

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
фармацевтичний факультет
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему: “АНАЛІТИЧНИЙ СУПРОВІД РОЗРОБКИ (СИНТЕЗУ)
НОВОГО АНАЛОГА ІМАТИНІБУ”

Виконала: здобувачка вищої освіти 5 курсу, групи Фс18 (5,0д)-03
Спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація, освітньої
програми “Фармація”

Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО

Керівник: завідувачка кафедри фармацевтичної хімії, д. фарм.
наук, професор, Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

Консультант: викладач фармацевтичної хімії та мас-
спектрометрії університету Корк (Ірландія) Флоренс МАККАРТІ

Рецензент: завідувачка кафедри медичної хімії, д. фарм. наук,
професор, Ліна ПЕРЕХОДА

Харків – 2023 рік

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі обґрунтовано підходи та розроблена методика для виявлення проміжного продукту синтезу нового АФІ, з інгібіторною активністю щодо ферменту групи кіназ та є аналогом Іматинібу. Досліджувану речовину з кодовою назвою LD-28.2 було синтезовано в якості стандартизованої домішки до головного АФІ. Методом УЕРХ-МС на хроматограмі було виявлено досліджувану речовину та деякі із супутніх домішок, що пов'язані із структурою головної домішки, присутність деяких із домішок вдалося обґрунтувати та передбачити їх причини утворення.

Загальний обсяг роботи 53 сторінки. Робота містить малюнків – 40, таблиць – 4, джерел літератури – 40, додатків – 1.

Ключові слова: АФІ; проміжний продукт; контроль якості; лікарський засіб; рідинна хроматографія.

ANNOTATION

In the qualification project the approaches and the developed technique for the detection of an intermediate product of the synthesis of a new API, with inhibitory activity against the enzyme of the kinase group and is an analogue of Imatinib, are substantiated. The investigated substance with the code name LD-28.2 was synthesized as a standardized admixture to the main API. Using the UPLC-MS method, the investigated substance and some of the accompanying impurities related to the structure of the main impurity, were detected on the chromatogram, the presence of some of the impurities was substantiated and the reasons for their formation could be predicted.

The total volume of work is 53. The work contains 40 pictures, 4 tables, 40 references, 1 applications.

Key words: API; intermediate product; quality control; drug; liquid chromatography.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5	
РОЗДІЛ I	ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО КІНАЗИ, ЇХ ІНГІБІТОРІВ. АНАЛІТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ НОВОГО АФІ НА КІНЦЕВОМУ ЕТАПІ СИНТЕЗУ З ІНГІБІТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ ЩОДО КІНАЗ МЕТОДОМ ВЕРХ-МС (Огляд літератури)	7
1.1	Кінази та їх інгібітори, роль у медицині	7
1.2	Іматиніб – сучасний хіміотерапевтичний засіб. Методи синтезу	11
1.3	Застосування хроматографічних методів для домішок та визначення АФІ	14
	Висновки до розділу I	19
РОЗДІЛ II	ОБ’ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ВІДОМОСТІ ПРО ПРИЛАДИ, ОБЛАДНАННЯ ТА РЕАКТИВИ	20
2.1	Об’єкт дослідження та технологія його синтезу	20
2.2	Методи дослідження та короткі відомості про прилади, обладнання та реактиви	23
	Висновки до розділу II	27
РОЗДІЛ III	ОЦІНКА ЧИСТОТИ ТА МОЖЛИВИХ ДОМІШОК СИНТЕЗОВАНОГО НАПІВПРОДУКТУ СИНТЕЗУ ПОТЕНЦІЙНОГО АФІ - АНАЛОГА ІМАТІНІБУ	28
3.1	Дослід з ВЕРХ-МС	28
3.2	Дослідження LD-28,2 за допомогою УЕРХ-МС	31
	Висновки до розділу III	52
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	53	
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54	
ДОДАТКИ.....	58	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АТФ – аденозинтрифосфат;

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

УЕРХ - ультра високоефективна рідинна хроматографія;

МС – мас-спектрометрія;

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат;

ТКІ – тирозинкіназний інгібітор;

ТК – тирозинкіназа;

ЛЗ – лікарський засіб;

ПЕГ – поліетиленгліколь;

ДМД – діодноматричний детектор.

ВСТУП

Актуальність теми. За даними ВООЗ близько десяти мільйонів людей щороку помирають від онкологічних захворювань. Частотою причиною розвитку злоякісних новоутворень є порушення регулювання та активності ферментів протеїнкіназ, які впливають на процес росту, руху та смерті клітин. У зв'язку з цим розробка нових та ефективних протипухлинних засобів є актуальним завданням. Протеїнкінази беруть участь у проліферації клітин, а це означає, що якщо це ракова клітина, то при цьому процесі їх кількість зростатиме. Відповідно докладне їх вивчення може відкрити шлях до вирішення проблеми з раком. На даний час відомо багато аналогів одного із перших представників даної групи Іматинібу. Проте час не стоїть на місці, та лікарські засоби, які були ефективними у минулому та здавалося б проривом у медицині для лікування важких захворювань, то з часом їх дія ослаблювалася. Такий результат можна пояснити прогресуванням захворювань та набуття стійкості до вже існуючих препаратів. Тому пошук та створення нових хіміотерапевтичних засобів з удосконаленими властивостями, які допоможуть у боротьбі з новими видами онкологічних захворювань є головною метою у медицині. На базі Ірландського національного університету в Корку було синтезовано нову речовину, що виявила високу інгібіторну активність щодо тирозинпротеїнкінази. Ця речовина була рекомендована для доклінічних досліджень. На цьому етапі для впевненості і стандартизації речовини, що рекомендується для доклінічних досліджень проводиться повний комплекс стандартизації синтезу та вимог до показників якості речовини.

Однією з найважливіших в контролі синтезу та контролі якості синтетичних АФІ є ідентифікація потенційних домішок синтезу та розробка методик для їх визначення.

Метою роботи була ідентифікація та визначення можливих супутніх домішок у проміжному продукту синтезу активного фармацевтичного

інгредієнта (АФІ), що відноситься до інгібіторів ферменту протеїнкінази та є аналогом вже існуючого препарату на фармацевтичному ринку Іматинібу.

Завдання дослідження. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Обґрунтувати можливість наявності домішок, виходячи із синтезу сполуки та використаних реактивів та передбачити їх структуру методом РХ-МС;
2. Підібрати умови для кількісного та якісного визначення досліджуваної речовини та інших супутніх домішок методом УЕРХ;
3. Обґрунтувати причини появи домішок за результатами отриманих мас-спектрів та спектрів діодно-матричного детектора.

Об'єкт дослідження – синтезована стандартизована домішка з кодовою назвою LD-28.2 та молярною масою 483 г/моль до нового АФІ, яка є проміжним продуктом синтезу нового АФІ для лікування ракових захворювань.

Предмет дослідження – розробка методики для виявлення та дослідження речовини з кодовою назвою LD-28.2 та в подальшому виявлення супутніх домішок.

Методи дослідження – фізико-хімічні методи аналізу, статистичний аналіз результатів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у можливості використати їх при розробці нового АФІ, з використання підходів та методик для контролю якості.

Структура та об'єм кваліфікаційної роботи. Робота складається з вступу, трьох розділів, загальних висновків та списку використаної літератури, який включає 40 джерел. Основний текст роботи розміщено на 53 сторінках та містить 4 таблиці, та 40 малюнків.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО КІНАЗИ, ЇХ ІНГІБІТОРИ, ІМАТИНІБ ТА МЕТОДИ ЙОГО СИНТЕЗУ, ХРОМАТОГРОФІЧНІ МЕТОДИ В АНАЛІТИЧНОМУ СУПРОВОДІ РОЗРОБКИ ПОТЕНЦІЙНИХ АФІ (Огляд літератури)

1.1 Кінази та їх інгібітори, роль у медицині

Як відомо, ферменти - це біологічні каталізатори реакцій у нашому організмі, вони мають білкове походження, можуть бути як однокомпонентними так і двоконпонентними, різниця між ними в їх структурі, прості одноконпонентні мають білкову структуру, тоді як другі складаються з білкової частини і небілковий (кофактор) [4].

Для нормального функціонування людського організму, тобто для підтримки його гомеостазу, у щоденному раціоні повинні бути присутніми білки, жири та вуглеводи. Білки займають друге місце після води за вмістом у клітині та становлять 10-20% її маси. Їх можна поділити на структурні та функціональні. Функціональні білки є комбінацією декількох глобулярних молекул. Більшість функціональних білків становлять клітинні ферменти [4, 10].

Для синтезу білків в організмі необхідна наявність амінокислот, що надходять з їжею, при вживанні білка, він проходить шлях через шлунково-кишковий тракт і розпадається на амінокислоти, які будуть використані надалі в біосинтезі білків, властиві організму людини. Хотілося б відзначити, що амінокислот, які необхідні для побудови білків у нашому організмі, всього 20, їх називають протеїногенними, інші амінокислоти є непротеїногенними, їх близько 80. Щоб отримати потрібний білок, наявність достатньої кількості амінокислот не є головною умовою, необхідний правильний порядок

амінокислот у побудові білка. Основною органелою в клітині є ядро, яке є матеріальним носієм відтворення спадкової інформації за допомогою нуклеїнових кислот, які кодують інформацію про порядок амінокислот у тому чи іншому білку, важливо сказати, що це двомембранна органела, сама природа зробила цю органелу більш захищеною від можливих ушкоджень. Інформація, що визначає особливості структури білків, закодована в ДНК і передається до ряду поколінь. Незважаючи на те, що ДНК добре захищена, все ж таки під впливом деяких факторів вона може бути пошкоджена, що стає причиною появи мутантних білків, а далі порушення подальших процесів. Цей принцип лежить у прогресуванні деяких ракових захворювань, пов'язаних з атиповою активністю деяких ферментів. Що стає умовою для пошуку лікарських засобів, які можуть блокувати неправильні ферменти [4, 10].

Кінази – це група ферментів, які беруть участь у перенесенні фосфатної групи, донором фосфатної групи виступає молекула АТФ, реакції фосфорилування. За допомогою цього ферменту відбувається регуляція багатьох внутрішньоклітинних процесів, такі як експресія генів, проліферація клітин, відбувається або активація, або дезактивація цих процесів. При проведенні аналізу геному людини передбачають наявність у людини 518 протеїнкіназ (розділених на 15 підродин). Протеїнкінази можна класифікувати на основі амінокислоти, яку вони фосфорилують у білках: серин, треонін або тирозин [7, 19].

Ці ферменти цікаві для медицини оскільки їм відведена роль прогресування ракових захворювань. Як було вже сказано, ці ферменти беруть участь у проліферації клітин, а це означає що якщо це ракова клітина, то при проліферації їх кількість зростатиме. Відповідно, докладне їх вивчення може відкрити шлях до вирішення проблеми з раком. Для прикладу варто навести структуру та механізм дії одного з різновидів кіназ – cAPK (рис.1) [7, 19, 24]:

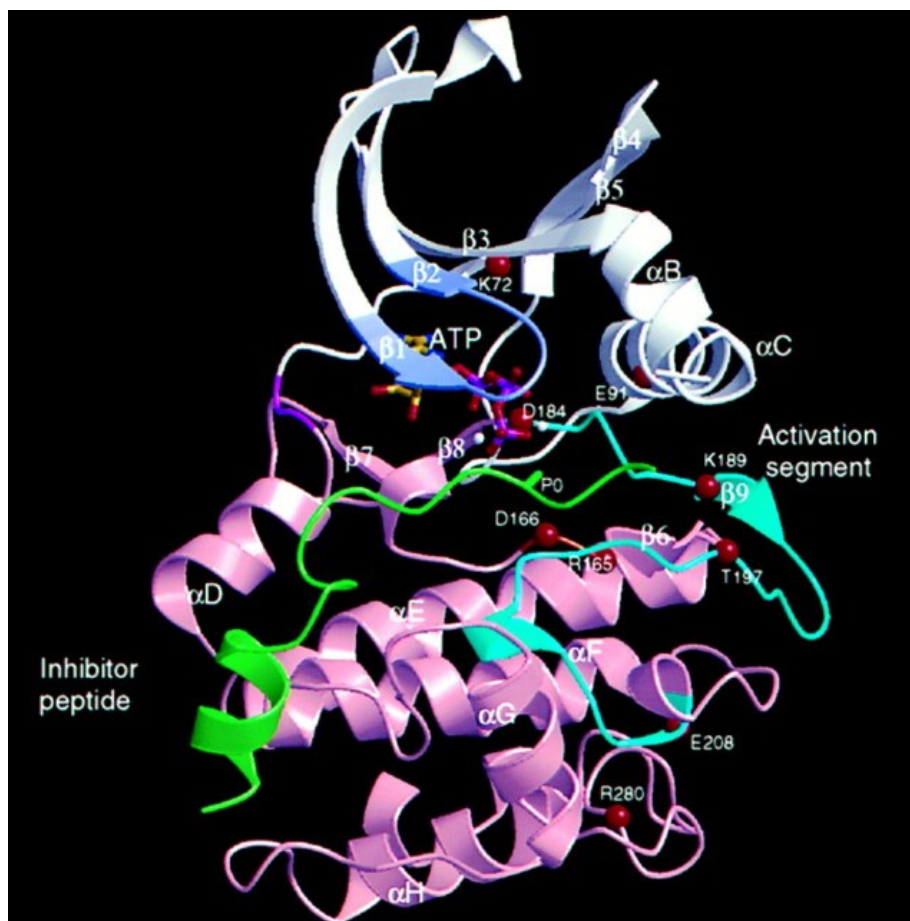


Рис. 1.1. Каталітичне ядро cAPK. [7].

cAPK – це фермент протеїнкіназа, в якому одна з його субодиниць пов'язує вторинний месенджер цАМФ (циклічний аденозинмонофосфат), циклічна аденозинмонофосфатзалежна протеїнкіназа. N-кінцева частка пофарбована в білий колір, а С-кінцева частка - у рожевий. Пептид-інгібітор показаний зеленим кольором, а положення серину, що є мішенню для фосфорилування, позначено як P0. Положення деяких залишків, важливих для зв'язування АТФ cAPK, показані червоними кружками на малюнку [7, 8].

Інгібітори кіназ – речовини, які блокують ферменти кінази. В нашому організмі багато різних кіназ, і вони виконують різноманітні функції, такі як метаболізм, поділ і виживання. Деякі кінази мають підвищену атипову активність в деяких типах ракових клітин, шляхом їх блокування можна запобігти росту ракових клітин. Інгібітори кінази можуть блокувати ріст нових

кровоносних судин, які є необхідною умовою для росту та метастазування пухлин. Деякі із інгібіторів використовуються для лікування раку [23].

Механізм дії інгібіторів тирозинкінази представлено на рис.2:

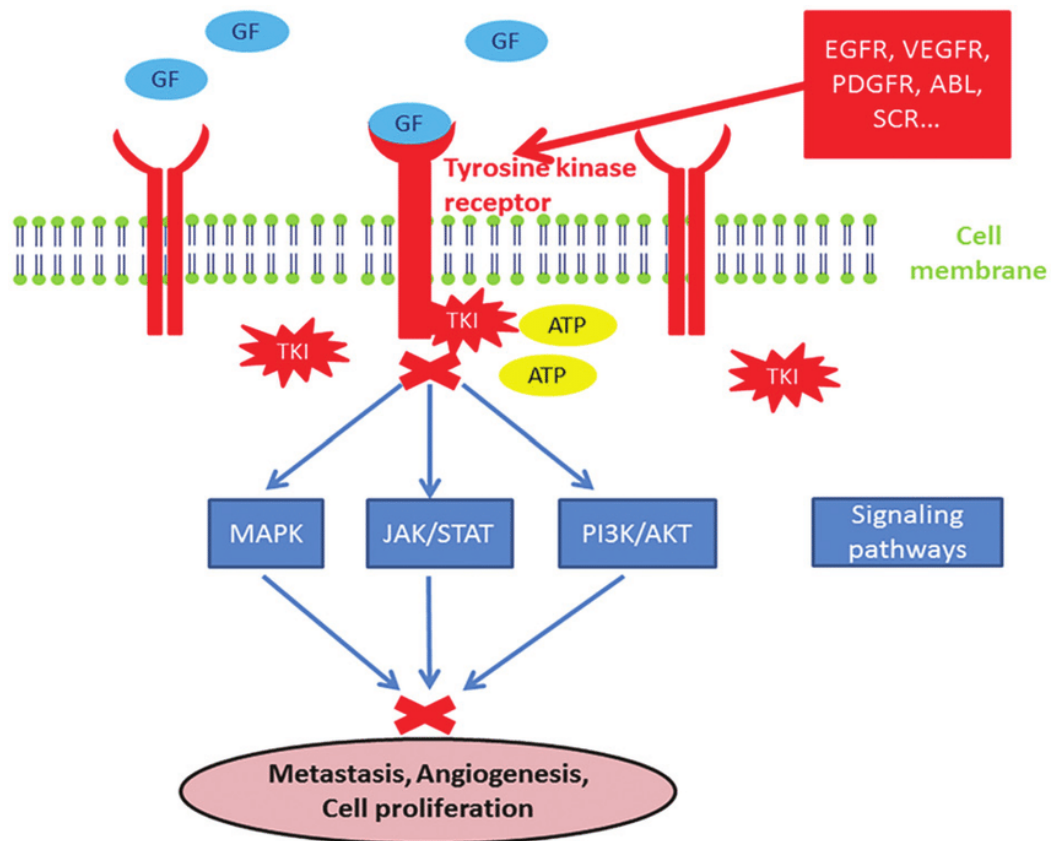


Рис.1.2. Схематичне зображення механізму дії інгібіторів тирозинкінази [21]

GF: фактор росту; EGFR: рецептор ендотеліального фактора росту; VEGFR: рецептор фактора зростання ендотелію судин; PDGFR: рецептор тромбоцитарного фактора зростання; ABL: сімейство тирозинкіназ Абельсона; SCR: сімейство тирозинкіназ SCR; АТФ: аденозинтрифосфат; MAPK: мітоген-активовані протеїнкінази; JAK/STAT: Янус-кінази/перетворювач сигналу та активація білків транскрипції та PI3K/AKT: фосфоінозитид-3-кіназа/протеїнкіназа В [21, 22].

Виходячи зі схеми, при активації тирозинкіназного рецептору молекулою АТФ, а далі через систему вторинних месенджерів відбуваються

процеси проліферації, ангіогенезу та метастазування. При приєднанні до рецептору ТКІ шляхом конкурентного інгібування, відбувається порушення процесу фосфорилування та переривання подальших процесів у клітині [21, 22].

1.2. Іматиніб – перший інгібітор кіназ в медичній практиці.

Першим інгібітором одного із видів кіназ, схваленим для використання у Сполучених Штатах, був Іматиніб (Gleevec: 2001) - 4-(4-метил-піперазин-1-ілметил)-N-(4-метил-3-4-(3-піридиніл)піримідин-2-іламінобензамід. Це інгібітор тирозинкінази, який використовується для лікування хронічного лімфоцитарного лейкозу з позитивною філадельфійською хромосомою, який має мутований кіназний рецептор (BCR-B). Іматиніб – препарат, який селективно блокує один із видів протеїнкіназ, а саме протеїнтирозинкіназу, невелика молекула аналогу АТФ. За механізмом дії відбувається конкурентне інгібування рецептору, але свою активність препарат проявляє лише до неактивних рецепторів ТК, тобто які не піддалися реакції фосфорилування. Що знижує його ефективність та є одним з недоліків цього препарату. Він був одним із перших протипухлинних лікарських засобів [9, 20].

