 \pm 0,2$, і ацетонітрил (70:30, об./об.). Детектування проводили при 280 нм. Метод В залежить від кількісного денситометричного визначення тонкошарової хроматографії TLC ривароксабану в присутності його розкладання без будь-яких перешкод. Проявною системою був хлороформ-ізобутиловий спирт (50:50 об./об.). Хроматограму сканували при 280 нм. Метод С базувався на першому вимірюванні похідної (D1) препарату при 237,4 нм; нульова точка внеску його лужної деградації. Метод D ґрунтувався на розділенні лікарського засобу та його лужних деградацій за спектрами співвідношення перших похідних (DD1) успішно застосовувався для визначення ривароксабану в масі порошку, фармацевтичних композиціях і в присутності його лужних деградацій. Отримані результати були статистично проаналізовані та порівняні з тими, що були отримані описаним методом [26].

Основною метою поточного дослідження була розробка та валідація HPTLC, простого, точного, точного та специфічного хроматографічного методу для визначення ривароксабану з його таблетованої лікарської форми. Методи: згаданий препарат наносили на пластини ТШХ силікагелю F254 під струменем чистого азоту споттером Linomat TLC. Розділення проводили з використанням метанолу, толуолу та триетаноламіну як рухомої фази у співвідношенні 7:2,5:0,5 об/об/об. Розроблені пластини ТШХ сканували за допомогою сканера SAMAG TLC і виявлення проводили при 249 нм. Результати: було встановлено, що значення Rf відокремленого препарату становить 0,60 для ривароксабану. Лінійність ривароксабану становить від 500 до 3000 нг/точку. Висновок: Розроблений метод був валідований згідно з рекомендаціями ІСН шляхом вивчення різних параметрів валідації, таких як точність, прецизійність, надійність, LOD, LOQ і стабільність розчинника. Розроблений і валідований метод успішно застосовано для визначення ривароксабану з його таблетованої лікарської форми [26].

Розроблено чутливий та перевірений метод ВЕРХ для аналізу ривароксабану та оцінки пов'язаних з ним домішок у вихідних лікарських речовинах та фармацевтичних лікарських формах. Аналіз проводився на колоні Macherey-Nagel Nucleodur C18 (250 × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм) з мобільною фазою, що містить ацетонітрил та воду в градієнтній програмі зі швидкістю потоку 1,5 мл/хв, температурою печі колони 55°C довжиною хвили. Лінійність, селективність, точність, точність, міцність, LOD та LOQ характеристики запропонованого методу показали прийнятні значення [27].

Метод високоефективної рідинної хроматографії та тандемної мас-спектрометрії (HPLC-MS/MS) був валідований для вимірювання концентрації ривароксабану в плазмі. Автори використовували просту підготовку зразка, осадження білка із метанолом та швидку хроматографію. Метанол (400 мкл), що містить дейтерованій ІС (Rivaroxaban-d4, 500 нг/мл), був доданий в депротеїні зразки. Потім зразки центрифугувалися при 4000 об/хв протягом 10 хвилин 4°C. Хроматографія була виконана на системі Agilent 1260 LC (Agilent

Technologies, місісога, Канада). З'єднання були виведені з ВЕРХ-колонки Kinetex C18 (100 × 3 мм, розмір частинок 2,6 мкм з Phenomenex, Торранс, СА) в ізократичному градієнті, що складається з 40% (А) надчистої води, що містить 0,01% мурашиної кислоти 60% (В) метанолу 0,01% мурашиної кислоти як рухливих фаз. Метод із лінійним діапазоном від 2 до 500 нг/мл і нижньою межею кількісного визначення 4 пг на колонці. Новий метод порівнювали з референсним методом (активність проти фактора Ха), і обидва продемонстрували хорошу кореляцію ($r = 0,98$, $p < 0,001$). Крім того, перевірено зразки гемолітичної, ліпемічної плазми для вимірювання ривароксабану за допомогою ВЕРХ-МС/МС без перешкод. Хромогенний і ВЕРХ-МС/МС методи сильно корелюють і повинні використовуватися як клінічні інструменти для моніторингу препаратів. Метод був успішно застосований у групі з 49 пацієнтів у реальному житті, що дозволило точно визначити максимальний і мінімальний рівні ривароксабану [28].

Поточна мета цього дослідження полягає в тому, щоб розробити простий, чутливий і надійний аналітичний метод, який може розділяти ривароксабан і пов'язані з ним домішки за допомогою ВЕРХ. Цей новий метод може відокремлювати енантіомери та всі пов'язані з процесом домішки ривароксабану. Цей метод також можна використовувати для визначення аналізу ривароксабану в лікарських речовинах і лікарських продуктах. Цей новий метод було розроблено з використанням колонки Chiralpak IC (250 × 4,6 мм, 5 мкм) при 27°C з градієнтною програмою 25,0 хв зі швидкістю потоку 0,8 мл/хв. Рухома фаза А складалася з ацетонітрилу, етанолу та н-бутиламіну у співвідношенні 95:5:0,5 (об./об./об.) відповідно. Мобільна фаза В складалася із суміші води Milli-Q, метанолу та н-бутиламіну у співвідношенні 50:50:0,5 (об./об./об.) відповідно. Довжина хвилі детектора становила 254 нм. Ривароксабан був підданий умовам примусової деградації (умовам стресу) гідролізу, основи, кислоти, термічного, фотолізу та окислення. Продукти розпаду були добре відокремлені від піку ривароксабану та піку енантіомеру, а його потенційні домішки доводять ефективність методу для визначення

стабільності. Запропонований новий метод індикації стабільності був валідований щодо специфічності, прецизійності, точності, межі кількісного визначення, межі виявлення, надійності лінійності та круглості згідно з рекомендаціями Міжнародної конференції з гармонізації. %RSD (відносне стандартне відхилення) для шести препаратів зразків для ривароксабану та домішок менше 10%, а вихід становить від 90 до 110%. Поточний метод можна використовувати в лабораторіях контролю якості для аналізу комерційних продуктів [29].

Простий, швидкий, точний, надійний і відтворюваний метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою був розроблений для визначення ривароксабану в чистій лікарській формі та фармацевтичній лікарській формі. Кількісне визначення проводили за допомогою колонки enable C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) у бінарному режимі з рухомою фазою, що містить 0,1 % крижаної оцтової кислоти: ацетонітрилу в 30:70 % об'єм/об'єм при швидкості потоку 1 мл/хв, детектування проводилося при 250 нм з використанням PDA-детектора з об'ємом ін'єкції 20 мкл, час утримання становив 3,44 хв. Запропонований метод був перевірений відповідно до рекомендацій ICH Q2B. Метод дав лінійну відповідь у діапазоні концентрацій 2-10 мкг/мл ($R^2 \sim 0,9993$). Були проведені дослідження відновлення, які виявились у межах 98-102%. Виявлено, що %RSD становить 2%. LOD і LOQ ривароксабану для цього методу були 0,008 мкг/мл і 0,248 мкг/мл відповідно. Запропонований метод був статистично оцінений і може бути застосований для рутинного аналізу, контролю якості сировини, рецептур різної концентрації, досліджень розчинення та досліджень біоеквівалентності для тієї самої рецептури ривароксабану [30].

Згаданий препарат наносили на пластини ТШХ із силікагелем F254 під струменем чистого азоту споттером Linomat TLC. Розділення проводили з використанням метанолу, толуолу та триетаноламіну як рухомої фази у співвідношенні 7:2,5:0,5 об/об/об. Розроблені пластини ТШХ сканували за допомогою сканера SAMAG TLC і виявлення проводили при 249 нм.

Встановлено, що значення R_f відокремленого препарату становить 0,60 для ривароксабану. Лінійність ривароксабану становить від 500 до 3000 нг/точку [29].

Розроблений метод був валідований згідно з рекомендаціями ІСН шляхом вивчення різних параметрів валідації, таких як точність, прецизійність, надійність, LOD, LOQ і стабільність розчинника. Розроблений і валідований метод успішно застосовано для визначення ривароксабану з його таблетованої лікарської форми [30].

Розроблено новий, простий, швидкий, селективний, точний метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою для оцінки складу таблеток ривароксабаніну. Розділення було досягнуто за допомогою колонки C-18 (250x4,6 мм, розмір частинок 5 мкм) при температурі навколишнього середовища в поєднанні з захисною колонкою з кремнезему в рухомій фазі Ацетонітрил-метанол-0,1% отофосфорна кислота (90:8:2) з значення рН доведено до 4,06. Швидкість потоку становила 1,5 мл/хв, і препарат виявляли за допомогою УФ-детектора на довжині хвилі 234 нм, а час роботи становив 7 хв. Виявлено, що час утримування становить 3,32 хвилини. Встановлено, що відсоток RSD для прецизійності та точності методу становить менше 2%. Метод валідований відповідно до рекомендацій ІСН [31].

