

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ГЕОРГІЄВСЬКИЙ ГЕННАДІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК: 615.014.21:615.272.4/.275.4+615.33

**АНАЛІТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ СИНТЕЗУ, СТАНДАРТИЗАЦІЇ ТА
ОРГАНІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА ПОХІДНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛУ
ТА ЇХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ**

15.00.03 – стандартизація та організація виробництва лікарських засобів

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фармацевтичних наук

Харків 2013

Дисертація є рукописом

Представлена робота виконана в лабораторії фізико-хімічних процесів Державного підприємства «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції» Державної служби лікарських засобів МОЗ України та ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Науковий консультант: доктор фармацевтичних наук, професор,
Заслужений діяч науки і техніки України
Мазур Іван Антонович,
Запорізький державний медичний університет
професор кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
Мерзлікін Сергій Іванович,
Національний фармацевтичний університет,
професор кафедри токсикологічної хімії

доктор фармацевтичних наук, професор
Ветютнева Наталія Олександрівна,
Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика
завідувачка кафедри контролю якості і стандартизації
лікарських засобів

доктор фармацевтичних наук, професор
Буряк Валерій Прокопович,
Запорізький державний медичний університет,
професор кафедри токсикологічної та неорганічної
хімії

Захист відбудеться «19» грудня 2013 р. о 10⁰⁰ годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному
фармацевтичному університеті (61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного
фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий «16» листопада 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, професор

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розробка нових ЛЗ здійснюється у напрямках пошуку і синтезу принципово нових біологічно активних молекул, синтетичної модифікації існуючих біологічно активних молекул, а також створення нових комбінацій існуючих субстанцій. Пошук і синтез нових молекул, промислове виробництво та реєстрація ЛЗ на основі нових активних фармацевтичних інгредієнтів і введення їх у стандарти лікування потребує значних фінансових затрат та часу, тому розвиток цього першого напрямку здійснюється, завдяки участі великих транснаціональних фармацевтичних корпорацій – «великої фарми». Перспективним напрямком є синтетична модифікація існуючих біологічно активних молекул з метою підвищення їх ефективності, зниження токсичності і розширення спектру дії, що є логічним продовженням робіт з реалізації фармакологічного потенціалу синтезованої фармакофорної структури. Розвиток цього напрямку потребує значно менших фінансових затрат і часу і може стати основним для вітчизняної фармації, у той же час він потребує створення певного алгоритму реалізації на практиці, якій тісно пов'язаний з аналітичним забезпеченням фармацевтичної розробки на новий активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ).

Сучасний арсенал лікарських засобів для лікування зазначених вище захворювань поширився за рахунок вітчизняних препаратів – похідних 1,2,4-триазолу: тіотриазоліну, кардіотрилу та їх комбінованих лікарських форм, створених колективом вчених Запоріжжя, Києва, Харкова, Дніпропетровська під керівництвом професора І.А.Мазура.

Логічним розвитком цього напрямку є пошук більш ефективних ЛЗ на основі синтетичної модифікації вже зареєстрованих субстанцій - тіотриазоліну, кардіотрилу. Оскільки ці субстанції є солями, то можна виділити два шляхи їх модифікації: модифікація противойону та модифікація біологічно активної частини молекули. На сьогодні відсутній стандартизований підхід до таких досліджень, що дозволив би значно оптимізувати їх.

З огляду на вищевказане актуальною задачею сьогодення є розробка аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки нових оригінальних АФІ та їх лікарських форм, що вимагає попереднього теоретичного обґрунтування та формулювання алгоритму.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у лабораторії фізико-хімічних процесів ДП «Державний науковий центр лікарських засобів» та в ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» згідно з планом науково-дослідної роботи «Цілеспрямований пошук біологічно-активних речовин у ряду заміщених та конденсованих похідних 1,2,4-триазолу (триазину), хіназоліну та створення на їх основі лікарських препаратів» (№ державної реєстрації 0107U005125) та Договору про науково-технічне співробітництво між Запорізьким державним медичним університетом та ДП «Державний науковий центр лікарських засобів» від 2004 р. та «Комплексною програмою розвитку медичної промисловості України на 1997-2003 рр. по

науково-технічній розробці готових лікарських засобів та субстанцій дослідного характеру», затвердженою постановою КМУ № 1538 від 18.1.1996 р. (№ державної реєстрації 0103U008804, 0103U002352).

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є теоретичне обґрунтування алгоритму аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки нових АФІ на прикладі похідних 1,2,4-триазолу та його експериментальна апробація, а саме - розробка і впровадження у виробництво нових оригінальних субстанцій - АФІ - похідних 1,2,4-триазолу, а також лікарських форм на їх основі.

Для досягнення цієї мети ставилися такі задачі:

- визначити необхідність створення нових оригінальних вітчизняних лікарських субстанцій та їх готових лікарських форм (ГЛФ) для застосування їх у найгостріший і гострий періоди інфаркту міокарду;
- науково обґрунтувати та сформулювати алгоритм розробки нових оригінальних АФІ у відомому ряду похідних 1,2,4-триазолу та здійснити його експериментальну апробацію;
- здійснити молекулярне моделювання та прогноз біологічної активності для проведення цілеспрямованого синтезу похідних 1,2,4-триазолу за рахунок синтетичної модифікації існуючих біологічно активних молекул з метою підвищення їх ефективності;
- обґрунтувати напрямок синтезу субстанцій – майбутніх АФІ;
- встановити хімічну будову синтезованих сполук;
- науково обґрунтувати і розробити комплекс необхідних методик контролю якості синтезованих сполук та їх лікарських форм для аналітичного забезпечення Фармацевтичної розробки;
- оцінити критичні показники якості субстанцій - АФІ для визначення:
 - кількісного вмісту діючої речовини;
 - допусків вмісту супровідних домішок методами ВЕРХ та ТШХ і вмісту залишкових органічних розчинників методом ГХ;
- розробити необхідні методики для проведення фармако-кінетичних досліджень;
- провести валідацію всіх розроблених методик згідно з вимогами ДФУ;
- розробити і впровадити у виробництво технологію нових похідних 1,2,4-триазолу за рахунок синтетичної модифікації існуючих біологічно активних молекул;
- обґрунтувати дані для патентування нових субстанцій - похідних 1,2,4-триазолу;
- виконати фармацевтичну розробку для підготовки до реєстрації нових лікарських субстанцій - похідних 1,2,4-триазолу та ін'єкційних розчинів на їх основі;

Об'єкт дослідження. Наукове обґрунтування та формулювання алгоритму аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки на прикладі нових оригінальних субстанцій - похідних 1,2,4-триазолу, щодо застосування при створенні нових оригінальних АФІ.

Предмет дослідження. Теоретичне та експериментальне обґрунтування створення комплексу фізико-хімічних (УФ-, ІЧ-, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопія, рентгено-дифракційний метод, потенціометричне титрування у неводних розчинниках), хроматографічних (хромато-мас-спектрометрія, ТШХ, ВЕРХ, ГХ) методик аналізу для аналітичного забезпечення створення регламентів, методик контролю якості на нові оригінальні субстанції - похідні 1,2,4-триазолу та наукове обґрунтування створення їх готових лікарських форм для забезпечення лікарськими засобами при лікуванні хвороб системи кровообігу.

Методи дослідження. Фізико-хімічні методи аналізу (УФ-, ІЧ-, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопія, хромато-мас-спектрометрія, ТШХ, ВЕРХ, ГХ, рентгено-дифракційний метод, потенціометричне титрування у неводних розчинниках), фармако-технологічні, фармакокінетичні методи та статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано та сформульовано алгоритм аналітичного забезпечення пошуку та створення оригінальних лікарських засобів – похідних 1,2,4-триазолу з використанням комплексу науково обґрунтованих фізико-хімічних (УФ-, ІЧ-, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопія, рентгено-дифракційний метод, потенціометричне титрування у неводних середовищах) та хроматографічних (хромато-мас-спектрометрія, ТШХ, ВЕРХ, ГХ) методик аналізу.

На прикладі похідних 1,2,4-триазолу вперше представлено розвиток нового наукового напрямку - аналітичного забезпечення створення та контролю якості ЛЗ за методологією науково обґрунтованого алгоритму, який складається з таких основних етапів: прогнозування можливих видів фармакологічної активності та підтвердження результатами фармакологічних досліджень; теоретичного та практичного обґрунтування синтезу у ряду похідних 1,2,4-триазолу шляхом синтетичної модифікації існуючих біологічно активних молекул; доказі будови та чистоти синтезованих активних фармацевтичних інгредієнтів; вивченні фізико-хімічних та хроматографічних властивостей АФІ для розробки комплексу фізико-хімічних та хроматографічних методик їх аналізу та валідації цих методик; дослідженні та встановленні критичних показників якості; дослідженні стабільності активних фармацевтичних інгредієнтів у тому числі у «стресових умовах»; обґрунтуванні правильності вибору лікарської форми при фармако-кінетичних дослідженнях; впровадженні результатів дослідження в нормативно-технологічну та аналітичну документацію на заводах-виробниках та ДФУ; розробці специфікацій зразків субстанцій АФІ та технологічних домішок для атестації їх стандартних зразків при контролі якості похідних 1,2,4-триазолу; патентному захисті наукових досліджень; підготовці до реєстрації нових препаратів у ДЕЦ та наступного випуску препаратів заводами-виробниками з ціллю вирішення соціально-медичної задачі – забезпечення населення України новими вітчизняними життєво-необхідними кардіологічними препаратами

Виконання наукових досліджень за алгоритмом дозволило створити нові вітчизняні оригінальні АФІ *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Лізиній) та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід (МТ) та їх

ін'єкційні лікарські форми, які за ефектом фармакологічної дії перевищують структурні аналоги – тіотриазолін та кардіотрил.

Наукове значення роботи полягає в розвитку наукового напрямку – аналітичного забезпечення створення та стандартизації лікарських засобів з використанням комплексу науково обґрунтованих фізико-хімічних та хроматографічних методик аналізу похідних 1,2,4-триазолу, що дозволило вперше теоретично обґрунтувати та експериментально довести можливість синтезу нових активних фармацевтичних інгредієнтів - *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Лізиній), 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід (МТ), встановити їх будову, стабільність, що покладено в основу розробки раціональних методів їх одержання при складанні модулю «Якість» реєстраційного досьє на ці субстанції та обґрунтування створення їх готових лікарських форм.

Наукову новизну роботи підтверджено 2 Патентами України, 2 Патентами РФ на винаходи щодо способів добування та склад лікарських препаратів, а також 1 Патентом України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів.

Запропонований в дисертації методологічний підхід для цілеспрямованого створення перспективних лікарських засобів може бути використаний виробниками для ефективної фармацевтичної розробки нових препаратів різних хімічних та фармакологічних груп.

Формулювання та виконання на практиці алгоритму аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки дозволило розробити МКЯ та регламенти на одержання 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду (МТ) (Акт впровадження № 01/386), *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Лізинію) (Акт впровадження № 01/387) та технологію виготовлення їх лікарських форм – ін'єкційних розчинів (Акт впровадження № 01/1713).

Комплекти документів на активні фармацевтичні інгредієнти Лізиній та МТ разом з ДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України (м. Харків) та їх ін'єкційні розчини АТ «Лекхім-Харків» підготовлені та направлені для одержання дозволу на застосування у «Державний експертний центр» МОЗ України.

Результати проведених досліджень по вивченню кислотно-основних властивостей похідних 1,2,4-триазолу прийняті до внесення до монографії «Титрування у неводних розчинниках» Державної Фармакопеї України 2 видання, що готується до офіційного видання (Акт впровадження №11/1869-5).

Результати проведених досліджень використовуються в науковій та науково-методичній роботі кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедри контролю якості та стандартизації лікарських засобів Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, кафедри органічної хімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною роботою, у якій автор самостійно обрав напрямки роботи, сформулював цілі, завдання та реалізував виконання експериментальної частини, згідно з розробленим ним особисто алгоритмом аналітичного забезпечення створення АФІ та їх лікарських форм.

Безпосередньо автором здійснено патентно-інформаційний пошук за темою дисертаційної роботи, визначено мету та задачі досліджень.

Дисертантом проведено аналіз та систематизацію одержаних результатів, сформульовані висновки і зроблені практичні рекомендації. У наукових публікаціях у співавторстві наводяться результати особистих експериментальних досліджень та їх інтерпретація.

Підготовка та представлення наукових статей, доповідей на конференціях виконувалась автором особисто або за його безпосередньою участю. Отримані результати обговорювались із науковим консультантом - професором, доктором фармацевтичних наук Мазуром І.А.

Апробація результатів дослідження. Результати досліджень доповідались на V Національному з'їзді фармацевтів України «Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку в новому тисячолітті» (Харків, 1999); Республіканській науковій конференції «Научные направления в создании лекарственных средств в фармацевтическом секторе Украины» (Харків, 2000); 8 Українській конференції з аналітичної хімії з міжнародною участю (Одеса, 2008); Науково-практичній конференції «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новий Світ, АР Крим, 2009); Річній Сесії Наукової Ради з проблеми «Аналітична хімія» НАН України (Новий Світ, АР Крим, 2009); Науково-практичній конференції «Качество и безопасность. Стандарты и тенденции развития современного химического анализа веществ и материалов» (Одеса, 2010); Міжнародній науково-практичній конференції «Тіотриазолін і його композиційні лікарські препарати: досягнення та перспективи» (Запоріжжя, 2010); Науково-практичній конференції «Актуальні питання клінічної та експериментальної фармакології» (Київ, 2011); 4 Науково-практичній конференції «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2011); Річної Сесії Наукової Ради з проблеми «Аналітична хімія» НАН України (Гурзуф, АР Крим, 2012), Семінарі Наукової Ради НАН України з проблеми «Наукові основи створення лікарських засобів – синтез, структура, властивості біологічно активних сполук» (Гурзуф, АР Крим, 2012).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 36 наукових робіт, з них 3 розділи монографії, 24 статті (22 - у фахових виданнях), 5 тез доповідей, 4 Патенти на винаходи України і РФ, 1 Патент України на корисну модель (усі Патенти впроваджені у виробництво - Акти впровадження № 01/386, № 01/387 та № 01/1713).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація представлена у вигляді рукопису і складається зі вступу, огляду літератури, 6 розділів експериментальних досліджень та їх обговорення, висновків, списку

використаної наукової літератури та додатків. Основний зміст дисертаційної роботи викладено на 288 сторінках, в тому числі основний текст становить 260 сторінок. Робота ілюстрована 120 рисунками, 60 таблицями і 9 схемами. Список використаних джерел включає 205 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Досягнення та перспективи розробки метаболічних препаратів – похідних 1,2,4-триазолу для лікування хвороб кровообігу (огляд літератури). Здійснено аналіз літературних джерел щодо проблеми захворювання серцево-судинної системи та існуючого арсеналу лікарських засобів для лікування цієї найбільш поширеної хвороби людства.

Розглянуті дослідження в лікуванні хвороб системи кровообігу метаболічними препаратами, у тому числі вітчизняними – похідними 1,2,4-триазолу та їх недоліки при забезпеченні адекватної фармакотерапії порушень кровообігу. Визначено необхідність пошуку нових активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) - похідних 1,2,4-триазолу та створення на їх основі високоефективних та безпечних препаратів.