Структура Іматинібу включає три гетероцикли - піперазиновий, піридиновий, піримідиновий. Існує два шляхи синтезу у фармацевтичній промисловості. Хотілося б навести два шляхи утворення цієї сполуки. Перший спосіб використовували у промисловості, але через його недоліки велися пошуки нового шляху синтезу даної речовини. За способом 1 (рис.3) синтез сполуки відбувається. За способом 1 (рис.3) синтез сполуки відбувається з використанням 2-метил-5-нітро-феніламін (I), як вихідної сполуки, додаючи ціанамід (II) для утворення 2-метил-5-нітро-феніламін гуанідинаміну (III) потім проведення циклізації 3-диметиламіно-1-(3-піридиніл)-2-пропілен-1-кетон (V), утворений з піридин-3-метилкетону (IV), подальшого відновлення

продукту циклізації з нітрогрупою (VI) до аміно (VII), та на останній стадії відбувається конденсація з п-хлорметилбензоїлом хлориду та N-метилпіперазину (VIII) з утворенням Іматинібу (IX). [22].

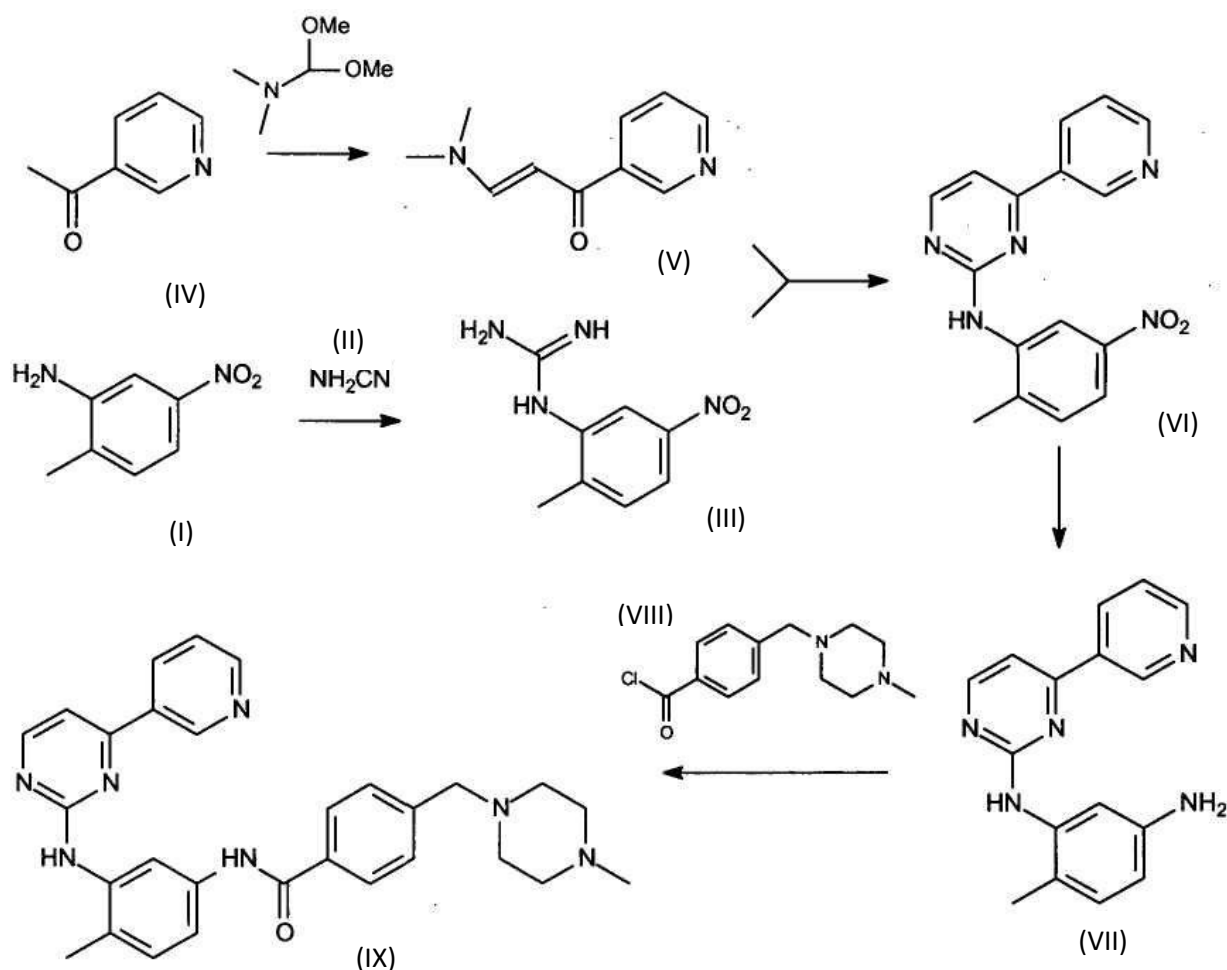


Рис.1.3. Схема промислового синтезу Іматинібу (спосіб 1).

Спосіб 2 отримання Іматинібу (рис.4) починається з 4-метил-3-нітрофеніламіну (I), шляхом послідовного проведення конденсації з п-хлорметилбензоїлхлоридом і N-метил-піперазину з утворенням продукту циклізації з нітрогрупою (II), потім відновлення нітрогрупи до аміногрупи (III), та подальшої взаємодії з ціанамідом та отриманням гуанідину (IV) з подальшою циклізацією з 3-диметиламіно-1-(3-піридиніл)-2-пропілен-1-кетон (V), який був утворений з піридин-3-метилкетону (VI). Та як продукт циклізації є Іматиніб (VII) [22]:

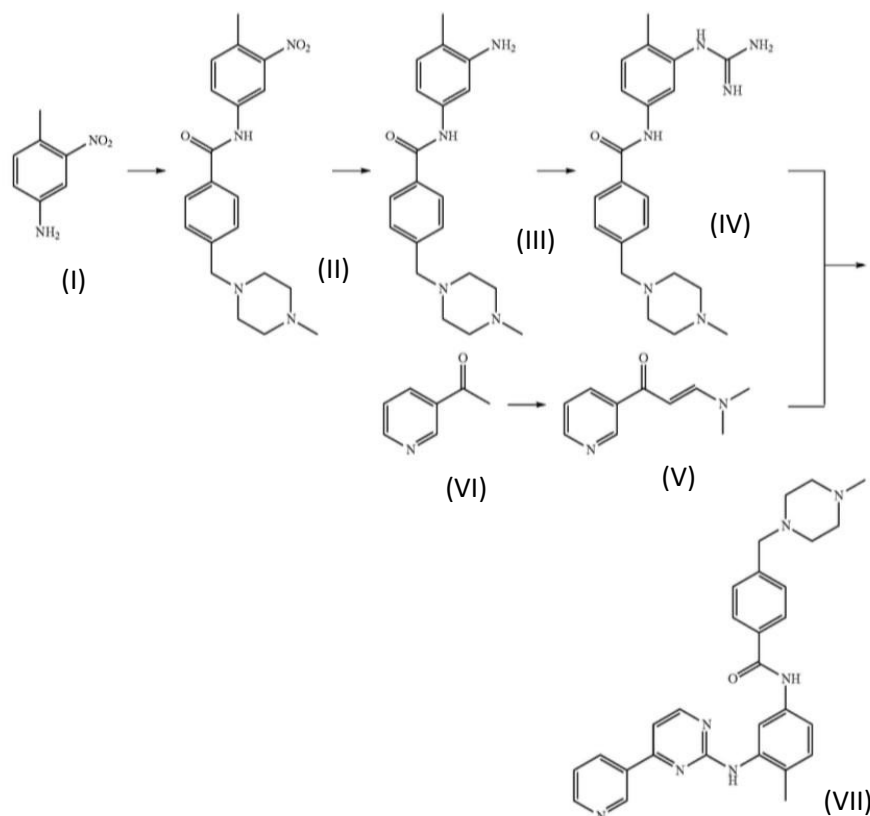


Рис. 1.4. Схема промислового синтезу Іматинібу (спосіб 2).

Але синтез цими двома шляхами має свої недоліки, отриманий гуанідин є нестабільним та летючим, а стадія утворення піримідинового кільця характеризується низьким виходом. Ці факти обумовлюють недостатній вихід цільового продукту та високі витрати у плані вихідних речовин, що в економічному плані є невигідним. Тому для вирішення цих недоліків розглядають новий метод (Рис. 1.5), щоб в майбутньому перевести його на промисловий масштаб [22, 40]. Запропоновано сучасний підхід до синтезу: реакція поєднання C-N 4-(4-метилпіперазин-1-метил)-бензаміду (II), з N-(5-бром-2-толіл)-4-(3-піридил)піримідином-2-амін (I), у середовищі органічного розчинника 1,2-Диметилетилендіамін з допоміжними реагентами K_2CO_3 , CuI , та толуолу, з подальшим утворенням 4-(4-метилпіперазин-1-илметил)-N-[4-метил-3-[4-(3-піридиніл)-піримідин-2-иламіно]-бензамід (III). Загальний вихід іматинібу становив 51,3%, а чистота - 99,9%. Цей простий та ефективний шлях

синтезу дозволяє уникнути виробництва генних домішок, такий шлях синтезу є екологічно безпечним з коротким часом реакції. [22, 40]:

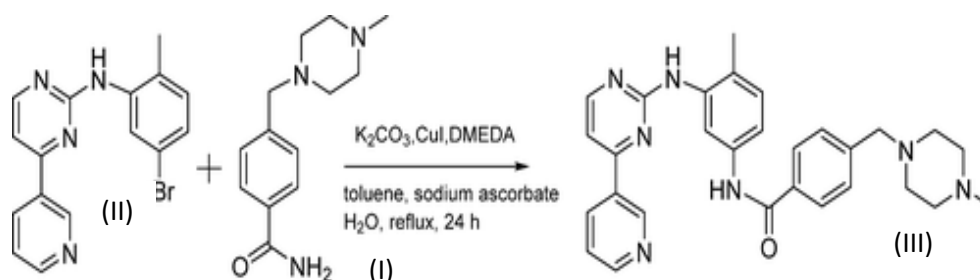


Рис. 1.5. Новий метод синтезу іматинібу.

Варто зазначити що лікарський засіб був ефективний на початку лікування захворювання, але фермент кіназа має тенденцію до мутації, що робить препарат неефективним, до того ж він діє лише на неактивні рецептори ТК. Одним із побічних ефектів даної групи препаратів є гіпотиреоз, тому необхідно проводити моніторинг гормонів щитоподібної залози при лікуванні цими препаратами. [18, 19, 21]. Ці факти створюють передумови для пошуку структурних аналогів Іматинібу з покращеними властивостями. Природно, що такий пошук активно проводиться серед аналогів Іматинібу.

1.3 Застосування хроматографічних методів в аналітичному супроводі розробки нових АФІ

Важливо проводити аналітичний контроль нового АФІ на всіх етапах його розробки, задля того, щоб отримати очищену діючу речовину потрібно прикласти багато зусиль, переконатися у правильності синтезованої речовини, шляхом встановлення її структури та відсутності домішок. У цьому допомагають хроматографічні методи аналізу.

Найкращим методом для вирішення проблем під час синтезу нових АФІ та перевірку на якість вже існуючих ЛЗ є метод рідинної хроматографії з

використанням мас детектору, перевагою цього детектора є його висока чутливість у фентаграмах (10 в мінус 15). На сьогодні цей метод аналізу є передовим у різних галузях, таких як фармацевтика, біотехнології, нафтова та харчовій промисловостях. Метою методу є поділ і виявлення кожного з компонентів суміші, включаючи домішки в пробі, а також їх кількість. ВЕРХ-МС – цей метод є швидким, високочутливим, економним у плані витрати розчинника та проби. ВЕРХ – один із методів рідинної хроматографії, в якій рухомою фазою є рідина, з використанням колонки, яка заповнена сорбентом (нерухома фаза). Залежно від фізико-хімічних властивостей зразка (аналіту), розчинника (рухомої фази) та нерухомої фази залежить час утримання вмісту речовин у пробі зразка у мікрочастинках нерухомої фази. Спорідненість компонентів між несучою та нерухомою фазами лежить в основі поділу. Речовини, які сильніше взаємодіють з нерухомою фазою, залишаються на колонці довше ніж речовини, які не сильно взаємодіють з нерухомою фазою, що називається часом утримуванням, чим довше речовини на колонці, тим довше час утримування і навпаки [1, 2, 25].

Мас-спектрометрія (МС) – це метод аналітичного визначення (детектування) речовини в пробі після його попереднього поділу в колонці. Вибір відповідного детектора та довжин хвиль моніторингу має важливе значення для чутливості виявлення ВЕРХ. Для того, щоб детектувати речовину, вона повинна іонізуватися на заряджені іони, процес іонізації перетворює нейтральні молекули в заряджені іони, які потім спрямовуються в мас-аналізатор. Мас-аналізатор розділяє іони на основі співвідношення їх маси до заряду (m/z), а отримані мас-спектри надають інформацію про молекулярну масу та структуру аналітів [3, 26, 27].

При вивченні мас-спектрометрії важливо завжди пам'ятати, що одиницею, яка вимірюється мас-спектрометром, є відношення маси іона до заряду, а не маса іона. Оскільки діапазон відношення m/z великий, це дає можливість визначати речовини з великим значенням Молекулярної маси,

наприклад білки і пептиди. За допомогою МС можливо визначити як цілісну молекулу так і її фрагменти, а також окремі атоми та їх ізотопи. МС забезпечує гнучкість одночасного багатокомпонентного аналізу, підвищену продуктивність та ефективність аналізу ВЕРХ [14, 15].

Вивчення метаболічних перетворень ліків є важливою частиною їх розробки. Так як біотрансформація може призвести до небажаних наслідків, швидке виведення ліків з організму, зі зниженням або відсутністю фармакологічного ефекту, утворення активних метаболітів, що може посилити і пролонгувати дію препарату на організм, міжлікарські взаємодії, так як деякі препарати метаболізуються одним і тим же ферментом, і якщо цього не враховувати, то можлива токсична дія одного із препаратів. Інформація, щодо визначення метаболічної долі лікарського засобу включає виявлення метаболітів, характеристику структури і кількісний аналіз [16].

Методом ВЕРХ можна діагностувати захворювання білкового та амінокислотного обміну, спричинені порушенням синтезу певних амінокислот через дефіцит конкретного ферменту (ферментопатія), що є наслідком таких захворювань як алкоптонурия, фенілкетонурия, альбінізм та хвороба кленового сиропу. У сечі та крові підвищується рівень токсичних речовин, які утворилися при незакінчених перетвореннях амінокислот, тобто напівпродукти реакції, які є причиною цих захворювань. Кількісне визначення біогенних амінів у клінічній хімії використовується для діагностики нейроендокринних пухлин, таких як феохромоцитома та карциноїди. Серотонін тромбоцитів вимірюється виявленням карциноїдних пухлин, секретуючих мало серотоніну [4, 16, 28].

ВЕРХ використовується для визначення чистоти та концентрації інгібіторів кінази. Для цієї мети зазвичай використовується обернено-фазова ВЕРХ, оскільки вона дозволяє розділяти інгібітори кінази на основі їх гідрофобності. Кількісне визначення може бути досягнуто шляхом поєднання

ВЕРХ з мас-спектрометрією (МС) для забезпечення вищої чутливості та селективності [32, 33].

Рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (РХ-МС) зазнала величезних технологічних удосконалень, що дозволило застосовувати її до ендogenous компонентів, таких як білки, пептиди, вуглеводи, ДНК та ліки або метаболіти. Поєднання ВЕРХ з МС забезпечує ефективне розділення та високочутливе виявлення аналітів, що робить його цінним інструментом для аналізу складних сумішей, таких як фармацевтичні препарати. Техніка ВЕРХ-МС пропонує кілька переваг перед автономними методами ВЕРХ або МС, включаючи підвищену селективність, чутливість і специфічність, а також здатність ідентифікувати та кількісно визначити широкий спектр сполук. Крім того, ВЕРХ-МС можна використовувати для аналізу як відомих, так і невідомих сполук, що робить його універсальним методом для характеристики та кількісного визначення АФІ та їхніх домішок [5, 29, 30].

РХ-МС має перевагу над ГХ-МС, оскільки при РХ-МС можливе визначення високомолекулярних сполук, коли як друга підходить тільки для речовин з молекулярною масою до 500 (низькомолекулярні сполуки). Що дозволяє проводити дослідження у різних галузях медицини – ендокринологія, токсикологія, онкологія, генетика [5, 29, 30, 31].

Зразки досліджуваного АФІ можуть містити не тільки саму головну речовину, але й один або кілька різних типів інших компонентів, які називаються домішками. Профіль домішок – це опис ідентифікованих та неідентифікованих домішок, присутніх у новій лікарській речовині. Це означає домішки, які ми очікуємо побачити, присутність яких ми передбачали, а неідентифіковані – це ті домішки, які ми не очікували побачити. При синтезі нового препарату, або при виготовленні вже існуючого на ринку, необхідною умовою є перевірка його на чистоту, тобто необхідно переконатися, що в ньому відсутні домішки, які перевищують норму, а також можуть бути токсичними для здоров'я людини. Домішки можуть впливати на ефективність

лікарського засобу, надаючи антагонізм або синергізм щодо препарату. Причини появи цих небажаних речовин у препаратах різні, це можуть бути вихідні чи проміжні речовини у процесі синтезу лікарського засобу, реагенти, розчинники. Продукти розпаду: ці домішки утворюються під час зберігання або введення препарату внаслідок хімічного або фізичного розкладання, такого як гідроліз, окислення або фотодеградація [5, 6, 29].

Якщо ми очікуємо побачити домішки в АФІ або лікарській речовині, їх необхідно ідентифікувати за допомогою аналітичних методів, ця процедура відома як визначення профілю домішок. Аналітичний моніторинг домішок є обов'язковою умовою та обов'язковою вимогою для затвердження дозволу на продаж нової фармацевтичної субстанції. Для виявлення домішок часто використовують різні методи фізико-хімічного аналізу, тонкошарова хроматографія, високоефективна хроматографія рідини або газової хроматографії [17].

Надефективна рідинна хроматографія (УЕРХ) — це вдосконалена форма ВЕРХ, у якій використовуються частинки меншого розміру (зазвичай <2 мкм) у стаціонарній фазі, що забезпечує вищу роздільну здатність, чутливість і швидкість аналізу. Основні переваги УЕРХ перед звичайною ВЕРХ включають [34]:

- Покращена ефективність розділення: менший розмір частинок у колонках УЕРХ дозволяє краще розділяти тісно пов'язані сполуки та домішки [35];
- Швидший аналіз: використання менших частинок і більш високого тиску в системах УЕРХ призводить до скорочення часу аналізу порівняно зі звичайною ВЕРХ [36];
- Підвищена чутливість: завдяки підвищеній роздільній здатності та ефективності UPLC він пропонує вищу чутливість у виявленні аналітів з низьким вмістом, що робить його ідеальним для аналізу слідів [37];

- Зменшене споживання розчинника: коротший час аналізу та менші об'єми колонки в UPLC призводять до зменшення споживання розчинника, що зменшує вартість аналізу та вплив на навколишнє середовище [38].

