

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУЧАСНИХ МЕТОДІВ
АНАЛІЗУ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ З ГРУПИ
НУКЛЕОЗИДНИХ АНАЛОГІВ – СОФОСБУВІР ТА ЗИДОВУДИНУ»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи Фс18(5.5з)-01а
спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Діана АВЕТИСЯН

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

Рецензент: доцент ЗВО кафедри фармацевтичної хімії,
к.фарм.н., доц. **Наталія БЕВЗ**

АНОТАЦІЯ

У роботі проводиться огляд сучасних літературних джерел для визначення ключових характеристик софосбувіру та зидовудину. Обрано та систематизовано методи аналізу, зокрема хроматографію, мас-спектрометрію, ЯМР, інфрачервону та УФ-спектроскопію, які є основними інструментами для вивчення структури та властивостей обраних протівірусних аналогів. Робота викладена на 59 сторінках, включає 6 таблиць, 9 рисунків, 50 джерел літератури.

Ключові слова: протівірусні препарати, нуклеозидні аналоги, аналітичні методи, фізико-хімічний аналіз, хроматографія, мас-спектрометрія, ЯМР, інфрачервона спектроскопія, УФ-спектроскопія.

ANNOTATION

The paper reviews modern literary sources to determine the key characteristics of sofosbuvir and zidovudine. Methods of analysis were selected and systematized, in particular, chromatography, mass spectrometry, NMR, infrared and UV spectroscopy, which are the main tools for studying the structure and properties of selected antiviral analogues. The work is laid out on 50 pages, includes 6 tables, 9 figures, and 49 literature sources.

Key words: antiviral drugs, nucleoside analogues, analytical methods, physicochemical analysis, chromatography, mass spectrometry, NMR, infrared spectroscopy, UV spectroscopy.

ЗМІСТ

	С.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ	6
1.1. Загальна характеристика противірусних лікарських засобів: виникнення, класифікація, хімічна структура	6
1.2. Фармакологічні аспекти софосбувір	9
1.3. Фармакологічні аспекти зидовудину	14
Висновки до розділу 1	21
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Об'єкти досліджень	22
2.2. Методи досліджень	30
Висновки до розділу 2	34
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ З ГРУПИ НУКЛЕОЗИДНИХ АНАЛОГІВ	35
3.1 Огляд аналітичного визначення софосбувір	35
3.2 Огляд аналітичного визначення зидовудину	44
Висновки до розділу 3	58
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	60

ВСТУП

Актуальність теми. За останні роки велика увага була приділена розробці та впровадженню нових противірусних препаратів, зокрема з групи нуклеозидних аналогів. Софосбувір і зидовудин є представниками цієї групи і є ключовими в лікуванні хвороб, таких як гепатит С і ВІЛ/СНІД, COVID-19.

Фармацевтична галузь нині переживає період інтенсивного розвитку, що включає в себе впровадження новітніх технологій та покращення аналітичних методів. Розуміння особливостей аналізу противірусних препаратів, таких як софосбувір та зидовудин, стає ключовим фактором для забезпечення якості та ефективності лікарських засобів.

Значущість порівняльного аналізу методів полягає у визначенні оптимальних стратегій аналізу цих складних речовин. Технології хімічного та фізичного аналізу, мас-спектрометрія, ядерний магнітний резонанс, інфрачервона та УФ-спектроскопія – це лише кілька із важливих методів, які можуть бути використані для детального вивчення структури та характеристик цих препаратів.

Важливим аспектом є також аналіз безпеки та можливостей виникнення резистентності до противірусних препаратів. Порівняльне дослідження методів може допомогти визначити параметри безпеки та виявити можливість розвитку резистентності, що має ключове значення для подальшого удосконалення терапій.

У практичному плані, отримані результати можуть бути використані для вдосконалення виробництва та контролю за якістю противірусних препаратів, що вплине на їхню ефективність та сприятиме підвищенню довіри до цих лікарських засобів в медичній практиці. Такий підхід є важливим кроком у забезпеченні високого стандарту лікування вірусних інфекцій та розвитку сучасної фармацевтики.

Мета дослідження є вивчення літературних даних щодо методик ідентифікації та кількісного визначення противірусних препаратів групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудин.

Завдання дослідження:

- аналіз фармакологічного спектру протівірусних препаратів групи нуклеозидних аналогів;
- визначити основні фізико-хімічні та аналітичні характеристики, зокрема софосбувіру та зидовудину;
- провести огляд літератури щодо сучасних методів аналізу протівірусних препаратів обраних препаратів;
- дослідити вплив різних факторів, таких як умови аналізу, хімічна стабільність та інші, на точність та надійність результатів

Матеріали даної роботи викладені у відповідності з поставленими задачами.

Об'єкт дослідження. Методики ідентифікації та кількісного визначення лікарських засобів, препаратів групи нуклеозидних аналогів.

Предмет дослідження. Субстанції та лікарські форми протівірусних препаратів групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудин.

Методи дослідження. Провести докладний аналіз наукових публікацій та статей, що стосуються фізико-хімічних та аналітичних методів аналізу протівірусних препаратів, зокрема софосбувіру та зидовудину.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження дозволять вибрати та оптимізувати методи аналізу, що сприятиме підвищенню якості та ефективності протівірусних препаратів.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається із вступу, трьох розділів, загальних висновків та списку використаних літературних джерел, що має у своєму складі 50 джерел. Зміст роботи викладений на 59 сторінках машинописного тексту і містить 6 таблиць, 9 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

1.1. Загальна характеристика противірусних лікарських засобів: виникнення, класифікація, хімічна структура

З 1972 року по сьогоднішній день було ідентифіковано понад 50 нових вірусів як етіологічні агенти захворювань людини [1]. Ці нові вірусні захворювання вимагали більш складних лікарських засобів, але процес розробки цих стратегій до цього моменту був повільним і повним перешкод. [1].

Противірусна терапія просувалася невеликими темпами, на відміну від антибіотиків, які за 30 років досягли прогресивної терапевтичної стадії. 34 роки минуло від опису антибактеріальної молекули сальварсану, «чарівної кулі», Ельріхом у 1910 році [2] до відкриття пеніциліну Флемінгом у 1929 році [3] до опису Домагком пронтозилу, попередника сульфонамідів у 1935 році [4] та виділення стрептоміцину, хлорамфеніколу, еритроміцину та тетрацикліну Ваксманом у 1944 році [5]. Проте знадобилося майже 60 років, щоб противірусні розробки досягли свого нинішнього статусу ефективності. Еволюція лікування гепатиту С є гарним прикладом того, наскільки складною може бути розробка противірусних препаратів і як комбінована та специфічна цільова противірусна терапія виявилася найкращим підходом для лікування вірусних захворювань [5,6].

Вірусні епідемії та пандемії стимулювали розробку відомих і відкриття нових противірусних засобів. Близько сотні моно- та комбінованих противірусних препаратів вже схвалено, а тисячі знаходяться в розробці [6].

Протягом останніх десятиліть було схвалено більше 100 противірусних засобів або їх комбінацій для лікування 9 інфекційних захворювань людини: ВІЛ, ВГС, вірус грипу, респіраторно-синцитіальний вірус, вірус простого герпесу, цитомегаловірус людини, вірус гепатиту і вірус натуральної віспи

(віспи людини). Протівірусні лікарські засоби можна класифікувати на основі їх хімічної структури, мішеней для ліків або механізмів дії [6,7]. Наприклад, більшість протівірусних засобів націлені або на вірусні ферменти, щоб блокувати реплікацію вірусу, або на поверхневі білки вірусу, щоб запобігти проникненню вірусу. Що стосується механізмів дії, аналоги нуклеозидів є ефективними інгібіторами вірусної полімерази, які нагадують природні нуклеозиди, щоб викликати припинення зароджуваного ланцюга вірусної ДНК, тоді як інгібітори протеази блокують протеолітичний процесинг, конкуруючи з пептидами-субстратами протеази. Виходячи з хімічної структури, ацикловір і валацикловір класифікуються як ациклічні аналоги гуанозину для лікування ДНК-вірусів, таких як вірус герпесу і вірус вітряної віспи, тоді як цидофовір, адефовір, тенофовіру алафенамід є ациклічними нуклеозидфосфонатними аналогами для лікування цитомегаловірус людини, вірус гепатиту і ВІЛ відповідно [6,7,8].

Термін «нуклеозид» вперше використали Левен і Джейкобс (1909) [7]. Нуклеозид складається з цукрового фрагмента та нуклеооснови, тоді як нуклеотид складається з цукру, нуклеооснови та принаймні однієї фосфатної (або фосфатоподібної) групи. Як нуклеозиди, так і нуклеотиди відіграють важливу роль у реплікації та транскрипції генетичної інформації, і як такі десятиліттями використовуються для хіміотерапії, антипаразитарної, антибактеріальної та протівірусної терапії [5, 6, 7, 8]. В ідеалі аналог нуклеозиду/тиду міг би імітувати структуру природного нуклеозиду настільки, щоб його розпізнали клітинні або вірусні ферменти та включили в цикл реплікації ДНК або РНК, однак ці аналоги мали б одну або більше модифікацій, які потім призводили б до порушення та/або припинення реплікації [7, 8]. Протягом багатьох років було зроблено численні модифікації каркасу нуклеозид(т)ідів, включаючи зміни цукру, нуклеооснови, глікозидного зв'язку та фосфатної групи. Ці модифікації варіюються від додавання замісника або групи до гетероциклічної основи або цукру, заміни атома в будь-якій частині, шляхом переміщення атома в інше положення або

комбінації цих підходів [8]. Зовсім недавно дослідники застосували останню, використовуючи комбінацію багатьох різних типів модифікацій, що призвело до розробки широкого спектру потужних нуклеозидних терапевтичних засобів зі складною структурою [8, 9].

Аналоги нуклеотидів і нуклеозидів мають подібну структуру, яка діє як антиметаболіти. Нуклеотидні інгібітори складаються з фосфатних груп, цукру та аналога нуклеїнової кислоти з одним-трьома фосфатами [8]. Нуклеозидні інгібітори складаються з цукру та аналога нуклеїнової кислоти. Обидва інгібітори використовуються в противірусних продуктах і терапевтичних препаратах для пригнічення реплікації вірусу в інфікованих клітинах [6]. Ефективність нуклеотидних аналогів була підтверджена як *in vitro*, так і *in vivo* проти різних ретровірусів і ДНК-вірусів [7]. За структурою нуклеотидні аналоги також відомі як ациклічні нуклеозидфосфонати (нуклеозидмонофосфати). Він запобігає першому етапу фосфорилювання, який необхідний для активації аналогів нуклеозидів, включаючи ламівудин, аденозин, ставудин, абакавір і зидовудин [8]. Аналоги нуклеозидів є початковим класом противірусних засобів, які зазвичай використовуються в терапії вірусу простого герпесу, вірусу імунodefіциту людини, цитомегаловірусної інфекції, вітряної віспи, гепатиту В та С віруси [9]. Аналоги нуклеозидів схожі на природні нуклеотиди, які завершуються ланцюгом ДНК. Насамперед, ці агенти безпечні та добре переносяться, використовуються вірусом, але не людськими полімеразами в реплікації ДНК [10]. Аналоги нуклеозидів є основними агентами, в яких доступні кілька препаратів проти раку та бактеріальних антибактеріальних засобів [11]. Нуклеотидні та нуклеозидні аналоги є значущими противірусними агентами, які інгібують полімерази та демонструють клінічну ефективність. В даний час вони використовуються для лікування простого герпесу, гепатиту В і ВІЛ-1 [12]. Аналіз реплікації коронавірусу, вірусу гепатиту С, дії вірусних інгібіторів і молекулярних структур показав, що Софосбувір трифосфат діє як ефективний інгібітор SARS-CoV-2 [13]. Попереднє дослідження вказує на те,

що Софосбувір, Ремдесивір, Рибавірин, Тенофовір і Галідесивір можуть проявляти інгібіторну дію проти SARS-CoV-2 [14]. Ці аналоги не були детально задокументовані як агенти проти агентів вірусу гепатиту та вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Крім того, вони знаходяться на різних етапах тестування, наприклад на доклінічній фазі, виключені з випробувань або схвалені як ліки. Знання, отримані за допомогою різних шляхів метаболізму, показують, що майбутні нуклеотидні проліки будуть більш інклюзивними. Це буде або комбінація існуючих ліків, або препаратів, націлених на тканини, з одним або декількома проліками проти кількох вірусних інфекцій. Відкриття нуклеотидних/нуклеозидних препаратів було видатним науковим підходом за останні 15 років [15]. Це може виступати як фундаментальна мішень для розробки нуклеотидних/нуклеозидних проліків у майбутньому.

1.2. Фармакологічні аспекти софосбувір

Софосбувір (відомий як PSI-7977) був представлений фармацевтичною компанією Pharmasset Ltd у 2010 році [16].

Софосбувір (торгова назва Sovaldi) – це противірусний препарат прямої дії, який використовується як частина комбінованої терапії для лікування хронічного гепатиту С, інфекційного захворювання печінки, викликаного інфекцією вірусу гепатиту С – це одноланцюговий РНК-вірус, який поділяється на дев'ять різних генотипів, вражає 72% усіх пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С [17].

З 2011 року варіанти лікування хронічного гепатиту С значно вдосконалилися з розробкою противірусних препаратів прямої дії, таких як софосбувір. Як проліки нуклеотидний аналог, Софосбувір метаболізується у свою активну форму як противірусний агент 2'-дезоксид-2'-α-фтор-β-С-метилуридин-5'-трифосфат (також відомий як GS-461203), який діє як дефектний субстрат для синтезу NS5B (неструктурного білка 5B). NS5B, РНК-

залежна РНК-полімераза, необхідна для транскрипції РНК вірусу гепатиту С, а також для її високої швидкості реплікації та генетичного різноманіття [18].

Таким чином, Софосбувір та інші протівірусні засоби прямої дії є дуже потужними варіантами лікування гепатиту С, оскільки вони виявляють високий бар'єр для розвитку резистентності [19]. Це важлива перевага порівняно з препаратами проти вірусного гепатиту С, які націлені на інші вірусні ферменти, такі як протеаза, для яких швидкий розвиток резистентності виявився важливою причиною терапевтичної невдачі.

Софосбувір рекомендують як терапію першої лінії в комбінації з іншими протівірусними препаратами для всіх шести генотипів гепатиту С [20]. Залежно від генотипу софосбувір часто використовується в комбінації з іншими протівірусними препаратами, такими як ледіпасвір, велпатасвір, даклатасвір, симепревір, ельбасвір, гразопревір, рибавірин, пегінтерферон альфа-2а або пегінтерферон альфа-2b, з метою лікування або досягнення стійкої вірусологічної відповіді, після 12 тижнів щоденної терапії [19].

Лікування протівірусними препаратами прямої дії, такими як софосбувір пов'язані з мінімальними побічними ефектами, найпоширенішими з яких є головний біль і втома. Відсутність значних побічних ефектів і коротка тривалість терапії є значною перевагою порівняно зі старішими схемами на основі інтерферону та рибавірину, які були обмежені реакціями в місці інфузії, зниженням кількості крові та нейропсихіатричними ефектами [20].