Розроблено та підтверджено тандемний мас-спектрометричний метод рідинної хроматографії високої ефективності для визначення ривароксабану в плазмі крові людини з використанням ривароксабану D4 як внутрішнього стандарту. Екстракцію аналіту та внутрішнього стандарту було здійснено методом твердофазної екстракції. Метод підтверджено в діапазоні концентрацій 5,96–801 нг/мл. Хроматографічне розділення було досягнуто за допомогою Gemini C18, 150 мм × 4,6 мм, 5 мкм, колонка з елююванням при швидкості потоку 1,5 мл/хв рухомою фазою (ацетонітрил: амонійно-ацетатний буфер (80:20 об./об.)). Загальний час виконання методу становив близько 1,8 хв з часом елюції ривароксабану та його внутрішнього стандарту

ривароксабану D4 приблизно 1,18 хв. Для ривароксабану та ривароксабану D4 переходи моніторингу множинної реакції були встановлені на 436/145 (m/z) та 440/145 (m/z) відповідно. Калібрувальні криві були лінійними ($r^2 \geq 0,99$) у діапазоні 5,96–801 нг/мл із нижньою межею кількісного визначення, підтвердженою на рівні 5,96 нг/мл. Відновлення екстракції становило >88% як для ривароксабану, так і для його стабільного міченого внутрішнього стандарту ривароксабану D4. Точність між днями/між серіями коливалася від 1,08% до 3,75%, тоді як точність коливалася від 96,3% до 102%. Представлений метод був використаний у фармакокінетичних дослідженнях на здорових добровольцях. Результати проведеного повторного аналізу зразків були в межах прийняттого діапазону $\pm 20\%$ від вихідного значення для 98,3% проб, проаналізованих повторно. Це свідчить про хорошу точність аналізу цільових аналітів у їхній реальній матриці за використовуваних експериментальних умов. Була продемонстрована придатність аналізу для визначення фармакокінетичних параметрів [32].

Для кількісного визначення дабігатрану (Pradaxa) і ривароксабану (Xarelto) було розроблено та перевірено чутливий і точний метод рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Як внутрішній стандарт використовували 13C6-дабігатран і 13C6-ривароксабан. Для приготування зразка плазми використовували одностадійну преципітацію білка. Цей метод був валідований щодо лінійності, селективності, між- та внутрішньоденної точності та точності, межі кількісного визначення та стабільності. Нижня межа кількісного визначення становила 2,5 нг/мл для обох препаратів у плазмі [33].

Ривароксабан (RRN) є першим доступним активним прямим інгібітором фактора Ха (антикоагулянт) для перорального застосування. Завдяки успіху на ринку були докладені зусилля для розробки різних складів RRN, і розробка хороших аналітичних методів для його оцінки *in vivo* є важливою передумовою. Таким чином, тут представлено простий та ефективний метод визначення RRN у плазмі щурів за допомогою рідинно-рідинної екстракції

(LLE) та рідинної хроматографії та моніторингу множинних реакцій (LC-MRM). Використання етилацетату як розчинника LLE призводить до відповідної екстракції та очищення RRN, а також сприяє значному зменшенню об'єму плазми щурів, необхідного для кількісного визначення RRN. Розроблений метод показав хороші аналітичні характеристики, включаючи специфічність, лінійність ($r^2 \geq 0,999$ в межах 0,5-500 нг/мл), чутливість (нижня межа кількісного визначення 0,5 нг/мл), точність (89,3-107,0%), прецизійність ($\geq 12,7$) і відновлення (89,2 - 105,7%). Крім того, RRN в екстрактах зразків показав хорошу стабільність. Нарешті, застосовність валідованого методу для оцінки ФК RRN була підтверджена після його перорального введення нормальним щурам. Даний метод є першим аналітичним методом, що використовує LLE для простої та ефективної екстракції та очищення RRN у плазмі щурів. Таким чином, даний метод може сприяти розробці нових складів RRN, а також моніторингу RRN в особливих клінічних ситуаціях шляхом його ефективного визначення в різних зразках з незначними модифікаціями або без них [34].

Висновки до розділу 1

В розділі описані можливості застосування препаратів з рибоксином в медичній практиці, а також існуючі методики його кількісного визначення в складі лікарських форм та біологічних рідинах.

На основі літературних даних, встановлено, що «Ксарелто» – перший таблетований пероральний прямий антикоагулянт. Лікарський засіб для перорального застосування, що має селективність, має широке терапевтичне вікно, низький ризик виникнення кровотеч, що не вимагає постійного контролю перебігу терапії, застосовується 1 раз на добу, що також сприяло б формуванню у пацієнта прихильності до лікування.

Проведений аналіз показав, що найбільш часто використовується метод ВЕРХ і різні варіації даного методу. Проте, незважаючи на позитивні сторони цього методу, він не завжди може бути застосований в практиці лабораторій Державних інспекцій з контролю якості через відсутність відповідного обладнання. Деякі методи характеризуються трудомісткістю пробопідготовки та значною тривалістю виконання. Деякі із наведених методів характеризуються малою специфічністю, невисокою вибірковістю, застосуванням малодоступних реагентів, що викликає певне ускладнення в аналізі даних лікарських препаратів.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Ривароксабан хімічно відомий як 5-хлор-N-({(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксоморфолін-4-іл)феніл]-1,3-оксазолідин-5-іл } метил)тіофен-2-карбоксамід – перорально активний інгібітор прямого фактора Ха (FXa), розроблений компанією Bayer і схвалений Управлінням з контролю за продуктами й ліками США (USFDA) у липні 2011 року під торговою назвою Xarelto [35].

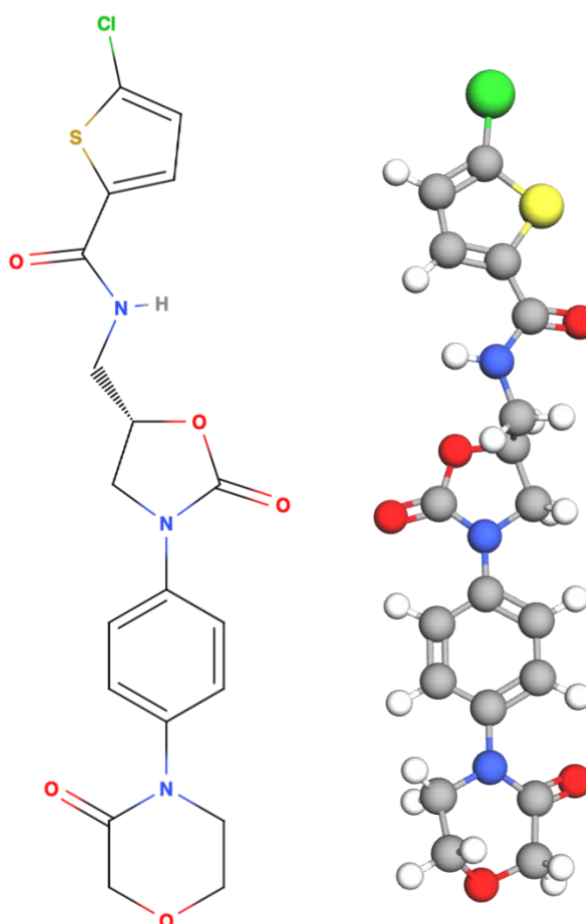


Рис. 2.1. Ривароксабан – 5-хлор-N-({(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксоморфолін-4-іл)феніл]-1,3-оксазолідин-5-іл } метил)тіофен-2-карбоксамід

Він є членом тіофенів, хлорорганічної сполуки, оксазолідинону, члена морфолінів, лактаму, ароматичного аміду та аміду монокарбонової кислоти [36].

Система 1,3-оксазолідинового кільця ривароксабану (5-хлор-N-[[5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксоморфолін-4-іл)феніл]-1,3-оксазолідин-5-іл]метил]тіофен-2-карбоксамід) має в положенні 5 а хіральний атом вуглецю і має два енантіомери, які називаються R і S, з явною перевагою (S)-конфігурації [8]. Оптимізована молекулярна конформація (S)-ривароксабану (рис. 4) забезпечує L-форму, необхідну для зв'язування фактора Ха. Експериментально визначена тривимірна структура досліджуваного (S)-ривароксабану відповідає зв'язаній молекулі з білком, тому загальні структурні мотиви препарату можна порівняти з результатами для ізольованої молекули лише теоретичними методами. Експериментальні значення для двограних кутів у комплексі ривароксабан-fХа добре інтерпретуються відповідними кутами, розрахованими для сольватованого (S)-ривароксабану. Основна відмінність у молекулярній структурі зв'язаного та незв'язаного ривароксабану виникає через положення кінцевого фрагмента морфолінону, двогранного кута α [C(1)-N(2)-C(3)-C(4)]. Карбонільна група цього фрагмента впливає головним чином на планаризацію морфолінонового кільця та приводить його до досить перпендикулярного розташування до арильного кільця [8]. Розрахунки DFT свідчать про більш плоске розташування морфолінових і арильних кілець. Двогранний кут α [C(1)-N(2)-C(3)-C(4)] становить приблизно 51° - 55° (метод DFT), а для (S)-ривароксабану у водному розчині та/ або на рецепторі збільшується приблизно до 67° - 77° (таблиця 1). Оксазолідонове та арильне кільця майже копланарні (двогранний кут β [C(5)-C(6)-N(7)-C(8)]) [35, 36, 37].

Ривароксабан має вражаючу структурну схожість з антибіотиком лінезолідом: обидва препарати мають однакову структуру ядра, похідного від оксазолідинону [38]. Відповідно, ривароксабан вивчався на предмет будь-яких можливих антимікробних ефектів і можливості мітохондріальної токсичності, яка є відомим ускладненням тривалого застосування лінезоліду [39]. Дослідження показали, що ані ривароксабан, ані його метаболіти не мають антибіотичної дії проти грампозитивних бактерій. Що стосується

мітохондріальної токсичності, дослідження *in vitro*, опубліковані до 2008 року, виявили низький ризик [38, 39].

Порошок від білого до жовтуватого кольору з молекулярною масою 435,89. Емпірична формула та відносна молекулярна маса ривароксабану були підтверджені елементарним аналізом та мас-спектрометрією [39].

Структуру підтверджується спектральними даними: ІЧ, УФ-VIS, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, мас-спектрометрією та елементарним аналізом. Кільцева система 1,3-оксазолідину містить у позиції 5 хіральний атом вуглецю з (S)-конфігурацією. Рентгеноструктурний аналіз монокристалів підтверджує S-конфігурацію молекули [40].