Розглянуто загальні підходи до синтезу похідних 1,2,4-триазолу, вимоги забезпечення якості лікарських засобів, основоположні документи зі створення, реєстрації лікарських засобів. Теоретичне обґрунтовано підстави для розробки *алгоритму аналітичного забезпечення створення та контролю якості активних фармацевтичних інгредієнтів.*

Розділ 2. Теоретичне обґрунтування необхідності створення алгоритму аналітичного забезпечення створення, стандартизації та контролю якості лікарського засобу (ЛЗ) та вибір об'єктів дослідження. Аналіз даних літератури та нормативних документів свідчить, що створення нових АФІ та готових лікарських форм (ГЛФ) регламентовано нормативною базою, яка відповідає міжнародним вимогам, а саме:

- Державною Фармакопеею України (ДФУ), що гармонізована з Європейською Фармакопеею (ЄФ).

- Настановою СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. – Лікарські засоби. Належна виробнича практика, що гармонізована з Настановою по належній виробничій практиці Європейського Союзу (GMP EC).

- Настановою 42-3.1:2004. – Настанови з якості. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка.

- Настановою СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. – Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8).

- Настановою 42-0.2:2002. - Належна виробнича практика фармацевтичних інгредієнтів, що гармонізована з Додатком 18 Настанови по належній виробничій практиці Європейського Союзу (GMP EC).

Підкреслено, що

- ДФУ вимагає проведення досліджень на етапі розробки з дотриманням вимог ДФУ до випробування АФІ та ГЛФ, але не встановлює методологію організації цих досліджень.

- Настанова з Належної виробничої практики СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011 не регламентує правила розробки лікарського засобу (ЛЗ).

- призначення Настанови з АФІ 42-0.2:2002 - надання керівних вказівок відносно GMP для виробництва АФІ при відповідній системі керівництва якістю, а також допомога по забезпеченню якості у відповідності до вимог до АФІ.

- Настанови з Фармацевтичної розробки 42-3.1:2004 та вдосконалена СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011 (ICH Q8), що відповідає вимогам Міжнародної конференції по гармонізації вимог щодо лікарських засобів для людини (ICH), встановлює рекомендації відносно структури досліджень при створенні лікарського засобу, що необхідні для створення реєстраційного досьє.

Інформаційні дані повинні тільки допомогти обґрунтувати вибір діючої речовини - АФІ, кількісний вміст та силу дії, визначення критичних показників якості, що впливають на якість ЛЗ - тобто бази створення нормативної аналітичної документації. Самі ж дані повинно обґрунтувати експериментально. Для виконання вимог, що наведені в документації, слід створити належне аналітичне забезпечення, що дозволяє передбачити належну якість лікарського засобу з етапу розробки до його промислового випуску. Таким чином створити якісний лікарський засіб можливо лише за умов визначення та дотримання показників його якості згідно до вимог ДФУ та його виробництва згідно до вимог Належної виробничої практики (GMP).

Відзначено, що нормативні документи встановлюють вимоги до якості лікарських засобів, але не визначають науковий підхід до розробки методології створення та контролю якості ЛЗ. У той же час вимоги, що закладені в цих документах можуть бути розвинуті при формулюванні алгоритму аналітичного забезпечення якості лікарських препаратів, що передбачає проведення серйозних наукових досліджень.

Аналіз наведених Настанов став теоретичним підґрунтям для формулювання *алгоритму аналітичного забезпечення створення та контролю якості активних фармацевтичних інгредієнтів* (схема 1). Коректність даного алгоритму вимагає експериментального підтвердження, тому основним завданням нашої роботи стало дослідження окремих його етапів на прикладі похідних 1,2,4-триазолу.

Для вибору об'єктів дослідження нами було проведено комп'ютерне прогнозування біологічної активності активних фармацевтичних інгредієнтів – похідних 1,2,4-триазолу та експериментальне підтвердження біологічної активності результатами фармакологічних досліджень. Цілеспрямований пошук біологічно-активних сполук - похідних 1,2,4-триазолу, проведений на основі логіко-структурного підходу та за допомогою програми PASS («Prediction of Activity Spectra for Substances») з використання ряду продуктів хімічної модифікації препаратів Тіотриазолін та Кардіотрил, дав можливість прогнозувати наявність антигіпертензивної дії сполук 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід та 1-(β -фенілетил)-4-(*n*-диметиламінобензиліденаміно)-1,2,4-триазолій бромід з ймовірністю $\geq 60\%$, підтвердив наявність кардіотонічної дії морфоліній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату з ймовірністю $\geq 70\%$, та можливість підвищення кардіотонічної дії в разі зміни

морфолінієвого фрагменту молекули на *D,L*-лізинієвий. Біологічну активність потенційних АФІ підтверджено результатами фармакологічних досліджень. Тому для фармацевтичної розробки та експериментальної апробації запропонованого алгоритму (Схема 1) нами було обрано найбільш перспективні субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід (під умовною назвою МТ) та *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (під умовною назвою Лізиній) та їх синтетичні попередники.

1.	Прогнозування можливих видів фармакологічної активності та підтвердження результатами фармакологічних досліджень
2.	Теоретичне та практичне обґрунтування синтезу у ряду похідних 1,2,4-триазолу шляхом синтетичної модифікації існуючих біологічно активних молекул
3.	Доказ будови та чистоти синтезованих активних фармацевтичних інгредієнтів
4.	Вивчення фізико-хімічних та хроматографічних властивостей АФІ для розробки комплексу фізико-хімічних та хроматографічних методик їх аналізу та валідація цих методик
5.	Дослідження та встановлення критичних показників якості та дослідження стабільності активних фармацевтичних інгредієнтів у тому числі у «стресових умовах»
6.	Обґрунтування правильності вибору лікарської форми при фармакокінетичних дослідженнях
7.	Впровадження результатів дослідження в нормативно-технологічну та аналітичну документацію на заводах-виробниках та ДФУ
8.	Розробка специфікацій зразків субстанцій АФІ та технологічних домішок для атестації їх стандартних зразків при контролі якості похідних 1,2,4-триазолу
9.	Патентний захист наукових досліджень
10.	Проведення реєстрації нових препаратів у ДЕЦ
11.	Випуск препаратів заводами-виробниками з ціллю вирішення соціально-медичної задачі - забезпечення населення України новими вітчизняними життєво-необхідними кардіологічними препаратами

Схема 1. Алгоритм аналітичного забезпечення створення та контролю якості активних фармацевтичних інгредієнтів

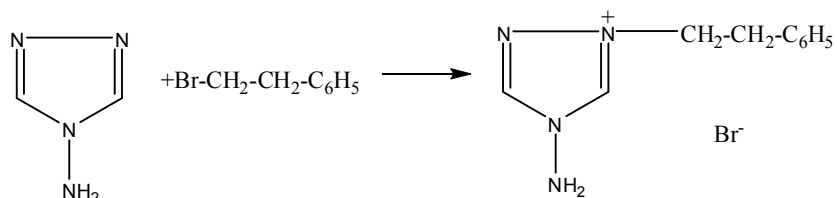
Розділ 3. Вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей активних фармацевтичних інгредієнтів - похідних 1,2,4-триазолу як складова частина аналітичного забезпечення. Проведено розрахунки енергетичних і геометричних характеристик вихідних речовин й можливих перехідних станів згідно версії модифікованого нехтування диференціальним перекриттям (MNDO) та вказано на хід реакції взаємодії 4-аміно-1,2,4-триазолу з галогеналканами, яка енергетично переважно перебігає через стадію кватернізації за гетероциклічним нітрогеном у положенні N1 чи N2 з утворенням 1-N-похідних.

Додатковим підтвердженням перебігу реакції 1,2,4-триазолу з β -брометилбензолом за гетероциклічним атомом нітрогену в положенні 1 є локалізація електронної густини у молекулі 4-аміно-1,2,4-триазолу, величина рівня енергії перехідних станів у реакції алкілування 4-аміно-1,2,4-триазолу алкілбромідами (табл. 1) (схема 2).

Таблиця 1

Порівняльний рівень відносної енергії перехідних станів, розрахованих за методом MNDO

№ п/п	Alk Замісник						σ^* - Тафта
		ПС1	ПС2	ПС3	ПС4	2.x-2.y	
1	C ₆ H ₁₁	365	329	297	210	-60	-0,150
2	C ₃ H ₇	367	331	299	212	-59	-0,115
3	CH ₃	369	333	300	215	-58	0
4	CH(CH ₃)C ₆ H ₅	372	336	302	217	-56	0,110
5	CH ₂ C ₆ H ₅	375	338	304	219	-54	0,215

Схема 2. Синтез 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду (MT)

У табл. 2 наведено показники локалізації електронної густини у молекулі 4-аміно-1,2,4-триазолу.

Таблиця 2.

Локалізація електронної густини у молекулі 4-аміно-1,2,4-триазолу

Фрагмент	N1	N2	C3	H(C3)	N4	C5	H(C5)	N(NH ₂)	H(NH ₂)
Заряд, e	-0,130	-0,130	0,075	0,008	0,085	0,079	0,008	-0,230	0,125

Розділ 4. Встановлення хімічної будови активних фармацевтичних інгредієнтів - похідних 4-аміно-1,2,4-триазолу. Доказ будови 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду було здійснено на основі даних ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР спектрів і хромато-мас-спектрів (рис.1).

Для підтвердження будови та індивідуальності, а також враховуючи відому симбатність між характером їх фрагментації та можливим метаболізмом, вивчено поведінку в умовах електронного удару (МС ЕВ) (рис.2).

Структуру осколків, що представляють піки молекулярних іонів $[M+]$, оцінювали за допомогою даних комп'ютерної бібліотеки Національного Бюро Стандартів США, що містить більш за 630000 мас-спектрограм.

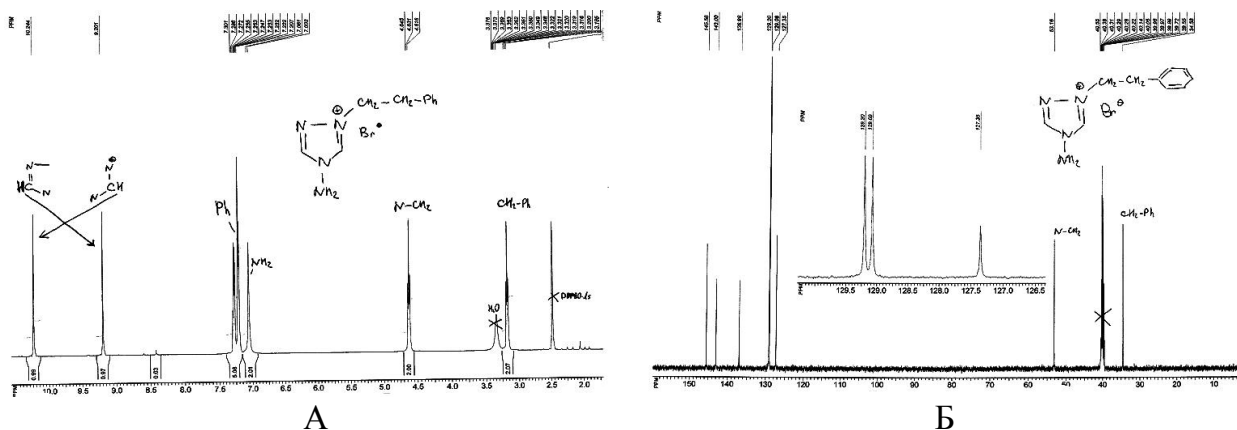


Рис.1. ^1H (А) та ^{13}C (Б) ЯМР-спектри 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду

Хромато-мас-спектрометричний аналіз підтверджує індивідуальність 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду, а теоретично характер його фрагментації під дією електронного удару повністю узгоджується з можливими структурами.

Молекулярному іону 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_5$) відповідає інтенсивний пік $M+ 189,2(3)$ (рис.2).

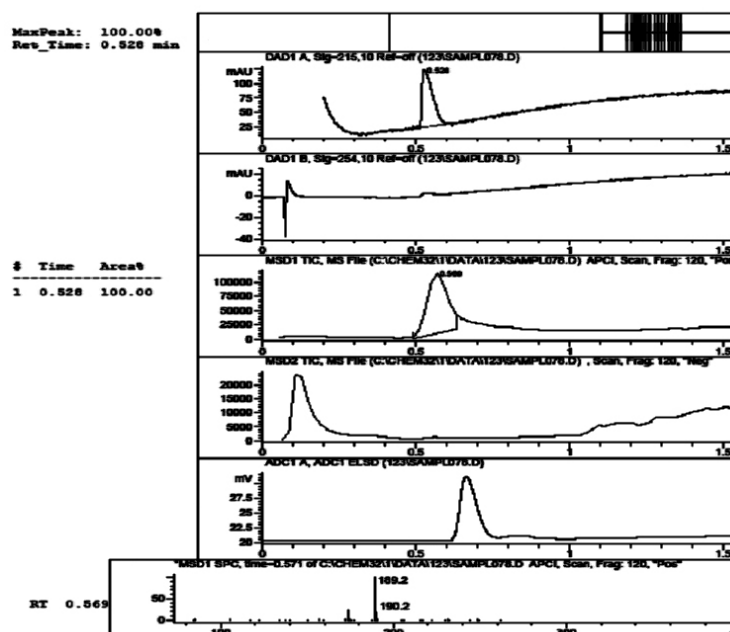


Рис.2.Хромато-мас-спектр 1-(β-фенілетил) -4-аміно-1,2,4-триазолій броміду

Розділ 5. Теоретичне та практичне обґрунтування синтезу *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату та підтвердження структури як складова частина аналітичного забезпечення. Синтез *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату здійснений у лабораторних умовах за наступною лабораторною методикою за схемою 3.

Як було наведено вище, у субстанції *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату кількість лізину у молярному співвідношенні повинна бути рівною кількості 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти.

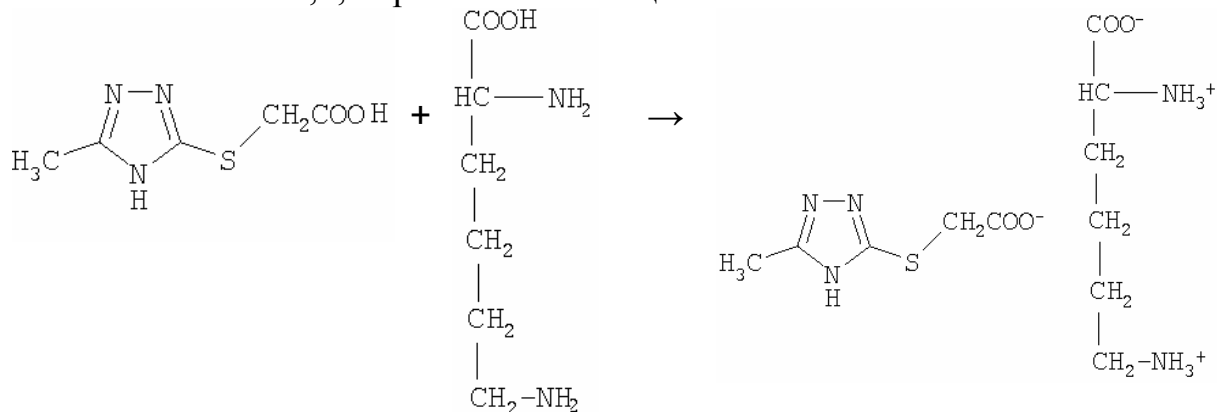


Схема 3. Синтез *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату

Як стандартний зразок використовували субстанцію 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти. Доведення кількісного співвідношення 1:1 лізину та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти при утворенні лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату проведено методом ВЕРХ (табл. 3) за таких умов:

колонка	- Resolv C18, розміром (300 × 4,6) мм, що заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм або аналогічна
рухома фаза	- ацетонітрил – буферний розчин (20:980), дегазована будь-яким зручним способом;
швидкість рухомої фази	- 1,0 мл/хв;
температура колонки	- 30 °С;
довжина хвилі	- 254 нм.