З 2014 року софосбувір доступний у вигляді комбінованого продукту з фіксованою дозою та ледіпасвіром (торгова назва Harvoni), який використовується для лікування хронічного гепатиту С [19, 20]. Софосбувір також доступний у вигляді комбінованого продукту з фіксованою дозою з Велпатасвіром у вигляді комерційно доступного продукту Epclusa. Вперше схвалений у червні 2016 року Epclusa є першим комбінованим препаратом проти гепатиту С, показаним для лікування всіх генотипів гепатиту С з цирозом або без нього.

АТС класифікація [21].

J – Протимікробні лікарські засоби для системного використання

J05 – Антивірусні препарати для системного застосування

J05A – Антивірусні препарати прямої дії

J05AX – Інші антивірусні препарати

J05AX15 – Софосбувір

Спосіб застосування та дози.

«Совальді» доступний у формі жовтої таблетки у формі капсули, вкритої плівковою оболонкою. 1 таблетка містить 200 / 400 мг софосбувіру.

Рекомендована доза софосбувір становить одну таблетку 400 мг, яку приймають перорально один раз на день з їжею або без їжі [15].

Софосбувір слід застосовувати в комбінації з рибавірином або в комбінації з пегільованим інтерфероном і рибавірином. Тривалість лікування складає 12 тижнів. Софосбувір у комбінації з рибавірином протягом 24 тижнів можна розглядати як терапевтичний варіант для пацієнтів із вірусним гепатитом С з інфекцією генотипу 1, які не мають права отримувати схему на основі інтерферону. Пацієнти з гепатоцелюлярною карциномою, які очікують трансплантації печінки софосбувір у комбінації з рибавірином рекомендовано протягом 48 тижнів або до моменту трансплантації печінки, для запобігання реінфекції гепатиту С після трансплантації [10, 11].

Зниження дози «Совальді» не рекомендується.

Генотип 1 і 4, якщо у пацієнта спостерігається серйозна побічна реакція, потенційно пов'язана з пегінтерфероном альфа та/або рибавірином, дозу пегінтерферону альфа та/або рибавіріну слід зменшити або припинити прийом [13].

Генотип 2 і 3, якщо у пацієнта спостерігається серйозна побічна реакція, потенційно пов'язана з рибавірином, дозу рибавіріну слід змінити або припинити, якщо це необхідно, доки побічна реакція не зникне або не зменшиться її тяжкість [14].

Фармакологічні властивості.

Фармакокінетика

Було проведено кілька досліджень фармакокінетики софосбувіру [7, 12, 13], деякі з них ще тривають [15, 16, 17] – окремо та в комбінації з іншими препаратами. Софосбувір має сприятливий фармакокінетичний профіль, ефективний перорально у вигляді одноразової добової дози; це, ймовірно, покращить комплаєнс порівняно з інгібіторами протеази (при багаторазовому пероральному прийомі добових доз і парентеральному введення). Після перорального введення софосбувір всмоктувався з максимальною концентрацією в плазмі, яка спостерігалася через ~0,5-2 години після-дози, незалежно від рівня дози. Пікова концентрація у плазмі спостерігалася через 2-4 години після прийому дози [16].

Вплив їжі. Порівняно з умовами голодування введення одноразової дози софосбувір зі стандартизованою їжею з високим вмістом жиру суттєво не вплинуло на C_{\max} софосбувіру. Тому софосбувір можна застосовувати незалежно від їжі.

Метаболічна активація проліків відбувається за допомогою ферментів, присутніх у печінці людини [18]. Системна експозиція >90% зумовлена метаболітом GS-331007 (раніше PSI-6206), який також має довші t_{\max} і $t_{1/2}$ виведення, ніж софосбувір [15, 16, 17].

Фармакодинаміка.

Софосбувір приблизно на 61-65% зв'язується з білками плазми людини. Кінцевий період напіввиведення 0,4 години.

У дозі, що втричі перевищує рекомендовану дозу, софосбувір не подовжує інтервал QTc до будь-якої клінічно значущої міри [17].

Софосбувір виводиться трьома шляхами: із сечею (80%), калом (14%) і диханням (2,5%); однак виведення через нирки є основним шляхом [18].

Софосбувір, як монопрепарат, має дуже слабку токсичність. Найчастішими побічними реакціями є головний біль і втома. Наразі FDA попереджає про ризик симптоматичної брадикардії, коли Epclusa використовується в комбінації з аміодароном.

Метаболізм

Вірус гепатиту С є одноланцюговим РНК-вірусом, і його відкрита рамка зчитування кодує десять структурних білків (вірусний капсид і оболонка) і неструктурних білків (необхідних для реплікації вірусу). NS5B є одним із неструктурних білків, необхідних для реплікації вірусної РНК, і було встановлено, що він є цінною мішенню для протівірусних агентів прямої дії (ПППД) [19]. Аналог уридину нуклеотиду софосбувір є проліками фосфорамідату, який повинен трифосфорилуватися в клітинах, щоб діяти. Ферменти, необхідні для його активації, присутні в клітинах печінки людини, тому він перетворюється на свій активний метаболіт під час метаболізму першого проходження безпосередньо в бажаному місці дії: печінці [5]. Метаболічний шлях для активації проліків [15, 20]. Дослідження *in vitro* на мікосомах печінки людини показали, що софосбувір є ефективним субстратом для катепсину А і карбоксилестерази 1. Софосбувір розщеплювався катепсином А та карбоксилестеразою 1, а наступні етапи активації включали видалення амінокислот білком 1, що зв'язує нуклеотид гістидинової тріади і фосфорилування уридинмонофосфат-цитидинмонофосфат-кіназою і нуклеозиддифосфат-кіназою. Дані *in vitro* показали, що катепсину А переважно гідролізував софосбувір (S-діастереомер), тоді як карбоксилестерази 1 не виявляв стереоселективності [19, 20, 21]. Потім цей аналог імітує фізіологічний нуклеотид і конкурентно блокує полімеразу NS5B, таким чином інгібуючи синтез РНК вірусного гепатиту С шляхом обриву ланцюга РНК [15, 16]. Каталітичний сайт ферменту також є висококонсервативним для всіх генотипів вірусного гепатиту С, що пояснює пангенотипову ефективність софосбувіру [16].

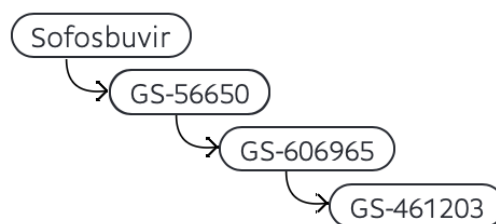


Рис. 1.1. Метаболізм софосбувір

1.3. Фармакологічні аспекти зидовудину

Зидовудин – нуклеозидний аналог, який використовується для лікування та профілактики ВІЛ-інфекції у дорослих і дітей із середини 1980-х років. Зидовудин широко використовується в комбінації з іншими антиретровірусними препаратами. В даний час він показаний для лікування ВІЛ-позитивних вагітних жінок і для запобігання передачі інфекції від матері до дитини.

Зидовудин спочатку був синтезований у 1960-х роках як можливий протираковий засіб, але виявився неефективним. Відомо, що зидовудин не є природним продуктом. У 1985 році було виявлено, що він активний проти ВІЛ-1 *in vitro* [21]. Він був схвалений як перший засіб проти ВІЛ у 1987 році та залишається широко призначаним основою терапії ВІЛ. Зидовудин має адитивну або синергетичну дію майже з усіма іншими антиретровірусними препаратами, за винятком хімічно спорідненого ставудину (3',5'-дидегідродідокситимідину), з яким він є антагоністом. Зидовудин сам по собі забезпечує лише тимчасову користь [21,22] через розвиток генотипічних змін у вірусі, що призводить до відносної стійкості до зидовудину. Тривале застосування зидовудину як частини схеми, яка не пригнічує реплікацію ВІЛ, може призвести до відбору штамів ВІЛ, які містять мутації, які створюють широку перехресну резистентність до всіх нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази [22].

Зидовудин (3'-азидо-3'-дезокситимідин) наразі схвалений Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) для терапії інфекції, викликаної вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ). Інші схвалені FDA антиретровірусні засоби включають дідезоксинозид, дідезоксицитидин і ставудин [21]. Зидовудин, аналог тимідину, пригнічує розмноження вірусу імунодефіциту людини. Незважаючи на те, що спочатку зидовудин дуже ефективний у сповільненні прогресування синдрому набутого імунодефіциту, переваги зидовудину тимчасові, і з часом пацієнт піддається опортуністичним

інфекціям, характерним для СНІДу [22]. Дослідження пацієнтів із пізньою стадією ВІЛ продемонстрували, що лікування зидовудином призводить до подовження виживаності, зниження частоти опортуністичних інфекцій, покращення енцефалопатії (як у дорослих, так і у дітей) і зниження Т-клітинної лейкоїї у дорослих (у комбінації з інтерфероном- α). Важливо, що зидовудин проникає через плаценту залежно від концентрації, і було чітко продемонстровано значне зниження вертикальної передачі ВІЛ до плоду. Побічні реакції добре описані та пов'язані з дозою та стадією захворювання. Найбільш помітно, що анемія та нейтропенія ускладнюють терапію. Анемія найчастіше виникає протягом перших 3 місяців лікування препаратом, тоді як нейтропенія може виникнути рано або пізно. Крім того, анемія може також виникнути у новонароджених, коли зидовудин використовується для запобігання вертикальній передачі [22,23].

Зидовудин часто включають у різноманітні високоактивні антиретровірусні схеми, такі як ламівудин та індинавір (інгібітор протеази), ламівудин та невірапін або ефавіренз, а також ламівудин та абакавір [23]. Зидовудин плюс диданозин є однією з найпотужніших, широко вивчених нуклеозидних схем [22], хоча він не перевершує диданозин плюс 3',5'-дидегідрокси-дидезокситимидин.

АТС класифікація [22].

J – Протимікробні лікарські засоби для системного використання

J05 – Антивірусні препарати для системного застосування

J05A – Антивірусні препарати прямої дії

J05AR – Протівірусні засоби для лікування ВІЛ-інфекції, комбінації

J05A R01 – Зидовудин і ламівудин



Рис. 1.2. Лікарських форма зидовудину

Спосіб застосування та дози.

Зидовудин застосовують всередину і внутрішньовенно; однак ін'єкційний склад не є легкодоступним.

Лікування ВІЛ-інфекції (не використовувати як монотерапію)

Пероральне дозування для дорослих [10]: 300 мг двічі на день

Педіатричне пероральне дозування [11]:

- Від 4 до < 9 кг: 12 мг/кг двічі на день
- ≥ 9 до <30 кг: 9 мг/кг двічі на день
- ≥ 30 кг: 300 мг двічі на день

Профілактика перинатальної передачі ВІЛ-1 під час пологів

Монотерапія зидовудином зараз вважається субоптимальною.

В/в: навантажувальна доза 2 мг/кг протягом 1 години з наступною безперервною інфузією 1 мг/кг/год.

Непрофесійна постконтактна профілактика ВІЛ-1 [16].

Перорально: 300 мг двічі на день у комбінації з іншими антиретровірусними засобами протягом 28 днів [17].

Механізм дії

Зидовудин, структурний аналог тимідину, є проліками, які повинні бути фосфорильовані до свого активного 5'-трифосфатного метаболіту, зидовудину трифосфату. Він пригнічує активність зворотної транскриптази ВІЛ-1 через розрив ланцюга ДНК після включення нуклеотидного аналога. Він конкурує з

природним субстратом dGTP і вбудовується у вірусну ДНК. Він також є слабким інгібітором клітинної ДНК-полімерази α і γ [19,20,21].

Фармакокінетика

Фармакокінетика зидовудину була детально розглянута та узагальнена [23], і спостерігалися значні між- та внутрішньоіндивідуальні варіації. Пікові концентрації зидовудину в плазмі після прийому дози 200 мг, як повідомляється, становлять 3,2-10,8 мкмоль/л [0,86–2,9 мг/л] і досягаються через 30–60 хв [24]. Період напіввиведення препарату з плазми становить приблизно 1 годину, а швидкість кліренсу становить 5-12,5 л/год [23]. В одному дослідженні за участю ВІЛ-негативних осіб, яким внутрішньовенно вводили зидовудин у дозі 2,5 мг/кг маси тіла, інтегрована площа під кривою концентрація в плазмі/час становила 22% від загальної для зидовудину, 72% для 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О- α -D-глюкопіранозилтимідину та 5% для 3'-аміно-3'-дезокситимідину, а час напіввиведення становив 1,2 години для зидовудину, 1,7 години для 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О- α -D-глюкопіранозил-тимідин і 2,7 години для 3'-аміно-3'-дезокситимідину [22]. Повідомлялося, що швидкість ниркового кліренсу становить приблизно 12 л/год для зидовудину та 18 л/год для 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О- α -D-глюкопіранозил-тимідину [23]. Ці показники знижені у пацієнтів із порушенням функції нирок [22,23]. У пацієнтів із нормальною функцією нирок і печінки фармакокінетика зидовудину подібна після першої дози та протягом тривалого дозування [24], але значні зміни можуть відбутися за наявності порушень функції печінки чи нирок [24]. Повідомлялося про фармакокінетику зидовудину в цереброспінальній рідині [25]; препарат повільно проникає у спинномозкову рідину, пік концентрації досягався через 2 години, площа під кривою становила приблизно 75% від площі в плазмі, а період напіввиведення становив приблизно 3 години.

Швидке та майже повне всмоктування з шлунково-кишкового тракту після перорального прийому; однак через метаболізм першого проходження системна біодоступність капсул і розчину зидовудину становить приблизно 65% (діапазон від 52 до 75 %) і розподіляється в клітинах шляхом пасивної

дифузії [22,23,24]. Препарат розподіляється по всьому тілу і був виявлений у плазмі, слині, спермі, грудному молоці та спинномозковій рідині, хоча концентрація в останній може становити лише 15% від концентрації в плазмі [24].

Біодоступність у новонароджених віком до 14 днів становить приблизно 89 % і знижується приблизно до 61 % і 65 % у новонароджених старше 14 днів і дітей віком від 3 місяців до 12 років відповідно. Застосування разом із їжею з високим вмістом жиру може зменшити швидкість і ступінь всмоктування. Період напіввиведення внутрішньовенне введення 1,1 години (діапазон 0,5 – 2,9 години) [25].

Фармакодинаміка.

Зидовудин є нуклеозидним інгібітором зворотної транскриптази (НІЗТ), активним проти вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1). Зидовудин фосфорилується до активних метаболітів, які конкурують за включення у вірусну ДНК. Вони конкурентно пригнічують фермент зворотної транскриптази ВІЛ і діють як термінатор ланцюга синтезу ДНК. Відсутність 3'-ОН групи у включеному нуклеозидному аналогу запобігає утворенню 5'-3' фосфодієфірного зв'язку, необхідного для подовження ланцюга ДНК, і, отже, ріст вірусної ДНК припиняється [18,20,23].

