

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

ШОВКОВА ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 615.283:543.054:543.062:543.422.3/.7:543.544

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК
ВИЗНАЧЕННЯ СЕКНІДАЗОЛУ
ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат

**дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

- Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, доцент
КЛИМЕНКО Ліна Юріївна
Національний фармацевтичний університет,
доцент кафедри аналітичної хімії
- Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, професор
ГРИЗОДУБ Олександр Іванович
ДП «Український науковий фармакопейний
центр якості лікарських засобів»,
директор, головний науковий співробітник
Відділу Державної Фармакопеї України
- доктор фармацевтичних наук, професор
КАПЛАУШЕНКО Андрій Григорович
Запорізький державний медичний університет,
завідуючий кафедрою фізколоїдної хімії

Захист відбудеться « 24 » червня 2019 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

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

Автореферат розіслано « 17 » травня 2019 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
професор

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Похідні 5-нітроїмідазолу представляють собою групу антипротозойних лікарських засобів, широко використовуваних для лікування інфекційних захворювань, що викликаються трихомонадами, лямбліями, лейшманіями, амебами тощо, а також в комплексній терапії виразки шлунка і дванадцятипалої кишки, пов'язаної з *Helicobacter pylori*. Похідні 5-нітроїмідазолу також широко застосовують в ветеринарії – для лікування великої рогатої худоби та овець, свиней, хутрових звірів, собак та котів, домашньої птиці, медоносних бджіл. Секнідазол – лікарський препарат з групи 5-нітроїмідазолів, що характеризується тривалим періодом напіввиведення з організму. Препарат має цілу низку побічних ефектів, що проявляються класичними симптомами гострої інтоксикації (запаморочення, нудота, блювота), особливо при взаємодії з іншими лікарськими засобами, а в разі застосування на фоні алкоголю можливі летальні випадки – навіть при прийомі терапевтичних доз. Виходячи з даних щодо фармакологічних та токсикологічних властивостей секнідазолу, можна вважати його потенціальним об'єктом досліджень в різних галузях аналітичної токсикології – як причину навмисних і випадкових отруєнь в разі прийому на фоні алкоголю, як речовину, наявність та вміст якої потрібно контролювати у продуктах харчування тваринного походження (м'ясо, птиця, яйця, молоко, сири, мед тощо), як речовину, що забруднює навколишнє середовище, зокрема, ґрунтові води.

Секнідазол є практично недослідженою речовиною з точки зору хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) – немає інформації щодо його поведінки в умовах загальноприйнятого систематичного токсикологічного аналізу (ефективність загальних способів пробопідготовки, хроматографічна поведінка в стандартних ТШХ-скринінгових системах тощо); у міжнародному виданні «Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material» (2011), що містить систематизовані дані щодо виконання хіміко-токсикологічних досліджень багатьох лікарських препаратів, інформація відносно секнідазолу відсутня.

Питанням розробки методик аналізу секнідазолу присвячено поодинокі публікації, проте вони призначені для його визначення або в лікарських формах (Saffaj et al., 2004; Darwish et al., 2012; El Wallily et al., 2000; Rivera et al., 2000), або в біологічних рідинах з метою дослідження фармакокінетичних параметрів (Ravi et al., 1997; Li et al., 2007; Zhu et al., 2007; Tenenbaum et al., 1993; Du et al., 2014), або в харчових продуктах (Mitrowska et al., 2017; Sun et al., 2009, 2007). Комплексні дослідження похідних 5-нітроїмідазолу в харчових продуктах та зразках повітря, ґрунтів та води методами капілярного електрофорезу, капілярної електрохроматографії та високоефективної рідинної хроматографії проведено в Іспанії (Hernández Mesa, 2016).

Таким чином, розробка комплексу методик виявлення та кількісного визначення секнідазолу в біологічних рідинах для застосування в ХТА є актуальною задачею сучасної фармацевтичної науки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0114U000958) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України.