Висновки до розділу 1

1. Таким чином, ВЕРХ-МС є потужною та універсальною аналітичною технікою для аналізу фармацевтичних препаратів, що забезпечує високу чутливість, вибірковість і специфічність. Завдяки поєднанню роздільних можливостей ВЕРХ із можливостями ідентифікації та кількісного визначення МС, ВЕРХ-МС забезпечує комплексний підхід до характеристики та кількісного визначення АФІ та їхніх домішок у складних сумішах.
2. УЕРХ особливо корисний для аналізу інгібіторів кінази завдяки своїй здатності забезпечувати розділення та виявлення складних сумішей з високою роздільною здатністю, що дозволяє ідентифікувати та кількісно визначити АФІ, домішки та продукти розпаду з більшою ефективністю та швидкістю порівняно зі звичайною ВЕРХ.

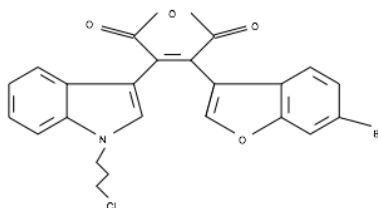
РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ВІДОМОСТІ ПРО ПРИЛАДИ, ОБЛАДНАННЯ ТА РЕАКТИВИ

2.1 Об'єкт дослідження та технологія його виробництва

Кінцева мета наукової розробки, що проводиться науковцями Ірландського національного університету в Корку, полягає у створенні лікарського засобу нового покоління, що може стати проривом у хіміотерапії з удосконаленими властивостями щодо інгібування ферменту протеїнкінази. Для того щоб отримати очікувану речовину з заданим якісним та кількісним складом та забезпечити її максимальний вихід необхідно контролювати вихід кожного проміжного продукту синтезу АФІ. Насамперед потрібно удосконалитися, що при кожній стадії синтезу ми отримуємо речовини, які відповідають реакціям синтезу, а також виявити інші домішки, та встановити можливі причини їх появи. З цією метою, в дослідницькому центрі аналітичної та біологічної хімії на базі Ірландського національного університету в Корку було синтезовано ряд стандартизованих домішок, що можуть забруднювати кінцевий продукт та завдавати вплив на фармакологічну активність та токсичність.

Основним об'єктом нашого дослідження стала синтезована стандартизована домішка до нового АФІ з кодовою назвою LD-28.2 (2.1) та молярною масою 483 г/моль. Домішка яка є проміжним продуктом синтезу нового АФІ для лікування ракових захворювань та відноситься до класу бензофураніліндолілмалеїнових ангідридів.



2.1. LD-28.2

Її синтез здійснено відповідно до рис. 2.1. Як вихідні речовини для синтезу ми використали індол-3-оксоацетил хлорид (2.2) та метиловий ефір 6-бромбензофуран-3-оцтової кислоти (2.3) з додаванням допоміжної речовини KOtBu, що призводить до утворення оцтового похідного бензофураніліндолілмалеїнового ангідриду (2.4), що під впливом соляної кислоти у водному середовищі утворюється сполука, що відноситься до бензофураніліндолілмалеїмідів (2.5) та з подальшою взаємодією з аміаком, що призводить до зміни у лактонному кільці на угруповання NH (2.6). Також побічним продуктом синтезу можна вважати речовину що утворюється на стадії заміщення оцтового похідного бензофураніліндолілмалеїнового ангідриду (2.4) на хлорпропільний замісник (2.1)

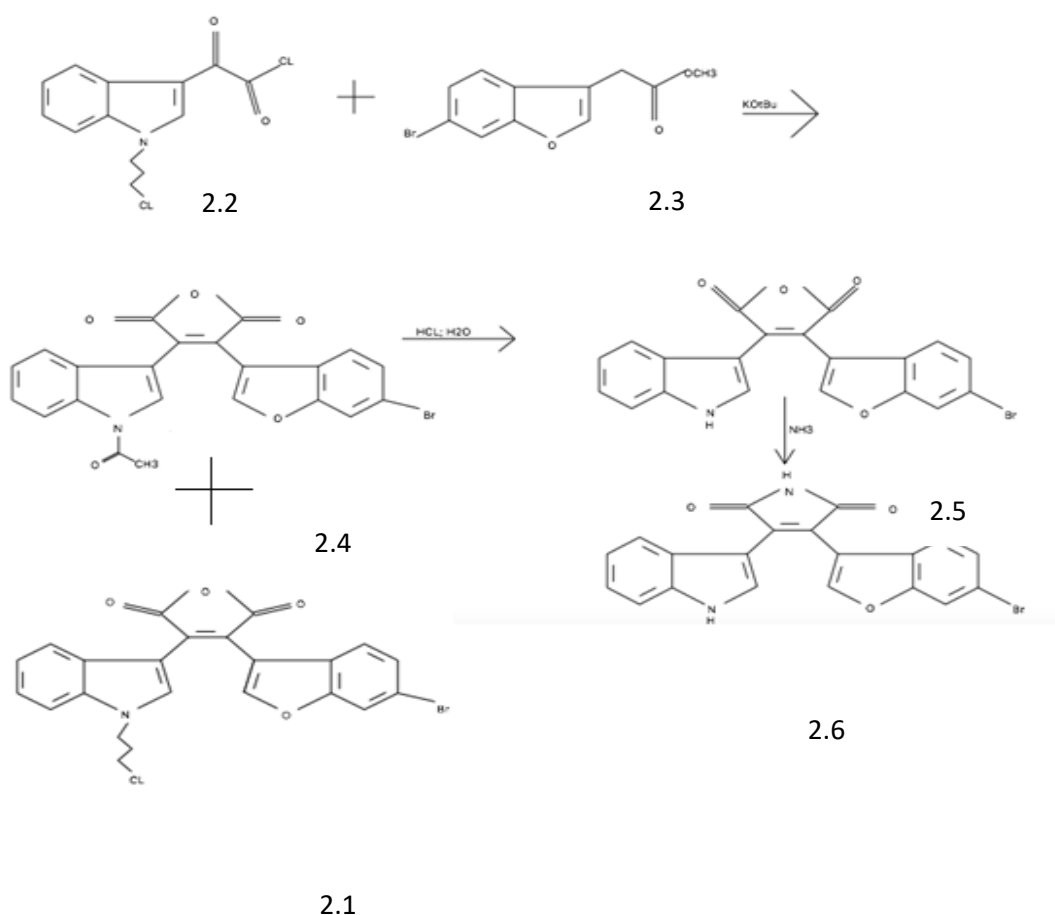


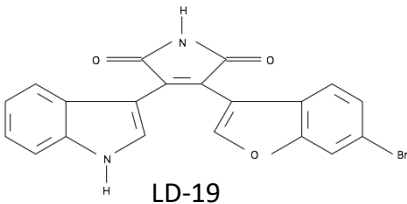
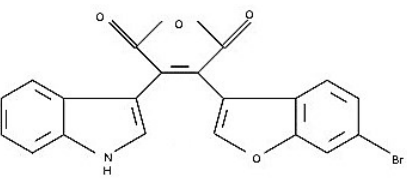
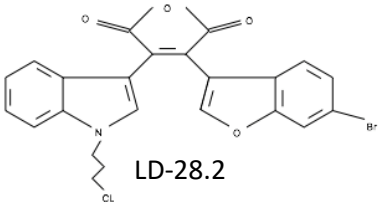
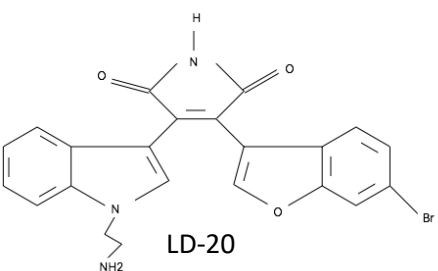
Рис. 2.2. Схема синтезу бензофураніліндолілмалеїнового ангідриду (2.1) та перспективного АФІ (2.6)

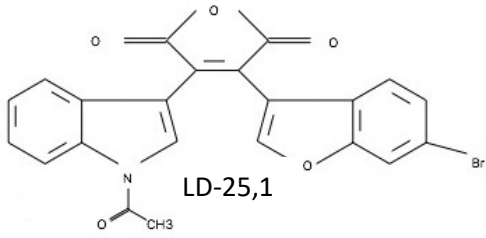
Після очищення ця речовина являє собою порошок червоного кольору. Зі схеми синтезу видно, що потенційна домішка LD-28.2 в свою чергу також може бути забрудненою напівпродуктом LD-25,1 (3), а також можливий перебіг побічних реакцій з утворенням LD-20 (2), а також LD-19 (1). Тому для проведення досліджень також було виділено домішку LD-25,1 (3).

Таким чином при виконанні експериментальної частини магістерської роботи досліджувались речовини. Наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Об'єкти дослідження

№	Шифр	Структурна формула	Брутто-формула	М.м
1		 LD-19	АФІ $C_{20}H_{11}O_3N_2Br$	406
	2.5		Напівпродукт $C_{20}H_{10}O_4NBr$	407
2	2.1	 LD-28.2	Побічний $C_{23}H_{15}O_4NClBr$	483
3		 LD-20	Побічний $C_{22}H_{16}O_3N_3Br$	449

4	2.4	 <p style="text-align: center;">LD-25,1</p>	Напівпродукт $C_{22}H_{12}O_5NBr$	449
---	-----	--	--------------------------------------	-----

2.2 Методи дослідження та короткі відомості про прилади, обладнання та реактиви

Експериментальна частина роботи виконана на базі дослідницького центру аналітичної та біологічної хімії, школа хімії національного університету в Корку. Всі прилади лабораторії атестовані в повному обсязі та мають відповідні свідоцтва про перевірку.

Для проведення дослідження використовували мірний посуд класу А (першого класу) фірми «Simax». Розчини для аналізу використовували свіжоприготовленими або застосовували протягом терміну придатності, що зазначений у відповідній НД. Виготовлення робочих розчинів проводили відповідно до методик, наведених у монографії ЄФ «Реактиви» [39].

Під час проведення експериментальної частини досліджень були використані сучасні фізичні, фізико-хімічні методи аналізу, статистична обробка результатів хімічного експерименту.

Для методу ВЕРХ-МС використовували рідинний хроматограф Waters Alliance 2695 (США) із УФ-детектором із фотодіодною матрицею Waters 2996 PDA та мас-детектором Waters quattro micro API mass spectrometer, хроматографічна колонка XBridge BEH C18 Column, 130Å, 5 μm, 4.6 mm x 150 mm.

Параметри аналізу:

Для підтвердження будови та чистоти готували розчин приблизно 1 мг/мл в розчині ацетонітрилу.

Свіжоприготовлену пробу ми помістили до автосамплеру, через комп'ютерне програмне забезпечення було задано параметри для аналізу. Для наочності роботи самого приладу ми ввели пробу без застосування колонки.

Рухома фаза - ацетонітрил 99,9% для ВЕРХ з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1% (А); вода для хроматографії з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1% (В). Це стандартно? Так як другий детектор ми використовували мас-детектор, то з метою протонного обміну додали мурашину кислоту. Дані розчини для аналізу стандартно використовуються в цьому навчальному закладі для речовин такої хімічної структури.

Experiment Report

MassLynx 4.1

Page 1 of 1

File:

c:\masslynx\backup\maryna.pro\acq\db\esposnegstandard_2min.hiv.exp

Printed:

Friday, December 02, 2022 10:53:09 Eastern Standard Time

Name

Default Experiment

Creation Time

Tue 22 Nov 2022 10:40:30

Instrument Identifier

Version Number

1.0

Duration (min)

2.0

Calibration Filename

C:\MassLynx\Default\pro\Acq\db\20060105 2.cal

Solvent Delay Divert Valve Enabled

0

Number Of Functions

2

Function 1 : MS Scan, Time 0.00 to 2.00, Mass 50.00 to 1200.00 ES+

Type

MS Scan

Ion Mode

ES+

Data Format

Centroid

Start Mass

50.0

End Mass

1200.0

Scan Time (sec)

0.95

InterScan Time (sec)

0.05

Start Time (min)

0.0

End Time (min)

2.0

Function 2 : MS Scan, Time 0.00 to 2.00, Mass 50.00 to 1200.00 ES-

Type

MS Scan

Ion Mode

ES-

Data Format

Centroid

Start Mass

50.0

End Mass

1200.0

Scan Time (sec)

0.95

InterScan Time (sec)

0.05

Start Time (min)

0.0

End Time (min)

2.0

Method File:

C:\MassLynx\Backup\Maryna.PRO\Acq\db\ESatan

Last Modified:

Friday, October 07, 2022 14:06:10 Eastern

Printed:

Friday, December 02, 2022 10:54:52 Eastern

Waters Alliance 2695 HPLC Pump Initial Conditions

Solvents

A%

100.0

Solvent A

B%

0.0

Solvent B

C%

0.0

Solvent C

D%

0.0

Solvent D

Degasser

Normal

Stroke Volume

130.0 µl

Final Flow Settings not being held at End of Run

Flow Ramp

2.00

Flow (ml/min)

0.300

Stop Time (mins)

2.0

Column Temperature (°C)

20.0

Column Temperature Limit (°C)

20.0

Min Pressure (Bar)

0.0

Max Pressure (Bar)

300.0

Pre-column Volume (µl)

0.00

Column Position

Column 1

Pre-column Volume (µl)

0.00

Waters Alliance 2695 HPLC Pump Gradient Timetable

No Entries in the gradient Timetable.

Waters Alliance 2695 HPLC Pump External Event Timetable

No Entries in the Pump External Event Timetable.

Waters Alliance 2695 Autosampler Initial Conditions

Draw Speed

Normal

Needle Depth (mm)

0.00

Sample Temperature (°C)

20.0

Sample Temperature Limit (°C)

20.0

Purge Loop Volumes

0.00

Waters996 PDA

Start Wavelength (nm)

210.00

End Wavelength (nm)

400.00

Resolution (nm)

1.2

Sampling Rate (spectra/s)

1.000

Filter Response

1

Exposure Time (ms)

Automatic

Interpolate 656

Yes

Acquisition stop time (mins)

2.00

Save to disk:

Yes

Waters996 PDA Analog Channel 1

Output Mode

Off

Waters996 PDA Analog Channel 2

Output Mode

Off

End Of Report

Рис. 2.3. Параметри ВЕРХ-аналізу

Параметри аналізу з колонкою:

Використана хроматографічна колонка XBridge BEH C18 Column, 130Å, 5 μm, 4.6 mm x 150 mm.

рухома фаза – розчин ацетонітрилу 99,9% з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1%; вода для хроматографії з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1%;

швидкість рухомої фази – 0.3 мл/хв;

довжина хвилі детектування – 210-400 нм;

об'єм інжекції – 130 мкл;

температура колонки – 20 °C;

градієнтний режим елюювання. Наведено в таблиці 2.2

Таблиця 2.2

Градiєнтний режим елюювання

№	Час (хв)	А (%)	В (%)	Швидкість потоку (мл/хв)	Крива
1	0,00	95,0	5,0	0,600	1
2	1,00	95,0	5,0	0,600	6
3	5,00	5,0	95,0	0,600	6
4	9,00	5,0	95,0	0,600	6
5	9,50	95,0	5,0	0,600	6
6	10,00	95,0	5,0	0,600	6

час хроматографування – 10 хв.

Діапазон мас при виявленні сполуки методом мас-спектрометрії – 50-1200 m/z;

час сканування при електроспрею іонізації з позитивним зарядом – 0.95 сек,

час інтерскану – 0.05 сек;

електроспрею іонізації з негативним зарядом – 0.95 сек,

час інтерскану – 0.05 сек.

Для методу УЕРХ-МС також використовували обладнання компанії Waters (США), а саме рідинний хроматограф ACQUITY UPLC I-Class PLUS System із УФ-детектором із фотодіодною матрицею The ACQUITY UPLC Photodiode Array (PDA) та мас-детектором «The Vion IMS QToF Mass Spectrometer from Waters», хроматографічна колонка ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm.

Параметри хроматографування:

хроматографічна колонка ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm;

рухома фаза – розчин ацетонітрилу 99,9% з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1% (А); вода для хроматографії з додаванням розчину мурашиної кислоти 0,1% (Б);

швидкість рухомої фази – 0,6 мл/хв;

довжина хвиль детектування – 210-400 нм;

об'єм інжекції – 10 мкл;

температура колонки – 20 °С;

градієнтний режим елюювання. Наведено в таблиці 2.3

Таблиця 2.3

Градiєнтний режим елюювання

№	Час	Швидкість Потоку (мл/хв)	А (%)	В (%)	Крива
1	0,00	0,600	90,0	10,0	1
2	10,00	0,600	10,0	90,0	6
3	12,00	0,600	10,0	90,0	6
4	12,20	0,600	90,0	10,0	6
5	14,00	0,600	90,0	10,0	6

час хроматографування – 14 хв.

Діапазон мас при виявленні сполуки методом мас-спектрометрії – 50-1000 m/z.

Висновки до розділу II

1. Обрано об'єкт дослідження – стандартизовану домішку з кодовою назвою «LD-28,2», що представляє собою проміжний продукт синтезу нового АФІ, який може стати лікарським засобом нового покоління для лікування ракових захворювань, надано його структурну формулу та технологію синтезу, а також наведені структурні формули інших стандартизованих домішок, які є результатами синтезу.
2. Охарактеризовано методи, обладнання та прилади, що використовувалися при проведенні дослідження.

РОЗДІЛ 3

ОЦІНКА ЧИСТОТИ ТА МОЖЛИВИХ ДОМІШОК СИНТЕЗОВАНОГО НАПІВПРОДУКТУ СИНТЕЗУ ПОТЕНЦІЙНОГО АФІ - АНАЛОГА ІМАТІНІБУ

Під час синтезу нового АФІ необхідно проводити аналітичний контроль на всіх етапах синтезу, для того щоб бути певними в чистоті та безпеці нової речовини, та відсутності токсичності майбутнього лікарського засобу. У вирішенні такого завдання допомагають фізико-хімічні методи, одним із яких є ВЕРХ-МС та його удосконалена версія УЕРХ. На сьогодні цей метод аналізу є передовим у різних галузях, таких як фармацевтика, біотехнології, нафтова та харчовій промисловостях. Він відзначається своєю ефективністю, точністю та є швидким відносно інших методів аналізу.

3.1 Дослід з ВЕРХ-МС

Першим етапом для проведення аналізу методом рідинної хроматографії була здійснена пробопідготовка досліджуваної речовини. Для цього важливим було підібрати розчинник. Оскільки синтез домішок, їх виділення та очистка є досить вартісним процесом, слід було розподілити наявну кількість речовини для необхідних досліджень. Розчин ацетонітрилу – 1мг/мл є універсальним розчинником для проби, тому в ході аналізу ми використовували саме цей розчин (рис.3.1). Для відбору зразка ми використовували шпатель потім помістили речовину у віалу та для відбору розчинника ми використали піпетку для точного дозування. Кількість речовини для аналізу було взято мінімально (скільки можливо побачити людським оком), з урахуванням того що загальна кількість цієї синтезованої стандартизованої домішки незначна та розчинили її у 2 мл розчину ацетонітрилу. Синтез цієї сполуки вимагає багато коштів та часу, тому для подальших випробувань та детального вивчення даної

речовини необхідно витратити мінімальну кількість для проведення досліджень. До того ж, метод ВЕРХ-МС та його удосконалена версія УЕРХ-МС відзначаються високою чутливістю, що дає можливість економно витратити матеріал для проведення фармацевтичного аналізу.