Метаболізм

Зидовудин метаболізується в основному трьома окремими шляхами, і близько 95% загальної дози виводиться із сечею, причому 15-20% у незміненому вигляді [24]. Основним шляхом є глюкуронізація першого проходження з виведенням нирками, що призводить до елімінації приблизно 65-75 % загальної дози. Метаболіт глюкуроніду в сечі, 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О- α -D-глюко-піранозил-тимідин, утворюється під дією уридин-5'-дифосфоглюкуронілтрансферази. У плазмі та сечі співвідношення 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О- α -D-глюкопіранозил-тимідин:зидовудин зазвичай становить 3 або 4, хоча повідомлялося про великі міжіндивідуальні варіації [25].

Другий шлях метаболізму – печінковий. Метаболізується шляхом кон'югації глюкуроніду до основного неактивного метаболіту, 3'-азидо-3'-дезоксид-5'-О-бета-D-глюкопірануронозилтимідину. UGT2B7 є основною ізоформою UGT, яка відповідає за глюкуронізацію. Порівняно зі зидовудиним площа глюкопірануронозилтимідину під кривою приблизно в 3 рази більша. Ізоферменти цитохрому P450 відповідають за відновлення азидофрагмента з утворенням 3'-аміно-3'-дезокситимідину [23,25].

Основний шляхом виведення був метаболізм до глюкопірануронозилтимідину. Після внутрішньовенного введення близько 29% дози виводилося з сечею в незміненому вигляді, а близько 45 % дози виводилося у вигляді глюкопірануронозилтимідину [25].

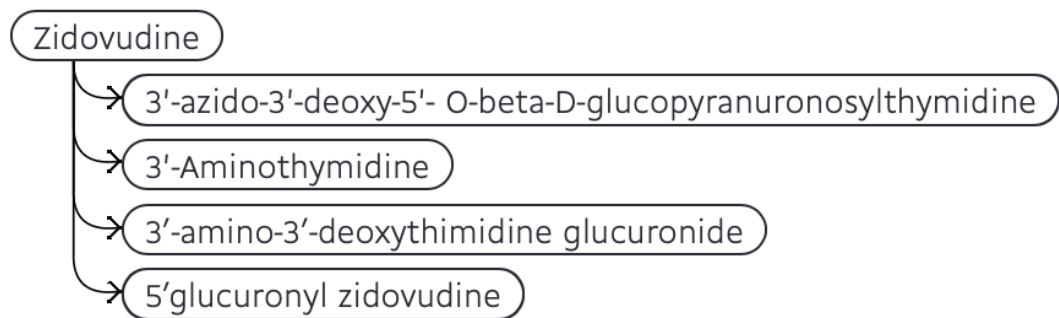


Рис. 1.3. Метаболізм зидовудину

Передозування. Симптоми передозування включають втому, головний біль, нудоту та блювання. Основним токсичним ефектом є дозозалежне пригнічення кісткового мозку, що призводить до анемії та лейкопенії [20].

Побічні ефекти. Зидовудин має високу частоту кількох побічних ефектів, що обмежує його використання [4].

Побічні ефекти включають:[4][7][19][21]

- Нудота/блювання (від 18,8 до 89%)
- Діарея (від 7 до 78%)
- Головні болі (від 15 до 38%)
- міалгії
- Безсоння

- Пригнічення кісткового мозку (повідомляється про 45%)
- Периферична міопатія
- Підвищений рівень печінкових ферментів
- Лактоацидоз
- Гепатотоксичність

Тривале лікування зидовудином може спричинити помірне підвищення рівня печінкових ферментів. Підвищення рівня печінкових ферментів не потребує коригування дози, оскільки у більшості випадків підвищення є безсимптомним і тимчасовим. Рідкісні випадки гострого холестатичного гепатиту, важкої гострої жирової дистрофії печінки з лактоацидозом і нециротичної портальної гіпертензії. Певну гепатотоксичність пояснюють зидовудином, який спричиняє інгібування мітохондріальної гамма-полімерази, що призводить до виснаження та дисфункції мітохондрій [18].

Пригнічення кісткового мозку, що спостерігається при застосуванні зидовудину, включає нейтропенію, лейкопенію та анемію. Повідомлялося, що анемія, що вимагає переливання крові, досягає 19,7% при застосуванні зидовудину [19]. Анемія та нейтропенія зазвичай оборотні після припинення прийому зидовудину [10].

Зидовудин протипоказаний пацієнтам із тяжкими небезпечними для життя реакціями гіперчутливості на цей препарат, включаючи анафілаксію та синдром Стівенса-Джонсона. Анафілаксія може супроводжуватися затрудненим диханням, дифузним висипом і гіпотензією. Синдром Стівенса-Джонсона – це дуже хворобливий стан шкіри, у якому утворюються пухири. Негайне припинення терапії зидовудином має вирішальне значення, якщо виникає будь-який із цих симптомів [24].

Висновки до розділу 1

У цьому розділі детально розглядаються фармакологічні властивості, особливості фармакокінетики та фармакодинаміки блокаторів кальцієвих каналів, зокрема софосбувір та зидовудину.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Совальді – торгова марка софосбувіру, інгібітора нуклеотидного аналога полімерази [2].

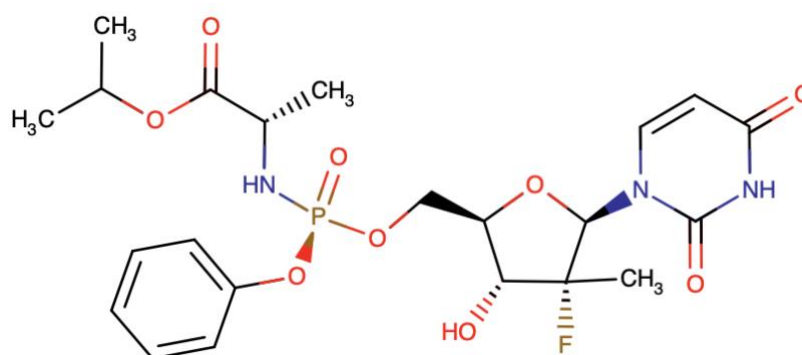


Рис. 2.1. Структура Софосбувіру – (S)-ізопропіл 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-діоксо-3,4-дигідропіримідин-1(2H)-іл)-4-фтор-3-гідрокси-4-метилтетрагідрофуран-2-іл)метокси)-(фенокси)фосфориламіно)пропаноат [5].

Молекулярна формула $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$ і молекулярну масу 529,45. Він має наступну структурну формулу [5,6].

Структура Софосбувіру була однозначно підтверджена даними ЯМР 1H , ^{13}C , ^{31}P і ^{19}F , УФ-спектроскопії, ІЧ-спектроскопії, мас-спектрометрії, елементного аналізу та рентгенівської кристалографії монокристалів [17].

Софосбувір являє собою негігроскопічну тверду речовину від білого до майже білого кольору, слабо розчинну у воді (рН 1,2-7,7), добре розчинну в етанолі та ацетоні, розчинну в 2-пропанолі та нерозчинну в гептані [18].

Софосбувір є хіральним і має 6 стереогенних центрів. Енантіомерну чистоту в проміжних продуктах синтезу контролюють за допомогою хіральної ВЕРХ. Софосбувір проявляє поліморфізм. Було виявлено вісім поліморфних форм софосбувіру, і процес виробництва постійно виробляє софосбувір як найбільш термодинамічно стабільну поліморфну форму, яка може містити невелику кількість метастабільної форми, яка була визначена як

фармацевтично еквівалентна. Тому вважалось прийнятним не контролювати присутність метастабільної форми в діючій речовині відповідно до ІСН [19].

Виготовляється як термодинамічно стабільна несольватована поліморфна форма II. Відомо декілька поліморфів (несольватовані та сольватовані форми). Потрібна форма контролюється за допомогою диференціальної скануючої колориметрії [26].

Софосбувір є слабкою кислотою з рКа 9,3. Він вважається добре розчинним відповідно до критеріїв Біофармацевтичної класифікаційної системи у водних розчинах з рН 2-7,7 (~2 мг/мл) [26].

Специфікації лікарської речовини включають обмеження 0,5% для кожної із зазначених домішок і обмеження 0,15% для окремих невизначених домішок [26].

Кожна таблетка містить 200 / 400 мг софосбувіру. До складу таблеток входять наступні неактивні інгредієнти: колоїдний діоксид кремнію, натрію кроскармелоза, магнію стеарат, маніт і мікрокристалічна целюлоза. Таблетки вкриті плівковою оболонкою, що містить такі неактивні інгредієнти: поліетиленгліколь, полівініловий спирт, тальк, діоксид титану та жовтий оксид заліза [26,27].

Синтез

Софосбувір синтезується в шість стадій синтезу з використанням трьох чітко визначених вихідних матеріалів із прийнятними характеристиками. Під час процедури заявник також запровадив альтернативний виробничий процес на додаток до попереднього, щоб зменшити використання хлорованого розчинника та підвищити ефективність процесу. Альтернативний процес схвалено для продуктів Solvadi та Harvoni. Після перекристалізації активну речовину просівають або подрібнюють, щоб отримати матеріал із відповідним розміром частинок для композиції. Виробництво GMP для Софосбувіру відбувається у кількох виробників [27].

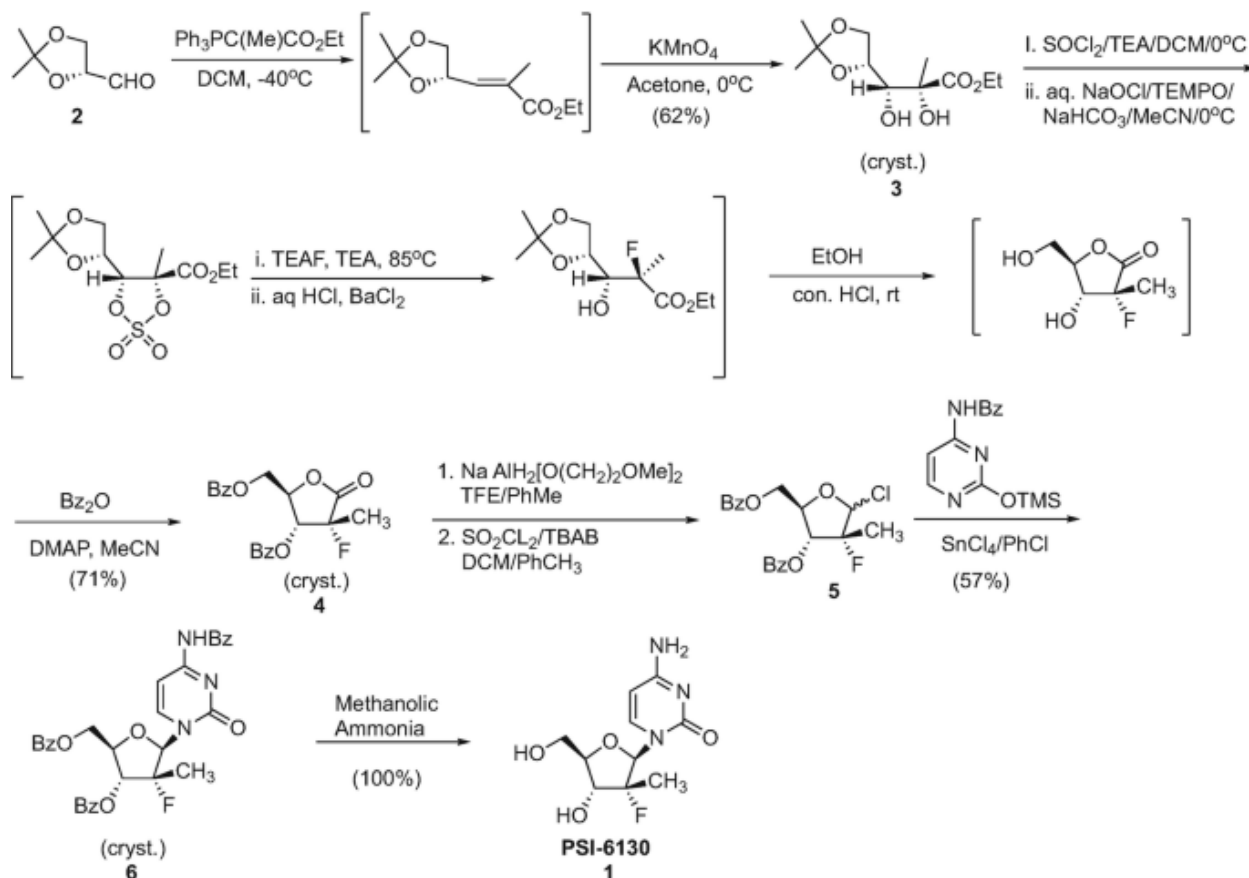


Рис. 2.2. Шлях синтезу софосбувір

Характеристика діючої речовини та її домішок відповідає настанові ЄС щодо хімії нових діючих речовин. Потенційні та фактичні домішки були добре обговорені щодо їх походження та охарактеризовані. Домішки, які перевищують порог кваліфікації згідно з ІСН Q3А, були кваліфіковані токсикологічними та клінічними дослідженнями, а відповідні специфікації були встановлені на основі досвіду виробництва на сьогоднішній день [26].

Під час синтезу застосовують засоби внутрішнього контролю. Представлено специфікації та методи контролю для проміжних продуктів, вихідних матеріалів і реагентів [25, 26].

Софосбувір упаковують в поліетиленові пакети з подвійним покриттям, закриті поліетиленовими або дротяними стяжками. Мішки зберігаються в поліетиленових барабанах високої щільності (або іншому відповідному вторинному контейнері) з кришками відповідного розміру та забезпечені

захисною пломбою, що запобігає втручанню. Використовуваний поліетилен відповідає вимогам ЄС [27].

Специфікація активної речовини включає тести на зовнішній вигляд, ідентичність (ІЧ, ВЕРХ), прозорість розчину, аналіз (ВЕРХ), домішки (ВЕРХ), залишкові розчинники та летючі органічні домішки (ГХ), метали (ICP-OES), розмір часток (Ph. Eur.) і поліморфна форма (DSC – Ph. Eur.) [27].

Обґрунтування відсутності тестів на вміст води (негігроскопічність) та мікробіологічних досліджень (низький вміст води та активність води, ізоляція від органічного розчинника) вважалося обґрунтованим. Випробування залишку при запалюванні не підходить, оскільки активна речовина містить фосфор: цей тест замінюється комбінацією тесту на прозорість розчину та ICP для елементарних домішок [26].

Стабільність. Дані про стабільність також були надані для 6 серій діючої речовини з джерел, відмінних від запропонованих для цієї заявки. Результати доступні протягом 12 або 18 місяців за довгострокових умов при 25°C / 60% відносної вологості та до 6 місяців за прискорених умов при 40°C / 75% відносної вологості згідно з рекомендаціями ІСН. Ці дані про стабільність також вважалися репрезентативними для всіх запропонованих джерел активної речовини [23].