Таблиця 3

Наважка 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти та площа піку 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти

Наважка	Площа піку
3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти	4977312
0,0313 г у 50 мл	5007024
	5007757
вміст 99,58%	5050877
Середнє	5010743

Дані та розрахунки, які наведені у таблиці 4, свідчать про те, що співвідношення лізину та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти у субстанції лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату становить 1:1.

Будова лізинієвої солі 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти методами ^1H ЯМР-спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії (рис.3,4).

Оскільки наведені спектр не дозволяють однозначно говорити про солеутворення, ми вдалися до дослідження структури синтезованих солей $-(\beta\text{-фенілетил})\text{-4-аміно-1,2,4-триазолій}$ броміду (МТ) та D,L -лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Лізиній) методом рентгеноструктурного аналізу.

Таблиця 4

Результати, одержані при визначенні співвідношення лізину та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти у субстанції D,L -лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату

Наважка субстанції D,L -лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату	Площа піку	Вміст 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти у субстанції, г	Число моль 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти у субстанції	Число моль лізину у субстанції	Вміст лізину у субстанції, г	Сумарно 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти та лізину
0,0393 г в 50 мл Вода = 0,08%	3303210	0,0205	0,000119	0,000119	0,01733	0,03786
	3323882	0,0207	0,000119	0,000119	0,01743	0,03809
	3339000	0,0208	0,000120	0,000120	0,01751	0,03827
	3336824	0,0207	0,000120	0,000120	0,01750	0,03824
	3348566	0,0208	0,000120	0,000120	0,01756	0,03838
	середнє	0,0207			0,01747	0,03817
% у субстанції <u>52,7</u>						

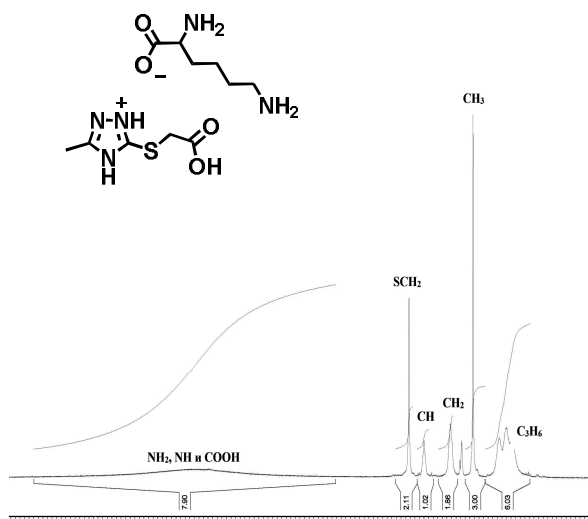
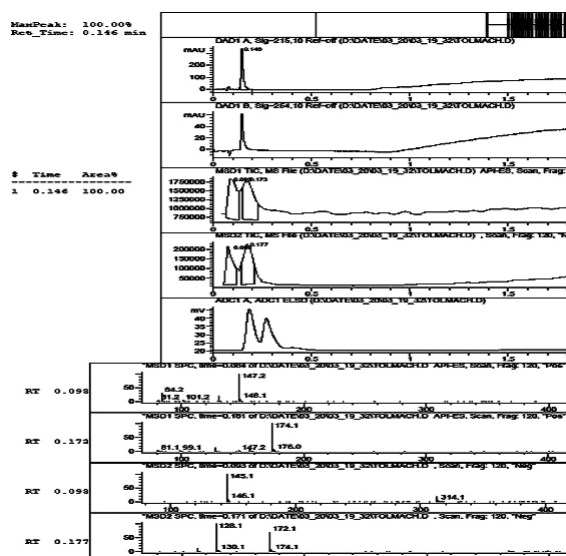


Рис.3. ^1H ЯМР-спектр D,L -лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату



Будову обох субстанцій встановлено нами разом зі співробітниками НТК «Інститут монокристалів» НАН України під керівництвом д.х.н., проф. Шишкіна О.В.

Згідно з одержаними даними сполука МТ є бромідом органічного катіону та існує у кристалі у вигляді гідрату складу 4:1:5 (рис.5). У незалежній частині елементарної чарунки знайдено два бромід-аніони (А й В), дві молекули катіону (А й В) та молекули води з заселеністю 0.75.

Дослідження показали, що у кристалі Лізинію 5-метил-1-Н-[1,2,4]-триазол-3-ілсульфонил-ацетат (MTSA) та лізин присутні у вигляді солі катіону лізину та аніону кислоти (MTSA). Лізин представлений цвіттер-іонами з двома протонованими аміногрупами (рис.6).

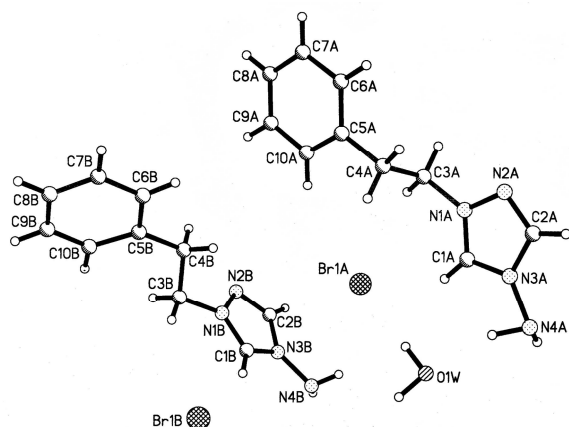


Рис.5. Кристалічна будова 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду

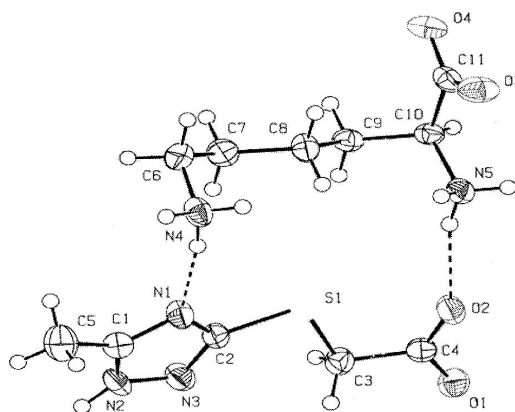


Рис 6. Кристалічна будова *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату

Розділ 6. Дослідження фізико-хімічних та аналітичних характеристик похідних 1,2,4-триазолу та вихідних продуктів їх синтезу з метою аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки. Для розробки методик визначення критичних показників якості синтезованих активних фармацевтичних інгредієнтів були досліджені оптичні, кислотно-основні, хроматографічні властивості синтезованих активних фармацевтичних інгредієнтів, та речовин, що використовуються при їх синтезі.

Аналіз спектрів поглинання 4-аміно-1,2,4-триазолу, 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти та її солей показав присутність наступних смуг поглинання: максимуми - 202-208 нм, 228-249 нм, 311-315 нм, 328-358 нм та 378-381 нм.

УФ-спектри вихідних продуктів синтезу показали, що 4-аміно-1,2,4-триазол має максимум поглинання за межами 200 нм, тоді як β -брометилбензол та досліджувана субстанція МТ мають максимуми при 209 нм і 211 нм відповідно (рис.7). У зв'язку з цим спектрофотометричне визначення субстанції у присутності вихідних продуктів синтезу є неможливим, та може бути ускладнене кількісне визначення 4-аміно-1,2,4-триазолу методом ВЕРХ із УФ-спектрофотометричним детектором.

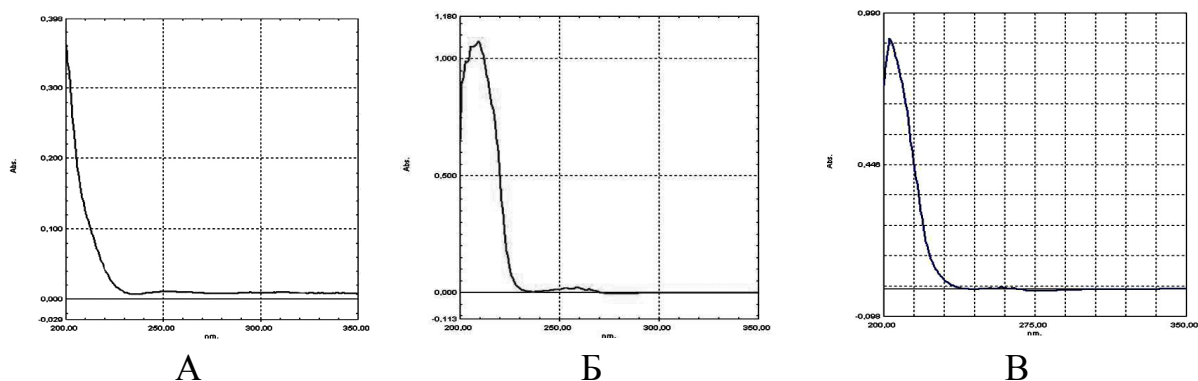
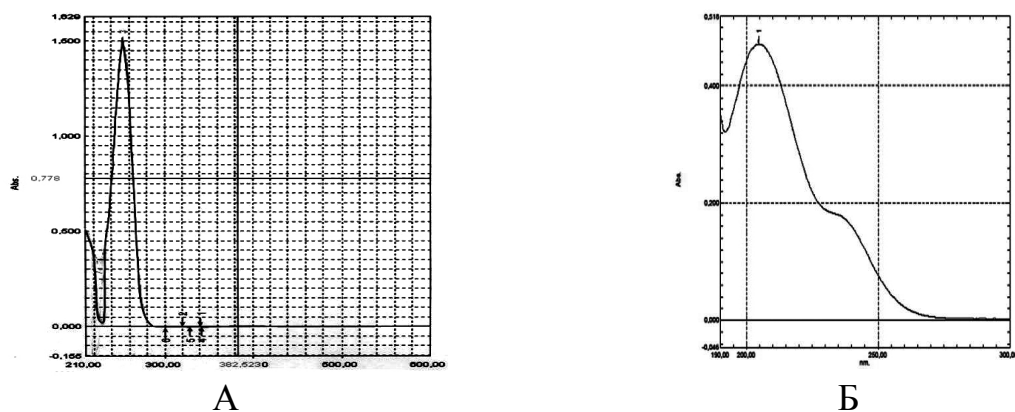


Рис. 7. УФ – спектри в метиловому спирті: А - 0,2% розчину 4-аміно-1,2,4-триазолу; Б - 0,2% розчину β -брометилбензолу; В - 0,2% розчину 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду

Спектр поглинання *D,L*-лізинієвої солі 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти (рис.8) має максимум поглинання при 204,5 нм та «плече» при 235 нм, що може бути використане як для ідентифікації, так і для кількісного визначення цієї сполуки.



ІЧ-спектри досліджуваних сполук мають очікувану систему характеристикних смуг і можуть бути використані для їх ідентифікації (рис.9).

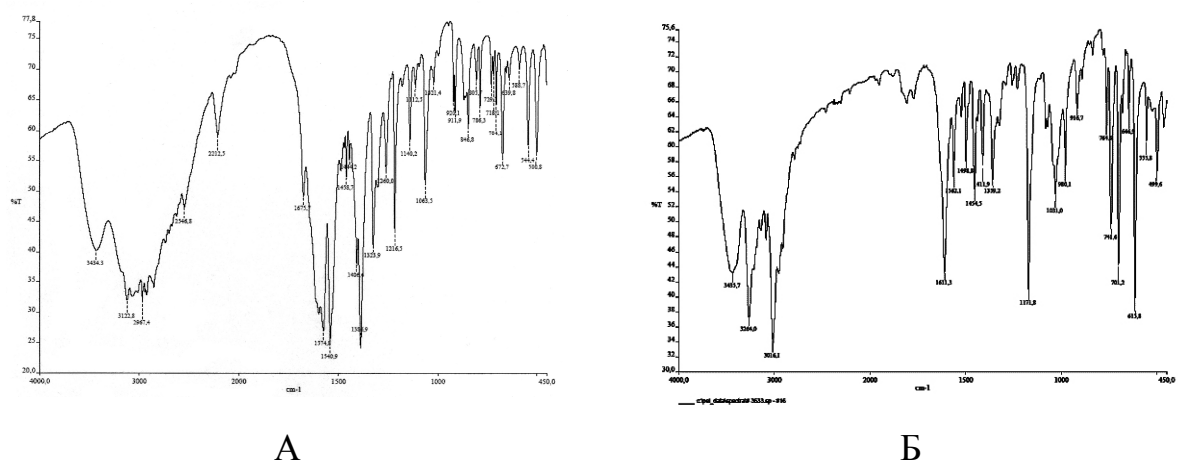


Рис.9. ІЧ-спектри: А - *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату; Б - 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду

ІЧ-спектр *D,L*-лізін-метил-1,2,4-триазол-5-тіоацетату та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду повинні співпадати зі ІЧ-вищенаведеними спектрами при ідентифікації даних сполук.

Також нами були досліджені кислотно-основні властивості потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів - похідних 1,2,4-триазолу та обґрунтування можливості проведення їх аналізу методом кислотно-основного титрування у неводних розчинниках. Проведено квантово-хімічні розрахунки методом MNDO з аналізом величин зарядів на атомах триазольного кільця, а також на зв'язаних з ним атомах, які дозволяють судити про основні властивості триазольного кільця й дані протонизації, довели, що похідні 1,2,4-триазолу повинні мати за рахунок значного негативного заряду на кільцевих атомах нітрогену помітні основні властивості й можуть бути відтитровані у кислих неводних розчинниках.

Оцінку умов титрування згідно з теорією кислотно-основного титрування М.А.Ізмайлова проведено за даними величин показників титрування $pK_T = pK_A$.

Показники констант дисоціації розраховували за модифікованим рівнянням Хасельбаха-Гендерсона (1).

$$pK_A = pK_A^{cm} + (E_{1/2} - E_{1/2}^{cm})/59 \quad (1)$$

Як стандартну речовину було взято антипірін (в оцтовій кислоті $pK_A = 8.35$, в оцтовому ангідриді $pK_A = 9.60$).

Потенціали напівнейтралізації антипірину ($E_{1/2}^{cm}$), що розраховані з кривих титрування, склали в оцтовій кислоті - 450 мВ, в оцтовому ангідриді - 456 мВ. На основі проведених теоретичних розрахунків нами була запропонована оригінальна методика кількісного визначення досліджуваних субстанцій, що наведено далі.

Методика визначення pK_A .

Точну наважку досліджуваної речовини (0,05-0,10 г) розчиняють у 30 мл оцтової кислоти (безводної) або оцтового ангідриду й титрують 0,01 М розчином кислоти хлорної (HClO_4) у кислоті безводній оцтовій.

Розраховано потенціал напівнейтралізації (ПНН), згідно до кривої титрування, досліджуваної речовини та стандартної речовини – антипірину.