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є обґрунтування та розробка методик виявлення та кількісного визначення секнідазолу у розчинах та біологічних рідинах, методик пробопідготовки біологічних рідин для подальшого визначення в них секнідазолу та їх валідація для підтвердження придатності до застосування в ХТА.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

- обґрунтувати вибір методів для ХТА секнідазолу та концентраційний діапазон вмісту секнідазолу в біологічних рідинах для розробки методик його виявлення та кількісного визначення з урахуванням результатів аналізу даних наукових джерел щодо фармакологічної і токсикологічної характеристики секнідазолу та наявних методик його виявлення та визначення;
- вивчити поведінку секнідазолу в умовах систематичного токсикологічного ТШХ-аналізу та запропонувати методики виявлення секнідазолу за допомогою методу ТШХ в комбінації з кольоровими реакціями на пластинах;
- розробити методики виявлення секнідазолу за допомогою методів ВЕРХ з УФ- і МС-детекцією та ГРХ з ПІД- і МС-детекцією;
- розробити методики кількісного визначення секнідазолу з використанням методів СФ, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ГРХ/ПІД і ГРХ/МС, провести їх валідацію за модельними розчинами у варіантах застосування МКГ, МС та МД з метою підтвердження їх придатності до застосування в ХТА;
- вивчити кислотно-основні рівноваги секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1) та дослідити ефективність екстракції секнідазолу з водних розчинів в двох напрямках – рідинно-рідинна екстракція органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та рідинна екстракція амфіфільними розчинниками;
- запропонувати шляхи ізолювання секнідазолу з біологічних рідин (реагенти для розриву зв'язків секнідазолу з компонентами біологічної матриці та осадження білків та формених елементів крові, розчинники для настоювання та екстракції, умови екстракційної, ТШХ- та ТФ-очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу та шляхи концентрування секнідазолу);
- оцінити специфічність/селективність запропонованих процедур пробопідготовки по відношенню до компонентів біологічної матриці, стабільність секнідазолу в аналізованих розчинах, встановити величини ступеня ізолювання секнідазолу з крові та сечі за запропонованими методиками на нижній межі діапазону застосування методик кількісного визначення секнідазолу;
- провести основний етап валідації методик кількісного визначення секнідазолу в крові та сечі за такими параметрами, як лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність з використанням зразків матриці у варіантах МКГ, МС та МД; зробити прогноз сумарної невизначеності методик.

Об'єкт дослідження – ХТА біологічних рідин на наявність та вміст секнідазолу.

Предмет дослідження – методики виявлення та кількісного визначення секнідазолу у модельних розчинах та біологічних рідинах, методики пробопідготовки крові і сечі для подальшого визначення в них секнідазолу, валідаційні параметри методик кількісного визначення секнідазолу у модельних розчинах та біологічних рідинах.

Методи дослідження. При вирішенні поставлених у роботі задач було застосовано фізичні та фізико-хімічні методи аналізу – ГРХ/ПД, ГРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ТШХ, СФ; методи ізолювання речовин із біологічних рідин шляхом їх обробки депротейнізуючими агентами з подальшою рідинно-рідинною екстракцією органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та шляхом обробки біологічних рідин амфифільними розчинниками з подальшим відділенням органічного шару в умовах насичення водної фази електролітом. Планування експерименту та обробку отриманих результатів проводили хемометричними методами моделювання, аналізу та візуалізації багатомірних даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше виконано дослідження з розробки комплексу методик виявлення та кількісного визначення секнідазолу в біологічних рідинах, обґрунтовано придатність їх застосування в ХТА та запропоновано алгоритм виконання досліджень біологічних рідин на наявність та кількісний вміст секнідазолу.