Тест на фотостабільність згідно з рекомендаціями ІСН Q1В проводився на 1 партії. Дослідження під впливом стресу проводили на одній партії при температурі від -20 до 50°C протягом 4 тижнів. Примусову деградацію проводили в кислотних (0,1 М НСІ), лужних (10 мМ Na₂CO₃) та окислювальних (3% H₂O₂) умовах і при 105°C [24].

Перевіреними параметрами були зовнішній вигляд, аналіз, вміст домішок, вміст води та поліморфна форма. Використані аналітичні методи були такими ж, як і для випуску, за винятком вмісту води, виміряного DVS, і вказували на стабільність [24].

Було показано, що софосбувір є стабільним у довгострокових, прискорених та стресових умовах і не чутливий до світла. Примусова

деградація показала, що активна речовина може розкладатися шляхом окислення або гідролізу в розчині, але залишається стабільною у твердому стані навіть до 105°C через 1 тиждень [25].

Результати стабільності вказують на те, що діюча речовина, виготовлена запропонованими постачальниками, є достатньо стабільною. Результати стабільності виправдовують запропонований 24-місячний період повторних випробувань у запропонованому контейнері [25,26].

Зидовудин був першим препаратом, дозволеним для лікування синдрому набутого імунodefіциту (СНІД). Його хімічна назва – азидотимідин. Зидовудин є аналогом тимідину, в якому 3-гідроксильна група замінена на азидогрупу [27].

Застосування азидотимідину пов'язане з токсичністю кісткового мозку. Коротший період напіврозпаду та нездатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр є фармакокінетичними проблемами цієї важливої молекули ліків. У структуру азидотимідину внесено різні модифікації. До них відносяться модифікація гідроксильної та азидогрупи, тимідинового кільця, отримання фосфатних і фосфонатних похідних, приєднання полімерів і синтез гібридних молекул. Деякі з цих змін створювали сполуки зі значно підвищеною активністю та меншою токсичністю [27,28].

Азидотимідин є синтетичним дидезоксинуклеозидом, в якому азидогрупа присутня замість 3'-гідроксильної групи тимідину (рис. 1) [28].

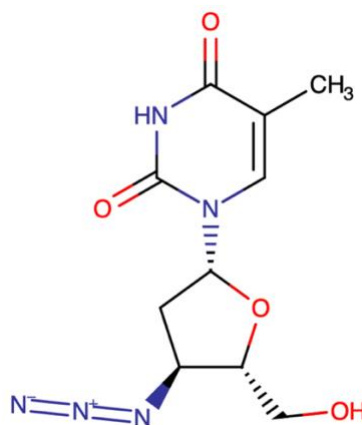


Рис. 2.3. Структура Зидовудин - 3'-Азидо-3'-дезокситимідин

Номенклатура [28]:

- Хімічна назва: 3'-Азидо-3'-дезокситимідин
- Систематична назва IUPAC: 3'-азидо-3'-дезокситимідин
- Синоніми: 1-(3-Азидо-2,3-дідезоксид-β-D-рибофуранозил)-5-метилпіримідин-2,4-(1H,3H)-діон; азидотимідин; 3'-азидотимідин; азидотимідин азидотимідин; 3'-дезоксид-3'-азидотимідин.

Хімічні та фізичні властивості діючої речовини [28]:

- Опис: кристали або голки від білого до майже білого кольору;
- Температура плавлення: 106-112°C (з петролейного ефіру); 120-122°C (з води);
- Дані спектроскопії: були надані дані інфрачервоного, ультрафіолетового, ядерного магнітного резонансу (протонний) і мас-спектр;
- Розчинність: Розчинний у воді (25 мг/мл при 25°C) та етанолі (67 мг/мл);
- Оптичне обертання: $[\alpha]^{25}_D$, +99° (c = 0,5 у воді);
- Константа дисоціації: pKa, 9,68.

Лікарські форми [28]:

Зидовудин доступний у вигляді таблеток по 300 мг, капсул по 100 або 250 мг, сиропу по 50 мг/5 мл і розчину для ін'єкцій по 200 мг/20 мл; він також доступний у вигляді таблеток у комбінації з ламівудином. Таблетки також можуть містити макрогол, стеарат магнію, мікрокристалічну целюлозу, повідон, карбоксиметилкрохмаль натрію та діоксид титану. Капсули також можуть містити кукурудзяний крохмаль, желатин, індигокармін, індиготин, стеарат магнію, мікрокристалічну целюлозу, полісорбат 80, натрію крохмаль гіколят, кукурудзяний крохмаль, сульфіти, оксиди заліза та діоксид титану.

Сироп містить безводну лимонну кислоту, ароматизатори, гліцерин, розчин мальтиту, сахарин натрію, бензоат натрію, гідроксид натрію та сахарозу.

Розчин для ін'єкцій містить соляну кислоту або гідроксид натрію [27]. Розчин для перорального застосування, що містить 50 мг/5 мл зидовудину, від безбарвного до блідо-жовтого і має рН 3-4; пероральний розчин містить бензоат натрію як консервант і може містити гідроксид натрію для регулювання рН.

Ін'єкція для внутрішньовенної інфузії має рН приблизно 5,5 і не містить консервантів, але соляну кислоту та/або гідроксид натрію можна додавати під час виробництва для регулювання рН [28].

Наступні домішки обмежені вимогами Британської та Європейської фармакопей: 1-[(2R,5S)-5-гідроксиметил-2,5-дигідро-2-фурил]-5-метилпіримідин-2,4 (1H,3H)-діон; 1-(3-хлор-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозил)-5-метил-піримідин-2,4(1H,3H)-діон; тимін; і трифенілметанол [28].

Синтез

Зидовудин був вперше синтезований у 1964 році. Його одержали шляхом мезилування 1'-(2'-дезоксипентоз-5'-О-третил-β-D-ліксосил)тиміну до сульфонату, який обробляли азидом літію в N,N -диметилформаміді з утворенням 3'-азидо-3'-дезокситимідину [29]. Повідомлялося про інші методи синтезу [30].

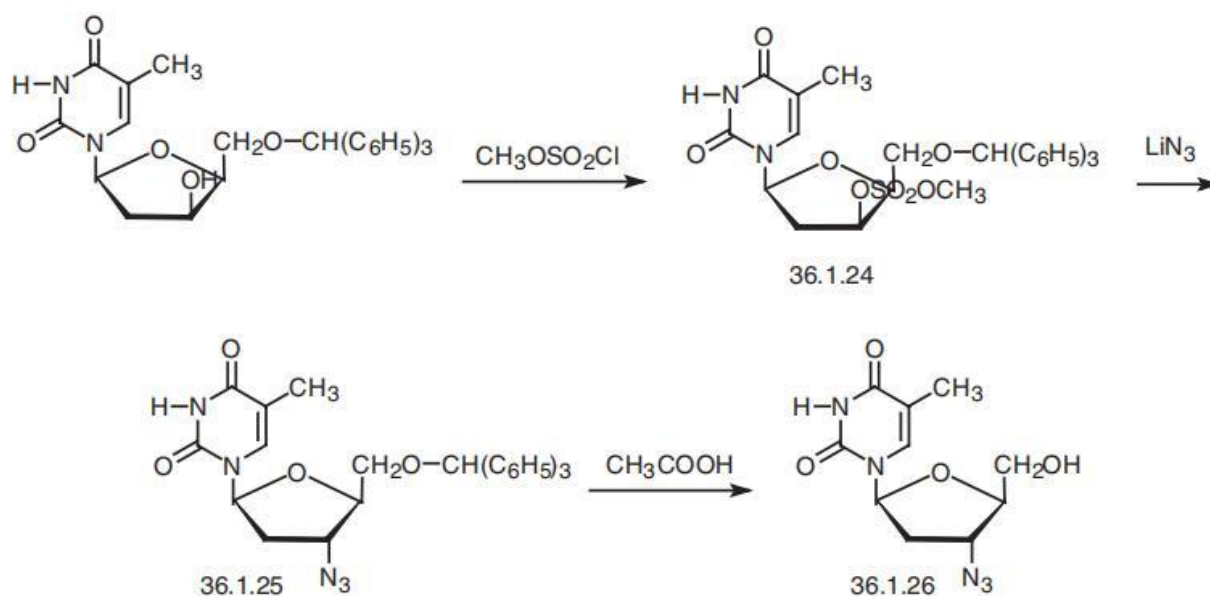


Рис. 2.4. Шлях синтезу зидовудину

Інформація, доступна з 1999 році, свідчить про те, що зидовудин вироблявся та/або виготовлявся в 35 країнах [29].

Синтезовано низку похідних азидотимідину, які продемонстрували цікаву біологічну активність. Проліки азидотимідину були отримані шляхом модифікації положення 5' амінокислотою, жирними кислотами, стероїдами, вуглеводами, алкілкарбонатом, карбаматом і тіоалкільними групами. Деякі з цих похідних, такі як карбонати, карбамати та жирні кислоти, показали меншу токсичність порівняно з азидотимідином [29]. Деякі фосфатні похідні азидотимідину, наприклад сполуки, отримані від феніл-S-ацил-2-тіоетил, показали активність проти ВІЛ у клітині з дефіцитом тимідинкінази. Фосфорильовані похідні азидотимідину, що мають ароматичні кільця в бічному ланцюзі, проявляли протиракову та протимікробну дію. Азидогрупа азидотимідину була перетворена в триазольне кільце, а триазольне кільце було додатково приєднане за допомогою тритерпеноїдів, хінолінів, кумарину та ароматичних кілець [28,29].

Тритерпеноїди, хінолін та ізоціанатопропілтриетоксисиланові похідні азидотимідину продемонстрували протипухлинну дію. Похідні азидотимідину, що мають пуринове кільце замість тимінового, також показали анти-ВІЛ активність. Полімерні форми азидотимідину становлять поліетиленгліколь, метоксиполіетиленгліколь, Poly-HEMA, декстрин і кон'югати PEG-CEPL. Ці похідні продемонстрували збільшений період напіввиведення, а також було встановлено, що вони стабільні. Гібридні молекули азидотимідину з іншими противірусними засобами та антибіотиками проявляли життєву активність. Гібридна молекулярна стратегія з антибіотиками є важливою, оскільки отримані молекули показали подвійну активність, тобто антибактеріальну та противірусну, і ці сполуки також продемонстрували кращий терапевтичний індекс [30].

2.2. Методи дослідження

З аналітичної точки зору, методи фармацевтичного аналізу є значно менш складними, ніж методи аналізу ліків та їх метаболітів у біологічних зразках, таких як кров, плазма, волосся або сеча. Проте однозначне визначення лікарського засобу у фармацевтичних формах є таким же важливим, як і визначення у складних матрицях, оскільки якість фармацевтичного продукту безпосередньо пов'язана зі здоров'ям пацієнта.

У розробці ліків і фармацевтичному контролі хімічний аналіз відіграє ключову роль для забезпечення високої ефективності та безпеки для пацієнтів.

З цієї причини відповідні методи контролю якості (якісні та кількісні аналізи, перевірка чистоти, хіральне розділення, споріднена речовина та стехіометричне визначення) мають першочергове значення для фармацевтичної промисловості [1].

Фармацевтичні дослідження розробляють дедалі складніші молекули та лікарські форми, тому кожна нова та високоселективна аналітична техніка представляє великий потенційний інтерес [2]. Таким чином, фармацевтичний контроль якості повинен забезпечувати використання відповідних аналітичних методів, серед яких спостерігається тенденція до використання швидших та ефективніших методів із економією коштів та зменшенням споживання розчинників.

Зважаючи на важливість методів контролю якості лікарських засобів і потребу в швидких і надійних аналітичних методах, у цій роботі нами розглянуто деякі кількісні аналітичні методи та їх застосування в фармацевтичному аналізі. Кілька методів, таких як ультрафіолетова/видима спектрофотометрія, флуориметрія, титриметрія, електроаналітичні методи (головним чином вольтамперометрія), хроматографічні методи (тонкошарова хроматографія, газова хроматографія і головним чином високоефективна рідинна хроматографія, капілярний електрофорез є основними методами, які використовувалися для кількісного аналізу фармацевтичних сполук.

Спектроскопічні методи в фармацевтичному аналізі є важливим інструментом для вивчення структури, концентрації та взаємодії різних хімічних сполук у лікарських засобах. Ці методи ґрунтуються на взаємодії світла з речовинами та дозволяють отримати інформацію про їхню хімічну природу. Основні спектроскопічні методи, використовувані в фармацевтичному аналізі, включають УФ-видиму, ІЧ та ЯМР-спектроскопію.

УФ-видима спектроскопія

УФ-видима спектроскопія – це метод, який вивчає поглиблення світла у видимому та ультрафіолетовому діапазоні при взаємодії із зразком. Цей процес дозволяє отримати інформацію про електронну структуру сполук. У видимому діапазоні поглиблення зумовлене електронними переходами, а в ультрафіолетовому – переходами, пов'язаними з атомами водню та азоту.

Застосування:

Визначення концентрації: Визначається за інтенсивністю поглиблення.

Ідентифікація сполук: Характеристичні піки в спектрах допомагають ідентифікувати речовини.

Кінетика реакцій: Вивчення змін у спектрах з часом.

ІЧ (інфрачервона) спектроскопія

ІЧ спектроскопія вивчає взаємодію молекул із світлом у інфрачервоному діапазоні. Під час взаємодії, молекули розтягуються та обертаються, що викликає зміни в інтенсивності світла.

Застосування:

Визначення функціональних груп: Кожна група має характеристичні піки у ІЧ діапазоні.

Якість сировини: Дозволяє визначити чистоту та ступінь переробки сировини.

Кількісний аналіз: Визначення концентрацій під час реакцій.

ЯМР (ядерно-магнітна резонанс) спектроскопія

ЯМР спектроскопія використовує магнітні властивості ядер для вивчення структури та взаємодії молекул. Атоми з ядрами, що мають

магнітний момент, піддаються зовнішньому магнітному полю та радіочастоті, що дозволяє отримати інформацію про їхню молекулярну організацію.

Застосування:

Визначення структури сполук: Отримання інформації про взаєморозташування атомів у молекулі.

Вивчення динаміки молекул: Слідкування за рухом атомів у просторі.

Визначення конформації: Аналіз просторового розташування фрагментів молекул.

Переваги та обмеження спектроскопічних методів

Переваги:

- Висока чутливість та специфічність.
- Можливість аналізу невеликих кількостей зразків.
- Невимагливість до підготовки зразків.

Обмеження:

- Обмежена роздільна здатність у деяких випадках.
- Необхідність калібрування та стандартизації.
- Деякі методи вимагають високоточного обладнання.

Спектроскопічні методи становлять потужний інструментарій для фармацевтичного аналізу, дозволяючи отримувати детальні дані про хімічну природу лікарських засобів та їхні властивості.