Ривароксабан лише незначно розчинний в органічних розчинниках (наприклад, ацетон, поліетиленгліколь 400) і практично нерозчинний у воді та водних середовищах з рН 1-9 (рН-незалежні 5–7 мг/л розчинні при 25°C). Коефіцієнт розподілу октанол/вода ($\log P_{o/w}$) становить 1,5 [39, 40].

Ривароксабан був протестований на поліморфізм і псевдополіморфізм відповідно до рекомендацій ICH Q6A. Ривароксабан кристалізується у вигляді трьох поліморфів. Поліморф I є термодинамічно стабільним і використовувався у всіх композиціях таблеток під час клінічної розробки та буде використаний у комерційному продукті. Ідентичність поліморфу I регулярно контролюється спектроскопією раманівського розсіювання під час випуску [40].

Специфікація

Специфікація активної речовини включає тести на зовнішній вигляд, колір розчину, ідентифікацію (ІЧ, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), аналіз (ВЕРХ), енантіомерну чистоту, поліморф I (спектри Рамана), розмір частинок (лазерна дифракція), пов'язані домішки (HPLC), залишкові розчинники (GC), вміст води (Карл-Фішер), сульфатна зола (Ph. Eur), важкі метали (Ph. Eur) і мікробна чистота (Ph. Eur). Аналітичні методи, не описані в Ph.Eur пройшли достатню валідацію, щоб відповідати загальним вимогам

настанови ІСН Q2R «Валідація аналітичних процедур: випробування та методологія» [43-46].

Критерії прийнятності в специфікаціях активної речовини були встановлені відповідно до ІСН Q6A і базуються на аналізі серій трьох репрезентативних пілотних серій, виготовлених за допомогою описаного процесу, призначеного для маркетингу, і 29 доклінічних, клінічних і стабільних серій. Усі результати відповідають специфікації та демонструють постійну якість вироблених партій [45].

Стабільність

Щодо стабільності серій діючої речовини, що зберігаються при 25 °С / 60% RH протягом 18 місяців і при 40 °С / 75 % протягом шести місяців [44, 45].

Досліджуваними параметрами були зовнішній вигляд (матеріал, колір), колір розчину, поліморфізм, розмір частинок, енантіомерна чистота, органічні домішки, аналіз і вміст води з використанням аналітичних методів тестування, призначених для вивільнення діючої речовини, які, як було показано, є показником стабільності. У всіх випадках результати відповідали попередньо визначеним умовам якості, встановленим під час тестування. Не було жодної деградації чи збільшення вмісту води [47].

Додаткові дослідження стабільності були проведені в стресових умовах (термічний, гідролітичний та окислювальний стрес). Результати цих досліджень показують, що ривароксабан є дуже стабільною речовиною щодо термічних умов і достатньо стабільною щодо гідролітичного стресу [46].

Фотостабільність діючої речовини перевіряли відповідно до вимог ІСН Q1B. Результати показали, що активна речовина у твердому стані є стабільною щодо впливу світла, тому немає необхідності вживати будь-яких заходів щодо упаковки та зберігання [46, 47].

Активна речовина практично нерозчинна у воді та має високу проникність, що підтверджено результатами валідованого аналізу Сасо-2. Тому його можна класифікувати як речовину класу II у системі

біофармацевтичної класифікації (низька розчинність, висока проникність) [47].

2.2. Методи дослідження

Спектрофотометрія – це фізико-хімічний метод дослідження речовин, заснований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій (200-400 нм), видимій (400-760 нм) та інфрачервоній (> 760 нм) областях спектра. Основна залежність, яка вивчається в спектрофотометрії, - залежність інтенсивності поглинання падаючого світла від довжини хвилі [36].

Описуючи адсорбційний спектр речовини, наводять положення максимумів, мінімумів поглинання, плечей та точок перегину, розчинник і концентрацію розчину. Наведення розчинника є обов'язковою умовою, оскільки сольватація речовини значно впливає на довжину хвилі.

Поглинання в УФ- та видимій областях спектра пояснюють наявністю в молекулі речовини певних груп – хромофорів, до яких можуть бути віднесені подвійні та потрійні зв'язки, ароматичні фрагменти, азо-, нітро- та ін. групи.

Спектри речовин схожі, коли молекули містять однакові хромофори. Якщо молекула містить два (або більше) хромофори, розділених більш ніж одним простим зв'язком, то спектр сполуки є сумою спектральних характеристик індивідуальних хромофорів. У випадку, коли хромофори розділені лише одним простим зв'язком, між ними виникає спряження і утворюється новий, більший хромофор з іншими спектральними характеристиками.

Функціональні групи, які не поглинають в ближньому ультрафіолеті або видимому світлі, але можуть впливати на поведінку супряженого з ними хромофора називають ауксохромами (-ОН, -SH, -NH₂, -NR₂, -OAlk). За звичай вплив ауксохромів викликає виникнення поглинання при більших довжинах хвиль і з більшим значенням ϵ , ніж це характерно для даного хромофору. Слабший ауксохромний ефект мають альکیلні замісники. Функціональні

групи, що мають електроноакцепторні властивості, можуть проявляти зворотній ефект.

Для характеристики спектральних змін викликаних модифікацією структури або зміною розчинника, вживають спеціальну термінологію: батохромний зсув – зміщення смуги поглинання у бік більших довжин хвиль; гіпсочромне зміщення – зміщення смуги поглинання в бік менших довжин хвиль; гіперхромний ефект – збільшення інтенсивності поглинання; гіпсочромний ефект – зменшення інтенсивності поглинання.

Вимірювання оптичної густини A на ультрафіолетовій та видимій ділянках спектрів проводять на фотоелектричних спектрофотометрах.

Вимірювальна шкала спектрофотометра проградуєвана у відсотках пропускання T або у величинах оптичної густини A , а шкала довжини хвиль або хвильових чисел – нанометрах або в см^{-1} відповідно.

У процесі вимірювання на шляху пучка випромінювання певної довжини хвиль, що виходить з монохроматора, по черзі встановлюють спочатку нульовий (контрольний) розчин (розчинник або розчин, який містить всі ті ж компоненти, за винятком речовини, що аналізується), для якого приймають, що $T = 100\%$, $A=0$, а потім розчин, що досліджується.

Для зниження величини похибки концентрації розчину та товщину його шару підбирають такими, щоб A на спектральній ділянці, що досліджується, знаходилась в межах рекомендованих інструкцією до відповідного приладу. Залежно від здатності речовини до поглинання, це звичайно досягається при використанні $0,01 - 0,00001\%$ розчину.

Фармакопеї різних країн рекомендують застосовувати адсорбційну спектрофотометрію для кількісного визначення лікарських засобів. Починають визначення з дослідження спектрів речовини поглинання в різноманітних розчинниках з метою вибору умов проведення аналізу та аналітичної смуги поглинання. Для досягнення максимальної відтворюваності, правильності і чутливості аналізу така смуга має відповідати декільком вимогам.

1. Аналітична смуга поглинання повинна мати високий показник поглинання χ . Чим вище значення χ , тим більше зміна оптичної густини ΔA буде відповідати зміні концентрації ΔC . Крім того, при великому значенні використання розчинів з меншою концентрацією дозволяє зменшити вплив можливих присутніх домішок (їх максимуми знаходяться на іншій ділянці спектра, χ за зазначеної довжини хвилі, а значить, і внесок в оптичну густину розчину буде не суттєвим).

2. Аналітична смуга поглинання має бути достатньо похилою. Вибір $\lambda_{\text{анал}}$ на похилому максимумі зменшує вплив ширини щілини і похибку при встановленні довжини хвилі. При роботі на похилому максимумі поглинання неточне встановлення довжини хвилі практично не впливає на точність вимірювань, у той час, як на крутих ділянках спектра похибка може зростати до 0,7% вимірюваної величини.

3. Аналітична смуга поглинання має бути максимально вільною від поглинання інших компонентів системи. Звичайно частка їхнього сумарного поглинання не має перевищувати десятої частини допусків вмісту аналізованого компонента. З цією метою при наявності у речовини декількох максимумів поглинання віддають перевагу максимуму з більшим значенням довжини хвилі (ДФУ критерієм незначності впливу вважає третину від допуску) [37, 38, 39].

Важливим етапом розробки є перевірка лінійності відгуку, тобто лінійної залежності вимірюваної величини від концентрації чи кількості речовини в пробі. У спектрофотометрії вона зводиться до перевірки меж підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера. Готують серію розчинів аналізованої речовини різної концентрації в межах можливості вимірювання даного приладу, визначають їх оптичну густину і будують графік залежності $A=f(C)$.

Як зазначалося, світлопоглинання розчинів підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій, де ця залежність відображається прямою лінією, що проходить через початок координат.

При виконанні закону Бугера-Ламберта-Бера величина вільного члена в рівнянні буде не значимою.

Наявність нелінійної залежності $A = f(C)$ не свідчить про неможливість застосування спектрофотометрії для кількісного визначення речовини. А вимагає додаткового кореляційного аналізу і доведення того, що нелінійна функція коректно описує залежність оптичної густини від концентрації розчину.

На практиці вибирають середину інтервалу концентрацій, де градувальний графік є лінійним, а відхилення показника поглинання – мінімальним, і для кількісного визначення готують розчини саме з такою концентрацією.

Концентрацію розчинів методом спектрофотометрії можна встановити чотирма способами:

1. **За градувальним графіком.** Градувальний графік – це експериментально знайдена графічна залежність оптичної густини від концентрації. Таким графік використовують, коли для речовини, що визначається, поглинання пропорційне концентрації в межах, як мінімум 75-125% від діапазону застосування методики.