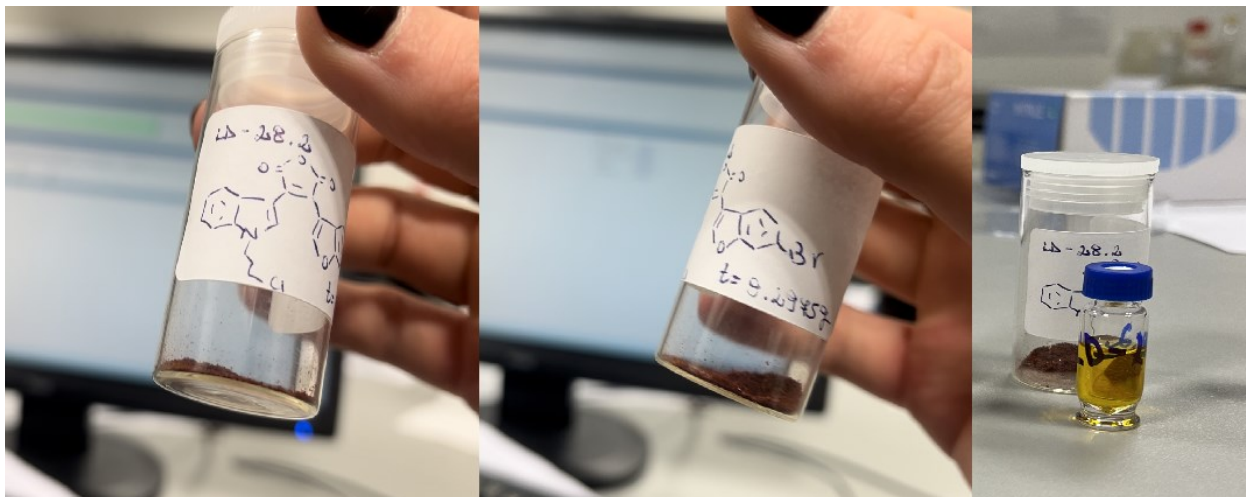


Рис. 3.1. Зразки досліджуваних речовин у кристалічній формі та розчин

На момент проходження проби через ДМД детектор було виявлено пік з часом утримування 0,28 хв, що дозволяє передбачити наявність подвійних зв'язків та/або ароматичних кілець у структурі молекули (рис.3.2).

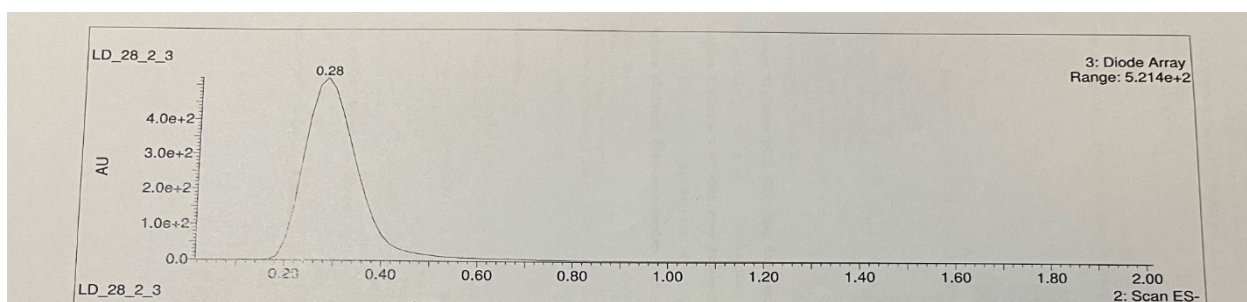


Рис. 3.2. Результат аналізу без колонки (ДМД).

При аналізі на мас-детекторі, найбільший інтенсивний молекулярний йон належить речовині із молярною масою 406.1/408.1 г/моль, відмінність маси йону в результаті присутності у структурі атому броду, що має 2 ізотопи із молярною масою 79 г/моль та 81 г/моль відповідно.

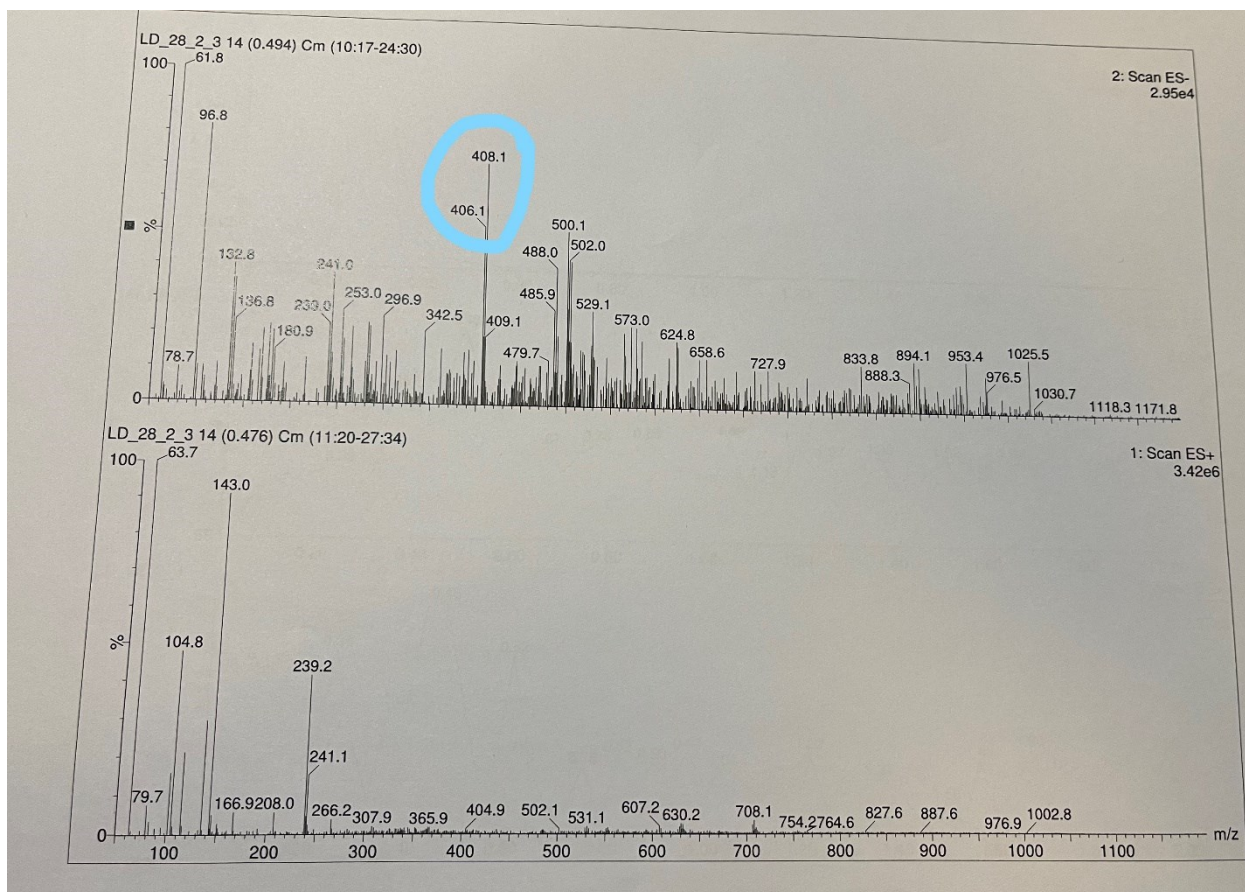


Рис. 3.3. Мас-спектр досліджуваної речовини.

У результаті проведених експериментальних досліджень методом ВЕРХ-МС виявлено найбільший інтенсивний молекулярний йон, що належить речовині із молярними масами 406.1 моль та 408.1 г/моль.

Хроматограма, одержана при проведенні експерименту з використанням колонки за методикою, наведеною в експериментальній частині (рис. 3.4), можна зробити висновок, що для даного дослідження потрібно збільшити час хроматографування, оскільки на діодноматричному детекторі видно появу нового піку з часом утримування близько 10 хв.

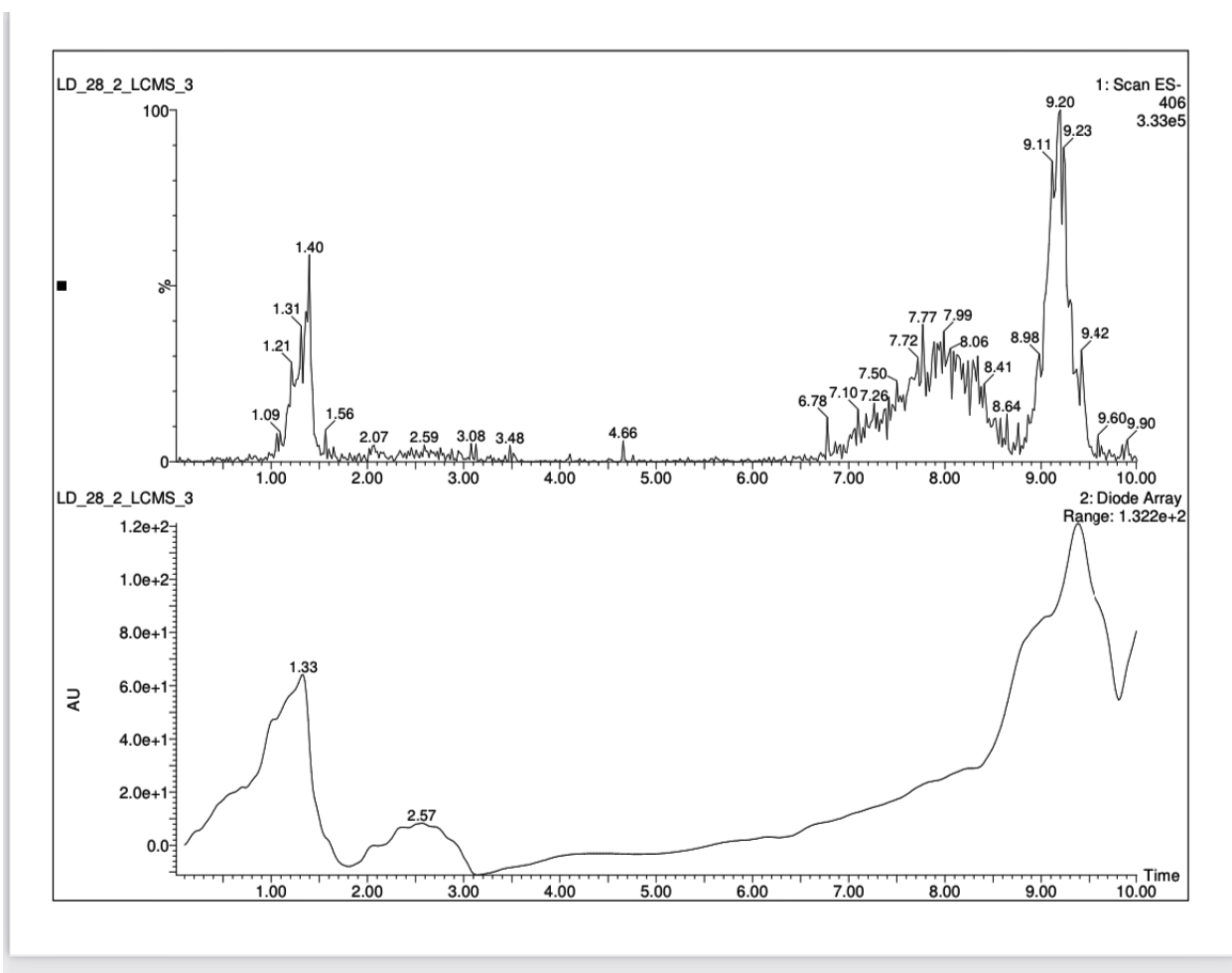
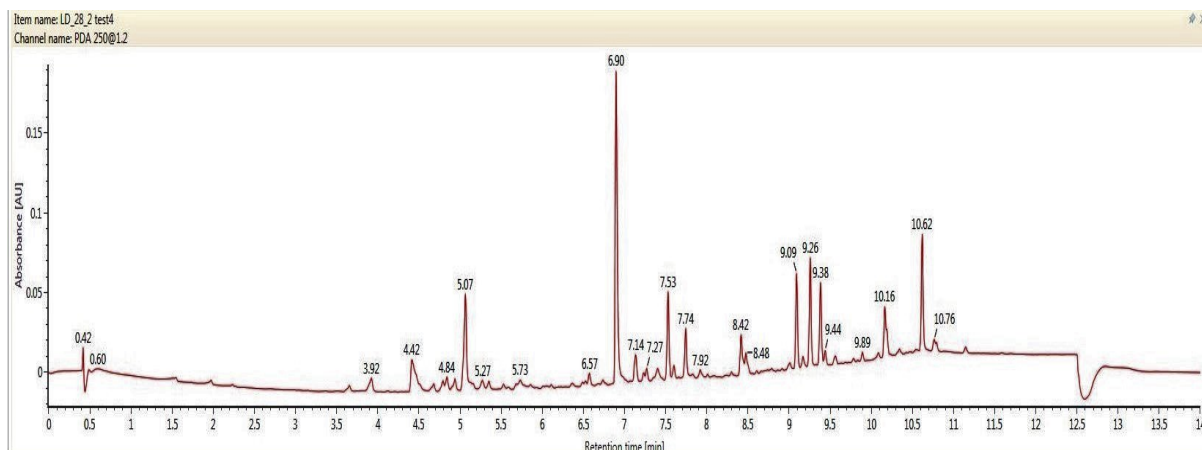


Рис. 3.4. Хроматограма ВЕРХ-дослідження.

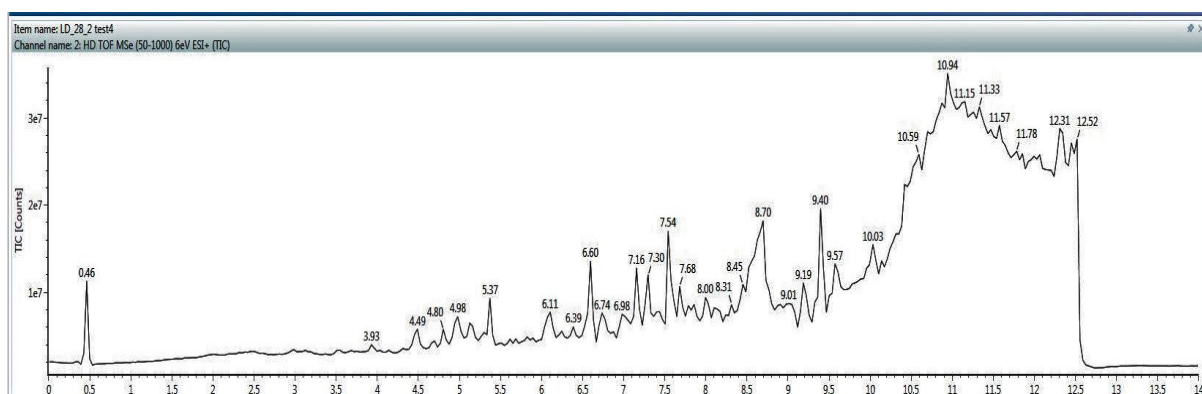
Для ідентифікації досліджуваної речовини із молекулярною масою 483 г/моль та перевірки в подальшому на чистоту сполуки необхідним є зміна умов аналізу.

3.2 Дослідження LD-28.2 за допомогою УЕРХ-МС

Аналіз в подальшому проводили з використанням УЕРХ-МС. На даному етапі дослідження, свою увагу ми зосереджували на піках, які були найбільші за розміром. Так як джерелами інших домішок могли бути пов'язані не з самою речовиною, а з розчинниками та ПЕГ у невеликих кількостях. Спектри з ДМД та мас-детектора наведено на рис. 3.5



А



Б

Рис. 3.5. ДМД (А) та Мас-спектр (Б) досліджуваної сполуки

На одержаній хроматограмі рис. 3.5 виявлено усього 31 домішку, найбільш інтенсивними були піки з часами утримування 4.9 хв; 5.1 хв; 6.9 хв; 6.9 хв; 7.1 хв; 7.5 хв; 7.7 хв; 8.4 хв; 9.4 хв; 10.6 хв; 10.9 хв. Серед них за результатами аналізу мас-спектрів (наявність подвійного молекулярного йону за рахунок ізоотопів) визначено 11 домішок, що містять бром. Аналіз цих домішок проводили за допомогою стандартної бібліотеки (програмне забезпечення до хроматографа), що дозволило спрогнозувати брутто-формули за комбінацією часів утримування та молекулярних йонів, а також за характером фрагментації. Попередні результати наведено в таблиці 3.1

Таблиця 3.1

Передбачувані домішки

№	Шифр	Час утримування	M/Z	Формула (із бібліотеки)
1	2.1.2	4.9 min	466 m/z	$C_{23}H_{16}O_5NBr$
2		5.1 min	389 m/z	$C_{20}H_8BrNO_3$
3	2.1	6.96 min	483 m/z	$C_{23}H_{15}O_4NCIBr$
4		6.98 min	465 m/z	$C_{23}H_{13}O_3NCIBr$
5		7.1 min	533 m/z	$C_{27}H_{18}BrClN_2O_3$
6		7.5 min	481 m/z	$C_{24}H_9BrClN_5$
7		7.7 min	389 m/z	$C_{20}H_8BrNO_3$
8		8.4 min	419 m/z	$C_{21}H_{10}BrNO_4$
9		9.4 min	557 m/z	$C_{27}H_{14}BrCl_2N_5$
10		10.6 min	557 m/z	$C_{27}H_{14}BrCl_2N_5$
11		10.9 min	268 m/z	$C_{11}H_9O_3Br$

Для нас було цікавим те, що після проведеного аналізу методом УЕРХ не було виявлено сполуку із молярними масами 406.1 г/моль та 408.1 г/моль, яка була виявлена при аналізі ВЕРХ на мас-детекторі та мала найбільший інтенсивний молекулярний йон. Що свідчить про те, щоб ідентифікувати дану сполуку потрібно підібрати інші умови для аналізу, або це була сполука, причиною утворення якої є умови самого аналізу.

Найбільш доцільно розпочати опис отриманих окремих піків з тих речовин, структуру яких нам вдалося обґрунтувати.

Перед проведенням даного аналізу ми очікували побачити деякі домішки, які є результатами синтезу на різних його етапах та реакції взаємодії з водою під час аналізу, так як воду ми використовували в якості розчинника, то реакція гідролізу була передбачувана. Тому заздалегідь до бази даних для пошуку вказаних сполук ми ввели брутто-формули деяких речовин та дали їм

відповідні назви. В першому випадку під час реакції гідролізу відбувається розкриття лактонного циклу з отриманням ациклічного похідного малеїнової кислоти (2.1.1), в другому заміна хлору на гідроксильну групу з утворенням сполуки з пропанолом у 1 положенні індольного кільця (2.1.2).