Хроматографічні методи в фармацевтичному аналізі представляють собою сімейство технік, які використовують роздільне ефект у змішених речовинах для визначення та кількісної оцінки окремих компонентів. Основні хроматографічні методи включають вискоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), газову хроматографію (ГХ).

Вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

Принцип:

ВЕРХ використовує стовпчастий або капілярний стовп, наповнений стаціонарною фазою, через яку пропускається рідина. Компоненти

роз'єднуються залежно від їхньої взаємодії із стаціонарною та рухливою фазами.

Застосування:

Визначення концентрацій окремих компонентів.

Якісна та кількісна ідентифікація речовин у зразках.

Оцінка чистоти та якості лікарських засобів.

Газова хроматографія (ГХ)

Принцип:

ГХ використовує газовий носій для перенесення речовин через стаціонарну фазу. Речовини розділяються залежно від їхньої афінності до стаціонарної фази та їхнього розподілу між газовою та стаціонарною фазами.

Застосування:

Визначення летючих та нелетючих сполук.

Аналіз органічних та неорганічних з'єднань.

Оцінка пуристичності речовин.

Переваги та обмеження хроматографічних методів

Переваги:

- Висока роздільна здатність.
- Велика чутливість.
- Можливість аналізу широкого спектру зразків.

Обмеження:

- Необхідність високоточного обладнання.
- Специфічність методу залежить від вибору стаціонарної та рухливої фаз.
- Підготовка зразків може вимагати часу та складних процедур.

Хроматографічні методи стали невід'ємною частиною фармацевтичного аналізу, дозволяючи визначати склад та концентрацію різних компонентів у лікарських засобах з високою точністю та чутливістю.

Висновки до розділу 2

Об'єктами дослідження – софосбувір та зидовудину. У фармацевтичній галузі важливим завданням є ефективне виявлення та докладна характеристика фармацевтичних інгредієнтів для забезпечення високої якості та належного контролю за якістю продукції.

РОЗДІЛ 3

МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ З ГРУПИ НУКЛЕОЗИДНИХ АНАЛОГІВ

3.1 Огляд аналітичного визначення софосбувір

Це дослідження зосереджено на багатьох аналітичних методах виявлення та кількісного визначення софосбувіру у фармацевтичних композиціях, біологічних зразках і фіксованих комбінаціях доз. Хроматографічні методи, електроаналітичні методи, хеометричні процедури та оптичні підходи – це лише деякі підходи, згадані в літературі. Найбільш часто використовуваними методами аналізу Софосбувіру є методи ВЕРХ із спектрофотометричним ультрафіолетовим/видимим спектром, флуоресценцією та мас-спектрометричним детектуванням [25].

В результаті дослідження літератури показало, що в основних фармакопєях, таких як USP, EP, JP, BP та IP, не існує офіційного методу високоефективної тонкошарової хроматографії. Існує кілька доступних аналітичних методів для оцінки софосбувіру окремо та в комбінації з деякими іншими препаратами. Наразі доступні методи визначення софосбувіру використовувалися для досліджень біоеквівалентності софосбувіру у щурів [31] і людини [32], плазми з використанням ультраефективної рідинної хроматографії та тандемної мас-спектрометрії. Деякі методи рідинної хроматографії для визначення лише софосбувіру у поєднанні з симепревіром.

Для оцінки софосбувіру в лікарській формі розроблено та валідовано метод високоякісної термохроматографії, що показує стабільність. Хроматографічне розділення проводили на попередньо покритих алюмінієвих пластинах силікагелю 60 F254 з використанням рухомої фази толуол: ацетон: оцтова кислота: вода (6,5:3,5:1:0,2 об./об.). Значення R_f для Софосбувіру

виявилося 0,67. Плями сканували денситометричним способом при 267 нм. Система розчинників здатна розділяти Софосбувір і продукти його розпаду, що утворюються в кислотних, лужних і окисних умовах. Розроблений метод HPTLC був валідований відповідно до рекомендацій ІСН. Дані лінійного регресійного аналізу для калібрувальних графіків показали хороший лінійний зв'язок із значенням R^2 Софосбувіру, що становить 0,997 у діапазоні концентрацій 200-1000 нг/смугу для Софосбувіру. Відсоток вилучення препарату встановлено в межах 98,53 – 100,34 % за розробленою методикою. Межа виявлення та межа кількісного визначення становили 16,0 нг/смужка та 48,73 нг/смужка для Софосбувіру відповідно. Розроблений метод HPTLC був валідований на точність, лінійність, прецизійність тощо. Метод застосовувався для оцінки Софосбувіру в його синтетичній суміші [33].

Розроблено новий аналітичний метод для визначення вмісту велпатасвіру та софосбувіру в лікарському засобі методом рідинної хроматографії. Хроматографічне розділення було досягнуто на колонці C18 (Luna 18 150*4,6 мм3,0 мкм) при температурі навколишнього середовища. Розділення, досягнуте за допомогою рухомої фази, яка складається з 0,1% об'єму мурашиної кислоти у воді:метанол:ацетонітрил (35:40:25). Швидкість потоку становила 0,8 мл/хв, ультрафіолетовий детектор при 269 нм. Середній час утримування для велпатасвіру та софосбувіру становив 2,62 хв та 3,72 хв. Результати: Розроблений метод валідовано відповідно до вказівок з валідації аналітичного методу ІСН. Усі параметри перевірки були в межах прийнятного діапазону. Було встановлено, що методи аналізу є лінійними від 80 до 240 мкг/мл для софосбувіру та 20-60 мкг/мл для велпатасвіру. Коефіцієнт кореляції становив 0,9998 і 0,9992 для велпатасвіру та софосбувіру відповідно. Середній відсоток відновлення для розробленого методу був у діапазоні 98,4–100,4% для велпатасвіру та 98,6–100,6% для софосбувіру. Розроблений метод також виявився надійним [34].

Простий, чутливий і швидкий метод високоефективної тонкошарової хроматографії був розроблений і валідований для кількісного визначення

софосбувіру і ледіпасвіру у субстанціях та у готових лікарських формах. Хроматографічний прояв проводили на алюмінієвих пластинах, попередньо покритих силікагелем 60 F254, використовуючи суміш етилацетату, метанолу, толуолу, ацетону та оцтової кислоти (2:1,5:4,5:2,0:0,2) (об./об./об./об.).) як рухома фаза. Детектування проводили денситометрично при 269 нм. Значення R_f для софосбувіру і ледіпасвіру було 0,19 і 0,06 відповідно. Встановлено, що калібрувальна крива є лінійною в діапазоні 200-1200 нг/точку та 45-270 нг/точку для софосбувіру і ледіпасвіру відповідно, з коефіцієнтом регресії 0,9979 і 0,9986 для софосбувіру і ледіпасвіру відповідно. Було встановлено, що точність була дуже високою 99,41-100,04 і 99,64-100,64 для софосбувіру і ледіпасвіру відповідно. Значення %RSD для внутрішньоденної та міжденної варіації були меншими за 2. Метод продемонстрував високу чутливість і специфічність [35].

Для одночасного визначення софосбувіру, ледіпасвіру, рибавіріну та силімарину у зразках плазми щурів і гомогенату печінки було розроблено екологічно чистий, швидкий і простий метод РХ-МС. Проста підготовка зразка з осадженням білка в поєднанні з чутливим і селективним розділенням РХ-МС забезпечила високу точність і чутливість методу за короткий час. Точність і точність запропонованого методу знаходяться в межах, необхідних для біоаналітичних аналізів. Розділення проводили на колонці Shimpack – ODS II з градієнтним елююванням розчинником метанолу та 1% мурашиної кислоти у воді зі швидкістю потоку 0,4 мл/хв. Часи утримування становили 2,0, 19,5 і 21,5 хв для ледіпасвіру, рибавіріну та силімарину відповідно, тоді як різні піки софосбувіру були розділені на 13,5, 14,3, 16,7, 17,13, 17,5, 18,2 і 18,5 хв. Вибрані значення m/z були 289, 481, 528 і 888 для софосбувіру, ледіпасвіру, рибавіріну та силімарину відповідно. Метод перевірено в діапазонах концентрацій 10-2000 нг/мл, 10-2000 та 25-2000 нг/мл для ледіпасвіру, рибавіріну та силімарину відповідно. Внутрішньо- та міжденна точність і точність зразків контролю якості показали відносні стандартні відхилення < 15% з хорошою точністю [36] (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Порівняльний аналіз хроматографічних методик

Метод	Нерухома фаза	Рухома фаза	Детектор	Лінійність
ВЕРХ	Колонка: C18 (150 мм х 4,6 мм, 5 мкм)	метанол: ацетонітрил (90:10 об./об.)	КПК детектор	Лінійність: від 50% до 150% МКВ: 0,0012%
ВЕРХ з звотною фазою	Колонка: C18 (150 мм х 4,6 мм, 5 мкм)	Суміш метанолу та (0,1%) трифтороцтової кислоти	231 нм УФ 245 двопроменевий УФ-видимий спектрометр	Межа виявлення: 0,01 мкг/мл; Межа кількісного визначення : 0,03 мкг/мл; Діапазон лінійності: 100-600 мл Кореляція
ВЕРХ	Колонка: C18 (250 мм х 4,0 мм, 5 мкм)	суміш води (містить мурашину кислоту 0,5 мл/л) і ацетонітрилу (57:43; об./об.)	231 нм	МКВ: 10 нг/мл
Зворотньо-фазна хроматографія	Synergi Max- RP80A (150×4,6 мм ID), 4 мкм	Фосфатний буфер Мобільна фаза В- ацетонітрил; Швидкість потоку: 1,0 мл/хв	230 нм	Лінійність: 50%-250%

Рідина хроматографія з тандемною мас- спектрометрією	Колонка: октадецилсилан ; C18 (150x4,6 мм, 5 мкм)	Буфер А-10М ацетат амонію (рН 5,0). Режим градієнтного елюювання В- ацетонітрилу		Лінійність: 50%-300%
ВЕРХ з зворотною фазою	C18 (250x4,6 мм, 5 мкм)	Фосфатний буфер (4,0) : метанол (50:50 об./об.)	262 нм	
Термічний розпад	C18 (250x4,6 мм, 5 мкм)	50 ммоль L-1 водного розчину ацетату амонію як елюент і ацетонітрилу як елюент. Швидкість потoku: 1,0 мл/хв	276 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)	Thermo Hypersil C8	0,01 М дигідрофосфат натрію (рН 2,5) : метанол (20:80 об./об.)	262, 332 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)	Zorbax SB C18	9 mM дикалій гідроортофосфатни й буфер (рН 4) : ацетонітрил (60:40, об./об.)	265 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)	Hisil C18	Фосфатний буфер (рН 4,0) : метанол (50:50% об./об.)	262 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)	Luna C18	буферний розчин ацетату амонію (рН 7,0): ацетонітрил (35:65 % об./об.)	245 нм	

Рідинна хроматографія – мас- спектрометрія (плазма)	Zorbax eclipse plus C18	10 mM ацетату амонію pH 4,0: ацетонітрил : 0,1% метанол (12/25/63, об./об./об.)		
ВЕРХ-УФ (таблетки)	Eclipse XDB C1	0,02 M дигідрофосфат калію та 5,7 mM гексансульфонат (pH 3,0): ацетонітрил N (50:50 об./об.)	254 нм	
Рідинна хроматографія (плазма)		ацетонітрил і 0,1% мурашиної кислоти у воді (градієнтне елюювання)		
Рідинна хроматографія (плазма)		0,1% мурашина кислота : ацетонітрил (50:50, об./об.)		
Рідинна хроматографія (плазма)		5 mM амоній- ацетатний буфер (pH 3,5) : ацетонітрил (50:50 об./об.)		
Рідинна хроматографія – мас- спектрометрія (таблетки)		метанол : вода (70:30 об./об.)		
Високоєфективн а рідинна хроматографія з діодним		ацетонітрил : дигідрофосфат калію, pH 2,5 (55:45 об./об.)	260 нм	

детектуванням (таблетки)				
ВЕРХ-УФ (таблетки)		ортофосфорна кислота у воді : ацетонітрил (60:40 об./об)	240 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		ацетонітрил : вода (50:50% об./об.)	235 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		метанол	265 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		метанол : буфер (60:40 об./об.)	254 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		дигідроортофосфат натрію (рН 4,2): ACN (85:15 об./об.)	292 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		буфер ортофосфорної кислоти : ацетонітрил (45:55 об./об.)	250 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		етилацетат- ізопропанол (90:10, об./об.)	260 і 302 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		90% етилацетат : 9% гексан : 1% триетиламін	250 нм	
ВЕРХ-УФ (таблетки)		метиленхлорид– метанол– етилацетат–аміак (25%) у співвідношенні 5:1:3:1 (об./об.)	275 нм	
ВЕРХ-УФ (плазма)		етилацетат – льодяна оцтова	265 нм і 327 нм	

		кислота (100:5 об./об.)		
ВЕРХ-УФ (плазма)		ацетатний буфер рН 5,0 : ацетонітрил (50:50 об./об.)	260, 313 нм	
ВЕРХ-УФ (плазма)		ацетонітрил : вода (80:20 об./об.)	260, 330 нм	
ВЕРХ-УФ (плазма, біологічна рідина)		0,1 М розчин додецилсульфату натрію, що містить 20% (об./об.) н- пропранололу та 0,3% (об./об.) рН 6,5	226 нм	

Простий, прямий і швидкий ультрафіолетовий спектрометричний метод був розроблений і валідований для визначення софосбувіру у формі таблеток. Софосбувір розчиняли в метанолі та вимірювали в ультрафіолетовій області за довжині хвилі λ_{max} 260 нм. Лінійність калібрувальної кривої була в діапазоні концентрацій 5-100 мкг/мл з коефіцієнтом кореляції 0,999. Чутливість перевіряли як межу виявлення та межу кількісного визначення, які становили 1,6 та 4,8 мкг/мл відповідно. Відсоток відновлення софосбувіру після екстракції з таблеток коливався від $98,23 \pm 1,04\%$ до $99,38 \pm 0,40\%$ з відносною стандартною поділкою менше 2,0%, що вказує на прийнятну точність і точність розробленого методу. Подальші дослідження точності та прецизійності запропонованого методу проводились стандартним методом додавання; середнє кількісне відновлення таких досліджень було в діапазоні від $97,99 \pm 0,32$ до $99,69 \pm 0,15$ з $\text{RSD} \leq 2,0\%$. Ці отримані рівні точності та прецизійності вказують на придатність розробленого методу для аналізу контролю якості софосбувіру у складі таблеток [37].

Для визначення софосбувіру у таблетованій лікарській формі розроблені та валідовані методи УФ-спектрофотометрії та стабілізаційної ВЕРХ-обробки. Метод ВЕРХ виконується на колонці ACE C18 (250 мм x 4,6

мм, 5 мкм) з розміром частинок, використовуючи буферний розчин рН 5,0, що містить 50 мМ дигідрофосфату калію: ацетонітрил (60:40 об./об.) як рухомий засіб. фазі зі швидкістю потоку 1,5 мл/хв, об'ємом ін'єкції 20 мкл та УФ-детектуванням при 260 нм. Лінійний діапазон 50-500 мкг/мл з коефіцієнтом кореляції 0,9996 і значенням R_t 4,100 хв для софосбувіру. УФ-спектрофотометричний метод заснований на вимірюванні абсорбції SOF при λ_{max} , що дорівнює 260 нм. Лінійний діапазон 5-50 мкг/мл з коефіцієнтом кореляції 0,9995 [38].