2. **За показником поглинання.** Для визначення концентрації розчинів спектрофотометричним методом використовують закон Бугера-Ламберта-Бера у вигляді рівняння:

$$C = \frac{A}{\chi b}$$

Основною перевагою методу показника поглинання є те, що цей метод не потребує використання стандартів, тобто є прямим методом аналізу. Метод показника поглинання має найменшу випадкову похибку аналізу, але найбільшу похибку градування.

Основний недолік – чутливість до класу приладу, тобто той факт, що різні спектрофотометри дають значні відхилення величини поглинання для

одного й того ж стандартного зразка, а також до помилок в аналітичній довжині хвилі.

3. За методом стандарту. Метод стандарту полягає в паралельному вимірюванні за аналітичної довжини хвилі оптичної густини розчину, що досліджується, і стандартного розчину з відомою концентрацією речовини, що аналізується. З отриманих даних розраховують концентрацію досліджуваної речовини в пробі за формулою:

$$\frac{A}{A_{\text{ст}}} = \frac{C}{C_{\text{ст}}}; \text{ звідки } C = \frac{A \cdot C_{\text{ст}}}{A_{\text{ст}}},$$

де A і $A_{\text{ст}}$ – оптичні густини досліджуваного та стандартного розчинів відповідно;

$C_{\text{ст}}$ – концентрація стандартного розчину.

Головна перевага методу – відсутність невідомої похибки градування, адже і випробуваний розчин і розчин порівняння вимірюють за однакових умов на одному приладі; недолік – необхідність використання фармакопейних стандартних зразків (ФСЗ), які через високу ціну збільшують вартість аналізу. До ФСЗ додається сертифікат, в якому зазначено вміст речовини, що аналізується, у відсотках. У цьому випадку формула розрахунку результатів набуває вигляду:

$$C = \frac{A \cdot C_{\text{ст}} \cdot B}{A_{\text{ст}} \cdot 100},$$

де B – вміст речовини, що аналізується, у даному зразку ФСЗ у відсотках.

4. За методом зовнішнього стандарту – це метод, у якому як стандарт використовують не ту сполуку, що досліджується, а іншу. Перевага методу – як стандарт використовують просту речовину, для якої легко отримати стандартний зразок. На додаток до недоліків і переваг методу стандарту метод зовнішнього стандарту має додаткову похибку, пов'язану з невідповідністю спектрів поглинання речовини, що досліджується, і зовнішнього стандарту. Застосовується цей метод, в основному, для аналізу рослинних препаратів, особливо методом фотоколориметрії [40, 41, 42].

Висновки до розділу 2

Об'єктами дослідження для розробки методик кількісного аналізу були обрані таблетки «Ксарелто». Обґрунтовано вибір як методу дослідження абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях. Вимірювання оптичної густини проводили з використанням програмного забезпечення ACD/Labs.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ АНТИТРОМБОТИЧНОГО ЗАСОБУ «КСАРЕЛТО»

3.1. Моделювання спектрофотометричної методики з використанням цифрових технологій

Моделювання в розробці лікарських не є новим. Новим є бачення переходу від ролі опису до ролі прогнозування та, отже, ролі прийняття рішень [48].

Моделювання та симуляція – це термін, який використовується для опису набору методів, які намагаються відтворити відповідні частини чогось у комп'ютерній програмі, а потім використовувати цю програму для постановки запитань [48].

Програмне забезпечення для моделювання – це потужні інструменти, які допомагають багатьом професіоналам створювати складну 3D-графіку та візуалізувати свою роботу. Симулятори безперервних хімічних процесів використовуються з початку 1960-х років. У галузі хімії існує різноманітне програмне забезпечення для молекулярного моделювання та візуалізації, але яке з них краще вибрати? Деякі хімічні програми є кращими з точки зору малювання хімічних реакцій, інші знаходять краще застосування для моделювання білкових структур, а також існують програми для молекулярного моделювання та візуалізації [49, 50]:

- ChemDoodle – це хімічний скетчер, який містить багато функцій для роботи з хімічною графікою. Це програмне забезпечення для молекулярного моделювання для хімії. Він має дуже зручний користувальницький інтерфейс (інтерфейс користувача), який можуть використовувати школярі та інженери-хіміки. Він може створювати хімічні 3D-структури з високоякісною 3D-графікою та швидко створювати та керувати схемами реакцій у режимі реального часу. Міні-додатки, які

виконують різноманітні завдання, сприяючи створенню молекулярної графіки. Такими завданнями можуть бути розрахунок молекулярних мас, проведення елементного аналізу, пошук хімічних структур у базах даних тощо [49, 50].

- Hypercube – це програмне забезпечення для молекулярного моделювання, яке використовується багатьма хіміками через його функціональність і зручний інтерфейс користувача. Основним пакетом цього програмного забезпечення для молекулярного дизайну є «HyperChem». Програмне забезпечення «HyperChem» підтримує багато функцій, пов'язаних з хімічним 3D-дизайном, таких як моделювання білків, молекулярне моделювання, молекулярна візуалізація, обчислення хімічних структур та інші операції, пов'язані з біоінформатикою [51, 52].

Hypercube пропонує інше спеціалізоване програмне забезпечення для молекулярного моделювання, залежно від вашої сфери діяльності в хімії. Одним із них є програмне забезпечення «HyperProtein», яке фокусується на моделюванні білків. Окрім основних функцій, пов'язаних із моделюванням і симуляцією, які може надати програмне забезпечення HyperChem, воно включає деяке програмне забезпечення, пов'язане з вирівнюванням послідовностей і створенням філогенетичного дерева для родин білків [52].

- BIOVIA Draw – це програма для молекулярного малювання, призначена в основному для хіміків і досвідчених професіоналів хімічної промисловості. Він пропонує вченим повний набір інструментів для малювання та модифікації складних молекул, хімічних реакцій і біологічних послідовностей. Його інтерфейс простий у вивченні та пропонує можливість перегляду, обміну даними та архівування наукової інформації [53, 54].

- MolView – це програмне забезпечення для моделювання для хімії з інтерфейсом, що зовсім відрізняється від інших пакетів, згаданих вище. Основна його відмінність полягає в тому, що це безкоштовний онлайн-додаток. Ця програма дуже проста у використанні, навіть якщо у вас немає попереднього досвіду роботи з програмним забезпеченням для 3D-

моделювання. Цю веб-програму з відкритим кодом можна використовувати як молекулярний редактор, так і як засіб перегляду 3D-моделей. Як користувач, ви можете завантажувати молекули з великих баз даних, таких як PubChem, RCSB Protein Data Bank і Crystallography Open Database. За допомогою MolView, крім створення структурних формул, ви також можете використовувати його для відображення білків, моделювання та імітації збірки білків і представлення ланцюга. І останнє, але не менш важливе: ви також можете експортувати різні типи даних у формат PNG (як знімок з інтерактивного спектру) або у формат файлу JCAMP (файл JCAMP-DX поточного спектру) [53, 54].

- ACD/Labs, розділ «Фармацевтичні/біофармацевтика». Дані визначають рішення на кожному етапі фармацевтичного відкриття, розробки та виробництва. Можливість, інтерпретувати аналітичні дані чи робите статистичні прогнози [55, 56].

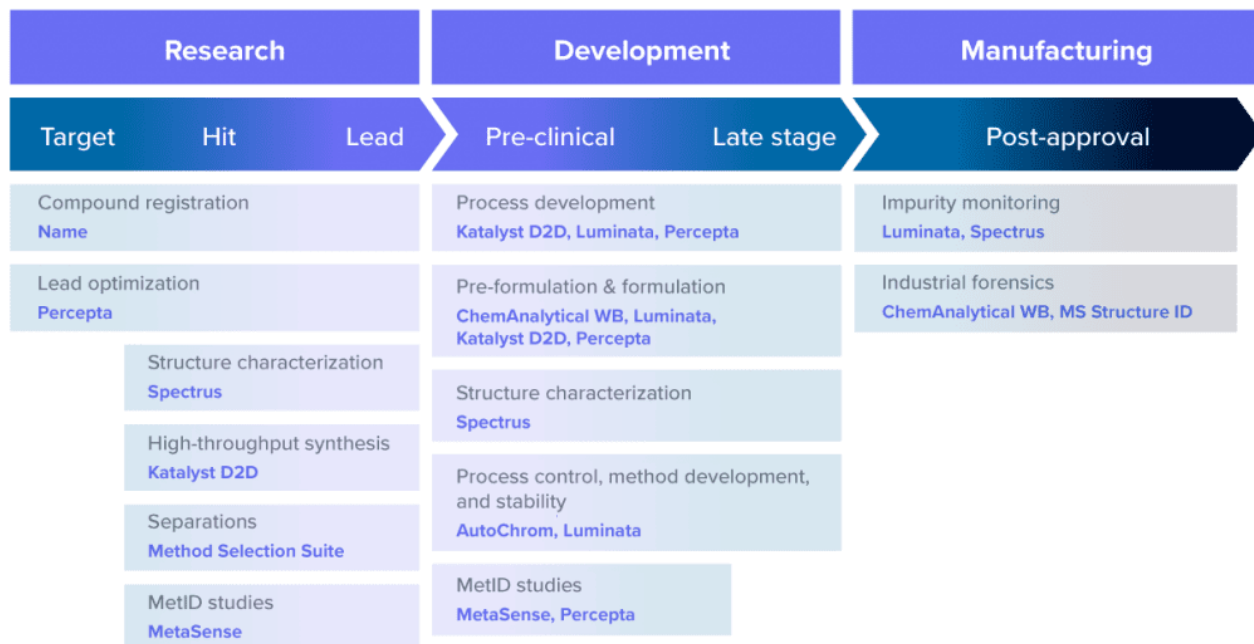


Рис. 3.1. Програмне забезпечення

Програмне забезпечення допомагає керувати даними та робити прогнози під час перевірки бібліотек, синтезу та оптимізації структур. За допомогою

інструментів експериментувати з високою пропускнуою здатністю. Використання програмного забезпечення для визначення характеристик структури. Яку б комбінацію аналітичних методів не використовували (LC/UV/MS, NMR, Raman, IR тощо), програмне забезпечення дозволяє збирати й обробляти всі дані в одній програмі [57, 58].