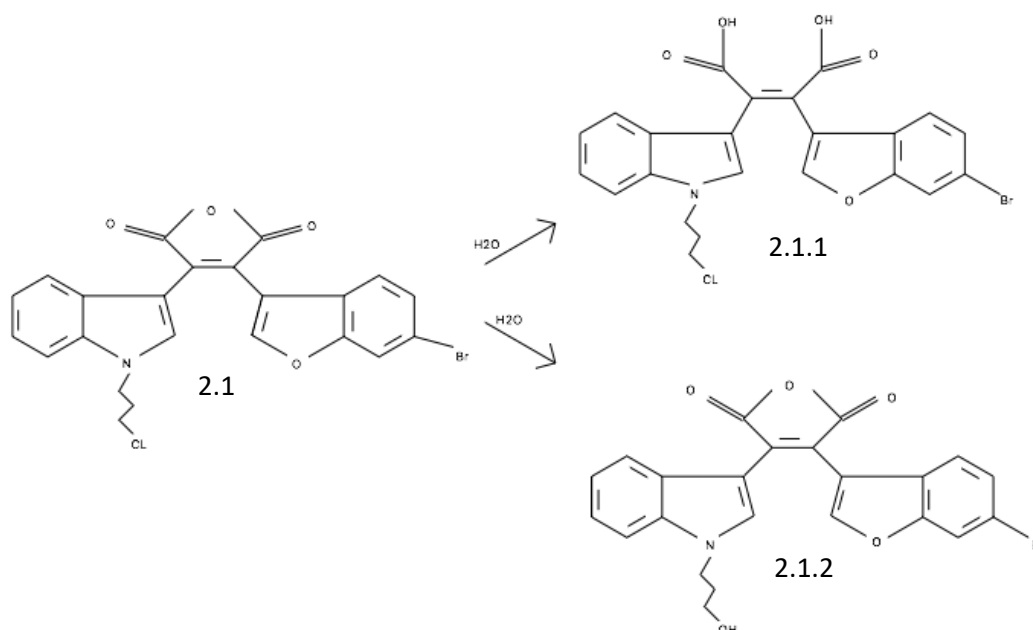
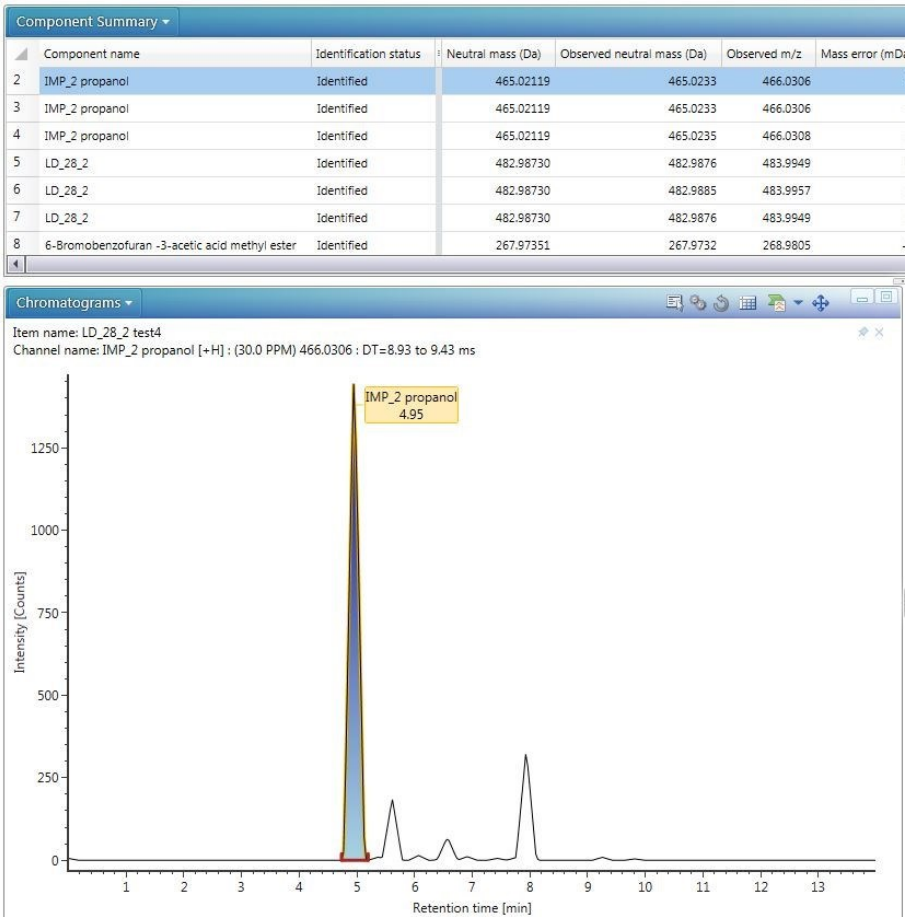


Рис. 3.6. Схема можливих хімічних перетворень сполуки 2. 1

На хроматограмі, спостерігаємо пік із часом утримування 4.95 хв. Молярна маса сполуки складає 465 г/моль, що відповідає брутто-формулі $C_{23}H_{16}O_5NBr$. Це відповідає речовині 2.1.2 (Схема 3.6). На рис. 3.7 наведено хроматограму з маскуванням інших піків.

Що стосується ациклічного похідного малеїнової кислоти (2.1.1, Рис. 3.6), то серед домішок, речовина з брутто-формулою – $C_{23}H_{17}O_5NClBr$ та молярною масою 501,5 г/моль виявлена не була.



3.7 Розрахована хроматограма речовини 2.1.2



Рис. 3.8 Розрахований (А) та експериментальний (В) мас-спектри речовини 2.1.2

Таким чином, можна вважати, що пік на хроматограмі (рис. 3.5), і відповідно сполука 1 в таблиці 3.1 відповідає продукту гідролізу речовини 2.1 з молярною масою 465 г/моль.

Наступним за інтенсивністю на хроматограмі (рис. 3.5) був пік із часом утримування 5.1 хв. При аналізі на мас-детекторі для нього виявлені значення молярних мас молекулярного іону 389/391 г/моль. З найбільшою вірогідністю (97,43%, рис. 3.9) сполуці з таким часом утримування відповідає брутто-формула $C_{20}H_8BrNO_3$.

Select/View Analysis

Operations

Elemental composition

Selected data:

☒ LD28_2 test4 - 2: Average Time 5.1605 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined

Results

	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
1	C ₂₀ H ₈ BrNO ₃	97.432403	4.006062	1.492451	389.976032	4.107044	1.597519	17.000000
2	C ₁₅ H ₅ Cl ₂ N ₅ O ₄	0.802241	3.152441	19.969301	389.979136	-3.870623	-1.505558	15.000000
3	C ₁₄ H ₉ Cl ₂ N ₅ O ₈	0.505691	0.959570	19.840936	389.977798	-0.432282	-0.168145	10.000000
4	C ₁₀ H ₆ Cl ₃ N ₅ O ₂	0.447092	1.349083	14.672002	389.978280	-1.671296	-0.650085	11.000000
5	C ₉ H ₈ BrN ₇ O ₆	0.195235	3.879527	18.360358	389.979220	-4.088725	-1.590393	9.000000
6	C ₉ H ₁₀ Cl ₃ N ₅ O ₆	0.150775	3.219962	19.850538	389.976943	1.767045	0.687328	6.000000
7	C ₈ H ₁₂ BrN ₃ O ₁₀	0.081107	0.610286	24.576595	389.977883	-0.650384	-0.252980	4.000000
8	C ₅ H ₄ BrN ₁₃ O ₄	0.078721	3.602216	24.130651	389.976535	2.814957	1.094935	10.000000
9	C ₁₄ H ₁₄ BrCl ₂ N ₃ O	0.060712	2.395261	29.405458	389.977007	1.602016	0.623137	8.000000
10	C ₅ H ₇ Cl ₄ N ₁₃	0.040596	2.878092	31.325938	389.977425	0.528031	0.205389	7.000000
11	C ₈ H ₁₅ Cl ₄ N ₃ O ₆	0.040249	1.944308	31.955763	389.978773	-2.937310	-1.142526	1.000000
12	C ₁₅ H ₄ ClN ₃ O ₈	0.034531	4.556157	64.308025	389.975968	4.272073	1.661710	15.000000
13	C ₄ H ₉ BrClN ₁₁ O ₄	0.027369	1.703104	37.834507	389.978365	-1.889398	-0.734920	5.000000
14	C ₄ H ₁₁ Cl ₄ N ₉ O ₄	0.021842	5.791303	40.580560	389.976087	3.966372	1.542801	2.000000
15	C ₁₃ H ₁₉ BrCl ₃ N ₅ O	0.021483	2.277437	42.810406	389.978837	-3.102339	-1.206718	3.000000
16	C ₃ H ₁₃ BrClN ₇ O ₈	0.016239	2.352896	50.479340	389.977028	1.548944	0.602493	0.000000
17	C ₄ H ₁₂ Cl ₅ N ₁₁	0.016058	2.800588	48.230847	389.979254	-4.176324	-1.624466	2.000000
18	C ₈ H ₁₇ Br ₂ N ₅ O ₃	0.013166	1.737183	52.464023	389.977092	1.383915	0.538302	2.000000
19	C ₄ H ₄ ClN ₉ O ₁₁	0.011964	3.513685	64.974377	389.979156	-3.923696	-1.526201	7.000000

Рис. 3.9. Матриця вірогідностей відповідності складу речовин часу утримування та молекулярному йону.

Найближчою за структурою є речовина $C_{20}H_{10}BrNO_4$ з молярною масою 467 г/моль, відмінність на 18 а.о.м відповідає скоріш за все за дегідратацію даної сполуки, що і зумовлює утворення $C_{18}H_8BrNO_3$ (Рис. 3.10).

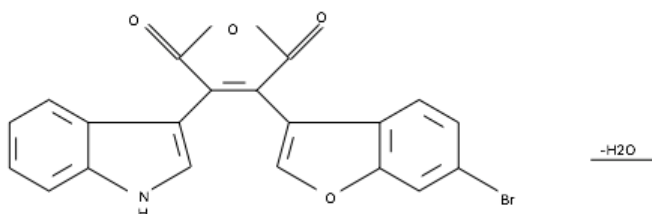


Рис. 3.10 Продукт дегідратації

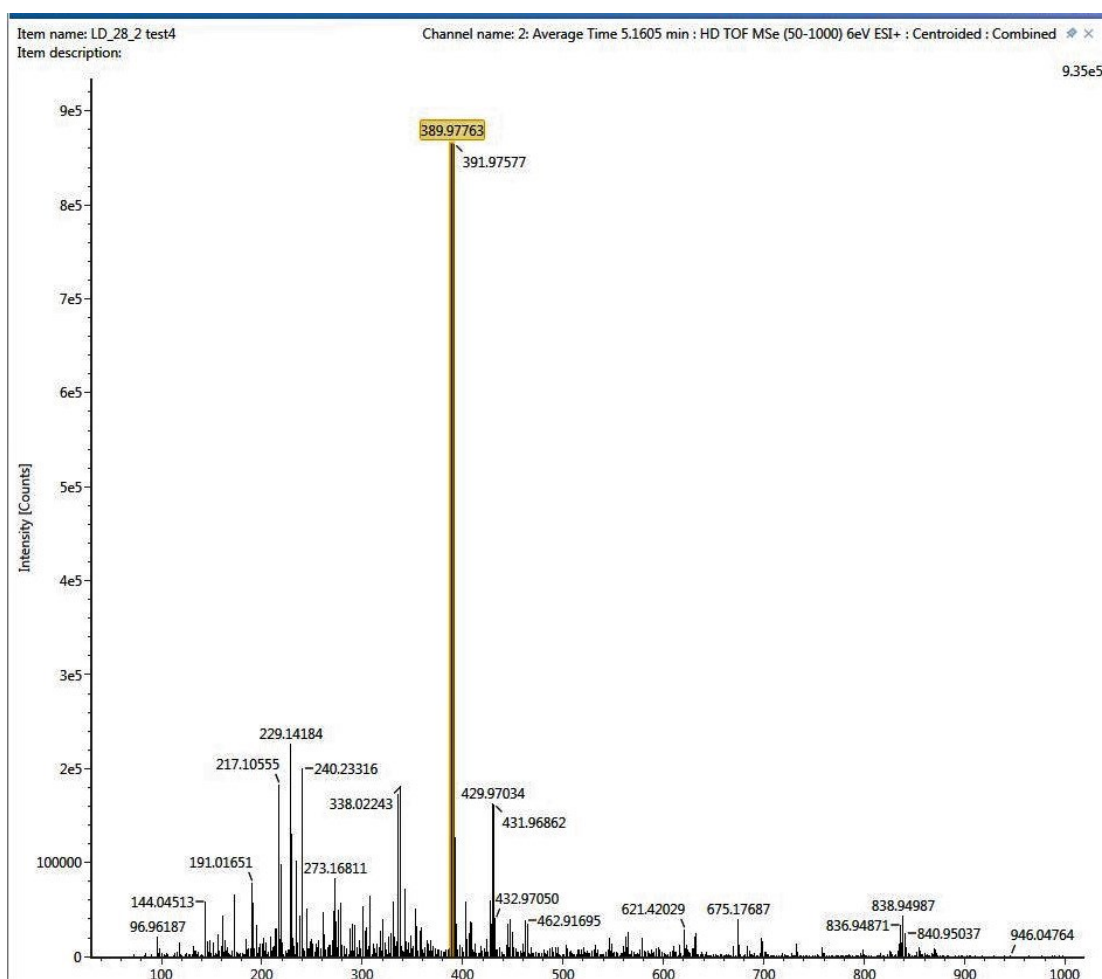


Рис. 3.11. Мас-спектр речовини (час утримування 5,1 хв.)

Таким чином, попередньо встановлено хімічний процес утворення домішки з часом утримування 5,1, для коректного доведення її структури потрібно провести додаткові дослідження.

Як і слід очікувати, на хроматограмі пік найбільшої інтенсивності належить синтезованій домішці 2.1. З відповідною молекулярною масою на мас-спектрі.

Також ми задали дані перед проведенням аналізу, що стосувалися нашого об'єкту, його назву та брутто формулу $C_{23}H_{15}O_4NCIBr$.

На хроматограмі, спостерігаємо пік із часом утримування 6.96 хв, та молярна маса 483 г/моль, яка відповідає заданій речовині (Рис. 3.12). Площа екстрагованого піку становить 74% від хроматограми.

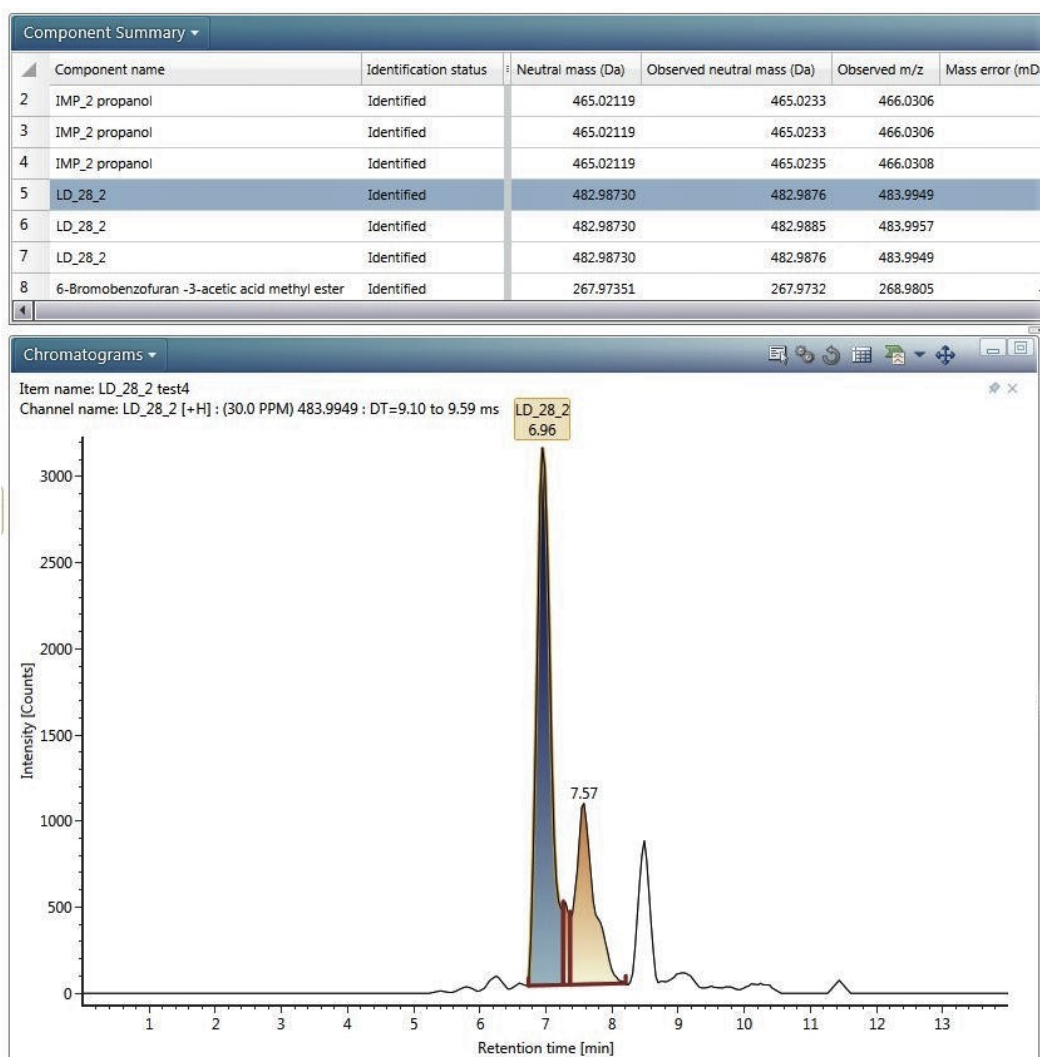


Рис. 3.12. Хроматограма (розрахункова)

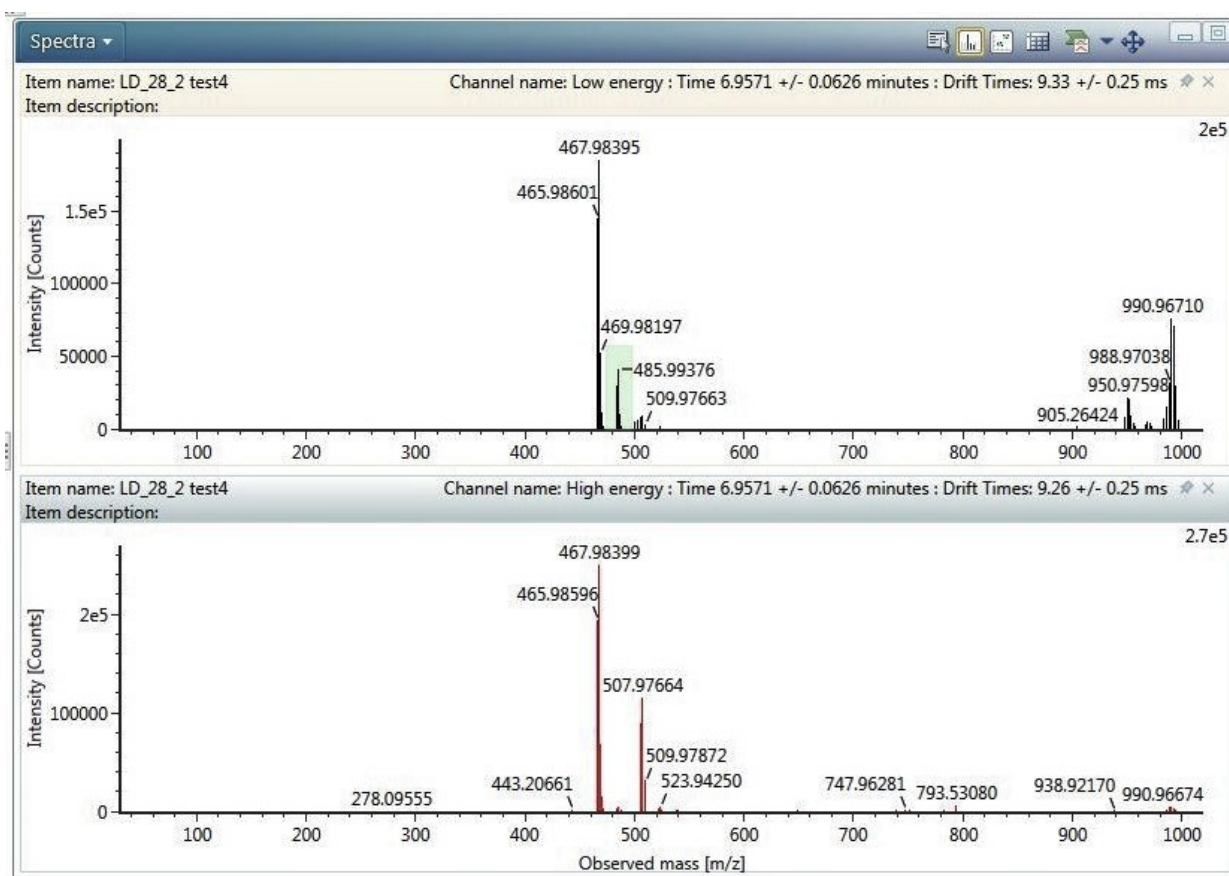


Рис. 3.13. Розрахунковий та експериментальний мас-спектри

На мас-спектрі поруч з основним піком було виявлено ще одну сполуку з часом утримування 6.98 хв, різниця з попереднім піком 0,02 хв, через невелику різницю піки могли не розділитися, та за розрахунками бібліотеки молярні маси становлять 465/467 г/моль, найбільш вірогідною сполукою з таким часом утримування є $C_{23}H_{13}O_3NClBr$ (98,31%, рис.)