Для аналізу софосбувіра у субстанціях, у лікарських засобах і в біологічних рідинах використовувалися різні методи. Доступні методи, описані в літературі, можна підсумувати таким чином (табл. 3.2.):

Таблиця 3.2

Порівняльний аналіз спектрофотометричних методик софосбувіра

Лікарська форма	Метод	Розчинник	Визначення	Лінійність
Субстанція	Двопроменевий УФ-видимий спектрофотометр	Вода і метанол	261 нм	Лінійність : 12-40 мкг/мл; R: 0,999
Субстанція та таблетки	Двопроменевий УФ-видимий	Метанол	260 нм	Лінійність : 5-40 мкг/мл; R: 0,9997
Субстанція	УФ-видимий спектрофотометр	Метанол	267 нм	Лінійність : 5-10 мкг/мл; R: 0,9997
Субстанція	Спектрофотометрія нульового порядку		251 нм	
Таблетки	УФ-спектрофотометрія	0,05 М розчин дигідроортофосфат у калію	262 нм	

Таблетки	Вимірювання УФ-поглинання, спектрофотометричний метод першої похідної		260 нм, 215 нм	
Таблетки	Перша похідна спектрофотометрія	Хлоформ-метанол	276 нм	
Комбінований лікарський засіб	Спектрофотометрія нульового порядку		261 нм	
Комбінований лікарський засіб	Вимірювання поглинання ультрафіолетового випромінювання. Метод різниці співвідношення. Метод послідовної похідної		224 нм та 258 нм	
Комбінований лікарський засіб	Вимірювання спектрів коефіцієнта поглинання УФ		262 нм	

3.2 Огляд аналітичного визначення зидовудин

Зидовудин включений до британської, європейської, французької, німецької, швейцарської та американської фармакопей [39].

Деякі міжнародні фармакопеї вказують інфрачервону абсорбційну спектрофотометрію з порівнянням зі стандартами та рідинну хроматографію як методи ідентифікації зидовудину [39,40].

Для перевірки його чистоти використовується рідинна хроматографія. У фармацевтичних препаратах зидовудин ідентифікують за допомогою ультрафіолетової абсорбційної спектрофотометрії, тонкошарової хроматографії та рідинної хроматографії [40].

Існує кілька форм зидовудину як окремо, так і в комбінації з одним або двома препаратами, такими як ламівудин, невірапін, ефавіренц і абакавір [41].

Такі методи, як електроаналітичний (вольтамперометричний, амперометричний), спектрофотометричний, капілярний електрофорез (СЕ), високоефективна рідинна хроматографія (HPLC), рідинна хромато-мас-спектрометрія (LC-MS), рідинна хроматографія та тандемна мас-спектроскопія, рідинна хроматографія під тиском (UPLC) були використані для аналізу, з яких методи ВЕРХ найбільш широко використовуються [42] (рис. 3.1).

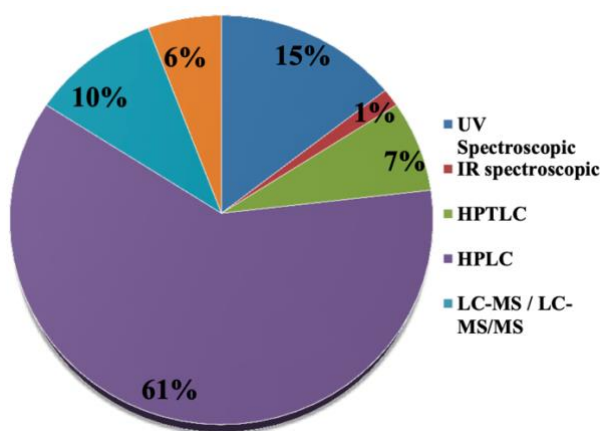


Рис. 3.1 Огляд аналітичних методів для визначення зидовудину в біологічних і фармацевтичних лікарських засобах

Рідинна хроматографія використовується для визначення вмісту зидовудину [42].

Повідомлялося про простий швидкий метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) для визначення зидовудину в плазмі з колонкою з оберненою фазою та детектуванням при 265 нм. Межі виявлення в плазмі та сечі становили 20 і 200 нг/мл відповідно. Повідомлялося про кількісне визначення зидовудину в сироватці, молоці та тканинах ізократичною ВЕРХ [43].

Колориметричний метод аналізу був розроблений для агентів проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ), включаючи зидовудин. Повідомлялося про одночасне кількісне визначення зидовудину та його метаболітів у

сироватці крові та сечі за допомогою ВЕРХ із застосуванням методу перемикання колонок. Концентрацію зидовудину в сироватці крові вимірювали за допомогою імуноферментного аналізу та імунофлуоресцентного аналізу з роздільною здатністю за часом. Також використовували паперову та тонкошарову хроматографію похідних нуклеозидів, включаючи зидовудин [44].

За даними літератури, було повідомлено про 10 методів визначення зидовудину за допомогою спектрофотометрії, з яких 4 методи призначені для визначення зидовудину окремо, тоді як інші призначені для кількісного визначення зидовудин у комбінації з іншими лікарськими речовинами. У таблиці 3 наведено підсумок представлених спектрофотометричних методів із зазначенням основного принципу, λ_{max} , розчинника, лінійності, межі виявлення та кількісного визначення [45] (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Порівняльний аналіз спектрофотометричних методик

Метод	Розчинник	λ_{max} , нм	МВ	МКВ
Кількісна оцінка	0,1 М НСІ	267	0,243	0,735
Одночасне оцінювання нульовим і першим порядком	Метанол : вода 60 :40	310, 270, 271	0,0938, 0,0012, 0,0129	0,2841, 0,0035, 0,0391
Кількісна оцінка	Метанол : вода	266	0,6	1,8
Метод абсорбції	Метанол	266	-	-
Багатовимірне калібрування за методом похідної першого та другого порядку	Вода	Перший порядок 267,3, 249,3 Другий порядок 250,7, 229,0	0,6, 0,18	0,12, 0,03

Одночасна оцінка	Ацетонітрил, водна суміш	295,6, 279,8, 262,2	1, 1, 2	3, 2, 5
Метод першого порядку для антиретровірусної терапії	0,1 М НСІ	279, 300	-	-
Екстракційний спектроскопічний метод	Іонна пара комплексна екстракція хлороформом	414, 414	0,106, 0,352	0,217, 0,722
Метод корекції поглинання	Метанол	305, 250, 254	0,08	0,2664
Метод абсорбції	Вода очищенна	266	6,45	21,79

Спектроскопічний метод інфрачервоної спектроскопії

Ранджу Бансал та інші працювали над новим, простим і економічно ефективним методом інфрачервоної спектроскопії для кількісної оцінки зидовудину в субстанції та таблетованій лікарській формі. Кількісний аналіз зидовудину проводили в твердій формі за допомогою методу гранул KBr і в рідкій формі за допомогою кварцової кювети. Було встановлено, що діапазон лінійності становить 0,8-1,6% мас./мас. у методі гранул KBr і 250-1500 мкг/мл у розчині. Запропоновані методи успішно застосовані для визначення зидовудину в лікарських формах (таблетках). Результати показали, що запропоновані методи є точними та відтворюваними (відносне стандартне відхилення <2%), а також є простими, економічними та менш трудомісткими, ніж інші доступні методи, і можуть бути використані для оцінки зидовудина у різних лікарських формах [44,45].

Метод високоефективної тонкошарової хроматографії

Згідно з оглядом літератури, повідомляється про 5 методів високоефективної тонкошарової хроматографії для одночасного визначення

зидовудину з іншими препаратами. Було помічено, що в усіх методах метанол використовується як розчинник для приготування основного розчину. У таблиці № 4 наведено підсумок описаних методів ВЕРХ із зазначенням основного принципу, стаціонарної фази, рухомої фази, λ_{max} , R_f , лінійності, межі виявлення та кількісного визначення [46] (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Порівняльний аналіз зроматографічних методик

Метод	Нерухома фаза	Рухома фаза	λ_{max} , нм	R_f	МВ	МКВ
Одночасне денситометричне вимірювання	Силікагель 60 F254 Пластинка	Толуол : Хлороформ : Метанол (1:6:3)	271	0,28	3,06	9,28
Одночасна оцінка за допомогою нормальної фази ВЕРХ	Пластинки Merck, попередньо покриті алюмінієвою пластиною TLC із силікагелем GF	Толуол : Етилацетат : Метанол (4:4:2)	276	0,41	2,90	8,85
ВЕРХ денситометричний метод для одночасної оцінки	Алюмінієва пластина TLC із попередньо покритим силікагелем GF	н-Гексан : Хлороформ : Метанол (1:7:2)	275	0,22	4,36	13,21
Одночасна оцінка	Силікагельна пластина 60 F254 із	Етилацетат: Гексан: Метанол:	278	0,25	5,09	15,43

	попереднім покриттям Merck	Оцтова кислота (4:4:2:0,1)				
ТШХ, що вказує на стабільність, денситометричне визначення	ТШХ алюмінієві пластини, попередньо покриті силікагелем 60F254	Толуол: Етилацетат: Метанол (8:1:1)	279	0,28	13,99	42,40

Повідомляється про 42 методи вискоєфективної рідинної хроматографії для визначення зидовудину окремо або в комбінації з іншими препаратами, з яких 12 літературних джерел стосуються оцінки зидовудину у біологічних зразках, а 30 літературних джерел – для оцінки зидовудину у лікарських формах [47] (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5

**Порівняльний аналіз хроматографічних методик в комбінованих
лікарських засобах**

Мета дослідження	Колонка	Рухома фаза	Лінійність	λ max, нм	Швидкість потoku мл/хв	Rt
Метод ВЕРХ для дослідження стабільності	Колонка Merck C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром з розміром частинок 5 мкм)	вода : метанол (77:23)	25-500	265	1	11,5

Одночасне визначення	Колонка HiQ Sil C18 V	0,01 М дигідрофосфат калію (рН 3,0) і метанол (55:45 об./об.)	0,5- 10	272	0,8	3,8
Одночасне визначення	Колонка Phenomenex Luna C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	0,1 М амоній-ацетатний буфер: метанол (50:50 об./об)		270	1,5	3,55
Розробка рідинного хроматографічного аналізу для таблеток проти ВІЛ.	Hypersil BDS C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром з розміром частинок 5 мкм) колонка	Ацетонітрил, суміш 0,2 М дигідрофосфату калію та води (1:1).		270	1	3,55
ОФ-ВЕРХ метод визначення	Колонка Zodiac 100-5 C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	Метанол : ацетонітрил (60:40)	0,1-0,6	270	1	2,51

Розробка та валідація таблетки з пролонгованим вивільненням	Колонка Waters RP-18 XTerra	Вода : метанол (80:20)	40-220	266	1	9,1
ВЕРХ визначення лікарської форми таблеток	Колонка Phenomenex Luna C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	Ацетонітрил : 0,02 М дигідрофосфат калію	10-60	270	1	4,5
Оцінка комбінації фіксованих доз ламівудину та зидовудину	Колонка RP C18	Вода : Ацетонітрил (pH 3,5)		272	1	2,6
Кількісне визначення противірусних препаратів у присутності домішок методом LC	Водна симетрія C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром з розміром частинок 5 мкм) колонка	0,025 М ацетатно-амонійний буфер (pH 4,2 відкоригований крижаною оцтовою кислотою) і метанол	15-45	270	1	13,4
Одночасне визначення трьох протиретровірусних препаратів	Колонка Luna C18 (150 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром	50 mM буфер ацетату амонію (pH 6,8) і метанол		265	1	7,9

	частинок 5 мкм)					
Новий аналіз ВЕРХ без використання сольових буферів	Колонка Zodiac C18 (250 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	Ацетонітрил : Вода (90:10) рН до 4,8		240	1	3,79
Одночасна оцінка АФІ та лікарської форми	Колонка Thermo Hypersil BDS C18 (150 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	Калій дигідроорто- фосфатний буфер: метанол : Ацетонітрил (70:5:25)		267	0,8	2,21
Одночасна оцінка, що вказує на стабільність	XTerra C18 (150 мм × 4,6 м з внутрішнім діаметром з розміром частинок 5 мкм) колонка	Вода : Метанол рН 2,1		275	1	1,91
Одночасна оцінка в комбінованій лікарській формі	Колонка Eurosphere 100-5 C18 (250 мм ×	Метанол: калій гідрофосфатний буфер:		271	0,6	4,87

	4,6 м з внутрішнім діаметром і розміром частинок 5 мкм)	Ацетонітрил (35:60:5)				
Одночасна оцінка	Symmetry C18 100 мм × 2,1 м внутрішній діаметр з розміром частинок 1,7 мкм).	Фосфатний буфер (рН 3): Метанол (60:40)		280	0,25	1,276
Одночасна оцінка	Колонка C18 100 мм × 2,1 м внутрішній діаметр з розміром частинок 1,7 мкм) кол	Фосфатний буфер (рН 3): Метанол (60:40)		280	0,25	1,019

Біоаналітичний визначення [48].

Різні методи визначення зидовудину у біологічних зразках, таких як плазма, сироватка та сеча, перераховані в таблиці №5.

Методи підготовки проб, які використовуються для екстракції зидовудину з біологічних зразків:

Підготовка проби є невід’ємною частиною аналітичної методології, і було повідомлено, що приблизно 30% помилок, створених під час аналізу проби, було спричинено підготовкою проби. У більшості випадків метанол використовувався як розчинник. Методи підготовки зразків для екстракції

зидовудину з біологічних матриць (плазми, сироватки та сечі) включають осадження білка метанолом, рідинно-рідинну екстракцію з використанням етилацетату, метанолу, підкисленого ацетонітрилу та дихлорметану, суміші етилацетату та ізопропілового спирту та твердофазну екстракцію за допомогою водно-метанольний і метанольний (рис. 3.2, табл. 3.6).