При розрахунках не враховувався вплив іонної сили розчинника, у зв'язку з чим значення pK_A є не термодинамічними, а концентраційними константами. Але оскільки титрування проводилось з розведеними розчинами із концентрацією не вище за 0.01 М, можна вважати, що одержані значення pK_A близькі до термодинамічних (табл.5).

Досліджувані об'єкти мали вміст основної речовини не менш 99,0%, втрату в масі при висушуванні $\sim 0,04\%$. Контроль супровідних домішок методом ТШХ не виявив додаткових плям, тобто вміст домішок менш за 0,05-0,1%, що дозволило нам вважати, що систематична складова невизначеності Δ_S була незначущою у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю всіх аналітичних методик $\max \Delta_{AS}$. У відповідності з принципом незначущості виконується співвідношення $\Delta_S \leq 0,32 \max \Delta_{AS}$. Виходячи з цього, з урахуванням незначущої втраті в масі при висушуванні ($\sim 0,04\%$), ми у своїх

розрахунках при проведенні аналізу домішки маємо вміст речовини рівним 100%.

Результати дослідження кислотно-основних властивостей досліджуваних об'єктів – похідних 1,2,4-триазолу та розрахунки pK_t довели, що можливо провести їх кількісне визначення в оцтовій кислоті та оцтовому ангідриді. Однак, оцінити кількість технологічних домішок у активних фармацевтичних інгредієнтах виявилось неможливим, тому що $\Delta pK_t \leq 2$, а кількість домішок складає 0,2%.

У той саме час, маючи дані величин еквівалентів усіх об'єктів дослідження, потенціометричне титрування дозволило відповісти на питання про вплив вмісту технологічних домішок на достовірність результатів аналізу. Вклад цієї систематичної похибки був оцінений з використанням наступних даних: розрахунок еквівалентних мас (при потенціометричному титруванні); вміст домішок в МТ та Лізині за даними хроматографічного аналізу (0,2%); вміст активної речовини у субстанції згідно з вимогами ДФУ (98,5-101%). При еквівалентній масі МТ - 0,02692 г еквівалентні маси технологічних домішок у субстанції МТ складають: 4-аміно-1,2,4-триазол - 0,0084 г; β -брометилбензол - 0,0185 г

Таблиця 5

Величини pK_t деяких похідних 1,2,4-триазолу та речовин, що застосовуються в їх синтезі

Речовина	Розчинник			
	оцтова кислота	оцтова кислота + ртуті (II) ацетат	оцтовий ангідрид	оцтовий ангідрид + ртуті (II) ацетат
1-(β -фенілетил)-4-(<i>n</i> -диметил-амінобензиліденаміно)-1,2,4-триазолій бромід	9.146	5.77	8.58	7.21
		9.54	11.39	9.24
1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід	не титрується	6.99	10.30	9.33
4-аміно-1,2,4-триазол	7.99	-	8.12	-
<i>n</i> -диметиламінобензальдегід	7.60	-	8.41	-
морфоліній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат	6.52	-	6.51	-
	8.64	-	8.64	-
морфолін	8.70	-	6.34	-
3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтова кислота	6.88	-	8.71	-
<i>D,L</i> -лізин	5.07	-	-	-
<i>D,L</i> -лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат	6.31	-	-	-

Розрахунок впливу домішок на результати кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів (субстанцій) МТ і Лізинію був наведений згідно з критерієм незначущості

$$|\Sigma_{imi} [E_{qs}/E_{qi} - 1]| \leq 0,32 \max \Delta_{AS}$$

$$|\Sigma_{imi} [0,0269/0,0084 - 1]| * 0,2 = 2,02 * 0,2 = 0,404$$

При $\Delta_{imp} \leq 0,32 \Delta_{AS}$ та 1,5% допуску у вмісті субстанції 98,5-101,0 %

$$\Delta_{imp} \leq 0,32 * 1,5 = 0,48$$

Відповідно $0,4 \leq 0,48$ систематична похибка, що внесена домішкою при кількісному визначенні МТ не має суттєвого впливу на загальний результат титриметричного визначення.

У випадку домішки *D,L*-Лізину у Лізинії 0,2% вплив її складе - $0,098 \approx 0,1$ (2).

$$|\Sigma_{imi} [0,01065/0,01827 - 1]| * 0,2 = (-0,49) * 0,2 = -0,098 \approx 0,1 \quad (2)$$

Тобто вплив систематичної похибки, що внесений домішкою, є незначущим, оскільки призводить до заниження результатів на 0,1%.

Результати проведених досліджень покладено в основу методик кількісного визначення потенційних оригінальних вітчизняних активних фармацевтичних інгредієнтів – *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Лізинію) та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду (МТ).

Також нами були досліджені хроматографічні властивості активних фармацевтичних інгредієнтів – похідних 1,2,4-триазолу. Масив експериментальних даних зі створення комплексу методик по контролю якості згідно до вимог ДФУ та розробки реєстраційного досьє на ЛЗ передбачає ідентифікацію, чистоту та стабільність субстанцій – АФІ – похідних 1,2,4-триазолу. Ці показники є також відправними даними при розробці оптимальної технології готових лікарських форм.

Виходячи з цього, нами були проведені дослідження хроматографічних властивостей досліджуваних сполук методами ТШХ, ВЕРХ та ГХ. Це було зроблено для встановлення величин R_f (ТШХ) та часів утримання (ВЕРХ та ГХ), визначення мінімуму, що відкривається (порогу чутливості), що дозволяють ідентифікувати та кількісно визначити активні фармацевтичні інгредієнти та їх супровідні домішки.

Чутливість відкриття (визначений мінімум) встановлений нанесенням на хроматограму різних проб розчинів, що містять від 0.01 мкг до 30 мкг речовини у пробі. Досліджувані речовини наносили у вигляді 0.5 % розчинів у 96 % спирті в кількості 10-30 мкг; проявник – пара йоду.

Одержані величини R_f досліджуваних активних фармацевтичних інгредієнтів та їх технологічних домішок дозволяють проводити їх ідентифікацію при взаємній присутності, а встановлені мінімальні межі чутливості детектування плям на хроматограмі дозволяють визначити мінімум наявності технологічних домішок з метою оцінювання чистоти субстанції при постадійному контролі виробництва.

Досліджені хроматографічні властивості досліджуваних сполук методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). Умови проведення дослідження наведені у табл.6.

Таблиця 6

R_f Похідних 1,2,4-триазолу та їх супровідних домішок

№	Речовина	Система		
		метанол-вода (3:7)	пропанол-1- вода (10:1)	ацетон-вода (50:2)
		Пластика		
		Sorbfil-ПТСХ-П-А		Плазмохром
1.	тіосемікарбазид	0.68		0.71
2.	ацетилтіосемікарбазид	0.54		0.84
3.	3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон	0.63		0.86
4.	морфоліній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Тіотриазолін)	0		0
5.	<i>D,L</i> -лізин	0.16		0.18
6.	<i>D,L</i> -лізиній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Лізиній)	0.06		0.04
7.	4-аміно-1,2,4-триазол	0.18	0.43	0.19
8.	диметиламинобензальдегід	0.04	0.11	0.05
9.	β -бромфенілетилбензол	0.20	0.22	0.23
10	1-(β -фенілетил)-4-(п-диметил-амінобензиліденаміно)-1,2,4-тріазолій бромід (Кардіотрил)	0.68	0.91	0.77
11	1-(β -фенілетил-4-аміно-1,2,4-тріазолій бромід (МТ)	0.22	0.78	0.14

Нами були проведені дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) активних фармацевтичних інгредієнтів - похідних 1,2,4-триазолу.

Здійснено вибір умов хроматографування методом ВЕРХ *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату. Для вибору умов хроматографування були використані розрахункові дані про величини коефіцієнту розподілення у системі октанол - вода ($\log P_{o/w}$, гідрофобність речовини), константи протонізації, а також літературні дані, з яких видно, що при хроматографуванні азотовмісних сполук найбільш часто використовують кислі рухомі фази.

За допомогою програми ACD Labs (ACD/Labs 10) були розраховані величини гідрофобності, які для тіотриазоліну та 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти склали $\log P=0.45$ та $\log P=-0.842$, відповідно. Виходячи з одержаних величин, був зроблений висновок, що солі 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти повинні утримуватися на обернено-фазових сорбентах типу C18 з використанням кислих рухомих фаз з низьким (до 10 %) вмістом органічного модифікатора. Крім того, наявність карбонільної групи дає підставу вважати, що рухома фаза повинна бути кислою ($pH < 3$).

Попередній експеримент показав, що прийнятного та відтворюваного утримування (близько 10 хв) солей 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти можливо досягти з використанням рухомої фази складу ацетонітрил - вода, доведеної до pH 2,0 кислотою фосфорною концентрованою у об'ємному співвідношенні 2:98.

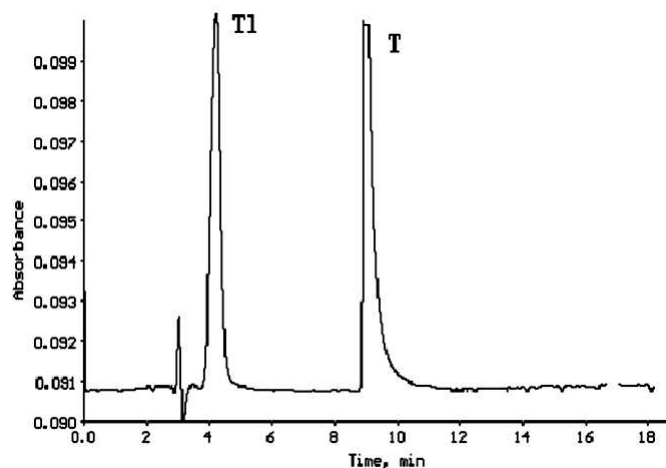


Рис. 10. Розподілення *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Т) з 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоном (Т1)

На хроматограмі розчину *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (рис. 10), що далі буде піддано різним стресовим розкладанням, є наявність домішки 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону (близько 0.2 %). Водно - ацетонітрильні розчини солей 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти достатньо стійкі, і після 8 год (зберігався в захищеному від світла місці) для даних розчинів не спостерігалось збільшення вмісту домішок.

У наведених умовах хроматографування можливо встановити наявність технологічної домішки - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону у кількості ≥ 0.2 %.

Здійснено вибір умов хроматографування 1-(β -фенілетил-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду та його технологічних домішок. Використання програми ACD Labs для розрахунку параметрів гідрофобності заряджених сполук має вади, оскільки загальні (табличні) критерії розрахунку гідрофобності в цьому випадку використовувати неможливо. Спрощений критерій гідрофобності Шатца в даному випадку також не може бути застосованим, з тієї ж причини. З цього виходить, що обрати умови хроматографування можливо тільки експериментально.

Азотовмісні основи частіше за все хроматографують з використанням кислих рухомих фаз з додаванням компонентів, які запобігають взаємодії з залишковими сіланолами рухомої фази. У нашому випадку для вибору умов хроматографування використовували буферний розчин, що містить літію фосфат, та градієнтне елюювання з використанням ацетонітрилу (від 0 % до 100 %). Водно - ацетонітрильний розчин субстанції - АФІ є достатньо стійким, після 6 год (зберігався в захищеному від світла місці) для даних розчинів не спостерігалось збільшення вмісту домішок. Розрахунки проводились без урахування піку бромід-іону.

Хроматограма, що одержана в умовах градієнтного елюювання, наведена на рис. 11. Видно, що режим градієнтного елюювання дозволяє розділити субстанцію - АФІ та напівпродукти її синтезу.

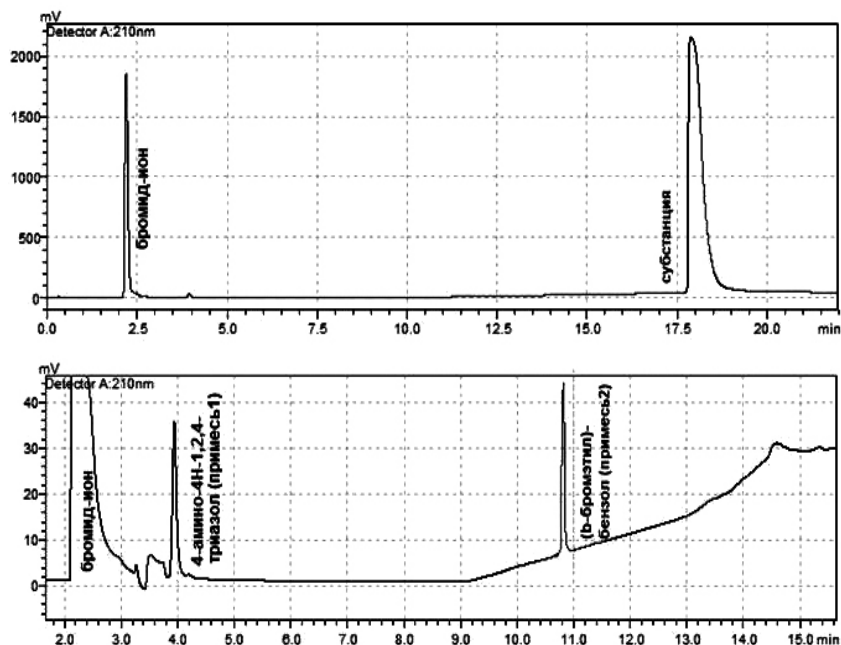


Рис. 11. Розподілення 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду з 4-аміно-1,2,4-триазолом та β -брометилбензолом

Як було наведено вище, дослідження УФ - спектрів вихідних продуктів синтезу довели, що 4-аміно-1,2,4-триазол має максимум поглинання за межами 200 нм, тоді як β -брометилбензол та досліджувана субстанція мають максимуми 209 нм і 211 нм відповідно. У зв'язку з цим спектрофотометричне визначення субстанції у присутності вихідних продуктів синтезу неможливо, та може бути ускладнене кількісне визначення 4-аміно-1,2,4-триазолу методом ВЕРХ із УФ - спектрофотометричним детектором. Тому застосування методу ВЕРХ потребує використання високоякісних розчинників для приготування рухомої фази - у нашому випадку – ацетонітрилу, оптичне поглинання якого при довжині хвилі 200 нм є меншим, ніж 0,05 одиниць оптичної густини. Це дозволяє застосовувати його при розробці методики ВЕРХ для речовин у діапазоні вище 210 нм, до яких відноситься домішка 4-аміно-1,2,4-триазолу.

Нами був проведений експеримент щодо вибору складу рухомої фази складу ацетонітрил – буферний розчин, що запрограмований таким чином:

Час (хв)	Вміст рухомої фази А	Вміст рухомої фази Б
0 – 5	100	0
5 – 15	100 – 0	0 – 100
15 – 20	0	100
20 – 22	0 – 100	100 – 0
22 – 30	100	0

швидкість рухомої фази – 0,8 мл/хв.;

температура колонки +30°C;

довжина хвилі реєстрації – 210 нм;

У наведених умовах хроматографування 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду та його технологічних домішок - 4-аміно-1,2,4-триазолу та β -брометилбензолу можливо провести чітке розділення вищевказаних речовин.

Час утримання 4-аміно-1,2,4-триазолу - 3,5 хв, β -брометилбензолу – 10,8 хв, 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію – 18,25 хв.