Select/View Analysis								
Operations								
Elemental composition								
Selected data:								
<input checked="" type="checkbox"/> LD28_2 test4 - 2: Average Time 6.9808 min : HD TOF MS (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined								
Results								
	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
1	C23H13BrClNO3	98.317327	4.149643	1.846398	465.984010	4.149973	1.929649	17.000000
2	C29H8BrNO	0.720856	1.030450	21.432768	465.986203	-0.566127	-0.263237	26.000000
3	C12H13BrClN7O6	0.353821	2.478435	15.823766	465.987198	-2.706065	-1.258262	9.000000
4	C18H9Cl2N3O8	0.152702	4.722627	37.729942	465.983946	4.288025	1.993840	15.000000
5	C19H5Cl2N7O4	0.151546	2.063074	40.606413	465.985284	1.411737	0.656428	20.000000
6	C17H17Br2N5O	0.140656	2.861675	23.702828	465.987262	-2.844117	-1.322454	11.000000
7	C16H21Br2NO5	0.089173	0.125281	26.223807	465.985925	0.032172	0.014959	6.000000
8	C6H18BrCl2N7O8	0.030661	2.575342	37.195161	465.985005	2.010035	0.934624	0.000000
9	C11H22Br2ClN5O3	0.025203	2.092363	39.742949	465.985070	1.871983	0.870432	2.000000
10	C24H4ClN3O6	0.018054	0.540869	109.324747	465.986139	-0.428075	-0.199046	24.000000

Рис. 3.14. Матриця вірогідностей відповідає складу речовини з часом утримування 6,98 молекулярному йону та характеру фрагментації

Найближчою за структурою є речовина $C_{23}H_{15}BrClNO_4$ з молярною масою 483 г/моль, відмінність на 18 а.о.м відповідає з великою вірогідністю дегідратації даної сполуки, що і зумовлює утворення $C_{23}H_{13}BrClNO_3$. Крім того, в ході аналізу, дуже легко може втрачатися хлорпропільний замісник, який заміщується атомом протону Гідрогену, який той у свою чергу може заміщуватися іншими радикалами. Навіть у процесі зберігання під гумовою кришкою, може відбуватися поглинання досліджуваною речовиною сполук, що входять до складу гуми. Тому відбувається приєднання до атому Нітрогену нового радикалу, що змінює структуру речовини (Рис. 3.15).

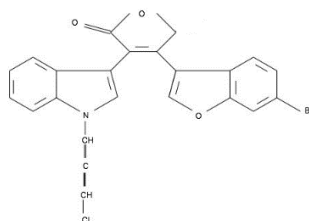


Рис. 3.15. Вірогідний продукт фрагментації сполуки 2.1

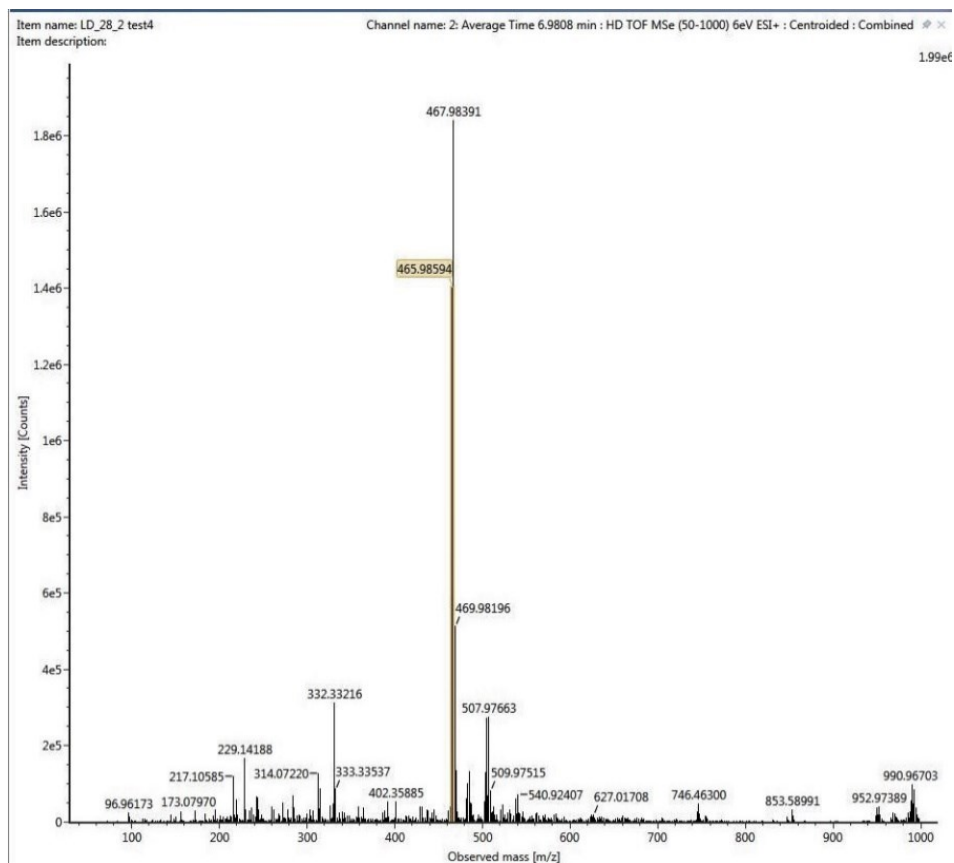


Рис. 3.16 Мас-спектр речовини (час утримування 6,98 хв.)

Наступним досліджуваним піком (рис. 3.5) став пік з часом утримування 7,1 хв, на мас-спектрі молекулярному йону відповідали молярні маси 533/535 г/моль. За даними комп'ютерних розрахунків найбільш вірогідною сполукою з таким часом утримування та m/z є $C_{27}H_{18}BrClN_2O_3$ (вірогідність 86,85%, рис. 3.17).

Select/View Analysis								
Operations								
Elemental composition								
Selected data:								
<input checked="" type="checkbox"/> LD28_2 test4 - 2: Average Time 7.1558 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined								
Results								
	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DfE
1	C27H18BrClN2O3	65.423575	1.327972	3.611522	533.026210	-1.540395	-0.819518	19.000000
2	C23H14BrClN8O	28.328491	4.056544	5.216079	533.023524	3.507042	1.865810	20.000000
3	C28H13BrN4O3	4.835140	1.926465	12.418276	533.024380	1.899065	1.010337	24.000000
4	C22H19BrCl2N6O	0.629805	1.087204	15.956314	533.025354	0.067583	0.035955	15.000000
5	C21H23BrCl2N2O5	0.329875	3.362669	17.975117	533.024017	2.581431	1.373368	10.000000
6	C22H14Cl2N4O8	0.192499	1.227089	33.791641	533.026145	-1.419738	-0.755327	17.000000
7	C26H27Br2Cl	0.064183	3.060778	31.514695	533.024081	2.460775	1.309177	12.000000
8	C16H22Br2N8O3	0.056723	0.614783	29.538241	533.025439	-0.091876	-0.048880	9.000000
9	C10H23BrCl2N8O8	0.041553	2.554408	32.121046	533.027205	-3.410680	-1.814543	2.000000
10	C15H26Br2N4O7	0.039280	2.942417	32.835343	533.024101	2.421972	1.288533	4.000000
11	C15H27Br2ClN6O3	0.023448	2.811310	39.996968	533.027269	-3.531336	-1.878735	4.000000
12	C23H9ClN6O8	0.019724	2.122449	91.512105	533.024315	2.019721	1.074528	22.000000
13	C19H35Br3O2	0.012344	0.788641	54.027772	533.025996	-1.138144	-0.605513	1.000000

Рис. 3.17. Матриця вірогідностей відповідності складу речовин з часом утримування 7,1 хв, молекулярному йону та характеру фрагментації

Найбільш вірогідними у структурній формулі відбуваються зміни, що стосуються лактонного кільця зі зміною атому Оксигену на Нітроген. Також було висунуте припущення щодо подовження алкільного ланцюжка в першому положенні індольного кільця (Рис. 3.18).

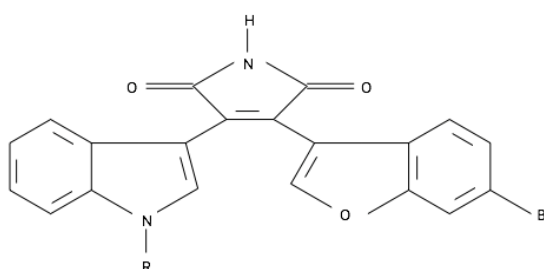


Рис. 3.18 Заміщене похідне LD-19

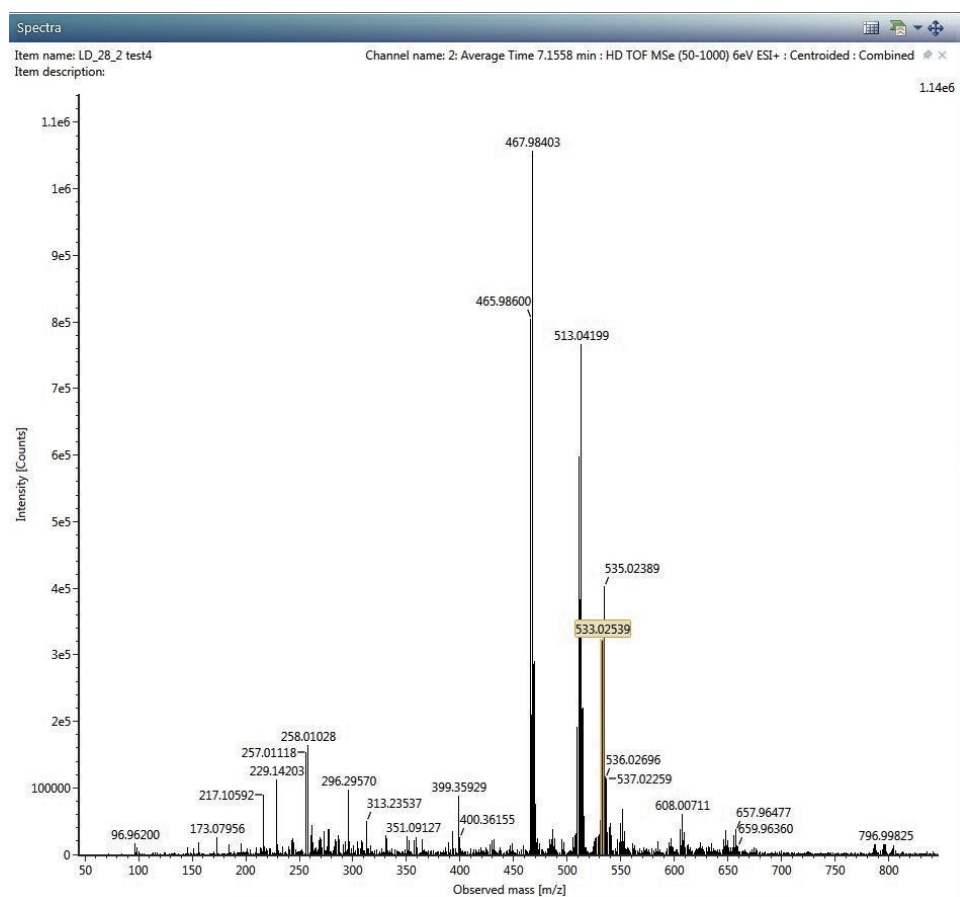


Рис.3.19 Мас-спектр домішки з часом утримування 7.1 хв

Таким чином, зроблене попереднє припущення щодо будови даної домішки, але для встановлення точної структури потрібне більш детальне дослідження.

На хроматограмі (Рис. 3.5) було виявлено наступний пік з часом утримування 7,7 хв, що на мас-спектрі відповідало значенням молярних мас 389/391 г/моль, найбільш вірогідною сполукою за даними штучного інтелекту з таким часом утримування є $C_{20}H_8BrNO_3$ (96,46%, рис. 3.20).

Select/View Analysis

Operations

Elemental composition

Selected data:

☒ LD28_2_test4 - 2: Average Time 7.7865 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined

Results

	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
1	C20H8BrNO3	96.465532	4.815126	4.042409	389.976032	4.852599	1.887519	17.000000
2	C15H5Cl2N5O4	1.951423	2.419284	18.227995	389.979136	-3.125063	-1.215558	15.000000
3	C14H9Cl2NO8	1.031699	1.415137	18.928592	389.977798	0.313276	0.121855	10.000000
4	C9H8BrN7O6	0.315784	3.105286	20.705314	389.979220	-3.343164	-1.300393	9.000000
5	C14H14BrCl2N3O	0.098790	3.194229	32.596547	389.977007	2.347573	0.913137	8.000000
6	C15H4ClN3O8	0.080520	5.354405	59.747897	389.975968	5.017628	1.951710	15.000000
7	C3H13BrClN7O8	0.031412	3.115421	55.557348	389.977028	2.294500	0.892493	0.000000
8	C8H17Br2N5O3	0.024839	2.539414	57.757262	389.977092	2.129471	0.828302	2.000000

Рис. 3.20 Матриця вірогідностей відповідності складу речовин з часом утримування 7,7 хв, молекулярному йону та характеру фрагментації.

Дана сполука за структурою найбільш подібна до C₂₀H₁₀BrNO₄, але в ході проведення аналізу вірогідно відбулася реакція дегідратації з чим пов'язана втрата 18 а.о.м. Також в ході проведення аналізу вже було виявлено пік із часом утримування 5,1 хв, з такою ж брутто формулою C₂₀H₈BrNO₃. За отриманими даними можна зробити висновок що це дві сполуки, які мають однаковий якісний та кількісний склад атомів, проте мають різну конфігурацію. Тобто відщеплення молекули води відбувається в різних місцях (Рис. 3.21).

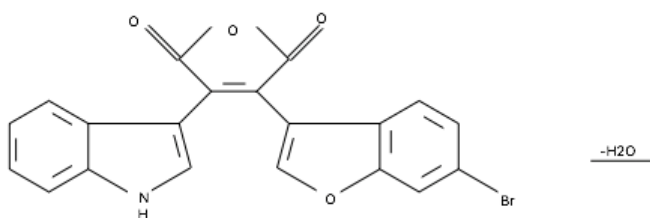


Рис. 3.21 Заміщене похідне LD-19

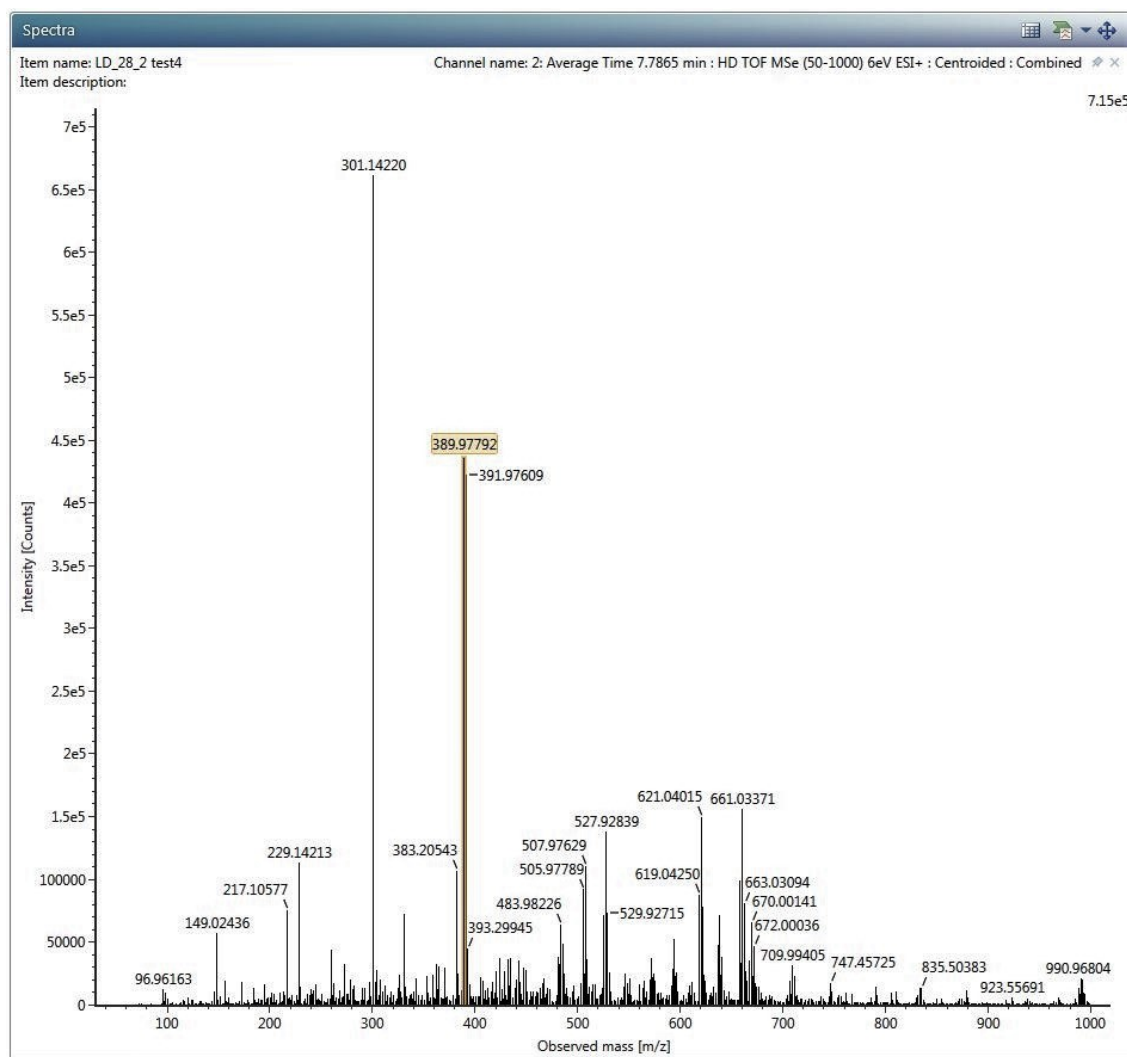


Рис. 3.22 Мас-спектр домішки з часом утримування 7.7 хв

Для встановлення точної структурної формули домішки необхідні подальші дослідження.