Тим часом фізико-хімічні властивості ADME допомагають зосередити оптимізацію свинцю на сполуках, які, швидше за все, демонструватимуть бажану фармакокінетику *in vivo*. Крім того, поєднайте прогнозування з експериментальною характеристикою, використовуючи програмне забезпечення, створене для досліджень ідентифікації метаболітів і розробки аналітичного розділення [59]:

- Розробка хроматографічного методу
- Високопродуктивне експериментування
- Ідентифікація метаболітів
- Синтетична хімія
- Ідентифікація та перевірка структури
- Інтерактивні комп'ютерні моделі для навчання аналітичній хімії
- Interactive Computer Models – це колекція безкоштовних

інтерактивних комп'ютерних моделей поширених аналітичних інструментів і методів, які можна завантажити. Більшість із них мають інтерфейс «вклади та клацни»; ви натискаєте кнопки та перетягуєте повзунки, щоб керувати змінними, і модель реагує динамічно, часто набагато швидше, ніж у реальному часі. Це радше інтерактивні математичні моделі, які, по суті, є наборами пов'язаних рівнянь, які описують різні частини або аспекти кожної системи [60, 61].

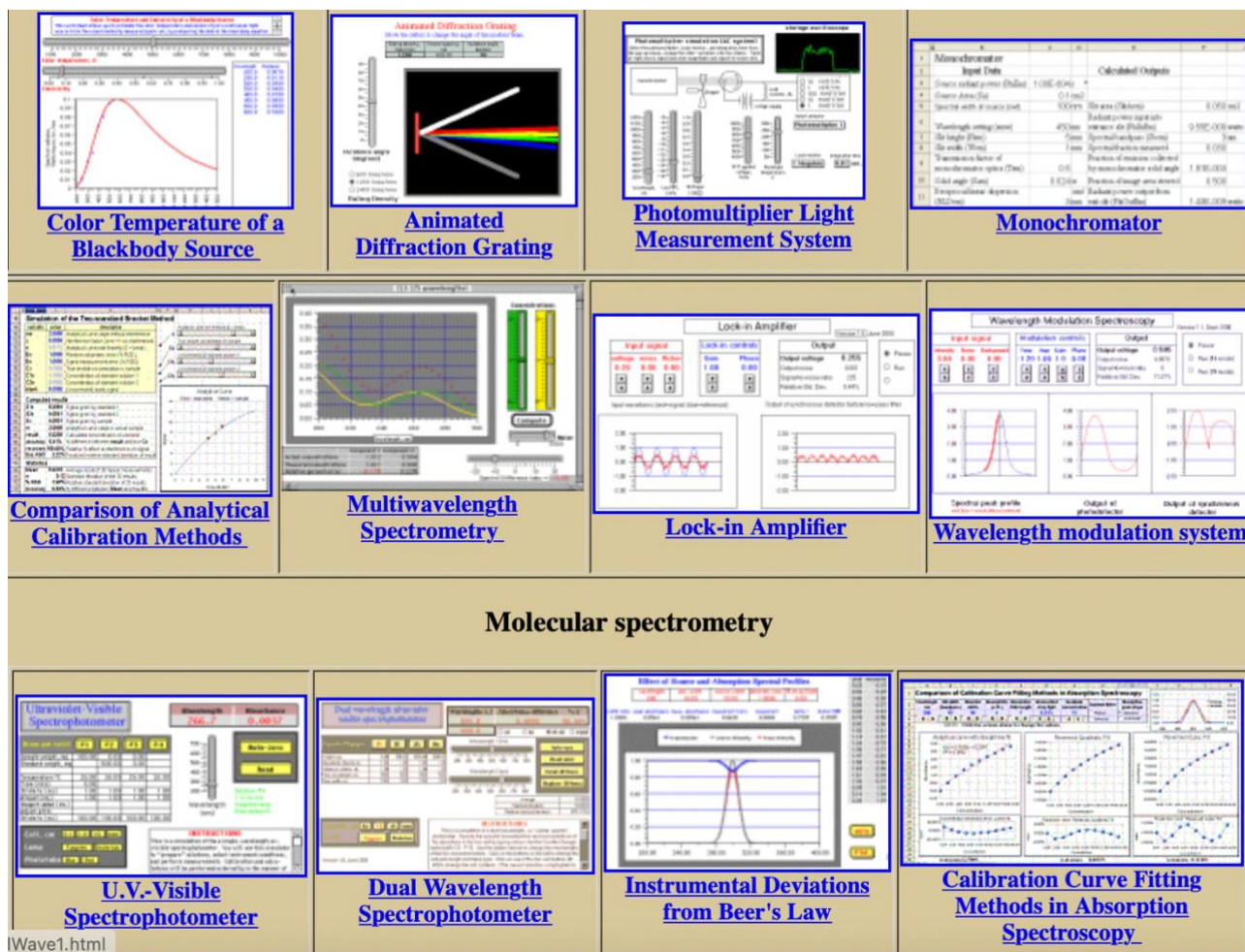


Рис. 3.2. Interactive Computer Models

• Автоматизація лабораторії та наукові рішення штучного інтелекту Alchemy допомагають хімікам, матеріалознавцям та іншому технічному персоналу прискорити дослідження та розробки, тестування, аналіз, контроль якості тощо [61].

3.2. Розробка методики кількісного визначення антитромботичного лікарського засобу «Ксарелто»

Запропоновано різноманітні аналітичні методи для оцінки ривароксабан у субстанціях, готових лікарських засобах та у біологічних рідинах. Вони включають аналіз специфічного хромогенного субстрату фактора Ха [7], хромогенний аналіз анти-фактора Ха [8-10], аналіз протромбінового часу [11], ВЕРХ-МС/МС [12-14], ВЕРХ [15, 16]. Наведені вище методи страждають від

таких недоліків, як довготривалість, громіздка процедура, дороговартісність і потребують досвіду персоналу [7-27]. Деякі з методів застосовуються лише для зразків плазми [7-14].

Для розробки методики кількісного визначення спочатку проводили з використанням програмного забезпечення ACD/Labs. Методика заснована на утворенні іонних асоціатів із кислотними барвниками. Для цього нами був використаний найчастіше використовуваний метиловий оранжевий.

Як відомо з літератури [39,40,41] утворення іонних асоціатів з барвниками при рН 7,4 або 9,0. Нами було обрано середовище з рН 7,5 і встановлено, що ривароксабан утворює іонний асоціат з метиловим оранжевим, хлороформом, максимуми абсорбційного спектра поглинання якого спостерігаються при довжинах хвиль 301 нм і 423 нм. Подальші дослідження показали, що фарбування хлороформного шару нестійке (рис. 3.3).

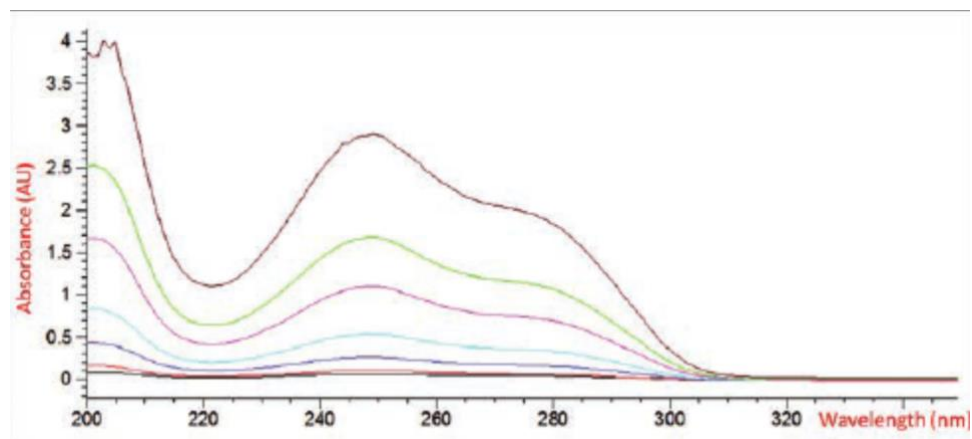


Рис. 3.3. Абсорбційний спектр поглинання хлороформного розчину іонного асоціату ривароксабан з метиловим оранжевим при рН 7,5

З наведеного на рис. 3.3 спектра спостерігаємо, що максимум за довжини хвилі 301 нм менш інтенсивніше, ніж за довжини хвилі 423 нм. Крім того, оптична густина в максимумі при довжині хвилі знаходиться в межах менше 0,2 і такий максимум не рекомендується використовувати для кількісного визначення.

Після цього запропонована реакція утворення іонного асоціату ривароксабан з метиловим оранжевим при рН 4,5 і витягували органічним розчинником. Реєстрували абсорбційний спектр поглинання одержаного хлороформного вилучення іонного асоціату в ділянці від 220 нм до 550 нм (рис. 3.4).