Розділ 7. Розробка методик оцінювання критичних показників якості у фармацевтичній розробці субстанцій - похідних 1,2,4-триазолу та лікарських форм. Нами було проведено розробку методик оцінювання критичних показників якості у фармацевтичній розробці субстанції *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату. Контроль якості субстанції – АФІ проводять за багатьма показниками (згідно з вимогами ДФУ та ЕФ), головним з яких є кількісний вміст основної діючої речовини у субстанції – АФІ та показники контролю складу домішок у субстанції (чистота субстанції). Найбільш розповсюдженими методами контролю чистоти субстанції є хроматографічні методи (ГХ, ВЕРХ, ТШХ), а кількісний вміст визначається титриметричними методами.

Нами було проведено кількісне визначення вмісту основної діючої речовини у субстанції *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату методом потенціометричного титрування. *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Лізиній) є трьохкислотною основою, для кількісного визначення якої обґрунтоване використання методу титрування у неводних розчинниках згідно з даними кислотно-основних властивостей похідних 1,2,4-триазолу (табл. 5).

При розробці методики було проведено дослідження впливу різних розчинників на вигляд кривої потенціометричного титрування. Було виявлено, що оптимальними умовами титрування є титрування у середовищі оцтової кислоти з додаванням мурашиної кислоти, на основі чого була запропонована оригінальна методика кількісного визначення:

0.080 г субстанції розчиняють у 5 мл мурашиної кислоти безводної, додають 40 мл оцтової кислоти безводної та титрують 0.1 М розчином кислоти хлорної потенціометрично (ДФУ, 2.2.20), використовуючи систему скляного та хлорсрібного електродів.

1 мл 0.1 М розчину кислоти хлорної відповідає 10.65 мг $C_{11}H_{21}N_5O_4S$, вміст якого має становити (98.5-101.0) %.

Валідацію методики потенціометричного титрування було проведено за показниками лінійність, правильність та прецизійність (згідно з вимогами ДФУ). Для цього було відтитровано 9 наважок субстанції у діапазоні ± 20 % від номінального вмісту – 80 мг субстанції. Розрахунки проводили у нормалізованих координатах з вірогідністю 95% (однобічний довірчий інтервал). Показники, що було вивчено та визначено при валідації методики потенціометричного титрування, та вимоги до них наведено у табл.7. Як можна побачити з табл. 7, усі показники за своїми отриманими величинами відповідають розрахунковим вимогам.

Нами було проведено визначення залишкових кількостей органічних розчинників в АФІ – Лізинії. Визначення складу домішок у субстанції включає до себе контроль вмісту органічних розчинників (стадія синтезу та очищення методом перекристалізації) та визначення домішок у субстанції (як

напівпродуктів синтезу, так і продуктів розкладу субстанції в процесі зберігання).

Таблиця 7

Валідаційні показники та критичні вимоги до них при проведенні валідації методики потенціометричного титрування субстанції Лізинію

Критерій	Вимоги	Отримано	Висновок
Невизначеність			
Невизначеність кількісного визначення	$\Delta_{Ass} \leq B = 1.0 \%$	0.1804	відповідає
Невизначеність пробопідготовки	$\Delta_{Sp} \leq \Delta_{Ass} \times 0,32 = 0,32 \%$	0.25	відповідає
Лінійність			
вимоги до вільного члену а	$ a \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \times SD_A = 1.895 \times SD_A$	0.0843	відповідає
критерій практичної незначущості	$ a \leq \frac{0.32 \times \Delta_{As}(\%)}{1 - (80/100)} = 1.6$	0.085	відповідає
довірчий інтервал	$RSD_{rest} / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, 7)} = \frac{1.0}{1.895} = 0.53$	0.1685	відповідає
коефіцієнт кореляції	$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_Y}\right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{0.53}{13.69}\right)^2} = 0.99926$	0.99993	відповідає
Правильність			
статистична незначущість	$ \bar{d} - 100 \leq \frac{\Delta_d}{\sqrt{9}} = \frac{\Delta_d}{3}$	0.081	відповідає
практична незначущість	$ \bar{d} - 100 \leq 0.32 \cdot 1.0 = 0.32$	0.085	відповідає

Стадії синтезу, включаючи перекристалізацію *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату, проходять в етанолі або в його суміші з водою. Відповідно до Настанови із регламентації залишкових кількостей органічних розчинників (ICH Topic Q3C (R4) Impurities: Guideline for Residual Solvents) етанол належить до розчинників класу 3 – малотоксичні розчинники. Клас 3 розчинників має значення дозволеної добової дії 50 мг/добу та більше, тобто критична межа концентрації етанолу у субстанції $\leq 0.5 \%$ та не потребує обґрунтування. З метою максимального зменшення наважки субстанції застосовано метод безпосереднього введення у колонку водного розчину субстанції. Для зменшення похибки визначення через зміну об'ємів розчинів, що вводяться у хроматограф, застосовано метод «внутрішнього стандарту». Як внутрішній стандарт використано пропанол-1, пік якого на хроматограмах елюється за піком визначуваної речовини.

Визначення залишкових кількостей етанолу в субстанції Лізиній проведено методом ГХ у наступних умовах:

- | | |
|---------------------|--|
| прилад | - газовий хроматограф |
| детектор | - полуменево - іонізаційний |
| колонка | - скляна, розміром 160 см \times 0.32 см |
| сорбент | - Порапак Q із розміром частинок (60–80) меш |
| температура колонки | - 175 °C |

температура блока вводу проб - 190 °C
 температура детектора - 220 °C
 швидкість газу - носія - 35 мл/хв

Типові хроматограми наведені на рис. 12.

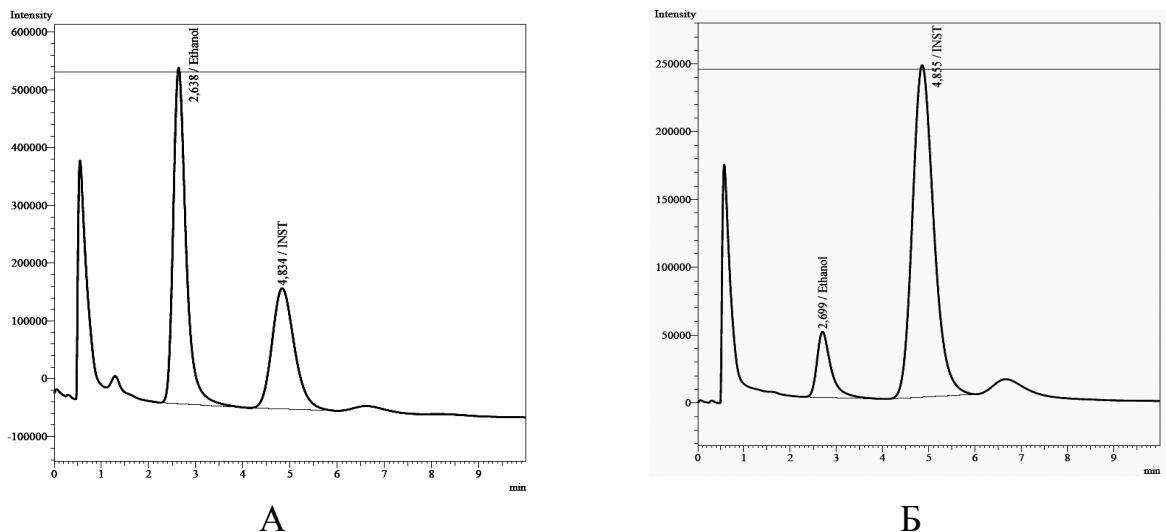


Рис. 12. Хроматограми: А - розчину порівняння етанолу; Б - випробовуваного розчину

Вміст етанолу у субстанції становить близько 0.042, що не перевищує критичну межу 0.5 %.

Нами було проведено визначення технологічних домішок та стабільності у «стресових умовах» похідних 1,2,4-триазолу. Для вирішення завдання щодо вивчення технологічних домішок та домішок, що можуть створюватися у процесі зберігання, кількість яких визначають критичні показники якості, ми використали умови проведення аналізу її застосуванням ВЕРХ, наведені вище.

Фармацевтична розробка потребує приведення даних про стабільність лікарської субстанції. Слід позначити, що при обґрунтуванні складу ГЛЗ необхідні дані про стабільність, які в свою чергу впливають на рН, вибір розчинника, температурних впливів, світла та ін. Виходячи з цього, при дослідженні стабільності необхідно застосовувати прискорені іспити, сплановані таким чином, щоб збільшити швидкість хімічного розкладу діючої речовини чи ЛЗ шляхом створення особливо несприятливих умов, які в деталях можуть прогнозувати оптимальні як умови створення лікарського засобу, так і умови його зберігання. (Настанова 42-3.3:2004 Настанови з якості. Лікарські засоби. Випробовування стабільності).

Дослідження стабільності субстанцій проведено з використанням різних методів їх розкладу (Директива ІСН Q16).

Стресове розкладання субстанції проводили з використанням різних методів їх розкладу:

- 1) опромінювання світлом, частіше за все ультрафіолетовим (згідно до вимог настанови ІСН Q16);
- 2) кислотний гідроліз (0.1 М розчин HCl);
- 3) лужний гідроліз (0.1 М розчин NaOH);

4) гідроліз водних розчинів та/або окиснювальний розклад (3% розчин H_2O_2).

Визначення складу домішок у субстанції Лізинію було проведено з використанням методу ВЕРХ у наступних умовах:

Приготування буферного розчину. У мірну колбу місткістю 1000 мл вміщують 0,01 г натрію октансульфонату, розчиняють у 800 мл води, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Доводять рН одержаного розчину до 2,2 кислотою фосфорною концентрованою (потенціометрично, ДФУ 2.2.3).

прилад	- ВЕРХ-хроматограф
детектор	- УФ-детектор diode-array detector ELSD (Evaporated Liquid Scattering Detector)
колонка	- Resolv C18, розміром (300 × 4,6) мм, заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги випробування «Перевірка придатності хроматографічної системи»
рухома фаза	- ацетонітрил – буферний розчин (20:980), дегазована будь-яким зручним способом
швидкість рухомої фази	- 1,0 мл/хв
температура колонки	- 30 °C
довжина хвилі	- 220 нм

Контролюють вміст 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону (технологічна домішка, максимальний вміст не більш 0,2%) та інших домішок (не більш 0,1% сумарний вміст невідомих домішок не більш 0,2%).

Згідно з вимогами ДФУ та Настановою ІСН із валідації методик ВЕРХ було проведено валідацію методики визначення вмісту сторонніх домішок, для чого було перевірено такі валідаційні характеристики як специфічність та межа виявлення. На рис. 13-16 наведено хроматограми розчинів, що отримано при визначенні специфічності методики.

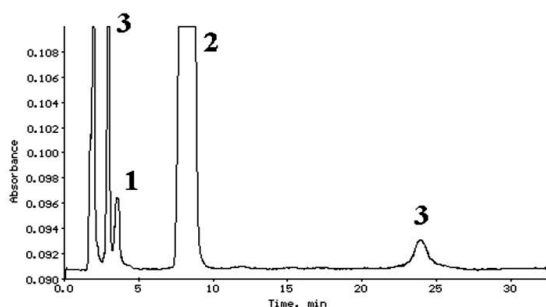


Рис. 13. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після опромінювання УФ-світлом
1 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіон;
2 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтова кислота;
3 – продукти розкладання

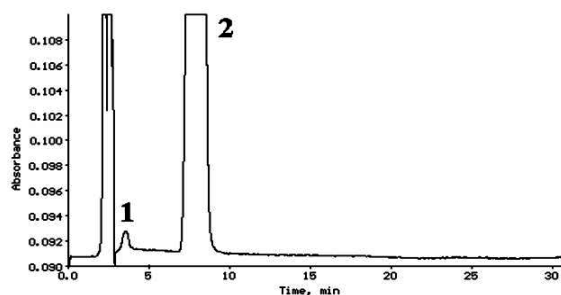


Рис. 14. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після кислотного гідролізу
1 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіон;
2 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтова кислота.

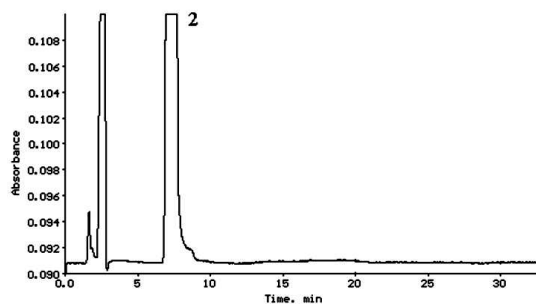


Рис. 15. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після лужного гідролізу
1 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіон;
2 - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтова кислота

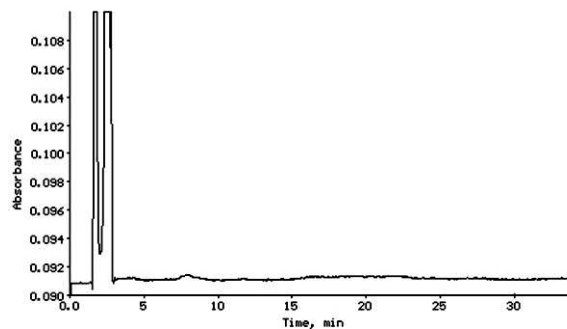


Рис. 16. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після обробки водню пероксидом (препарат практично повністю розклався)

Межа виявлення домішок складає 0.032%. Для відомої домішки - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону було проведено додаткові валідаційні випробування, критерії та величини, що визначено, наведені у табл. 8.

Таблиця 8

**Валідаційні показники та вимоги до них методики визначення домішки
3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону у субстанції Лізинію**

Критерій	Вимоги	Отримано	Висновок
статистична незначущість вільного члену	$ a < 2.3534 * S_a = 2.27$	1.23	відповідає
практична незначущість	$ a \leq 6.8$	-1.23	відповідає
відносне стандартне залишкове відхилення	$RSD_0/b \leq 6.8$	0.94	відповідає
коефіцієнт кореляції	$r \geq 0.9916$	0,99973	відповідає

Згідно з результатами аналізу у «стресових умовах», отриманих за валідованою методикою визначення домішок, можна констатувати:

- *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат достатньо майже повністю розкладається, особливо за окиснювальних способів розкладання (УФ - опромінювання та водню пероксид).

- Термічна обробка субстанції не приводить до розкладання.

- У нейтральних і слабо кислих (до рН 4) водних розчинах субстанція є стійкою. У сильно кислих розчинах (рН 1 та менше) субстанція частково розкладається з утворенням 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіону.

Проведені дослідження дозволили зробити висновки про необхідність особливих умов виробництва та зберігання:

- Виготовлення ін'єкційних розчинів можна проводити без додавання антиоксидантів;

- Зберігання субстанції треба проводити в захищеному від світла місці при кімнатній температурі.

Умови визначення стабільності були взяті за основу розробленої та валідованої методики кількісного визначення 2,5% розчину Лізинію для ін'єкцій.

Нами було проведено оцінювання критичних показників якості субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду (МТ).

Нами була розроблена методика кількісного визначення 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду методом потенціометричного неводного титрування.

Згідно з результатами дослідження кислотно-основних властивостей похідних 1,2,4-триазолу оптимальними умовами при проведенні кількісного визначення методом неводного титрування є середовище оцтового ангідриду, у якому 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід титрується як однокислотна основа (рис.17А) або в середовищі оцтової кислоти з додаванням ацетату ртуті (II) (рис.17Б).