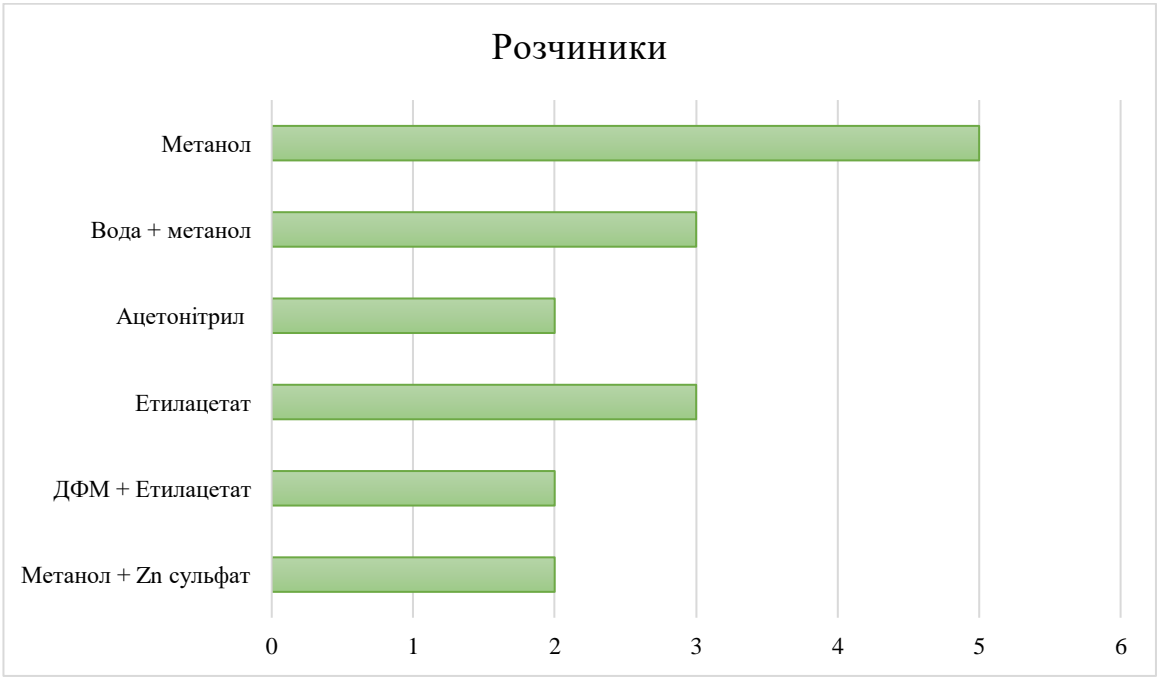


Рис. 3.2 Різні розчинники, що використовуються для екстракції зидовудину з біологічних зразків.

Таблица 3.6

Порівняльний аналіз хроматографічних методик в біологічних зразках

Мета дослідження	Біологічний зразок	Підготовка проб	Рухома фаза	λ_{max} , нм	Швидкість потоку мл/хв	Rt
Біоаналіз зидовудину	Плазма і сеча людини	Рідина - рідина з етилацетатом	1% ацетатний буфер (pH 5): метанол (82:18)	265	1,5	-

Одночасне кількісне визначення зидовудину та його глюкуроніду	Людська сироватка	Твердофазна екстракція з метанолом	15% ацетонітрил забуферений до рН 2,7 фосфатом амонію C18	267	1	
Кількісне визначення зидовудину і зидовудину фосфату в периферичній крові	Кров людини	Твердофазна екстракція метанолом	Дигідрофосфат натрію: динатрій гідрофосфатний буфер (140 мМ): дигідрофосфат тетрабутиламонію (рН 7,5): ацетонітрил (957,3:7,7:35)	254	1	14,64
Одночасне визначення	Плазма	Твердофазна екстракція водою- метанолом	Ацетатний буфер (20 мМ ацетату калію, доведеного до рН 4,6 за допомогою оцтової кислоти)	260	1	
Одночасне визначення	Людська плазма	Осадження білка за допомогою метанолу	Вода : ацетонітрил (рН 3,0) (73:27)	246	0,9	5,26
Кількісне визначення зидовудину	Плазма щурів	Рідина - рідинна екстракція підкисленим ацетонітрилом	ацетонітрил: метанол: 0,1% мурашина кислота (20:20:60)	266	0,8	-
Флуоресцентна дериватизація для хроматографічного визначення зидовудину на	Плазма щурів	Рідина - рідинна екстракція метанолом	ацетонітрил 0,5 мМ НСІ буфер (рН 7,4) (50:50)	310	1	-

основі реакції Гюїзгена						
----------------------------	--	--	--	--	--	--

Інші методи [47, 48,49].

Крім спектроскопічних і хроматографічних методів, існують також деякі електрохімічні методи, такі як вольтамперометричний і амперометричний методи визначення зидовудину та інших препаратів проти ВІЛ.

Визначення зидовудину у лікарських засобах за допомогою диференціальної імпульсної вольтамперометрії. Контроль якості цієї речовини в ліках має виняткове значення для громадського здоров'я через її небажані ефекти та короткий терапевтичний інтервал. Для визначення зидовудину у лікарських засобах була розроблена альтернативна аналітична методологія з використанням вольтамперометрії. Зниження зидовудину на висячому ртутному краплинному електроді становить -0,96 В при рН 8,0. Було оптимізовано вплив електроаналітичних параметрів, таких як швидкість сканування (20 мВ/с), амплітуда (50 мВ), природа опорного електроліту (фосфатний буфер) і рН (8,0) на вольтамперометричний сигнал. За цих оптимізованих умов піковий струм зидовудину змінювався лінійно з його концентрацією від 0,25 до 1,25 мг/л (від 1 до 5 мкМ). Були отримані межі виявлення та визначення 0,0025 та 0,025 мг/л, відповідно, і вихід 99,88% з відносним стандартним відхиленням 0,95%. Результати, отримані за допомогою цієї методології при аналізі препаратів, що містять зидовудин, були вигідно порівняні з результатами, отриманими методом рідинної хроматографії, рекомендованої Фармакопеею США [47].

Визначення зидовудину у розбавленому лужному електроліті за допомогою адсорбційної вольтамперометрії на плівковому ртутному електроді. Він описує метод стріппінгу для визначення зидовудину на рівнях субмікромолярної концентрації. Цей метод заснований на контрольованому адсорбційному накопиченні зидовудину на тонкоплівковому ртутному електроді з подальшим вимірюванням поверхневих частинок методом лінійної

розгортки. Оптимальні умови експерименту включають розчин NaOH $2,0 \times 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$ (допоміжний електроліт), потенціал накопичення -0,30 В і швидкість сканування 100 мВ \cdot с $^{-1}$. Відповідь на зидовудину є лінійною в діапазоні концентрацій 0,01 - 0,08 ppm. Після часу накопичення 5 хвилин виявилось, що межа виявлення становить 0,67 ppb ($2,5 \times 10^{-9}$ моль \cdot л $^{-1}$). Були також досліджені більш зручні методи вимірювання концентрації зидовудину в присутності диданозину, ацикловіру. Присутність зидовудину разом з АТФ демонструє корисність цього методу [48].

Запропоновано амперометричне вимірювання препарату проти ВІЛ зидовудину на модифікованому скляному вуглецевому електроді з Ag наноплівки та багат шарових вуглецевих нанотрубок. На основі нанокompозиту наноплівки срібла (Ag-NF) та багат шарових вуглецевих нанотрубок, іммобілізованих на скловугільному електроді, виготовлено новий сенсор зидовудину. Модифіковані електроди були охарактеризовані методами скануючої електронної мікроскопії, енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, рентгенівської дифракції, циклічної вольтамперометрії і лінійної вольтамперометрії. Результати показали, що електроосаджене срібло має структуру наноплівки, а подальші електрохімічні дослідження показали, що отриманий нанокompозит має високу електрокаталітичну активність і підходить для використання в сенсорах. Амперометричний метод за оптимальних умов використовується для визначення AZT в діапазоні від 0,1 до 400 ppm ($0,37 \text{ мкМ}^{-1}$, 5 мМ) з низькою межею виявлення 0,04 ppm (0,15 мкМ) (S/N = 3) і хорошою чутливістю. Підготовлений датчик мав точну та швидку реакцію на зидовудину і показав середнє відновлення 98,6% у реальних зразках [49, 50].

Висновки до розділу 3

Порівняльний аналіз фізико-хімічних методів для ідентифікації та кількісного аналізу противірусних препаратів є важливим кроком в напрямку розробки нових методик аналізу. Отримані результати дозволяють виявити можливості та обмеження існуючих методів, а також визначити напрями для подальших вдосконалень та інновацій.

Розробка нових методик аналізу є необхідною для подолання викликів, пов'язаних із зростанням комплексності противірусних препаратів та їхнім різноманіттям. Використання новітніх технологій, таких як розвиток високочутливих апаратних засобів та програмного забезпечення для обробки даних, може значно полегшити та покращити точність аналізу.

Одним із можливих напрямків розвитку є впровадження мультидисциплінарних підходів, які об'єднують фізико-хімічні методи з іншими науковими галузями, такими як біологія та інженерія. Це може відкрити нові можливості для комплексного аналізу противірусних препаратів та більш точної оцінки їх ефективності.

Отже, результати нашого дослідження не лише розкривають переваги фізико-хімічних методів у сфері противірусних препаратів, але також створюють базу для подальшого розвитку та вдосконалення методик аналізу, що може призвести до вдосконалення противірусної терапії та покращення управління вірусними захворюваннями.

ВИСНОВКИ

1. Огляд наукових джерел вказує на інтенсивне дослідження фармакологічної активності протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудину. Відзначається, що у проведенні аналізу даної групи лікарських засобів широко використовуються хімічні та фізико-хімічні методи. За даними літератури, в аналітичній документації високорозвинених країн світу переважає використання інструментальних методів аналізу.

2. Результати огляду літератури демонструють, що понад 75% всіх методик визначення блокаторів кальцієвих каналів становлять хроматографічні методи, такі як газова, рідинна, тонкошарова та ВЕРХ-хроматографія. Ці методи володіють великою чутливістю, точністю та селективністю, хоча витрати на матеріали можуть обмежувати їхнє використання. Також популярні оптичні методи, зокрема колориметрія, фотометрія, спектрофотометрія та флуориметрія, які застосовуються в 20% від загальної кількості методик, хоча і можуть виявитися менш селективними.

3. Електрохімічні методи займають менший обсяг, а саме 5% від загальної кількості методик. Ми вважаємо, що вивчення та розвиток перспективних, чутливих, специфічних та ефективних методів аналізу є ключовим напрямком досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Guangdi L. Antiviral Classification [Електронний ресурс] / L. Guangdi, J. Xixi, Z. Pan // Encyclopedia of Virology. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7917465/>
2. Seven classes of antiviral agents [Електронний ресурс] / [A. Ianevski, A. Shahzaib, A. Kraipit та ін.] // Cell Mol Life Sci. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9701656/>
3. Калашник К.В., Рябоконь Ю.Ю., Абрамов А.В., Рябоконь О.В. Вплив поліморфізму гену IL-17 (rs 612242) на перебіг хронічного гепатиту С, ефективність противірусної терапії та динаміку вмісту IL-17 в сироватці крові залежно від результатів лікування. – Гепатологія. – 2019. – №4. – С.28-39
4. Ahmed Abdullah Al Awadh. Nucleotide and nucleoside-based drugs: past, present, and future [Електронний ресурс] / Ahmed Abdullah Al Awadh // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X22003977>
5. Drug Discovery of Nucleos(t)ide Antiviral Agents: Dedicated to Prof. Dr. Erik De Clercq on Occasion of His 80th Birthday [Електронний ресурс] / [L. Guangdi, Y. Tingting, Z. Pan та ін.] // Molecules. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/923>.
6. Kayali Z. Finally sofosbuvir: an oral anti-HCV drug with wide performance capability / Z. Kayali, W. Schmidt. // Pharmacogenomics Personalized Medicine. – 2014. – №7. – 387 p.
7. Development of sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus infection / E. Lawitz et al. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 1358(1). – P. 56-67
8. Nekkala K. Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of sofosbuvir and velpatasvir drug product by reverse phase high performance liquid chromatography method / K. Nekkala, J V Shanmukha Kumar, D. Ramachandran // Asian J Pharm Clin Res. – 2018. – Vol 11, Issue 2. – P. 164-168

9. Aude Desnoyer. Pharmacokinetics, safety and efficacy of a full dose sofosbuvir-based regimen given daily in hemodialysis patients with chronic hepatitis C / Aude Desnoyer // *Journal of Hepatology*. – 2016. – Volume 65(1). – P 40-47
10. Nussenzweig Early therapy with remdesivir and antibody combinations improves COVID-19 disease in mice [Электронный ресурс] / [D. Martinez, A. Schaefer, S. Leist та ін.] // *BioRxiv*. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.27.428478v1.full>.
11. Zachary E. Zidovudine [Электронный ресурс] / E. Zachary, J. Curtis, E. Chaudhary // *StatPearls*. – 2023. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554419/>
12. Yates M. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold / M. Yates, K. Seley-Radtke. // *Antiviral Res.* – 2019. – №162. – P. 5–21
13. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection / [E. Lawitz, A. Mangia, D. Wyles та ін.]. // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – №368. – P. 1878–1887
14. Analytical method development and validation for the estimation of sofosbuvir and ledipasvir in raw material and tablet formulation by high performance thin layer chromatographic (HPTLC) method [Электронный ресурс] / Senthil KUMAR. N AND RAMESH. Jayaprakash, Anandakumar Karunakaran, Kailasam Periyana Gounder та ін.] // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: https://www.researchgate.net/publication/357768117_ANALYTICAL_METHOD_DEVELOPMENT_AND_VALIDATION_FOR_THE_ESTIMATION_OF_SOFOSBUVIR_AND_LEDIPASVIR_IN_RAW_MATERIAL_AND_TABLET_FORMULATION_BY_HIGH_PERFORMANCE_THIN_LAYER_CHROMATOGRAPHIC_HPTLC_METHOD
15. Green analytical method for the determination of sofosbuvir, ledipasvir, ribavirin and complex silymarin flavonoids simultaneously in biological fluids [Электронный ресурс] / Amira F. El-Yazbi, Yasmine Khalifa, Mohammed A.W.

Elkhatib, Ahmed F. El-Yazbi // Microchemical Journal. – 2021. – Режим доступа до ресурсу:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X21000497>

16. A concise review based on analytical method development and validation of sofosbuvir bulk and marketed dosage form [Электронный ресурс] / Hema V. Badgujar, Twinkle S. Rana, Ashok H. Akabari та ін.] // IAJPS. – 2021. – Режим доступа до ресурсу: <https://zenodo.org/records/5163144>.

17. Mamdouh Attia Abu-Zaied. Sofosbuvir Thio-analogues: Synthesis and Antiviral Evaluation of the First Novel Pyridine- and Pyrimidine-Based Thioglycoside Phosphoramidates [Электронный ресурс] / Mamdouh Attia Abu-Zaied, Sherif F. Hammad, Fathi T. Halaweish // ACS Omega. – 2020. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7315579/>

18. El-Kassem M. UV-Spectrophotometric and stability indicating rp-hplc methods for the determination of the hepatitis c virus inhibitor sofosbuvir in tablet dosage form / M. El-Kassem, M. Hassouna, M.A. Mohamed // Analytical Chemistry Letters. – 2018. – 8(2). – P. 217-229

19. Harmeet K. B. Sofosbuvir: A novel treatment option for chronic hepatitis C infection / K. B. Harmeet, S. Harmanjit, G. Nipunjot, K. N. Navreet // J Pharmacol Pharmacother. – 2014. – 5(4). – P. 278-284

20. Hamd Mohamed A El. Validated ultraviolet-spectrometric method for determination of sofosbuvir in tablets formulation / Mohamed A El Hamd // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2017. – 7(2). – P. 114-119.