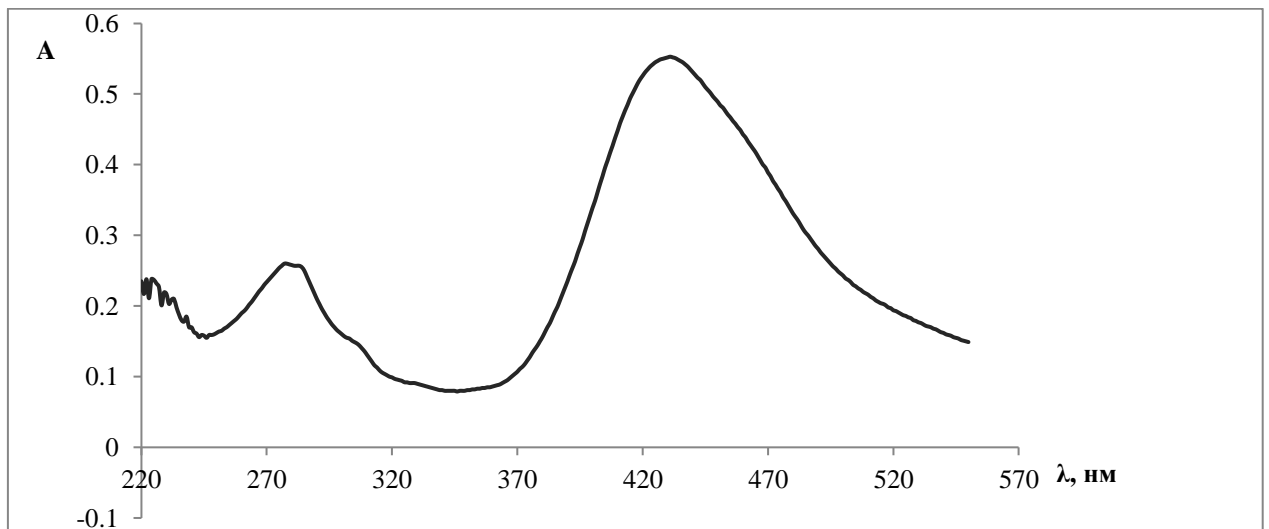


Рис. 3.4. Абсорбційні спектри поглинання: 1 – хлороформного розчину іонного асоціату ривароксабану з метиловим оранжевим при рН 4,5

Дані рис. 3.4 свідчать, що в абсорбційному спектрі поглинання спостерігаються два досить пологих максимуми при довжинах хвиль 278 нм і 430 нм. Максимум при довжині хвилі 430 нм специфічніший і був обраний нами як аналітична довжина поглинання. Експериментально встановлено (рис. 3.4), що за цих умов метиловий оранжевий у хлороформному шарі не переходить і практично не поглинає.

Для дослідження підпорядкування хлороформного розчину іонного асоціату ривароксабану з метиловим оранжевим законом Бугера-Ламберта-Бера запропонована серія стандартних розчинів з різною концентрацією ривароксабану та вимірювали їх оптичну густину.

Методика приготування розчинів ривароксабану 0,05 г поміщують у мірну колбу об'ємом 50 мл, доводять водою очищеної до мітки. Аліквоту досліджуваного розчину об'ємом 0,05мл; 0,10 мл; 0,15 мл; 0,20 мл; 0,25 мл; 0,30 мл; 0,35 мл; 0,40 мл або 0,45 мл кількісно переносять у ділильну лійку,

додають 20 мл буферного розчину з рН 4,5, 3 мл 0,1% розчину метилового оранжевого, 10 мл хлороформу. Струшують протягом 5 хвилин і залишають для поділу шарів. Хлороформну витяжку фільтрують через паперовий фільтр мірну колбу на 50 мл. Екстракцію хлороформом повторюють ще двічі, використовуючи щоразу 10 мл хлороформу. Відфільтровують через той самий фільтр у мірну колбу, доводять об'єм хлороформом до мітки, перемішують.

Результати дослідження залежності оптичної густини від концентрації стандартних розчинів ривароксабану наведено в табл. 3.3 та на рис. 3.4 і свідчить про те, що підпорядкування хлороформних розчинів іонних асоціатів ривароксабану з метиловим оранжевим законом Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в концентрації аналізованої речовини від $2,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,2 \cdot 10^{-3}\%$.

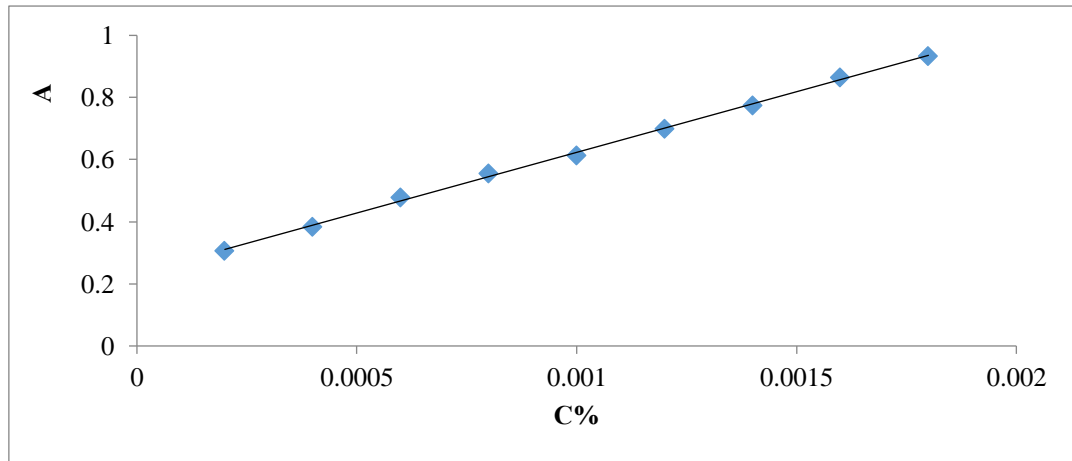


Рис. 3.5. Графік залежності оптичної густини від концентрації дослідженого розчину ривароксабану при довжині хвилі 430 нм

Таблиця 3.1

Результати визначення оптичної густини стандартних розчинів ривароксабану

№ п/п	Об'єм розчину, мл	Концентрація розчинів, %	Оптична густина	Питомий показник поглинання
1	0,05	0,0002	0,306	1530
2	0,10	0,0004	0,385	963
3	0,15	0,0006	0,478	797

4	0,20	0,0008	0,555	694
5	0,25	0,0010	0,614	614
6	0,30	0,0012	0,699	583
7	0,35	0,0014	0,775	554
8	0,40	0,0016	0,865	541
9	0,45	0,0018	0,933	518

Далі ми експериментально встановлювали кількість метилового оранжевого, необхідне для утворення іонного асоціату. Для цього ми проводили реакцію утворення іонного асоціату за наведеною методикою з додаванням 1,0 мл; 1,5мл; 2,0 мл; 2,5 мл; 3,0 мл; 3,5 мл; 4,0 мл або 4,5 мл 0,1% розчину метилового оранжевого та визначена оптичну густина отриманих хлороформних розчинів при довжині хвилі 430 нм. Отримані результати наведено у табл. 3.2 і свідчать, що для утворення іонного асоціату доцільно використовувати 3 мл розчину метилового оранжевого.

Таблиця 3.2

Залежність оптичної густини від кількості індикатора

С, мг/мл	Оптична густина при додаванні метилового оранжевого, мл							
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
0,5	0,443	0,557	0,561	0,592	0,604	0,577	0,564	0,486
1,0	0,845	1,071	1,080	1,150	1,162	1,125	1,069	0,917

Висновки до розділу 3

1. Розроблено умови спектрофотметричного визначення ривароксабану: вибраний барвник, рН середовища, екстрагент, довжина хвилі.

2. Підпорядкованість хлороформних розчинів іонних асоціатів ривароксабану з метиловим оранжевим законом Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в концентрації аналізованої речовини від $2,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,2 \cdot 10^{-3}\%$.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено та узагальнено дані літератури за способами отримання, фізико-хімічними властивостями, методами аналізу та фармакологічної активності ривароксабану.

2. Змодельована методика спектрофотометричного визначення ривароксабану: вибраний барвник, рН середовища, екстрагент, довжина хвилі.

3. Підпорядкованість хлороформних розчинів іонних асоціатів ривароксабану з метиловим оранжевим законом Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в концентрації аналізованої речовини від $2,0 \cdot 10^{-4}$ до $2,2 \cdot 10^{-3}\%$.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ДЕРЖАВНИЙ ФОРМУЛЯР лікарських засобів / Під редакцією В.Т.Чумака, В.І. Мальцева, А.М.Морозова, В.Д. Парія, А.В. Степаненко.- К., 2010.- 945 с.
2. Statystyka zakhvoriuvan v Ukraini stanom na 27. 04. 2022 roku. – URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/ukraine/>
3. Огляд фармацевтичного ринку антикоагулянтів для лікування коронавірусної хвороби (Covid-19) під час воєнного стану в Україні / О. М. Заліська, О. М. Семенов / Фармацевтичний журнал. – 2022. – Т. 77, № 5. – С. 3-11
4. Direct Oral Anticoagulant Agents: Pharmacologic Profile, Indications, Coagulation Monitoring, and Reversal Agents / D. K. Rose, B. Bar // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2018. – Vol. 27. – P. 2049-2058
5. Антитромботична терапія хворих з фібриляцією передсердь: Практичні рекомендації щодо використання нових оральних антикоагулянтів / Асоціація кардіологів України. Асоціація аритмологів України. Київ, 2014. 56 с.
6. Evolution of Medicare formulary coverage changes for antithrombotic therapies after guideline updates / E. J. Dayoub, J. S. Ross, N. D. Shah, S. S. Dhruva // Circulation. – 2019. – Vol. 140(14). – P. 1227-1230
7. Anticoagulants: A Short History, Their Mechanism of Action, Pharmacology, and Indications / M. Heestermans, G. Poenou, H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, L. Bertoletti // Cells. – 2022. – Vol. 11 (3214). – P. 1-17
8. Ведення пацієнтів з гострою правошлуночковою недостатністю на сучасному етапі: Положення Асоціації фахівців із серцевої недостатності та робочої групи з проблем легеневого кровообігу функціонального стану правого шлуночка Європейського товариства кардіологів / V.-P. Narjla, A. Mebazaa, J. Selutkine et al. // Кардіохірургія та інтервенційна кардіологія. – 2016. – № 3. – С. 60-66.