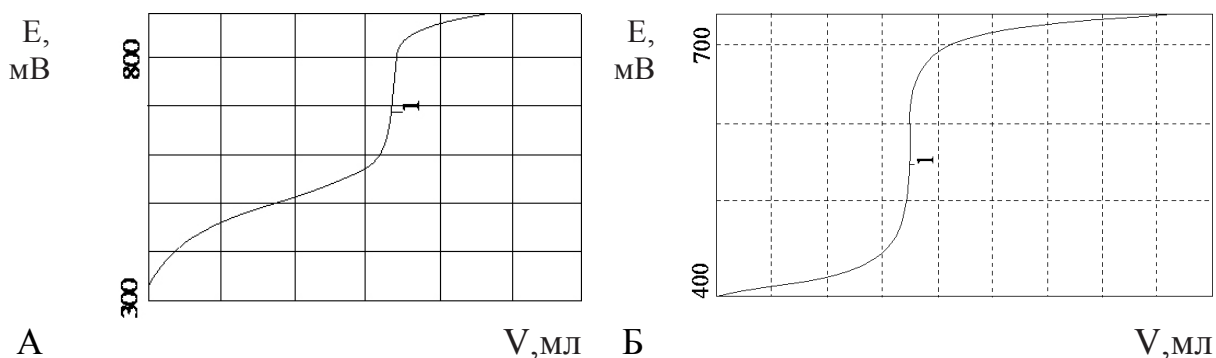


Рис. 17. Типові криві потенціометричного титрування

А - 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду в оцтовому ангідриді

Б - 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду в оцтовій кислоті + ртуті (II) ацетат

Визначення 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду проводили за наступною методикою: 0,10 г (точна наважка) 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду розчиняють в 40 мл оцтового ангідриду, титрують 0.1 М розчином кислоти хлорної в безводній оцтовій кислоті потенціометрично (ДФУ 2.2.20) з використанням системи електродів скляний - хлорсрібний.

1 мл 0,1 М розчину кислоти хлорної у безводній оцтовій кислоті відповідає 0.02692 г 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду, вміст якого у субстанції має становити 98,5-101%.

Валідацію даної методики проведено згідно до вимог ДФУ за характеристиками – лінійність, правильність, прецизійність, а розрахунки наведені у «нормалізованих» координатах. Наведені характеристики вивчено для 5 наважок препарату в ділянці ± 20 % від номінального вмісту.

Нами були розроблені методики визначення залишкових кількостей органічних розчинників (ацетону та ізопропанолу) у субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду методом ГХ.

На рис. 18 наведено хроматограми випробовуваного зразку та зразків порівняння ацетону та пропанолу-2.

Усі стадії синтезу 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду, включаючи перекристалізацію, відбуваються в ацетоні або ізопропанолі, котрі, як і етанол у субстанції Лізинію, згідно з Настановою із регламентації залишкових кількостей органічних розчинників (ICH Topic Q3C (R4) Impurities: Guideline for Residual Solvents) належать до розчинників класу 3 – малотоксичні розчинники, тобто критична межа концентрації ацетону або ізопропанолу у субстанції ≤ 0.5 % не потребує обґрунтування.

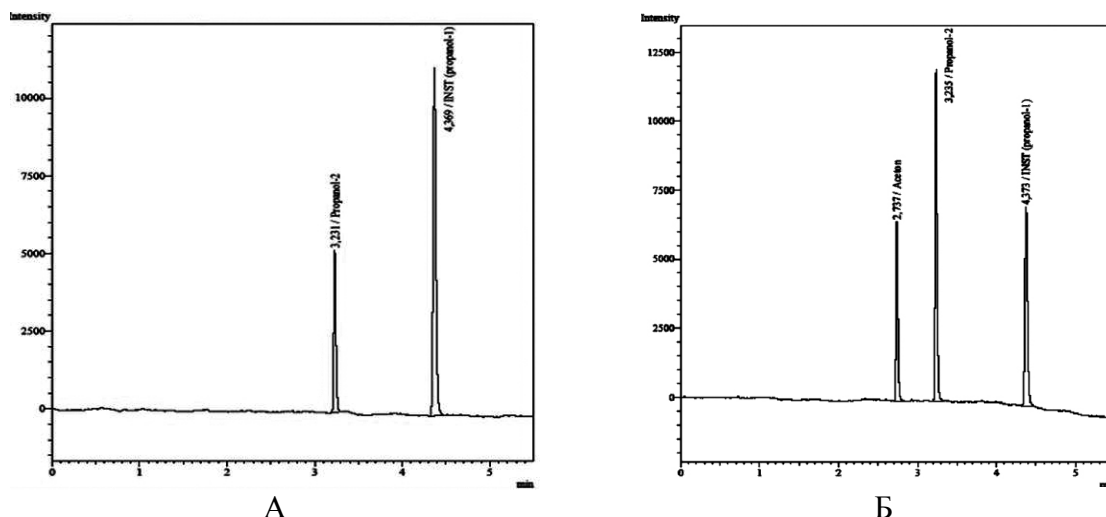


Рис. 18. Хроматограми А - випробовуваного зразку
Б - зразків порівняння ацетону та пропанолу-2

Визначення проведено методом газової хроматографії відповідно вимог ДФУ 2.2.28 и 2.2.46(N).

Результати аналізу свідчать про наявність у досліджуваних зразках 0,18% пропанолу-2 та відсутність ацетону, кількість яких можливо буде контролювати, якщо вони будуть використовуватися у синтезі.

Розроблена ТШХ-методика визначення вмісту технологічних домішок у субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду. Межа визначення 4-аміно-1,2,4-триазолу складає в субстанції 0,25%, що дозволило перевіряти якість субстанції за наявністю технологічних домішок при постадійному контролі виготовлення.

Нами проведено визначення супровідних домішок у субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-триазолій броміду. Випробовування проведено методом ВЕРХ, відповідно до ДФУ 2.2.29 та 2.2.46 і 2.2.46^N. Вибір умов хроматографування нами було обґрунтовано раніше, а також:

швидкість рухомої фази – 0,8 мл/хв.;

температура колонки +30°C;

довжина хвилі реєстрації – 210 нм;

Із хроматограми, що одержана в умовах градієнтного елюювання (рис. 11), видно, що режим градієнтного елюювання дозволяє розділити активний фармацевтичний інгредієнт і напівпродукти його синтезу.

Розроблена методика визначення супровідних домішок у субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-триазолій броміду. Випробовування проведено методом ВЕРХ, відповідно до ДФУ 2.2.29 та 2.2.46 і 2.2.46^N за наступних умов:

Приготування випробовуваного розчину. 50,0 мг Препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 20 мл води, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують (2 мг/мл).

Приготування розчину порівняння 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу. 25,0 мг 4-Аміно-4H-1,2,4-триазолу поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл розчиняють у 20 мл води, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують (0,5 мг/мл).

1,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують (10 мкг/мл).

По 20 мкл випробовуваного розчину, розчину порівняння 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу і розчинника хроматографують на рідинному хроматографі з УФ спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка сталева, розміром 250 □ 4,6 мм Spherisorb ODS 2, розмір часток 5 мкм, або аналогічна;
- склад рухомої фази (РФ) програмують, як наведено на раніше.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піку 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу має бути не більше площі піку 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу на хроматограмі розчину порівняння 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу (не більш 0,5%). Площа будь якого іншого стороннього піку на хроматограмі випробовуваного розчину має бути не більше 1/5 частини площі піку 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу на хроматограмі розчину порівняння 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу (не більше 0,1 %).

Сумарна площа піків усіх додаткових піків має бути не більше подвійного значення площі піків 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу (не більше 1,0%).

Системний пік, що має час утримання близько 2 хв (броміду), і піки, час утримання яких збігається з часом утримання піків на хроматограмі розчинника, не враховують.

Результати вважаються достовірними, якщо виконуються такі умови:

- відносне стандартне відхилення площ піків 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу, розраховане з хроматограм, має відповідати вимогам ДФУ табл. 2.2.46 - 2;
- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу, має бути не менше 1500 теоретичних тарілок;
- фактор утримування, розрахований за піком 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу має бути не менше 0,6.

Розроблену методику визначення 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу в препараті було досліджено за такими валідаційними характеристиками: специфічність, межа виявлення, лінійність і прецизійність відповідно до вимог ДФУ.

Специфічність методики визначення домішки (4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу) підтверджується тим, що на хроматограмі випробовуваного розчину препарату з добавкою 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу, час утримання додаткового піку співпадає з часом утримання піку 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу на хроматограмах розчину порівняння 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу. Повним розділенням піків 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу і препарату та відсутністю піків, час утримання яких відповідає часу утримання піку 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу на хроматограмах розчинника і випробовуваного розчину додатково очищеної субстанції (рис. 18).

Визначення характеристик «лінійність» і «прецизійність» проводили методом «введено-знайдено» на 9 модельних розчинах препарату з концентрацією 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу, що відповідає від 25 % до 225 % по відношенню до гранично допустимої концентрації (0,5 %).

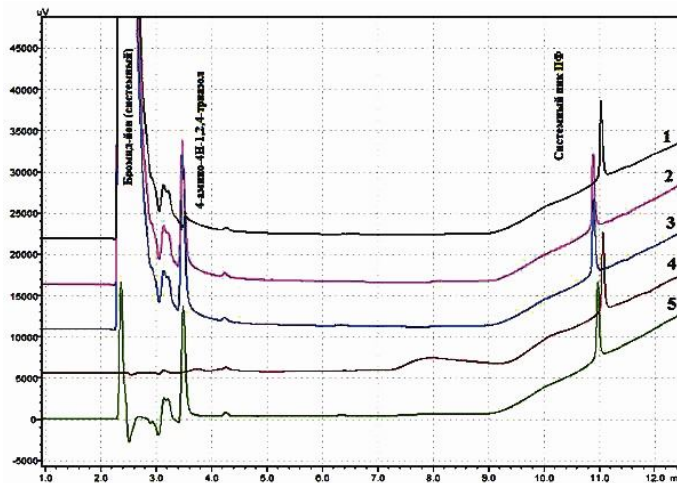


Рис. 18. Хроматограми: 1 - випробовуваного розчину без додавання 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу; 2 і 3 - випробовуваного розчину із додаванням домішки 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу; 4 - розчинника; 5 - розчину порівняння 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу

Вимірювання концентрації проводили за вище наведеною методикою. Результати вимірів з метрологічною обробкою наведено в табл.9.

Таблиця 9

**Результати і метрологічні характеристики методики визначення
4-аміно-4H-1,2,4-триазолу**

№ модельного розчину	Введено в % від гранично допустимої концентрації 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу (X _i , факт.)	Знайдено в % від гранично допустимої концентрації 4-аміно-4H-1,2,4-триазолу (Y _i , %)	Знайдено в % до введенного Z _i =100×(Y _i /X _i)
1	25,0	23,56	94,23
2	50,0	51,25	102,50
3	75,0	75,24	100,32
4	100,0	99,30	99,029
5	125,0	126,87	101,50
6	150,0	149,96	99,98
7	175,0	171,77	98,16
8	200,0	198,16	99,08
9	225,0	229,83	102,15
Середнє значення Z _{ср} , %			99,661
Відносне стандартне відхилення, RSD _z , %			2,524975
Відносний довірчий інтервал Δ _z (%)=t _(95%,9-2) ×RSD _z =1,895×2,525=			4,784875
Критичне значення збіжності результатів Δ _{As} %=			5,12
Систематична похибка % = Z _{ср} –100			0,339
Критерії незначущості систематичної похибки:			виконується
1.Статистична незначущість: (δ<Δ _z /√3=4,79/3=1,60>0,34			
Якщо не виконується (1) , то max δ			
2. Практична незначущість: δ≤ 0,32×5,12=1,64 >0,34			
Загальний висновок про методику			Коректна

За результатами визначення вмісту 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу в модельних розчинах препарату розраховані метрологічні характеристики «лінійність». Графік лінійної залежності знайденої концентрації 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу від введеної наведено на рис.19.

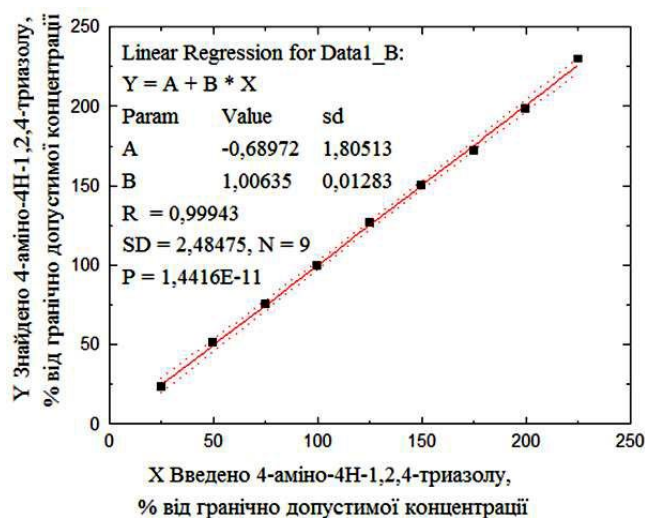


Рис. 19. Графік лінійної залежності знайденої кількості 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу від введеного

Метрологічні характеристики наведено в табл.10.

Таблиця 10

Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої кількості 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу у субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазоліній броміду від його введеної кількості.

Параметр	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
B	1,0064			
S _b	0,01283			
a	-0,68972	$\leq 2,04 $	$\leq 1,64 $	Витримується за 1 критерієм
S _a	1,80513			
RSD ₀	2,48			
RSD ₀ /b	2,47	2,70		Витримується
r	0,9994	$> 0,99443 $		Витримується

Як свідчать наведені дані, методика за характеристиками «лінійність» і «прецизійність» відповідає критеріям придатності аналітичних методик визначення гранично допустимих концентрацій домішок.

Розрахунок сумарної невизначеності пробопідготовки проведено відповідно до вимог ДФУ, і вона складає 0,75 %. Невизначеність кінцевої аналітичної процедури розраховували за результатами хроматографування модельного розчину зі вмістом 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу, що відповідає гранично припустимому значенню і розчину порівняння 4-аміно-4*H*-1,2,4-триазолу. Сумарна невизначеність аналітичної операції складає 3,40 %, а

сумарна невизначеність результатів усієї методики дорівнює 3,48 %, що не перевищує гранично допустиме значення 5,12 %.

Для оптимізації застосування в подальшому та вивчення фармакокінетичних характеристик нами розроблена методика кількісного визначення субстанції *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в сироватці крові. Розробка методики проведена у співпраці з науковцями відділу фармакокінетики (керівник проф. Ярош О.К.) ДУ «ІФТ НАМН України».

Тваринам піддослідної групи внутрішньоочеревинно вводили *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат у дозі 50 мг/кг маси тіла тварини. Точну наважку Лізинію розчиняли у воді. Проби крові брали відразу після декапітації тварин під ефірним наркозом через 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180 хвилин після введення досліджуваної сполуки.

Для безпосереднього кількісного визначення вмісту *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату нами було запропоновано пробопідготовка у відповідності до властивостей субстанції:

В пробірку вносили 0,8 мл сироватки крові, додавали 1,0 мл метанолу та ставили на 5 хвилин в ультразвукову баню при температурі 55 °C для повного осадження білків. Центрифугували при 8000 об/хв протягом 30 хвилин. Отриманий прозорий розчин декантували у нову чисту пробірку, піпеткою заміряли його точний об'єм, який переносили до віали для подальшого хроматографування.