Перед початком проведення аналізу до бази даних пошуку конкретних сполук ми ввели дані, що стосувалися вихідних речовин синтезу даної сполуки, однією із таких речовин був метиловий ефір 6-бромбензофуран-3-оцтової кислоти з молярною масою сполуки 268 г/моль (Рис. 3.23).

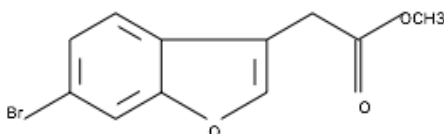


Рис. 3.23 Метилловий ефір 6-бромбензофуран-3-оцтової кислоти

В результаті на хроматограмі, ми отримали пік із часом утримування 10,9 хв. За допомогою діодно-матричного детектору було встановлено, що речовина поглинає світло при довжині 224 нм.

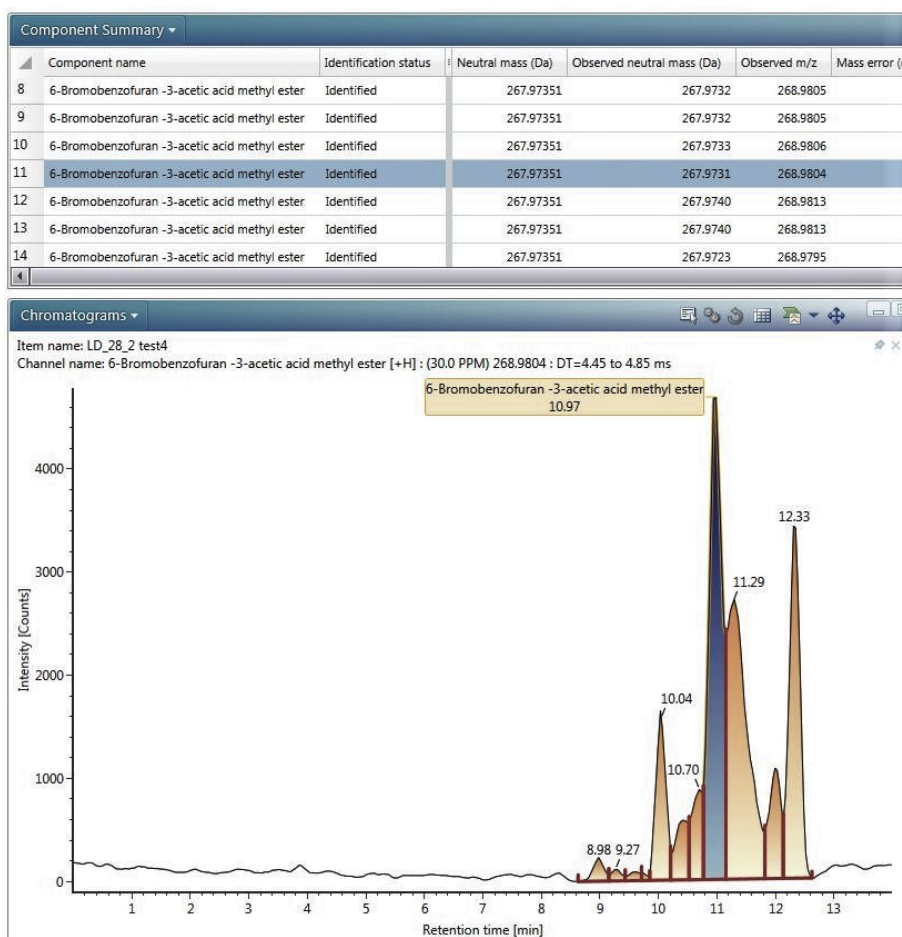


Рис. 3.24 Розрахована хроматограма метилового ефіру 6-бромбензофуран-3-оцтової кислоти

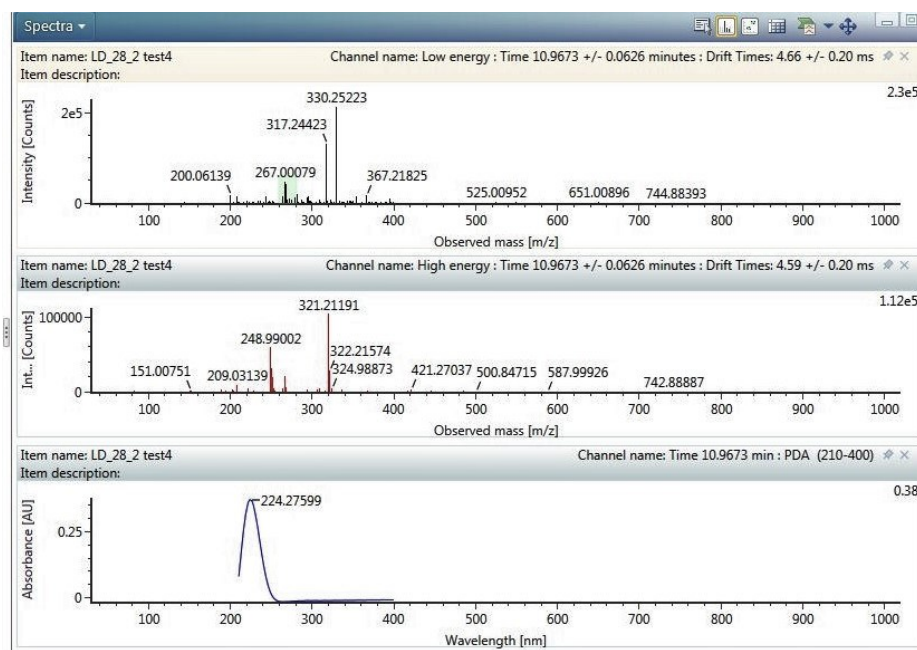


Рис. 3.25 Розрахунковий та експериментальний мас-спектри

Для наступних наведених піків, природу виникнення речовин обґрунтувати не вдалося.

На хроматограмі було виявлено пік з часом утримування 7.5 хв, що на мас-спектрі відповідало молярній масі 481/483 г/моль, найбільш вірогідною сполукою з таким часом утримування є $C_{24}H_9BrClN_5$ (96,21%, рис. 3.26).

Select/View Analysis

Operations

Elemental composition

Selected data:

☒ LD28_2 test4 - 2: Average Time 7.5584 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined

Results

	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE	
1	C ₂₄ H ₉ BrClN ₅	96.210576	1.661390	1.248864	481.980262	1.658331	0.797614	22.000000	
2	C ₂₃ H ₁₄ BrClN ₃	2.153795	1.952741	12.589100	481.982092	-2.146148	-1.032241	17.000000	
3	C ₂₉ H ₈ BrNO ₂	0.933347	0.747260	18.854026	481.981118	-0.120296	-0.057859	26.000000	
4	C ₁₂ H ₁₃ BrClN ₇ O ₇	0.234954	1.991605	17.103704	481.982113	-2.189069	-1.052885	9.000000	
5	C ₁₉ H ₅ Cl ₂ N ₇ O ₅	0.141607	2.251754	38.259758	481.980198	1.791792	0.861805	20.000000	
6	C ₂₃ H ₉ Cl ₂ N ₇ O	0.133293	3.684087	39.874530	481.982884	-3.791314	-1.823523	19.000000	
7	C ₁₇ H ₁₇ Br ₂ N ₅ O ₂	0.095042	2.376682	25.066064	481.982177	-2.322530	-1.117076	11.000000	
8	C ₁₆ H ₂₁ Br ₂ N ₆ O ₆	0.062179	0.377991	27.739825	481.980840	0.458106	0.220337	6.000000	
9	C ₁₁ H ₂₂ Br ₂ ClN ₅ O ₄	0.018942	2.405810	41.849129	481.979984	2.236733	1.075810	2.000000	
10	C ₂₄ H ₄ ClN ₃ O ₇	0.016265	0.325505	104.046885	481.981054	0.013165	0.006332	24.000000	

Рис. 3.26 Матриця вірогідностей відповідності складу речовин з часом утримування 7,5 хв, молекулярному йону та характеру фрагментації

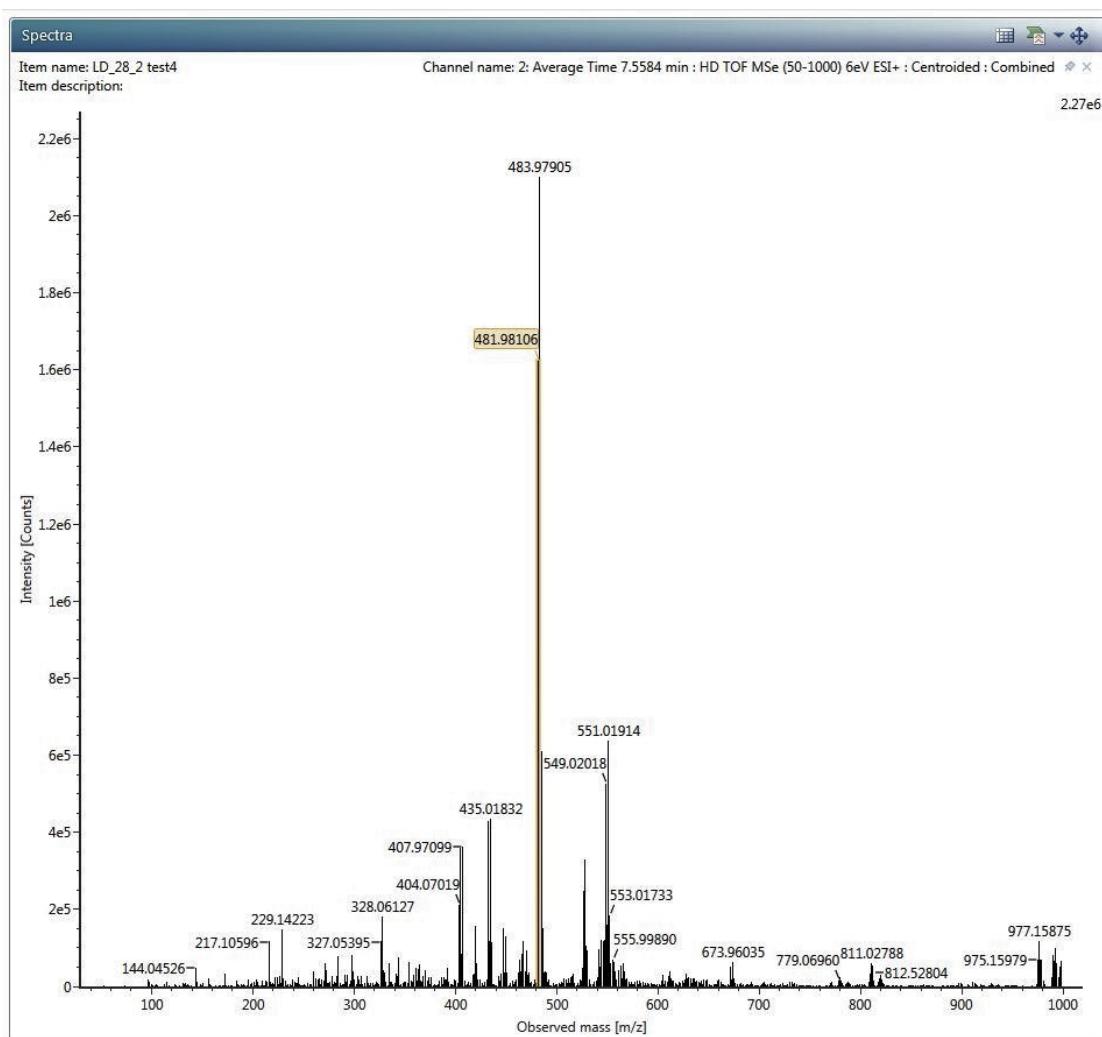


Рис. 3.27 Мас-спектр домішки з часом утримування 7.5 хв.

На хроматограмі виявлено пік з часом утримування 8,4 хв, та за даними комп'ютерної програми молярна маса становить 419 г/моль (Рис. 3.28).

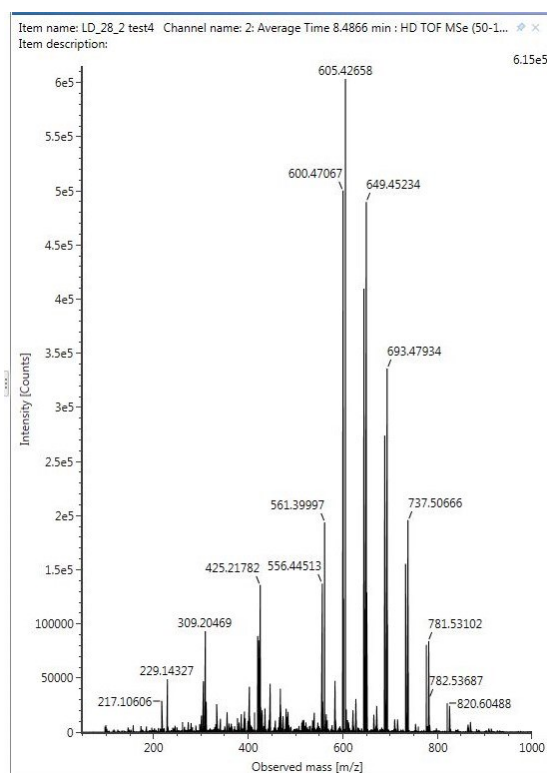


Рис. 3.28 Мас-спектр домішки з часом утримування 8.4 хв

На хроматограмі проведеного аналізу виявлено наступний пік з часом утримування 9,4 хв, відповідно до мас-спектру молярна маса досліджуваної сполуки, яка була розрахована за допомогою бібліотеки 557/559 г/моль, найбільш вірогідною сполукою з таким часом утримування є $C_{27}H_{14}BrCl_2N_5$ (94,9%, рис. 3.29).

Select/View Analysis								
Operations								
Elemental composition								
Selected data:								
<input checked="" type="checkbox"/> LD28_2 test4 - 2: Average Time 9.4143 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined								
Results								
	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
1	C ₂₇ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅	94.901975	2.800446	1.140209	557.988240	2.890116	1.609744	22.000000
2	C ₂₅ H ₂₁ Br ₂ N ₄ O ₄	2.864089	2.555721	11.612674	557.991010	-2.083402	-1.160418	15.000000
3	C ₂₁ H ₁₇ Br ₂ N ₇ O ₂	1.320558	2.426032	13.090965	557.988325	2.737804	1.524909	16.000000
4	C ₁₅ H ₁₈ BrCl ₂ N ₇ O ₇	0.458760	0.385119	14.231749	557.990091	-0.432247	-0.240754	9.000000
5	C ₂₀ H ₂₂ Br ₂ ClN ₅ O ₂	0.209018	0.745585	20.733574	557.990155	-0.547495	-0.304945	11.000000
6	C ₁₉ H ₂₆ Br ₂ ClN ₆ O ₆	0.127633	1.609392	22.841919	557.988818	1.853680	1.032467	6.000000
7	C ₂₇ H ₉ Cl ₂ N ₃ O ₇	0.045230	1.391493	66.107616	557.989032	1.469458	0.818463	24.000000
8	C ₂₈ H ₅ Cl ₂ N ₇ O ₃	0.037926	0.915712	70.785829	557.990369	-0.931717	-0.518950	29.000000
9	C ₁₄ H ₂₇ Br ₂ Cl ₂ N ₅ O ₄	0.034810	3.359132	33.041298	557.987962	3.389586	1.887941	2.000000

Рис. 3.29 Матриця вірогідностей відповідності складу речовин з часом утримування 9,4 хв молекулярному йону та характеру фрагментації.

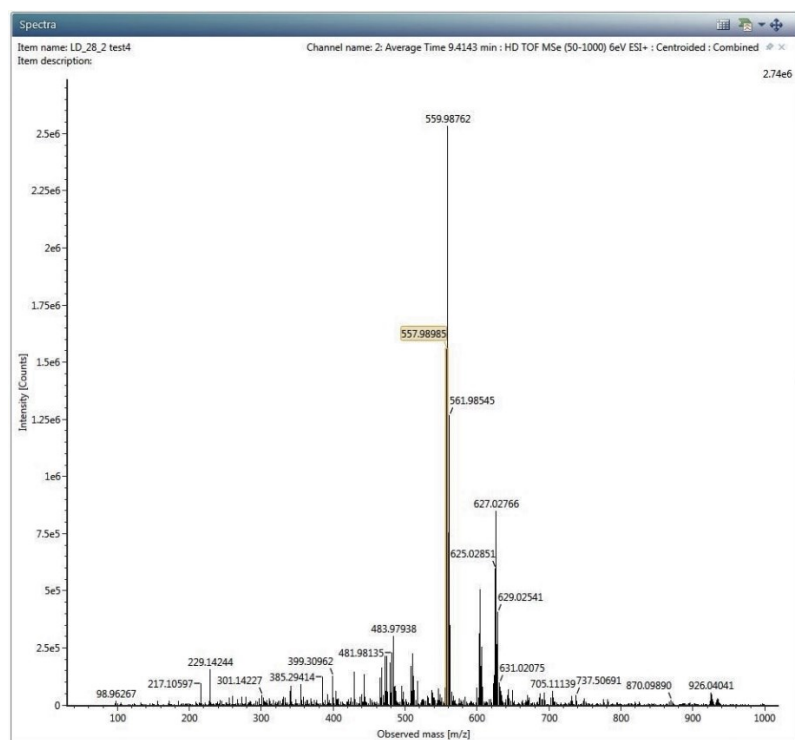


Рис. 3.30 Мас-спектр домішки з часом утримування 9.4 хв

Наступним виявленим піком на хроматограмі був пік з часом утримування 10,6 хв, що на мас-спектрі відповідає молярним масами 557 г/моль та 559 г/моль, найбільш вірогідною сполукою з таким часом утримування є $C_{27}H_{14}BrCl_2N_5$ (90,75%, рис.).

Select/View Analysis

Operations

Elemental composition

Selected data:

☒ LD28_2 test4 - 2: Average Time 10.6288 min : HD TOF MSe (50-1000) 6eV ESI+ : Centroided : Combined

Results

	Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
1	C27H14BrCl2N5	90.753226	3.082480	2.996833	557.988240	2.602855	1.449744	22.000000
2	C25H21Br2NO4	5.116079	2.289385	11.688651	557.991010	-2.370665	-1.320418	15.000000
3	C21H17Br2N7O2	2.453245	2.699984	12.904182	557.988325	2.450543	1.364909	16.000000
4	C15H18BrCl2N7O7	0.955850	0.568781	13.066210	557.990091	-0.719509	-0.400754	9.000000
5	C20H22Br2ClN5O2	0.343724	0.595699	20.633281	557.990155	-0.834758	-0.464945	11.000000
6	C19H26Br2ClNO6	0.208278	1.866704	22.535592	557.988818	1.566418	0.872467	6.000000
7	C27H9Cl2N3O7	0.063838	1.625887	66.840965	557.989032	1.182196	0.658463	24.000000
8	C14H27Br2Cl2N5O4	0.053678	3.635707	32.464812	557.987962	3.102325	1.727941	2.000000
9	C28H5Cl2N7O3	0.052081	0.920645	71.999301	557.990369	-1.218980	-0.678950	29.000000

Рис. 3.31 Матриця вірогідностей відповідності складу речовин з часом утримування 10,6 хв молекулярному йону та характеру фрагментації.