9. Therapeutic strategies for thrombosis: New targets and approaches / N. Mackman, W. Bergmeier, G. A. Stouffer, J. I. Weitz // Nat. Rev. Drug Discov. – 2020. – Vol. 19. – P. 333-352.
10. Priscilla Bento Matos Derogis,¹ Livia Rentas Sanches,¹ Valdir Fernandes de Aranda, Determination of rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295670/>
11. Janssen Pharmaceuticals Inc. Xarelto (rivaroxaban) Prescribing Information; 2013. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022406s004lbl.pdf
12. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty / M. R. Lassen, W. Ageno, L. C. Borris // N Engl J Med. – 2008. – Vol. 358. – P. 2776-86.
13. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with acute coronary syndromes / X. S. Xu, K. Moore, P. Burton // Br J Clin Pharmacol. – 2012. – Vol. 74. – P. 86–97.
14. Effect of multiple doses of omeprazole on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of a single dose of rivaroxaban / K. T. Moore, A. N. Plotnikov, A. Thyssen // J Cardiovasc Pharmacol. – 2011. – Vol. 58. – P. 581-588.
15. Recent advances in the treatment of venous thromboembolism in the era of the direct oral anticoagulants / J. I. Weitz, I. H. Jaffer, J. C. Fredenburgh // F1000Research. – 2017. – 6. – 985 p.
16. Ривароксабан для профілактики інсульту в пацієнтів із фібриляцією передсердь: цінність доказів із реальної практики / А.І. Самт, С.І. Coleman, Т.В. Larsen // Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя» № 15 (484), 2020 р. <https://health-ua.com/article/61485-rivaroksaban-dlya-proflaktiki-nsultu-vpatcntv--zfbrilyatcyu-peredserd-tcnns>

17. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban / W. Mueck, J. Stampfuss, D. Kubitzka, M. Becka // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2014. Vol. 53. – P. 1-16

18. Baglin T. The role of the laboratory in treatment with new oral anticoagulants / T. Baglin // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2013. – 11 (1). – P. 122-128.

19. Rivaroxaban: a review of its use in the treatment of deep vein thrombosis or pulmonary embolism and the prevention of recurrent venous thromboembolism / C. B. Burness, C. M. Perry // *Drugs*. – 2014. – Vol. 74(2). – P. 243-262.

20. The safety of oral anticoagulants registry (SOAR): A national, ED-based study of the evaluation and management of bleeding and bleeding concerns due to the use of oral anticoagulants / C. V. Pollack [et al.] // *Am. J. Emerg. Med.* – 2020. – 38. -P. 1163-1170.

21. The chemistry of snake venom and its medicinal potential / A. L. Oliveira [et al.] // *Nat. Rev. Chem.* – 2022. – 6. – P. 451-469.

22. Rivaroxaban: an oral factor Xa inhibitor / T. F. Thomas, V. Ganetsky, S. A. Spinler // *Clinical therapeutics*. – 2013. – 35(1). – P.4-27.

23. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of rivaroxaban in human plasma and its application to a pharmacokinetic study / Khurshid_Shaikh [et al.] // *European Journal of Mass Spectrometry* – 2019. – P. 91-105

24. Alexander S, Thomas L, Jens P, Susanne R, Elisabeth P et al (2009) Substituted Oxazolidinones and Their Use in the Field of Blood Coagulation. U.S. Patent 7,576,111

25. Rivaroxaban monograph for professionals. Drugs.com. American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved 3 March 2019.

26. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring / Wolfgang Mueck, Stephan Schwerts, Jan Stampfuss // *Thrombosis*

<https://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-9560-11-10>

27. Bayer Pharma AG: Xarelto (rivaroxaban) summary of product characteristics. 2013.

[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR -
Product Information/human/000944/WC500057108.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf)

28. Janssen Pharmaceuticals Inc: Xarelto® (rivaroxaban) prescribing information. 2013.

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022406s004lbl.pdf

29. Samama MM: The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thromb Res* 2011, 127: 497-504

30. The effects of rivaroxaban, an oral anticoagulant, on human IVD primary cultures / T. Caliskan, H. Akalan, I. Yilmaz, N. Karaarslan, D. Y. Sirin, H. Ozbek // *Arch Med Sci.* – 2022. – 18(4). – P. 1062-1070.

31. Facile approach for the synthesis of rivaroxaban using alternate synthon: reaction, crystallization and isolation in single pot to achieve desired yield, quality and crystal form / Anil C Mali, Dattatray G Deshmukh, Divyesh R Joshi, Hitesh D Lad, Priyank I Patel, Vijay J Medhane & Vijayavitthal T Mathad // <https://sustainablechemicalprocesses.springeropen.com/articles/10.1186/s40508-015-0036-3#Tab2>

32. Evaluation of remote pharmacist-led outpatient service for geriatric patients on rivaroxaban for nonvalvular atrial fibrillation during the COVID-19 pandemic / X. Li, C. Zuo, W. Lu // *Front Pharmacol.* – 2020. – 11. – 1275 p.

33. Anticoagulant effects of rivaroxaban after surgical fixation of spinal fracture / L. Chunhong, L. Jin, Z. Qin, X. Guohui // *Pak J Pharm Sci.* – 2018. – 31. – P. 1131-1135.

34. TWICE daily for lysis of thrombus in the left atrial appendage in patients with non-valvular atrial fibrillation: the RIVA-TWICE study / R. Piotrowski [et al.] // *RIVARoxaban Arch Med Sci.* – 2019. – 16. – P.289-96.

35. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Rivaroxaban in Human Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study / K.Shaikh, A. Mungantiwar, S. Halde, N. Pandita // J. Mass Spectrom. – 2019. – 20. – P. 91-105.

36. Simultaneous Determination of Rivaroxaban and TAK-438 in Rat Plasma by LC–MS/MS: Application to Pharmacokinetic Interaction Study / L.Wang [et al.] // Bioanalysis. – 2020. – 12. – P.11-22.

37. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms / M. Celebier, T. Recber, E. Kocak, S. Altinoz // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 49 (2). – P.360-366.

38. Bakshi M. Development of validated stability- indicating assay methods-critical review / M. Bakshi, S. Singh // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol.28. – P. 1011-1140.

39. Electrochemical behaviour investigation and square-wave voltammetric determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms / I. Suslu, M. Celebiera, S. Altinoza // Analytical Methods. – 2014 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/ay/c4ay01871k/unauth>

40. Kasad P. A. Photolytic-thermal degradation study and method development of rivaroxaban by RP-HPLC / P. A. Kasad // International Journal of PharmTech Research. – 2013. – 5. – P. 1254-1263.

41. Stress study and estimation of a potent anticoagulant drug rivaroxaban by a validated HPLC method: Technology transfer to UPLC / J. Hetal, D. Batuk, P. Madhavi, J. Yashwant Sinha, S. Anamik // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2015. – 7. – P. 65-74.

42. Stability-indicating UPLC method for determining related substances and degradants in rivaroxaban / P. S. Rao, V. K. Cholleti, V. R. Reddy // International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences – 2015. – 5. – P. 17-24.

43. Design and Validation of Dissolution Profile of Rivaroxaban by Using RP-HPLC Method in Dosage Form / A. Kasad Pinaz, K. S. Muralikrishna // *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2013. – 3. – P. 75-78.
44. UV Spectrophotometric Method For Determination Of The Dissolution Profile Of Rivaroxaban / M. Celebier, M. S. Kaynak, S. Altinoz, S. Sahin // *Dissolution Technologies*. – 2014. – P. 56-59.
45. Review on Characteristics and Analytical Methods of Rivaroxaban / T. Recber, I. Celalettin Haznedaroglu, M. Celebier // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol. 52. – P. 865-877.
46. Rapid Determination of Rivaroxaban in Human Urine and Serum Using Colloidal Palladium Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / Y. H. Cheng, W. C. Chen, S. Y. Chang // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2015. – 29. – P. 1977-1983.
47. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry / T. M. Gous [et al.] // *Therapeutic Drug Monitoring*. – 2014. – Vol. 36 (5). – P. 597-605.
48. Spectrophotometric analysis for the quantification of rivaroxaban in bulk and tablet dosage form / B. S. V. Seshamamba, C. B. Sekaran // *IJMPS*. – 2017. – P. 21-34.
49. Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests A study in 9 Swiss laboratories / L. M. Asmis [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2012. – 129. – P. 492-498.
50. RP-HPLC method development and validation for the analysis of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms / P.V.V. Satyanarayana, A. S. Madhavi // *International Journal of Science and Innovative Discovery*. – 2012. – 2. – P. 226-231.
51. A new method development and validation for analysis of rivaroxaban in formulation by RP HPLC / K.S. Chandra [et al.] // *Research Desk*. – 2012. – 1. – P. 24-33