Об'єм ін'єкції підготовленої біопроби становив 5 мкл. Елюювання проводили в ізократичному режимі з наступним промиванням колонки. Тривалість аналізу складала 10 хв. (з урахуванням промивки колонки).

прилад	-	рідинний хроматограф
детектор	-	мас-селективний
колонки	-	Rapid Resolution HT Cartridge 4,6x30 mm 1,8 μ m Zorbax SB-C 18 та Agilent XDB-C18 4,6x50 mm 1,8 μ m, з'єднані послідовно
Швидкість потоку	-	0,5 мл/хв
температура	-	450°C
рухома фаза	-	деіонізована вода та ацетонітрил
Метод реєстрації	-	SIM Method (174 m/z)
Фрагментор	-	120
напруга на капілярі	-	4000 В
температура газу	-	250°C
швидкість газу	-	12 л/хв
тиск розпилювача	-	35 psig

Результати експериментів піддавали статистичній обробці за допомогою комп'ютерних програм Excel Microsoft, Statistika 6,0 з використанням t-критерію Ст'юдента.

Хроматографування проводили через 3,5,10,20,40,60,90 хв (рис. 20).

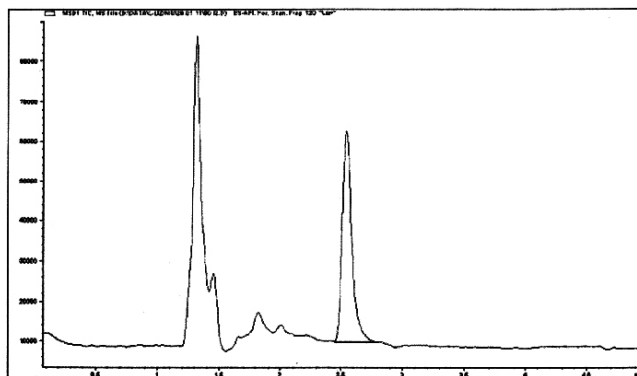


Рис.20. Типова хроматограма *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в крові піддослідного щура, одержана через 90 хв. після парентерального введення сполуки в дозі 50 мг/кг маси тіла

Після проведення експерименту одержані хроматограми досліджуваних розчинів були проінтегровані. Концентрацію Лізинію розраховували з використанням калібрувальної кривої залежності «площа хроматографічного піку – концентрація». Фармакокінетична крива *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату, що відтворює залежність концентрації діючої субстанції в крові від часу після її введення тваринам наведена на рис. 21.

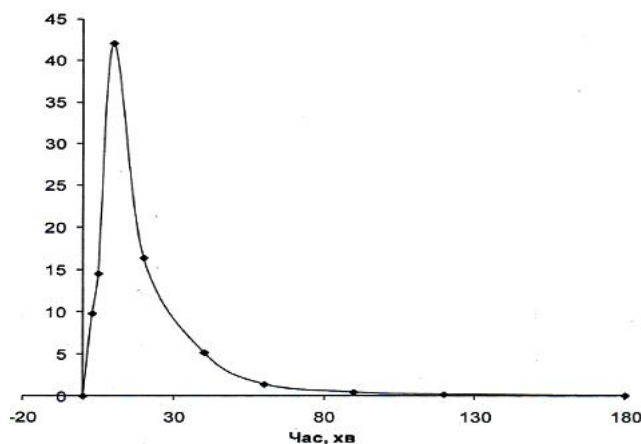


Рис. 21. Фармакокінетична крива залежності концентрації (мкг/мл) *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в крові щурів від часу (хвилини) після введення діючої субстанції в дозі 50 мг/кг маси тіла

Встановлено, що Лізиній швидко всмоктується в кров з досягненням максимальної концентрації через 10 хв після ін'єкції препарату.

Високі значення уявного об'єму розподілу вказують на добрий розподіл АФІ в тканинах тварин, а значення констант елімінації та середнього часу утримання в крові вказують на швидкість виведення препарату з крові щурів.

Результати розрахунків дослідження наведені у табл. 11.

Одержані фармакокінетичні параметри були використані для розробки схеми курсового використання *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в лікарських формах. Нами проведено Аналіз результатів фармакологічних властивостей *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Лізинію) та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду (МТ) у порівнянні із структурними аналогами та референтними препаратами.

**Основні фармакокінетичні параметри
D,L-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в крові щурів
після парентерального введення в дозі 50 мг/кг маси тіла**

№п/п	Параметри	Позначення	Значення
1.	Максимальна концентрація в крові	C_{\max} , мкг/мл	$42,0 \pm 15,2$
2.	Час досягнення максимальної концентрації	T_{\max} , хв	$10,0 \pm 0$
2.	Константа елімінації	K_{el} , $хв^{-1}$	$0,05 \pm 0,002$
3.	Уявний об'єм розподілу	V_d , мл/кг	$463,9 \pm 3,4$
4.	Площа під фармакокінетичною кривою	AUC , мкг·хв/мл	$2143,2 \pm 101,8$
5.	Загальний кліренс	Cl_t , мкг/хв $^{-1}$ ·кг $^{-1}$	$23,3 \pm 1,1$
6.	Середній час утримання в крові	MRT , хв.	$19,9 \pm 0,93$

Аналіз результатів біологічної активності субстанцій МТ та Лізинію за даними доклінічних досліджень, що були нами стандартизовані та якісно й кількісно оцінені, свідчать наступне:

D,L-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Лізиній), який рекомендується для лікування серцево-судинної та нервової систем, проявляє виражену кардіопротекторну активність, в основі якої лежить здатність препарату ослаблювати явища ендотеліальної дисфункції та відновлювати структурно-функціональні порушення міокарда. Застосування Лізинію у комплексі невідкладних дій у гострий період ішемії та протягом наступних діб інтенсивної терапії дозволяє підвищити захист міокарда у більш повному обсязі життєдіяльності організму.

Запропонований оригінальний препарат, що містить 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій бромід (МТ) при лікуванні інфаркту міокарда у найгострішому та гострому періодах і артеріальної гіпертензії за ефективністю використання значно перевищує за всіма показниками ефективність використання з цією ж метою референтного препарату – карведилолу та структурного аналогу – кардіотрилу.

В роботі наведено специфікація зразків субстанцій та їх технологічних домішок для атестації їх стандартних зразків при контролі якості похідних 1,2,4 – триазолу. Проведена робота по специфікації субстанцій – Лізинію, МТ та їх вихідних продуктів синтезу, наявність яких повинна контролюватися згідно до вимог щодо фармакопейних стандартних зразків: СЗ для проведення офіційних методів аналізу та СЗ, що використовуються для забезпечення якості результатів аналізу.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування та практичне вирішення наукової проблеми, що стосується аналітичного забезпечення синтезу, стандартизації та контролю якості похідних 1,2,4-триазолу та їх готових лікарських форм. В результаті практичної апробації запропонованого методологічного підходу розроблено та підготовлено для впровадження у

виробництва двох лікарських субстанцій, похідних 1,2,4-триазолу та їх ін'єкційних розчинів.

1. Вперше теоретично обґрунтовано та сформульовано *алгоритм* аналітичного забезпечення створення та контролю якості активних фармацевтичних інгредієнтів.

2. Вперше зроблено вибір напрямку створення нових оригінальних вітчизняних лікарських субстанцій та їх ГЛФ для застосування їх в найгостріший і гострий періоди захворювання на основі аналізу арсеналу лікарських препаратів для лікування хвороб системи кровообігу та визначено місце серед них препаратів - похідних 1,2,4-триазолу;

3. Вперше проведено прогнозування можливих видів біологічної активності (у нашому випадку - за допомогою програми PASS) для оптимізації та здійснення цілеспрямованого синтезу похідних 1,2,4-триазолу з подальшим підтвердженням прогнозованих видів активності за результатами фармакологічних досліджень;

4. Вперше теоретично обґрунтовано проходження синтезу 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду через реакцію алкілгалогенування по гетероциклічному атому азоту за допомогою методу квантово-хімічних обчислювань згідно версії модифікованого нехтування диференційним перекриттям (MNDO);

5. Вперше доведено методами хромато-мас-спектрометрії та ВЕРХ співвідношення 1:1 між 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтовою кислотою та *D,L*-лізином при синтезі *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату;

6. Вперше встановлено методами ЯМР, ІЧ-спектроскопії та хромато-мас-спектрометрії хімічну будову синтезованих сполук: 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій броміду та *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату та підтверджено їх структури за допомогою рентгеноструктурного методу.

7. Вперше вивчено фізико-хімічні та аналітичні характеристики (спектральні, хроматографічні, кислотно-основні, рентгеноструктурні) синтезованих сполук та їх технологічних домішок, що покладено в основу наукового обґрунтування створення комплексу методик контролю якості синтезованих сполук та їх ін'єкційних лікарських форм;

8. Створення комплексу фізико-хімічних методик вперше дозволило оцінити критичні показники якості для даних АФІ:

- кількісне визначення діючої речовини методом кислотно-основного титрування у неводних розчинниках;

- визначення критичних параметрів вмісту технологічних домішок методом ТШХ та ВЕРХ для *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду та вмісту залишкових органічних розчинників методом ГХ;

- кількісне визначення АФІ при доказі стабільності у «стресових умовах» ін'єкційних розчинів методом ВЕРХ Лізинію та МТ із застосуванням стерилізації при температурі 120 °С або методом стерильної фільтрації;

- методика ВЕРХ для проведення фармако-кінетичних досліджень *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату, що використана для розробки

схеми курсового використання *D,L*-лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату в лікарських формах;

9. Вперше проведено валідацію всіх розроблених методик згідно з вимогами ДФУ, а її результати використані для фармацевтичної розробки препаратів *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат та 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію бромід;

10. Обґрунтування, формулювання, та практичне доведення *алгоритму* аналітичного забезпечення синтезу, стандартизації та контролю виробництва препаратів – похідних 1,2,4-триазолу та їх лікарських форм вперше дозволило:

- обґрунтувати дані для одержання Патентів України та РФ на препарати МТ (1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію бромід) та Лізиній (*D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат);

- впровадити технологію 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолій (МТ) бромід та *D,L*-лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Лізинію) на ДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України (м. Харків), а технології ін'єкційних розчинів - на АТ «Лекхім-Харків»;

- виконати фармацевтичну розробку для реєстрації лікарських препаратів Лізиній, МТ та їх ін'єкційних розчинів у ДП «Державний експертний центр» МОЗ України.

11. Вперше розроблене наукове обґрунтування аналітичного забезпечення створення оригінальних препаратів - похідних 1,2,4-триазолу та їх лікарських форм дозволило вирішити важливе медико-соціальне питання розробки оригінальних вітчизняних метаболічних препаратів для лікування хвороб кровообігу, що перевищують за ефектом фармакологічної дії референтні препарати та структурні аналоги.

Основний зміст дисертації викладений у публікаціях:

1. Применение спектроскопии ЯМР в установлении строения биологически активных соединений и количественном определении готовых лекарственных средств / С. М. Десенко, С. А. Комыхов, С. И. Мусатов, Г. В. Георгиевский // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012. – Т. 1. – С. 353–462. *(Здобувачем особисто здійснений огляд літературних досліджень по можливості застосування ЯМР у вивченні будови та аналізі біологічно-активних речовин та їх лікарських форм, у тому числі й похідних 1,2,4-триазолу).*

2. Георгиевский Г. В. Тонкослойная хроматография / В. П. Георгиевский, А. Ю. Куликов, Г. В. Георгиевский // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012. – Т. 2. – С. 487–611. *(Здобувачем систематизовані та наведені літературні дані по застосуванню ТШХ в аналізі субстанцій та готових лікарських форм, поетапному контролю якості, у тому числі – похідних 1,2,4-триазолу).*

3. Георгиевский Г. В. Стабильность и установление сроков годности лекарственных средств / Г. В. Георгиевский // Аналитическая химия в создании,

стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012. – Т. 3. – С. 1220–1262. *(Здобувачем наведені сучасні міжнародні вимоги щодо стабільності лікарських засобів та на конкретних прикладах, у тому числі – похідних 1,2,4-триазолу, розкриті можливості фізико-хімічних та хроматографічних методів аналізу в доказі стабільності та встановлені термінів придатності лікарських засобів).*

4. Разработка количественного определения тиотриазолина в 2% мази / З. Б. Морьяк, И. А. Мазур, Т. В. Проценко, Г. В. Георгиевский, А. А. Прокофьева // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики. – 1998. – Т. 1, вип. 2. – С. 80–82. *(Здобувачем особисто обґрунтовано можливість застосування УФ-спектрофотометричного методу для кількісного визначення похідних 1,2,4-триазолу у лікарській формі, підготовлено матеріал до друку).*

5. Разработка количественного определения тиотриазолина в суппозиториях / З. Б. Морьяк, И. А. Мазур, Т. В. Проценко, Г. В. Георгиевский, А. А. Прокофьева // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики. – 1998. – Т. 1, вип. 2. – С. 82–85. *(Здобувачем особисто обґрунтовано можливість застосування УФ-спектрофотометричного методу для кількісного визначення похідних 1,2,4-триазолу у лікарській формі, підготовлено матеріал до друку).*

6. Газохроматографічне визначення тіотриазоліну в таблетках тіотриазоліну / Л. І. Кучеренко, Л. В. Вронська, Г. В. Георгієвський, Л. О. Лебединець // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики : зб. наук. ст. – 2000. – Вип. VI. – С. 17–23. *(Здобувачем обґрунтована можливість застосування газохроматографічного методу для кількісного визначення похідних 1,2,4-триазолу у лікарській формі, обговорені результати, підготовлено матеріал до друку).*

7. Георгієвський Г. В. Монографії Державної Фармакопеї України на лікарські субстанції / Г. В. Георгієвський // Фармаком. – 2002. – № 1. – С. 31–36.

8. Георгієвський Г. В. Монографії на лікарські субстанції в Доповненні 1 до Державної Фармакопеї України 1-го видання / Г. В. Георгієвський, Т. М. Тихоненко // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 60–66 *(Здобувачем особисто проаналізовані вимоги Європейської Фармакопеї щодо показників якості субстанцій, проведено їх порівняння з вимогами ГФ СРСР XI видання та підготовлено макет монографії для введення в ДФУ I видання Доповнення 1).*

9. Георгиевский Г. В. Биологическая активность производных 1,2,4-триазола / Г. В. Георгиевский // Фармаком. – 2006. – № 3. – С. 27–31.

10. Георгиевский Г. В. Целенаправленный поиск новых фармакологически активных средств в ряду производных триазола / Г. В. Георгиевский // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 60–66.

11. Георгиевский Г. В. Обоснование проведения анализа производных 1,2,4-триазола при кислотно-основном титровании в неводных средах / Г. В. Георгиевский // Фармаком. – 2008. – № 4. – С. 60–65.