21. Attia K.A.M. Application of different analytical techniques for determination of velpatsvir and sofosbuvir in the pharmaceutical preparation / K.A.M. Attia, N.M. El-Abasawi, A. El-Olemy, A.H. Abdelazim // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2018. – 41(9). – P.467-473.

22. Zaman B. Development and validation of spectrophotometric method for assay determination and in vitro dissolution studies of sofosbuvir tablets / Bakht Zaman //Journal of the Chemical Society of Pakistan. – 2017. – 39(6). - P. 962-969

23. Konam K. Quantification of sofosbuvir and velpatasvir in human plasma using LCMS/MS technique -application to pharmacokinetic study / K. Konam, S. Reddy // J. Young Pharm. – 2019. – 11(3). – P.266-273.
24. Suganthia A. Development of validated specific stability-indicating HPTLC method for the simultaneous determination of ledipasvir and sofosbuvir in fixed dose tablet formulation / A. Suganthia, S. Satheshkumara, T.K. Ravi // Asian J. Nanosci. Mater. – 2019. – 2. – P. 228-243.
25. Evangelin M.P. UPLC method development and validation for simultaneous estimation of sofosbuvir and ledipasvir in tablet dosage form / M.P. Evangelin, S.M. Babu, K.R. Kumar, P. Sunitha // World J. Pharm. Res. – 2018. – 4. – P. 225-229
26. Damle M.C. Stability indicating HPTLC method for sofosbuvir and velpatasvir in combination / M.C. Damle, P.B. Kalaskar // Int. J. Pharm. Sci. Drug Res. – 2020. – 12. – P. 129-135.
27. Mamatha J. Simultaneous RP-HPLC method development and it's validation for estimation of sofosbuvir and velpatasvir in their combined dosage form / J. Mamatha, N. Devanna // Rasayan J. Chem. – 2018. – 11. – P. 392-400
28. Hanuman T. New analytical method development and validation for simultaneous estimation of sofosbuvir and velpatasvir in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method / T. Hanuman, T. Sivakkumar, S. Sridhar// J. Drug Deliv. Ther. – 2020. – 10(5). – 143-148.
29. El-Yazbi A.F.Eco-friendly HPTLC method for simultaneous analysis of sofosbuvir and ledipasvir in biological and pharmaceutical samples: Stability indicating study / A.F. El-Yazbi, N.E. Elashkar, K.M. Abdel-Hay та інших. // Microchem. J. – 2020. – 154. – 104584 p.
30. Kishore, M.S. Development and validation of UV Spectrophotometric method for the estimation of Sofosbuvir and Ledipasvir in combined Pharmaceutical dosage forms / M.S. Kishore, C. Rambabu // Int. J. Chemtech Res. – 2019. – 12(3). – P. 33-40.

31. Ezzeldin E. Validated reversed-phase liquid chromatographic method with gradient elution for simultaneous determination of the antiviral agents: Sofosbuvir, ledipasvir, daclatasvir, and simeprevir in their dosage forms / E. Ezzeldin, N.F. Abo-Talib, M.H. Tammam та інші. // *Molecules*. – 2020. – 25(20). – 4611 p.
32. Mehmood Y. Development and validation of a stability-Indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of sofosbuvir and velpatasvir in fixed dose combination tablets and plasma / Y. Mehmood, I.U. Khan, Y. Shahzad та інші // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2019. – 32(4). – P. 1835-1842
33. Rezk M.R. Novel and sensitive UPLC-MS/MS method for quantification of sofosbuvir in human plasma: Application to a bioequivalence study / M.R. Rezk, E.B. Basalious, M.E. Amin // *Biomed. Chromatogr.* – 2016. – 30(9). – P. 1354-1362.
34. Noor U. Amin Mohsin. Zidovudine: structural modifications and their impact on biological activities and pharmacokinetic properties / Noor U Amin Mohsin, Matloob Ahmed, Muhammad Irfan // *Journal of the Chilean Chemical Society*. – 2019. – 64(3). – P. 4523-4530
35. Amira F El-Yazbi. Comparative validation of the determination of sofosbuvir in pharmaceuticals by several inexpensive ecofriendly chromatographic, electrophoretic, and spectrophotometric methods / F El-Yazbi Amira // *Journal of AOAC International*. – 2017. – 100(4). – P. 1000-1007
36. Rubiana M. Mainardes. Gremião Reversed phase HPLC determination of zidovudine in rat plasma and its pharmacokinetics after a single intranasal dose administration / M. Mainardes Rubiana, Palmira D. Maria // *Biol Res*. – 2009. – 42. – P. 357-364
37. Baker M. M. Validated spectrophotometric and chromatographic methods for analysis of the recently approved hepatitis C antiviral combination ledipasvir and sofosbuvir / MM Baker та інші. // *Annales pharmaceutiques francaises*. – 2018. – 76(1). – P. 16-31

38. Wafaa S Hassan. Comparative study of six sequential spectrophotometric methods for quantification and separation of ribavirin, sofosbuvir and daclatasvir: An application on Laboratory prepared mixture, pharmaceutical preparations, spiked human urine, spiked human plasma, and dissolution test / S Hassan Wafaa та інш. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2018. – 202(5). – P. 159-173

39. Ludivine Vieira-Sellai. Green HPLC quantification method of lamivudine, zidovudine and nevirapine with identification of related substances in tablets / Vieira-Sellai Ludivine, Quintana Mercedes, Diop Ousmane // *Green chemistry letters and reviews*. – 2022. – Vol. 15(3). – P. 695-704

40. Ashish S. Patil. A Review of Analytical Methods / S. Patil Ashish, Patil Zidovudine Gaurav // *Asian Journal of Pharmaceutical Technology & Innovation*. – 2015. – 03 (14). – P. 24-36

41. Verweij-van Wissen. Simultaneous determination of the HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors lamivudine, didanosine, stavudine, zidovudine and abacavir in human plasma by reversed phase high performance liquid chromatography / Verweij-van Wissen, C.P.W.G.M., R.E. Aarnoutse, D.M. Burger // *Journal of Chromatography B*. – 2005. – 816(1-2). – P. 121-129

42. Vasudev Pottabathini. Identification, Isolation and Structure Confirmation of Forced Degradation Products of Sofosbuvir / P. Vasudev, G. Vijayacharan, K. Muralidharan, B. Satyanarayana // *American Journal of Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol.7 Режим доступу до ресурсу: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=71906>

43. Yao L. Development and validation of sensitive methods for simultaneous determination of 9 antiviral drugs in different various environmental matrices by UPLC- MS/MS / L. Yao, W.Y. Dou, Y.F. Ma, Y.S. Liu // *Chemosphere*. – 2021. Режим доступу до ресурсу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521015198?via%3Dihub>

44. Courlet P. Determination of nucleosidic/tidic reverse transcriptase inhibitors in plasma and cerebrospinal fluid by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / P. Courlet, D. Spaggiari, M. Cavassini // *Clinical Mass Spectrometry*. – 2018. – 8. – P. 8-20.
45. Tarinas A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for determination of zidovudine, stavudine, lamivudine and indinavir in human plasma / A Tarinas, RD Tápanes, G Ferrer, J. Pérez // *Farm Hosp.* – 2007. – 31. – P. 243-247.
46. Gizem T. Analysis of abacavir lamivudine and zidovudine by spectrophotometric method in triple mixture / T. Gizem, ERK Nevin // *J. Fac. Pharm. Ankara / Ankara Ecz. Fak. Derg.* – 2023. – 47(3). – P. 927-934
47. Ashok P. A quantitative analysis of Zidovudine containing formulation by FT-IR and UV spectroscopy / P. Ashok, V. Sagar, B. Chandrakant // *Analytical Methods*. – 2010. – 2(11). – P.1756-1763
48. Mounika A. Method development and validation of zidovudine by rp-HPLC / A. Mounika, R.M. Yeshwanth, R.A. Raghuram // *IJRPC*. – 2014.- 4(3). – P. 606-610
49. Srinivasa rao Atlas. Simple and rapid method development and validation of RP-HPLC method for the determination of zidovudine in human plasma / Srinivasa rao Atlas, Baby Nalanda // *Journal of Pharmacy Research*. – 2016. – 10(4). – P. 160-166
50. Arnaldo Aguiar Castro. Determination of the Antiretroviral Drug Zidovudine in Diluted Alkaline Electrolyte by Adsorptive Stripping Voltammetry at the Mercury Film Electrode / Aguiar Castro Arnaldo, Queiroz Aucélio Ricardo, Adrián Rey Nicolás // *American Journal of Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol.2 No.2. – Режим доступа: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=5117>

Національний фармацевтичний університет

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
медичної хімії

Ліна ПЕРЕХОДА

«23» серпня 2023 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Діани АВЕТИСЯН

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу противірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудину»
керівник кваліфікаційної роботи: Ольга ВІСЛОУС, к.фарм.н., асистент
затверджений наказом НФаУ від «23» жовтня 2023 року № 233.
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: грудень 2023 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: провести огляд літератури щодо сучасних методів аналізу противірусних препаратів, зокрема софосбувіру та зидовудину. Визначити основні фізико-хімічні та аналітичні характеристики обраних препаратів.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
 - аналіз фармакологічного спектру противірусних препаратів групи нуклеозидних аналогів;
 - визначити основні фізико-хімічні та аналітичні характеристики, зокрема софосбувіру та зидовудину;
 - проаналізувати та узагальнити літературні та патентні джерела щодо існуючих методик ідентифікації та кількісного визначення лікарських засобів, противірусних препаратів
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): таблиць 6, рисунків 9.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	07.09.2023 р.	07.09.2023 р.
2	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	09.10.2023 р.	09.10.2023 р.
3	Ольга ВІСЛОУС, асистент кафедри медичної хімії	08.11.2023 р.	08.11.2023 р.

7. Дата видачі завдання: «23» серпня 2023 року.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Вибір теми.	вересень 2023 р.	виконано
2	Аналіз літературних джерел.	жовтень 2023 р.	виконано
3	Проведення експериментальних досліджень.	жовтень-листопад 2023 р.	виконано
4	Оформлення роботи.	листопад-грудень 2023 р.	виконано
5	Надання готової роботи до комісії.	грудень 2023 р.	виконано

Здобувач вищої освіти

Діана АВЕТИСЯН

Керівник кваліфікаційної роботи

Ольга ВІСЛОУС

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 233
по Національному фармацевтичному університету

від 23 жовтня 2023 року

Затвердити тему, керівника та рецензента кваліфікаційної роботи здобувачу вищої освіти заочної форми навчання фармацевтичного факультету НФаУ 2024 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.	Аветисян Діана Мурадівна	Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів - софосбувір та зидовудину	Comparative characteristics of modern methods of analysis of antiviral drugs from the group of nucleoside analogues - sofosbuvir and zidovudine	ас. Віслоус О. О.	доц. Бевз Н. Ю.

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**

№ 124967 від « 28 » січня 2023 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти заочної форми навчання Аветисян Діани Мурадівни, ____ курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів - софосбувір та зидовудину / Comparative characteristics of modern me-thods of analysis of antiviral drugs from the group of nucleoside analo-gues - sofosbuvir and zidovudine», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

0%

24%

ВІДГУК

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

Діани АВЕТИСЯН

**на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу
протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та
зидовудину».**

Актуальність теми. Актуальність контролю якості лікарських засобів, зокрема протівірусних препаратів софосбувіру та зидовудину, полягає в гарантії їхньої ефективності та безпеки для пацієнтів. Дослідження сучасних методів аналізу визначає важливість розробки точних та чутливих методик аналізу для забезпечення якості лікарських препаратів та покращення їхнього внеску у клінічну практику.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Під час роботи здобувач вищої освіти опрацював літературні джерела свідчать про те, що аналіз софосбувіру та зидовудину здійснюються в основному хроматографічними та спектрофотометричними методами. Результати досліджень знайдуть практичне застосування у фармацевтичному аналізі.

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

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

Науковий керівник

Ольга ВІСЛОУС

«08» грудня 2023 р.

РЕЦЕНЗІЯ

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

Діани АВЕТИСЯН

**на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу
протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та
зидовудину».**

Актуальність теми. Контроль якості для софосбувіру та зидовудину гарантує ефективність, стабільність та відповідність стандартам, забезпечуючи надійність протівірусного лікування.

Теоретичний рівень роботи. Аналітичний огляд літературних джерел інформації щодо дослідження софосбувіру та зидовудину фізичними та фізико-хімічними методами аналізу.

Пропозиції автора з теми дослідження. Приведені дані можуть бути застосовані для подальшого пошуку оптимальних методик ідентифікації та кількісного визначення софосбувіру та зидовудину як чистому вигляді, так і в суміші з іншими діючими та допоміжними речовинами.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Під час роботи здобувач вищої освіти проаналізував літературні дані, освоїв фізичні, фізико-хімічні методи досліджень, які представляють практичний інтерес.

Недоліки роботи. За змістом роботи зустрічаються орфографічні помилки, технічні помилки.

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

Рецензент _____

доц. Наталія БЕВЗ

«11» грудня 2023 р.

ВИТЯГ
з протоколу засідання кафедри медичної хімії
№ 6 від 21 грудня 2023 р.

ПРИСУТНІ:

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

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Звіт про стан виконання кваліфікаційної роботи здобувача вищої освіти фармацевтичного факультету, Фс18(5.5з)-01а групи, спеціальності «226 Фармація, промислова фармація», освітньої програми «Фармація» Діани АВЕТИСЯН на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу противірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудину»

СЛУХАЛИ: доповідь здобувача вищої освіти фармацевтичного факультету, Фс18(5.5з)-01а групи, спеціальності «226 Фармація, промислова фармація», освітньої програми «Фармація» Діани АВЕТИСЯН на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу противірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудину», керівник – асистент кафедри медичної хімії, к.фарм.наук Ольга ВІСЛОУС.

УХВАЛИЛИ: рекомендувати кваліфікаційну роботу Діану АВЕТИСЯН до офіційного захисту в Екзаменаційній комісії.

**Зав. кафедри медичної хімії,
професор**

Ліна ПЕРЕХОДА

**Секретар кафедри медичної хімії,
доцент**

Марина РАХІМОВА

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

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

Направляється здобувач вищої освіти Діана АВЕТИСЯН до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «Порівняльна характеристика сучасних методів аналізу протівірусних препаратів з групи нуклеозидних аналогів – софосбувір та зидовудину».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Микола ГОЛІК /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

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

Керівник кваліфікаційної роботи

Ольга ВІСЛОУС

«08» грудня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

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

Завідувачка кафедри
медичної хімії

Ліна ПЕРЕХОДА

«21» грудня 2023 року

Кваліфікаційну роботу захищено

у Екзаменаційній комісії

« ____ » _____ 2024 р

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,

доктор фармацевтичних наук, професор

_____ / Марія ЗАРІЧКОВА /