52. Rohde G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor - in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / G. Rohde // *J. Chromatogr. B.* – 2008. – Vol. 872. – P. 43-50.
<https://www.sculpteo.com/en/3d-learning-hub/3d-printing-software/molecular-modeling-software/>
53. A review on the synthetic approaches of rivaroxaban: An anticoagulant drug / T. A. Fattah, A. Saeed // *Chemistry.* – 2017. – Vol. 28. – P. 485-504
54. New synthetic strategy for preparation of the anticoagulant drug Rivaroxaban via an asymmetric Henry reaction / P. Drabina, V. Feixova, Milos Sedlak // *Tetrahedron Letters.* – 2019. – Vol. 60. – P. 99-101
55. Review on Synthetic Approaches toward Rivaroxaban (Xarelto), an Anticoagulant Drug / D. Y. Mladentsev, E. N. Kuznetsova, M. N. Skvortsova, R. R. Dashkin // *Org. Process Res. Dev.* – 2022. – Vol. 26(8). – P. 2311-2329
56. Quantification of anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and prasugrel by chromatographic and spectrometric techniques – review / S. Prasad B, S. Jayakumari // *Asian J Pharm Clin Res.* – 2019. – Vol. 12 (4). – P.1-8
57. Development and validation of bioanalytical method for estimation of rivaroxaban using HPLC-PDA in human blood plasma / S. Yadav, N. Dubey // *J Drug Deliv Ther.* – 2017. – Vol. 7. – P. 123-125.
58. Development and Validation of HPLC-MS/MS method for rivaroxaban quantitation in human plasma using solid phase extraction procedure / G. S. Reddy, S. L. Reddy, L. S. Reddy // *Orient J Chem.* – 2016. – Vol. 32. – P.1145-1154
59. High performance thin layer chromatographic method with densitometry analysis for determination of rivaroxaban from its tablet dosage form / D. Vaghela, P. Patel // *Int J Pharm Pharm Sci.* – 2014. – Vol. 6. – P. 383-386.
60. RP-HPLC method development and validation for determination of rivaroxaban in the pure and pharmaceutical dosage form / R. Meenakshi, R.N. Rao // *J Chem Pharm Res.* – 2016. – Vol. 8. – P. 38-44.
61. Development and validation of stability indicating UPLC method for the determination of rivaroxaban in bulk and finished products and identification of

degradation products by LCMS / S. Mastan Ali, D. Ramachandran // Journal of Applicable Chemistry. – 2021. – Vol. 10(3). – P. 291-301.

Національний фармацевтичний університет

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра медичної хімії
Ступінь вищої освіти магістр
Спеціальність 226 Фармація, промислова фармація
Освітня програма Фармація

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
медичної хімії

Ліна ПЕРЕХОДА

«22» серпня 2022 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Христини КОНДРАТЬЄВОЇ

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто»
керівник кваліфікаційної роботи: Ольга ВІСЛОУС, к.фарм.н., асистент
затверджений наказом НФаУ від «14» жовтня 2022 року № 227.
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: грудень 2022 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: лікарські засоби, які мають антитромботичну активність широко використовуються в лікуванні тромбоемболії. Розробка методики кількісного визначення ривабоксану в субстанції фізико-хімічним методом є актуальними.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): провести моніторинг вітчизняного ринку антикоагулянтів; вивчити та узагальнити дані літератури по фізико-хімічним властивостям, методом аналізу та фармакологічній активності; розробити спектрофотометричний метод кількісного визначення ривароксбан з використання комп'ютерних технологій.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): таблиць – 3, рисунків – 8, схеми – 3.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	07.09.2022 р.	07.09.2022 р.
2	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	13.10.2022 р.	13.10.2022 р.
3	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	08.11.2022 р.	08.11.2022 р.

7. Дата видачі завдання: «22» серпня 2022 року.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Вибір теми.	вересень 2022 р.	виконано
2	Аналіз літературних джерел.	жовтень 2022 р.	виконано
3	Проведення експериментальних досліджень.	жовтень-листопад 2022 р.	виконано
4	Оформлення роботи.	листопад-грудень 2022 р.	виконано
5	Надання готової роботи до комісії.	грудень 2022 р.	виконано

Здобувач вищої освіти

_____ Христина КОНДРАТЬЄВА

Керівник кваліфікаційної роботи

_____ Ольга ВІСЛОУС

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 227
по Національному фармацевтичному університету
від 14 жовтня 2022 року

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 2 курсу, спеціальність – 226 Фармація, промислова фармація, освітня програма – Фармація, ступінь вищої освіти – магістр, термін навчання – 1 р. 6 міс., заочна форми.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Кафедра медичної хімії				
Кондратьєва Христина Ігорівна	Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто»	The use of digital technologies in the development of spectrophotometric methods of the antithrombotic agent «Xarelto»	к.фарм.н., асистент кафедри медичної хімії Віслоус О.О.	к.фарм.н., доцент закладу вищої освіти кафедри фармацевтичної хімії Бевз Н.Ю.

Ректор

Алла КОТВИЦЬКА

Вірно:
Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту



Наталія ЖИВОРА

ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 110306 від «21» грудня 2022 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти заочної форми навчання Кондратьєвої Христини Ігорівни, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто»/ The use of digital technologies in the development of spectrophotometric methods of the antithrombotic agent «Xarelto»», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

0%

19%

ВІДГУК

**наукового керівника на кваліфікаційну роботу ступеня вищої освіти
магістр, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація**

Христини КОНДРАТЬЄВОЇ

**на тему: «Використання цифрових технологій в розробці
спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто».**

Актуальність теми. Нові оральні антикоагулянти ривароксабан «Ксарелто» характеризуються швидким початком дії, відносно коротким періодом напіввиведення, передбачуваним антикоагулянтним ефектом. У зв'язку з необхідністю підвищення ефективності та безпеки нового лікарського засобу є розробка методики кількісного визначення ривароксабану в таблетковій масі фізико-хімічним методом.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. В експериментальній частині наведені дані, отримані в ході досліджень, які можуть бути використані на практиці при розробці нормативних документів для лікарського засобу.

Оцінка роботи. Кваліфікаційна робота за об'ємом теоретичних і практичних досліджень повністю відповідає вимогам до оформлення кваліфікаційних робіт.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Кваліфікаційна робота Христини КОНДРАТЬЄВОЇ може бути представлена до захисту в Екзаменаційну комісію Національного фармацевтичного університету на присвоєння ступеня вищої освіти магістр.

Науковий керівник _____

Ольга ВІСЛОУС

«05» грудня 2022 р.

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу ступеня вищої освіти магістр, спеціальності 226
Фармація, промислова фармація

Христини КОНДРАТЬЄВОЇ

на тему: **«Використання цифрових технологій в розробці
спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто».**

Актуальність теми. ТромбоеMBOLІчні захворювання займають лідируючу позицію в захворюваності та смертності в усьому світі. Значне місце в терапії хворих займають антикоагулянти, зокрема лікарський засіб «Ксарелто». Тому необхідно удосконалювати та розробляти методи кількісного визначення для оцінки якості лікарських засобів.

Теоретичний рівень роботи. Вивчено фізичні, фізико-хімічні та методами аналізу з використанням цифрових технологій.

Пропозиції автора з теми дослідження. Проведено моделювання спектрофотометричної методики кількісного визначення ривароксабану.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. В ході проведених досліджень розроблено методику кількісного визначення ривароксабан в таблетковій масі методом спектрофотометрії, яка є чутливою, об'єктивною, надійною та відтворюваною.

Недоліки роботи. Серед недоліків варто виділити граматичні та технічні помилки.

Загальний висновок і оцінка роботи. Кваліфікаційна робота Христини КОНДРАТЬЄВОЇ може бути представлена до захисту в Екзаменаційну комісію Національного фармацевтичного університету на присвоєння ступеня вищої освіти магістр.

Рецензент _____

доц. Наталія БЕВЗ

«13» грудня 2022 р.

ВИТЯГ
з протоколу засідання кафедри медичної хімії
№ 5 від 23 грудня 2022 р.

ПРИСУТНІ:

проф. Ліна ПЕРЕХОДА, доц. Вадим ЗУБКОВ, доц. Ірина СИЧ, доц. Віталій ЯРЕМЕНКО, доц. Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ, доц. Наталія КОБЗАР, доц. Марина РАХІМОВА, доц. Маргарита СУЛЕЙМАН, ас. Олена БЕВЗ, ас. Ольга ВІСЛОУС.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Звіт про стан виконання кваліфікаційної роботи здобувача вищої освіти факультету фармацевтичних технологій та менеджменту Фм21(1,5з)-01а (226 Фармація, промислова фармація, освітньої програми Фармація) Христини КОНДРАТЬЄВОЇ на тему: «Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто».

СЛУХАЛИ: доповідь здобувача вищої освіти факультету фармацевтичних технологій та менеджменту Фм21(1,5з)-01а Христини КОНДРАТЬЄВОЇ на тему: «Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто», керівник асистент каф. медичної хімії, к.фарм.н. Ольга ВІСЛОУС.

УХВАЛИЛИ: рекомендувати кваліфікаційну роботу Христини КОНДРАТЬЄВОЇ до офіційного захисту в Екзаменаційній комісії.

**Зав. кафедри медичної хімії,
професор**

Ліна ПЕРЕХОДА

**Секретар кафедри медичної хімії,
доцент**

Марина РАХІМОВА

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОДАННЯ ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Направляється здобувач вищої освіти Христина КОНДРАТЬЄВА до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «Використання цифрових технологій в розробці спектрофотометричної методики антитромботичного засобу «Ксарелто»».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Наталія ЖИВОРА /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Христина КОНДРАТЬЄВА представила кваліфікаційну роботу, яка за об'ємом теоретичних і практичних досліджень повністю відповідає вимогам до оформлення кваліфікаційних робіт.

Керівник кваліфікаційної роботи

_____ Ольга ВІСЛОУС

«05» грудня 2022 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Христина КОНДРАТЬЄВА допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри
медичної хімії

_____ Ліна ПЕРЕХОДА

«23» грудня 2022 року

Кваліфікаційну роботу захищено

у Екзаменаційній комісії

«09» лютого 2023 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,

доктор фармацевтичних наук, професор

_____ / Володимир ЯКОВЕНКО /