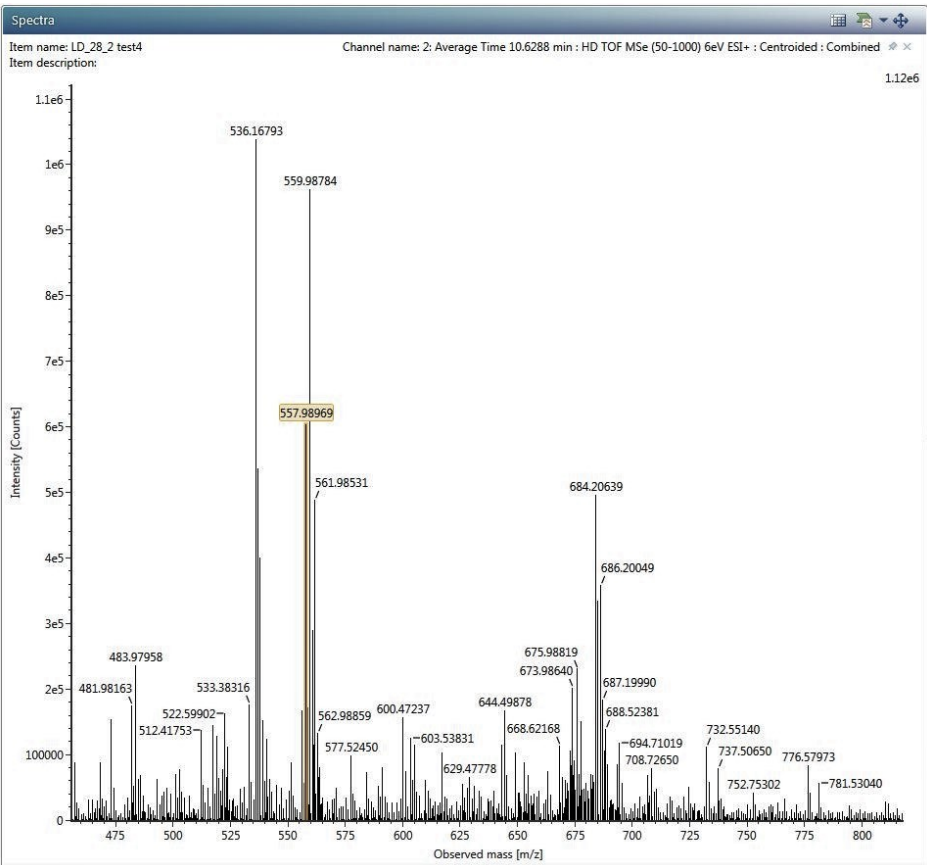


Рис. 3.32 Мас-спектр домішки з часом утримування 10,6 хв

В ході проведеного аналізу на хроматограмі було виявлено пік із часом утримування 9,4 хв, з такою ж брутто-формулою. За отриманими даними можна зробити висновок що це дві сполуки, які є ізомерами та мають однаковий якісний та кількісний склад атомів.

Висновки до розділу III

1. Синтезована стандартизована домішка з кодовою назвою LD-28,2, яка відноситься до класу сполук із загальною назвою бензофураніліндолілмалеїнових ангідридів була виявлена методом УЕРХ.
2. В якості домішок було виявлено декілька споріднених сполук до досліджуваної речовини та встановлена їх передбачувана структура.
3. Деякі з домішок були продуктами реакції гідролізу, як результат взаємодії досліджуваної речовини та рухомої фази В – води.
4. Було підібрано відповідні умови для хроматографування методом УЕРХ.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Кваліфікаційна робота присвячена вирішенню наукових задач із розробки методики для ідентифікації синтезованої стандартизованої домішки з кодовою назвою LD-28,2, та дослідження її на супутні домішки:

1. Досліджено літературні дані щодо активності ферментів групи кіназ та лікарських засобів, що є їх інгібіторами. Розглянуті відомості про сполуку Іматиніб, її властивості, синтез та проблеми при застосуванні даного ЛЗ у наш час.
2. Методом вибору для вирішення завдань при синтезі нового АФІ та дослідження його на домішки є РХ-МС, методом ВЕРХ та його удосконалена версія УЕРХ, що відзначаються високою чутливістю, вибірковістю та специфічністю.
3. Методом УЕРХ було виявлено досліджувану речовину з кодовою назвою LD-28,2 та її супутні домішки, що є результатами синтезу та реакції з рухомою фазою.
4. Деякі із домішок виявилися спорідненими сполуками.
5. Було підібрано відповідні умови для хроматографування методом УЕРХ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Petrova O. E., Sauer K. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP c-di-GMP Signaling: Methods and Protocols. 2017. C. 33-43.
2. Hamilton R. J., Sewell P. A. Introduction to high performance liquid chromatography. Springer Netherlands, 1982. C. 1-12.
3. Watson J. T., Sparkman O. D. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. John Wiley & Sons, 2007.
4. Загайка А. Л., Александрової К. В. Біохімія: підручник. Видавництво «Форт», 2014. С. 728
5. Kang J. S. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples Tandem Mass Spectrometry—Applications and Principles. 2012. Т. 29. С. 441-92.
6. Guideline I. C. H. H. T. Impurities in new drug substances Q3A (R2) Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland. 2006. Т. 25.
7. Johnson L. N., Noble M. E. M., Owen D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation Cell. 1996. Т. 85. №. 2. С. 149-158.
8. Patra C. et al. Biochemistry, cAMP StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2022.
9. Roskoski Jr R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update Pharmacological research. 2022. С. 106552.
10. Guyton A. C. et al. Textbook of medical physiology. Philadelphia : Saunders, 1986. Т. 548.
11. Götze L. et al. Development and clinical application of a LC-MS/MS method for simultaneous determination of various tyrosine kinase inhibitors in human plasma Clinica Chimica Acta. 2012. Т. 413. №. 1-2. С. 143-149.

- 12.Choudhary A. Editable Pharmaceutical Documents in MS-Word Format Sign. T. 1. №. 2. C. 3.
- 13.Murayama C., Kimura Y., Setou M. Imaging mass spectrometry: principle and application Biophysical reviews. 2009. T. 1. C. 131-139.
- 14.Dunham W. H., Mullin M., Gingras A. C. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies Proteomics. 2012. T. 12. №. 10. C. 1576-1590.
- 15.Wang R., Yin Y., Zhu Z. J. Advancing untargeted metabolomics using data-independent acquisition mass spectrometry technology Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2019. T. 411. C. 4349-4357.
- 16.Kang J. S. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples Tandem Mass Spectrometry–Applications and Principles. 2012. T. 29. C. 441-92.
- 17.Parmar I., Rathod H., Shaik S. A Review: Recent Trends in Analytical Techniques for Characterization and Structure Elucidation of Impurities in the Drug Substances Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2021. T. 83. №. 3. C. 402-415.
- 18.Torino F. et al. Hypothyroidism related to tyrosine kinase inhibitors: an emerging toxic effect of targeted therapy Nature reviews Clinical oncology. 2009. T. 6. №. 4. C. 219-228.
- 19.Alexander S. P. H. et al. The concise guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Enzymes British journal of pharmacology. 2017. T. 174. C. S272-S359.
- 20.Shchemelinin I., Sefc L., Necas E. Protein kinase inhibitors FOLIA BIOLOGICA-PRAHA-. 2006. T. 52. №. 4. C. 137.
- 21.Gabora K. et al. Current evidence on thyroid related adverse events in patients treated with protein tyrosine kinase inhibitors Drug metabolism reviews. 2019. T. 51. №. 4. C. 562-569.
- 22.Shen, X., He, X., Yang, J., Wu, S., & Zhan, H. (2013). *U.S. Patent No. 8,609,842*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

23. Ferguson F. M., Gray N. S. Kinase inhibitors: the road ahead *Nature reviews Drug discovery*. 2018. T. 17. №. 5. С. 353-377.
24. Manning G. et al. The protein kinase complement of the human genome *Science*. 2002. T. 298. №. 5600. С. 1912-1934.
25. Безуглий, П. О., Георгіянц, В. А., Гриценко, І. С., Таран, С. Г., Українець, І. В., Бевз, Н. Ю., ... & Українець, І. В. (2013). Фармацевтичний аналіз.
26. Hoffmann, E. D., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons.
27. Cech, N. B., & Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362-387.
28. Pitt J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009. T. 30. №. 1. С. 19.
29. Niessen, W. M. (2011). Liquid chromatography–mass spectrometry: general principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4087-4091.
30. Guan, F., & Uboh, C. E. (2013). Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and their metabolites. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(9), 1159-1175.
31. Plumb, R., Castro-Perez, J., Granger, J., Beattie, I., Joncour, K., & Wright, A. (2004). Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(19), 2331-2337.
32. Neue, U. D. (2005). *HPLC columns: theory, technology, and practice*. Wiley-VCH.
33. March, R. E., & Hughes, R. J. (2018). A brief history of high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS) and its role in the life

- sciences. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(7-8), 439-447.
34. Swartz, M. E. (2005). UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253-1263.
 35. Guilleme, D., Ruta, J., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2010). New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1069-1082.
 36. Gritti, F., & Guiochon, G. (2012). The current revolution in column technology: how it began, where is it going?. *Journal of Chromatography A*, 1228, 2-19.
 37. Wren, S. A., & Tchelitcheff, P. (2006). Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, 1119(1-2), 140-146.
 38. Desai, D., & Wrona, M. (2011). UPLC: an introduction and review of instrumentation, method development, and applications. *LCGC North America*, 29(5), 474-485.
 39. AUTORŮ K. *European Pharmacopoeia* 8th edition. Council of Europe, Strasbourg, 2014. ISBN 978-92-871-7525-0. C. 809-812.
 40. Wang C. et al. Synthesis of Imatinib by C–N Coupling Reaction of Primary Amide and Bromo-Substituted Pyrimidine Amine *Organic Process Research & Development*. 2019. T. 23. №. 9. C. 1918-1925.

ДОДАТКИ



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



СЕРТИФІКАТ УЧАСНИКА

Цим засвідчується, що

Запорожченко М.В.

Наукові керівники: Георгіянц В.А., Флоренс МакКарті

брав(ла) участь у роботі

XXIX Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету



Алла КОТВИЦЬКА

19-21 квітня 2023 р, м. Харків



Національний фармацевтичний університет

Факультет фармацевтичний
Кафедра фармацевтичної хімії
Ступінь вищої освіти магістр
Спеціальність 226 Фармація, промислова фармація
Освітня програма Фармація

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
фармацевтичної хімії

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ
«24» серпня 2022 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Марини ЗАПОРОЖЧЕНКО

1. Тема кваліфікаційної роботи «Аналітичний супровід розробки нового потенційного АФІ, аналога Іматинібу», керівник кваліфікаційної роботи Вікторія ГЕОРГІЯНЦ, д. фарм. наук., професор, консультант Флоренс Маккарті, затверджений наказом НФаУ від «6» березня 2022 року № 59.
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи квітень 2023 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: дослідити профіль чистоти синтезованої домішки побічного продукту синтезу нового АФІ, аналога іматинібу.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Огляд літератури за темою магістерської роботи, обґрунтування підходів до визначення проміжного продукту синтезу нового АФІ та визначення можливих супутніх домішок
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): 4 таблиці, 40 рисунків.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРИЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Вікторія Георгіянц, завідувачка кафедри фармацевтичної хімії	25.08.2022	25.08.2022
2	Вікторія Георгіянц, завідувачка кафедри фармацевтичної хімії Флоренс Маккарті, викладач (університет Корк, Ірландія)	27.10.2022	27.10.2022
3	Вікторія Георгіянц, завідувачка кафедри фармацевтичної хімії Флоренс Маккарті, викладач (університет Корк, Ірландія)	26.12.2022	26.12.2022

7. Дата видачі завдання: «24» «серпня» 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1.	Огляд літератури	Вересень-жовтень 2022	виконано
2.	Підбір умов для хроматографування досліджуваної речовини методом УЕРХ	Листопад-грудень 2022	виконано
3.	Визначення досліджуваної речовини та можливих її домішок	Січень-лютий 2023	виконано
4.	Оформлення кваліфікаційної роботи	Березень-квітень 2023	виконано

Здобувач вищої освіти

_____ Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО

Керівник кваліфікаційної роботи

_____ Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 59
по Національному фармацевтичному університету
від 06 березня 2023 року

Затвердити тему, керівника та рецензента кваліфікаційної роботи здобувачу вищої освіти денної форми навчання фармацевтичного факультету НФаУ 2023 року випуску:

№ з/п	Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
1.	Запорожченко Марина Валеріївна	Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога іматинібу	Analytical support for the development (synthesis) of the novel imatinib analogue	проф. Георгіянц В. А. консультант dr. Florence McCarty	проф. Перехода Л. О.

ПІДСТАВА: службова записка завідувача кафедри про затвердження теми кваліфікаційної роботи, керівника та рецензента.



Вірно: пров. фахівець деканату

Н. В. Фоменко

ВИСНОВОК

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

№ 112797 від «1» травня 2023 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Запорожченко Марини Валеріївни, 5 курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога іматинібу / Analytical support for the development (synthesis) of the novel imatinib analogue», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копії).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

0%

13%

ВІДГУК

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

Марини ЗАПОРОЖЧЕНКО

**на тему: «Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога
імаїнібу»**

Актуальність теми. На сьогоднішній день, онкологічні захворювання є одними із перших причин смертності у світі, для лікування яких необхідний особливий підхід, це стосується не тільки вже існуючих лікарських засобів, але й створення нових, так як деякі із захворювань мають тенденцію до мутації, та препарати, які були ефективними у минулому, вже не мають такої фармакологічної активності до нових штамів, що спонукає пошук до нових АФІ.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.

Здобувачем вищої освіти було розроблено та обґрунтовано методiku, що може бути використана для контролю якості при синтезі нового АФІ, що є аналогом імаїнібу.

Оцінка роботи. Кваліфікаційна робота виконана на достатньо високому науковому рівні. Під час виконання магістерської роботи Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО брала особисту участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень, набула навичок роботи методом ВЕРХ з застосуванням різних детекторів, інтерпретації результатів хроматографічних досліджень. Результати експериментів статистично оброблені та представлені у роботі у вигляді таблиць та рисунків. Висновки узагальнено, що є логічним завершенням теоретичних та експериментальних досліджень.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Робота здобувачки вищої освіти Марини ЗАПОРОЖЧЕНКО на тему «Аналітичний

супровід розробки (синтезу) нового аналога іматинібу» відповідає всім вимогам, що висуваються до кваліфікаційних робіт, і може бути представлена до захисту до Екзаменаційної комісії.

Науковий керівник

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

«7» квітня 2023р.

РЕЦЕНЗІЯ

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

Марини ЗАПОРОЖЧЕНКО

**на тему: «Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога
імаїнібу»**

Актуальність теми. Автором роботи доведено високу поширеність у світі онкологічних захворювань. Було розглянуто дані, що стосуються ферменту протеїнкінази та її різновидів, а також їх роль у медицині. Одним із видів кіназ є тирозинпротеїнкіназа, що фосфорилує у білках залишки амінокислоти – тирозин, цей фермент відіграє велику роль у прогресуванні онкологічних захворювань. У роботі було наведено перший із інгібіторів цього ферменту - Імаїніб. Недоліком цього препарату є те, що він діє лише на неактивні рецептори протеїнкінази, що не піддалися реакції фосфорилування, іншим із недоліків даного препарату є мутація ферменту. Зазначені недоліки є умовою для створення нових лікарських засобів, з інгібіторною активністю щодо кіназ. Під час синтезу нових АФІ, потрібно проводити аналітичний супровід на всіх етапах його розробки. Тому метою роботи є виявлення проміжного продукту на останньому етапі синтезу та можливих його домішок методом РХ-МС, з огляду на те, що це кінцевий етап синтезу, то виявлені домішки будуть і в головній речовині – АФІ.

Теоретичний рівень роботи. Магістерська робота виконана на високому теоретичному рівні: проведено аналіз джерел наукової літератури щодо фармакологічної активності, застосування у медицині препаратів з інгібіторною активністю щодо ферменту протеїнкінази, шляхи його синтезу та методи дослідження.

Пропозиції автора з теми дослідження. Робота присвячена аналітичному супроводу при синтезі нового АФІ, а саме ідентифікації та визначення

можливих супутніх домішок у проміжному продукту на останній стадії синтезу активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ). В результаті експериментальних досліджень здобувачкою вищої освіти запропоновано методику, яку можна використовувати для аналітичного контролю під час синтезу нового АФІ, що відноситься до інгібіторів ферменту протеїнкінази та є аналогом іматинібу.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.

Одержані під час виконання експериментальних досліджень результати можливо використати при розробці нового АФІ з метою аналітичного контролю якості.

Недоліки роботи. У тексті зустрічаються деякі граматичні помилки та некоректні вирази.

Загальний висновок і оцінка роботи. Кваліфікаційна робота Марини ЗАПОРОЖЧЕНКО за результатами досліджень і виконаному об'ємі може бути представлена до захисту до Екзаменаційної комісії.

Рецензент

проф. Ліна ПЕРЕХОДА

«12» квітня 2023 р.

ПРОТОКОЛ № 10
засідання кафедри фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університету
від 21 квітня 2023 р.

ПРИСУТНІ:

Георгіянець В. А. зав.каф., проф., Власов С. В. проф., Сидоренко Л. В. проф.,
Бевз Н. Ю. доц., Абу Шарк А.І., доц., Гарна Н. В. доц., Грудько В. О. доц.,
Головченко О. С. доц., Горохова О. В. доц., Гриненко В.В. доц., Колісник
О.В. доц., Северіна Г. І. доц., Михайленко О. О. доц., Григорів Г.В. асис.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ: заслухати звіти про стан виконання кваліфікаційних робіт.

СЛУХАЛИ: доповідь здобувача вищої освіти Марини
ЗАПОРОЖЧЕНКО, студентки фармацевтичного факультету на тему:
«Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога іматинібу»,
керівник завідувач кафедри фармацевтичної хімії, д.ф.н. Вікторія ГЕОРГІЯНЦ,
науковий консультант Форенс МАККАРТІ (університет Корку, Ірландія).

УХВАЛИЛИ: рекомендувати кваліфікаційну роботу Марини
ЗАПОРОЖЧЕНКО до офіційного захисту в ЕК.

Голова

Зав. кафедри, доктор фарм. наук, проф. _____ Вікторія ГЕОРГІЯНЦ
(підпис)

Секретар

канд. фарм. наук, доц. _____ Олена КОЛІСНИК

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувачка вищої освіти Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО до захисту кваліфікаційної роботи

за галуззю знань 22 Охорона здоров'я

спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація

освітньою програмою Фармація

на тему: «Аналітичний супровід розробки (синтезу) нового аналога іматинібу»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Микола ГОЛІК /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувачка вищої освіти Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО в процесі роботи розглянула сучасний стан досліджень в області розробки та застосування лікарських засобів, з групи інгібіторів ферменту тирозинкінази. Автором було розроблено та обґрунтовано методику для контролю якості нового АФІ, на проміжному етапі його синтезу. Здобувачка вищої освіти Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО допускається до захисту кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії Національного фармацевтичного університету.

Керівник кваліфікаційної роботи

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

«7»квітня 2022 року

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувачка вищої освіти Марина ЗАПОРОЖЧЕНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри
Фармацевтичної хімії

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

«21» квітня 2022 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії

«13» червня 2023 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,
доктор фармацевтичних наук, професор

_____ /Лена ДАВТЯН/