12. Георгиевский Г. В. Определение примесей в отечественных субстанциях - производных 1,2,4-триазола методом обращено - фазовой ВЭЖХ / Г. В. Георгиевский, А. Ю. Куликов // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 67–98. *(Здобувачем обґрунтовано вибір умов проведення розділення похідних 1,2,4-триазолу та продуктів розкладу у «стресових» умовах, проведена валідація розроблених методик, підготовлено матеріал до друку).*

13. Вітчизняний антиоксидант підвищує безпечність та ефективність антиагрегантної фармакотерапії / А. Е. Левих, В. Й. Мамчур, Л. І. Кучеренко, О. В. Тригубчак, Г. В. Георгієвський // Запорожский мед. журн. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 31–35. *(Здобувачем особисто проаналізовані літературні дані про антиоксидантну активність похідних 1,2,4-триазолу, приготовані зразки для проведення фармакологічних досліджень, брав участь в обговоренні одержаних результатів та підготовки матеріалу до друку).*

14. Состояние энергетического метаболизма при центральной ишемии и его модуляция производными L-лизина / А. А. Егоров, И. Ф. Беленичев, И. А. Мазур, Г. В. Георгиевский, М. А. Егорова // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – Спец. вип. № 4. – С. 48. *(Здобувачем особисто приготовані зразки для проведення фармакологічних досліджень, брав участь в обговоренні одержаних результатів та підготовки матеріалу до друку).*

15. Георгиевский Г. В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов – производных 1,2,4-триазола / Г. В. Георгиевский // Запорожский мед. журн. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 58–70.

16. Георгієвський Г. В. Будова та критичні показники якості субстанції лізинію / Г. В. Георгієвський, І. А. Мазур // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 40–48. *(Здобувачем особисто розроблені та валідовані методики визначення критичних показників якості, які гарантують якість препарату та його лікарських форм, встановлена будова та запропоновані методики ВЕРХ для доказу співвідношення лізину та 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти 1:1 у молекулі «лізинію», підготував матеріал до друку).*

17. Вплив нового метаболітотропного кардіопротектора «лізиній» на стан лімітуючих ланок енергетичного обміну і компенсаторних метаболічних шунтів в умовах гострого інфаркту міокарда / І. Ф. Беленічев, Л. І. Кучеренко, І. А. Мазур, Г. В. Георгієвський, Н. В. Бухтіярова, В. С. Стеблюк, І. В. Павлюк // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 36–39. *(Здобувачем особисто проведено оцінку якості зразків «лізинію», брав участь в обговоренні одержаних результатів та підготовки матеріалу до друку).*

18. Георгієвський Г. В. Методики оцінювання критичних показників якості у фармацевтичній розробці субстанції лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату та 2,5 % розчину лізинію для ін'єкцій / Г. В. Георгієвський // Фармацевтичний журнал. – 2012. – № 2. – С. 27–42.

19. Вивчення процесу покриття таблеток-ядер кислоти ацетилсаліцилової в комбінації з тіотриазоліном у псевдо зрідженому шарі / О. В. Тригубчак, Л. І. Кучеренко, Т. А. Грошовий, Г. В. Георгієвський // Актуальні питання

фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 1. – С. 78–82. *(Здобувачем особисто запропоновані методики контролю похідних 1,2,4-триазолу при процесі покриття таблеток-ядер при приготуванні комбінованих таблеток).*

20. Подходы к разработке и созданию метаболитотропных препаратов – производных 1,2,4-триазола / И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Г. В. Георгиевский, Н. В. Бухтиярова, И. В. Павлюк, В. С. Стеблюк // Фармаком. – 2012. – № 3. – С. 40–48. *(Здобувачем розроблений комплекс фізико-хімічних та хроматографічних методик аналізу похідних 1,2,4-триазолу, що застосовані при контролі якості та проведенні фармако-кінетичних досліджень).*

21. Георгієвський Г. В. Розробка методики кількісного визначення вмісту 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду у 0,2 % розчині для ін'єкцій / Г. В. Георгієвський // Запорожский мед. журн. – 2012. – № 6 (75). – С. 59–62.

22. Профіль фармакокінетики сполуки «Лізіній» у крові після парентерального введення / О. К. Ярош, І. А. Мазур, В. М. Бобков, Л. І. Кучеренко, О. І. Барчина, А. Г. Крисько, Г. В. Георгієвський, А. В. Волуй // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 5(30). – С. 93–98. *(Здобувачем особисто розроблені методики кількісної оцінки із застосуванням методів ВЕРХ, підготував матеріал до друку).*

23. Георгієвський Г. В. Визначення вмісту технологічних домішок в субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду / Г. В. Георгієвський, О. А. Зінченко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 6(31). – С. 29–36. *(Здобувачем особисто розроблені методики кількісної оцінки домішок із застосуванням методів ВЕРХ, ГХ та ТШХ, підготував матеріал до друку).*

24. Георгієвський Г. В. Розробка методики потенціометричного визначення субстанції 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду / Г. В. Георгієвський // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 158–161.

25. Георгієвський Г. В. Обґрунтування напрямку синтезу та доказ хімічної будови 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду / Г. В. Георгієвський, І. А. Мазур // Фармаком. – 2012. – № 4. – С. 41–47. *(Здобувачем особисто визначено напрямок синтезу, встановлена будова, підготував матеріал до друку).*

26. Розробка методики кількісного вмісту домішки 4-аміно-4Н-1,2,4-триазолу в активному фармацевтичному інгредієнті 1-(β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду / Г. В. Георгієвський, О. А. Зінченко, Л. І. Кучеренко, Л. І. Шаповалова // Фармаком. – 2013. – № 1. – С. 32–37. *(Здобувачем особисто розроблені методики кількісної оцінки домішки із застосуванням методу ВЕРХ, підготував матеріал до друку).*

27. Пат. 2404974 Российская Федерация, МПК C07D 249/08, A 61P 9/04, A 61P 9/10, A 61P 9/12. Бромид 1-(β фенилетил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ), обладающий кардиопротективным, противоишемическим, антигипертен-

живным, антиоксидантным, протеинсинтетическим и энерготропным действием / Колесник Ю. М., Кучеренко Л. И., Волошин Н. А., Абрамов А. В., Чекман И. С., Горчакова Н. А., Загородний М. И., Мамчур В. И., Довгань Р. С., Георгиевский Г. В.; заявитель и патентообладатель ООО «Научно-производственное объединение «Фарматрон» (НПО «Фарматрон»). – №2008148765; заявл. 10.12.08 ; опубл. 20.06.10. *(Здобувачем визначено напрямок синтезу, встановлена будова, показники якості субстанції, обґрунтовано можливість створення ін'єкційної лікарської форми, представлені зразки для проведення фармакологічних досліджень).*

28. Пат. 92692 Україна, МПК А 61К 31/41, С07D 249/00, А 61Р 9/00, А 61Р 9/20, А61К 9/08. Лікарський засіб для лікування ішемічної хвороби серця та гіпертонічної хвороби / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М., Кучеренко Л. І., Волошин М. О., Абрамов А. В., Чекман І. С., Горчакова Н. О., Загородній М. І., Мамчур В. І., Довгань Р. С., Георгієвський Г. В.; заявник та патентовласник ТОВ «Науково-виробниче об'єднання «Фарматрон». – № а 200906983 ; заявл. 03.07.09.; опубл. 25.11.10., Бюл. № 22 *(Здобувачем визначено напрямок синтезу, встановлена будова, показники якості субстанції, обґрунтовано можливість створення ін'єкційної лікарської форми, представлені зразки для проведення фармакологічних досліджень).*

29. Пат. 2370492 Российская Федерация, МПК С07D 249/12, А 61К 31/41 Лизиний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиотропное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное и противогипоксическое действие, обладающий низкой токсичностью / Кучеренко Л. И., Волошин Н. А., Чекман И. С., Мамчур В. И., Горчакова Н. А., Георгиевский Г. В., Грошовый Т. А.; заявитель и патентообладатель ООО «Научно-производственное объединение «Фарматрон» (НПО «Фарматрон»). – № 2007121014/04 ; заявл. 04.06.07 ; опубл. 10.12.08. *(Здобувачем встановлена будова, визначено умови синтезу, показники якості субстанції, обґрунтовано можливість створення ін'єкційної лікарської форми, представлені зразки для проведення фармакологічних та фармако-кінетичних досліджень).*

30. Пат. 86668 Україна, МПК С07D 249/08, А 61К 31/4196, А 61Р 9/00, А61Р 9/10, А61Р 25/28. Лізиний 3-метил-1,2,4- триазоліл-5-тіоацетат / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М., Абрамов А. В., Кучеренко Л. І., Волошин М. О., Чекман І. С., Мамчур В. І., Горчакова Н. О., Георгієвський Г. В., Грошовий Т. А.; заявник та патентовласник ТОВ «Науково-виробниче об'єднання «Фарматрон». – № а200705865 ; заявл. 25.05.07 ; опубл. 12.05.09, Бюл. № 9 *(Здобувачем встановлена будова, визначено умови синтезу, показники якості субстанції, обґрунтовано можливість створення ін'єкційної лікарської форми, представлені зразки для проведення фармакологічних та фармако-кінетичних досліджень).*

Крім наведених робіт, матеріали дисертації відображено в 6 тезах доповідей.

АНОТАЦІЯ

Георгієвський Г.В. Аналітичне забезпечення синтезу, стандартизації та організації виробництва похідних 1,2,4-триазолу та їх лікарських форм. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття вченого ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.03 - стандартизація та організація виробництва лікарських засобів. - Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2013.

На прикладі похідних 1,2,4-триазолу вперше обґрунтовано розвиток нового наукового напрямку - аналітичного забезпечення створення та контролю якості ЛЗ за методологією науково обґрунтованого алгоритму. Здійснено прогноз та доказ фармакологічної активності похідних 1,2,4-триазолу – продуктів хімічної модифікації Тіотриазоліну та кардіотрилу, доведена їх будова та чистота; вивчено фізико-хімічних та хроматографічних властивостей, що покладено в основу розробки комплексу методик їх аналізу; досліджено та встановлено критичні показники якості та стабільність; обґрунтовано правильність вибору лікарської форми при фармако-кінетичних дослідженнях. ; Результати дослідження впровадженні в нормативно-технологічну та аналітичну документацію на заводах-виробниках та ДФУ; розроблено специфікації зразків оригінальних субстанцій під умовними назвами МТ та Лізиній, їх технологічних домішок для атестації їх стандартних зразків при контролі якості. Підготовлено документацію для реєстрації нових препаратів у ДЕЦ.

Виконання наукових досліджень за алгоритмом дозволило створити АФІ Лізиній та МТ та їх ін'єкційні лікарські форми, які за ефектом фармакологічної дії перевищують структурні аналоги – тіотриазолін та кардіотрил.

Ключові слова: аналітичне забезпечення, фармацевтична розробка, стандартизація, критичні показники якості, «стресові умови», технологічні домішки, активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ), похідні 1,2,4-триазолу.

АННОТАЦИЯ

Георгиевский Г.В. Аналитическое обеспечение синтеза, стандартизации и организации производства производных 1,2,4-триазола и их лекарственных форм. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.03 - стандартизация и организация производства лекарственных средств.- Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков, 2013.

Диссертационная работа посвящена разработке аналитического обеспечения синтеза, создания готовых лекарственных форм, организации производства новых активных фармацевтических ингредиентов для лечения заболеваний сердечно - сосудистой и нервной систем на основе производных 1,2,4-триазола.

Теоретически обоснован и сформулирован алгоритм аналитического обеспечения создания и контроля качества активных фармацевтических

ингредиентов (АФИ), их лекарственных форм, согласно которому впервые в Украине научно обосновано аналитическое обеспечение синтеза, стандартизации и контроля качества производных 1,2,4-триазола, их готовых лекарственных форм и выполнены:

- выбор направления создания новых оригинальных отечественных лекарственных субстанций, их ГЛФ для применения в надострый и острый период заболевания на основе анализа арсенала лекарственных препаратов для лечения заболеваний системы кровоснабжения, определение места среди них производных 1,2,4-триазола;

- прогнозирование возможных видов биологической активности с помощью программы PASS для проведения целенаправленного синтеза производных 1,2,4-триазола;

- установление возможности прохождения синтеза 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий бромида при реакции алкилгалогенирования методом квантово-химических расчетов по версии модифицированного пренебрежения дифференциальным перекрытием (MNDO);

- установление методами ЯМР-, ИК-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии химического строения синтезированных соединений: 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий бромида (МТ) и *D,L*-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата (Лизиний) и подтверждении их структуры с помощью рентгеноструктурного анализа;

- изучение физико-химических и аналитических характеристик (спектральных, хроматографических, кислотно-основных, рентгеноструктурных) синтезированных АФИ, их технологических примесей, положенных в основу научного обоснования создания комплекса методик контроля качества АФИ и их инъекционных лекарственных форм;

- создание комплекса физико-химических методик, позволяющих оценить критические показатели качества субстанций - АФИ:

- количественное определение действующего вещества методом кислотно-основного титрования в неводных растворителях;

- определение критических параметров содержания технологических примесей методом ВЭЖХ для Лизиния и МТ и содержания остаточных количеств органических растворителей методом ГХ;

- исследование стабильности синтезированных АФИ в том числе в «стрессовых условиях» с целью обоснования правильности выбора лекарственной формы;

- определение фармако-кинетических параметров для разработки схемы курсового применения Лизиния в лекарственных формах методом ВЭЖХ при проведении фармако-кинетических исследований;

- научное обоснование внедрения в производство нормативно-аналитической (МКК) и технологической документации на препараты 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий бромид (МТ) и *D,L*-лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (Лизиний);

- включение комплекса методик, валидированных согласно требованиям ГФУ, в фармацевтическую разработку препаратов Лизиний и МТ для

представления к регистрации в ГП «Государственный экспертный центр» МЗ Украины;

- обоснование данных для получения Патентов Украины и РФ на препараты МТ и Лизиний.

По данным фармакологических исследований установлено, что Лизиний проявляет выраженную кардиопротекторную активность и может найти применение в комплексе неотложных мер в острый период ишемии. Препарат МТ при лечении надострого и острого периода инфаркта миокарда и артериальной гипертензии по эффективности применения превышает существующие препараты карведилол и кардиотрил.

Ключевые слова: аналитическое обеспечение, фармацевтическая разработка, стандартизация, критические показатели качества, «стрессовые условия», технологические примеси, активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), производные 1,2,4-триазола,.

SUMMARY

Georgievskiy G.V. Analytical software for the synthesis, standardization and organization of manufacturing of derivatives of 1,2,4-triazole and their drug dosage forms. - A manuscript.

Dissertation for the degree of the Doctor of Pharmaceutical Sciences, specialty 15.00.03, Standardization and organization of the manufacturing of drugs. - The National University of Pharmacy, the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2013.

At the example of 1,2,4-triazole derivatives, for the first time, it was justified the development of a new scientific direction - analytical assurance for the development and quality control of drugs by the methodology of evidence-based algorithm. Prognosis and confirmation of pharmacological activity for 1,2,4-triazole derivatives which are products of chemical modification of Tiotriazoline and Kardiotril, were carried out; their structure and purity was proved, physico-chemical and chromatographic characteristics studied were used for the development of a complex methods of the analysis; critical quality attributes and stability were studied and established, correctness of choice for the dosage forms was justified by pharmacokinetic studies. Results obtained were implemented into technical and analytical documentation for manufactures and the State Pharmacopoeia of Ukraine; specifications for APIs samples as MT and Lysiniy and technological impurities were developed for certification of reference samples for quality control. Documentation for registration was prepared.

Performed by us scientific studies using our algorithm allowed us to create APIs: Lysiniy and MT and they dosage forms for injections, pharmacological effects of these APIs were higher than effects of structural analogues (tiotriazolin and cardiotril).

Keywords: analytical assurance, pharmaceutical development, standardization, critical quality attributes (CQA), «stress conditions», technological impurities, active pharmaceutical ingredients (APIs), 1,2,4-triazole derivatives.