Вперше досліджено поведінку секнідазолу та ряду інших похідних 5-нітроімідазолу в умовах систематичного ТШХ-аналізу (стандартні ТШХ-системи розчинників та реактиви, що використовують для ТШХ-скринінгу речовин кислого, нейтрального та основного характеру) на пластинах з двома типами підложки (пластик та скло) та з УФ-індикатором і без нього із застосуванням декількох режимів проявлення. Підбрано склад окремих реагентів та модифіковано методику застосування розчинів нінгідрину та *n*-ДМАБ, що дозволяє селективно, стабільно і відтворювано виявляти секнідазол в присутності препаратів порівняння. За результатами досліджень отримано позитивні рішення на видачу 2 патентів України на корисну модель (№ u201812236 від 10. 12. 2019 р., № u201812410 від 13. 12. 2019 р.). Вперше підбрано некорелюючі рухомі фази в методі ТШХ для ідентифікації секнідазолу.

Вперше досліджено УФ-спектри секнідазолу в 0,1 М розчині хлоридної кислоти, 96% етанолі, 0,1 М метанольному розчині калій гідроксиду та 0,1 М розчині натрій гідроксиду та розраховано значення його питомих і молярних показників поглинання. Запропоновано чотири нові методики кількісного визначення секнідазолу методом УФ-СФ та проведено валідацію запропонованих методик у варіантах МКГ, МС та МД.

Запропоновано чотири нові хроматографічні методики кількісного визначення секнідазолу методами ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ГРХ/ПД, ГРХ/МС та проведено їх валідацію у варіантах МКГ, МС та МД.

Запропоновано нові методики пробопідготовки біологічних рідин для подальшого визначення в них секнідазолу (реагенти для розриву зв'язків секнідазолу з компонентами біологічної матриці та осадження білків і формених елементів крові, розчинники для настоювання та екстракції, умови екстракційної, ТШХ- та ТФ-очистки). За результатами досліджень отримано патент України на корисну модель №134279.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі комплексу проведених досліджень обґрунтовано алгоритм ХТА біологічного матеріалу на секнідазол, що знайшла своє відображення в підготовленому проекті методичних рекомендацій «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на секнідазол», які рекомендовано застосовувати в практичній роботі відділень судово-медичної токсикології для вирішення питань щодо отруєння секнідазолом, в клінічних лабораторіях з метою визначення секнідазолу в біологічних рідинах, а також у криміналістичному аналізі.

Розроблені методики виявлення та кількісного визначення секнідазолу у розчинах та біологічних рідинах впроваджено в практику роботи відділень судово-медичної токсикології Житомирського, Миколаївського, Полтавського, Херсонського, Харківського ОБСМЕ і ДУ «Головне бюро судово-медичної експертизи» МОЗ України та науково-педагогічний процес кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри лікарської та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету, кафедри неорганічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри хімії фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником визначено мету та завдання досліджень, розроблено методичні підходи, згідно з якими підібрано методи виконання експериментальної частини дисертації.

Безпосередньо здобувачем проведено патентно-інформаційний пошук щодо фармакологічної та токсикологічної характеристики секнідазолу, його фармакокінетики, методик виявлення та визначення в лікарських формах та біологічних об'єктах.

Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження з розробки методик виявлення та кількісного визначення секнідазолу методами ГРХ/ПД, ГРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ТШХ, СФ, проведено їх валідацію в рамках щонайменше однієї аналітичної послідовності, встановлено константи кислотно-основних рівноваг секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1), вивчено ефективність екстракції секнідазолу з водних розчинів, розроблено способи пробопідготовки біологічних рідин для подальшого визначення в них секнідазолу. Дисертантом проведено основний етап валідації методик кількісного визначення секнідазолу в крові та сечі.

Дослідження методом ВЕРХ проведено на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків, директор – В. Ф. Першин), ГРХ – на базі ТОВ «Дослідний завод» «ДНЦЛЗ» (м. Харків, директор – В. Б. Демьохін) та Черкаського ОБСМЕ (м. Черкаси, начальник – Федоренко М. А.).

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведено дослідження. Персональний внесок у всіх опублікованих працях із науковцями (Клименко Л. Ю., Шовковою З. В., Коваленко С. М., Жуковою Т. В., Лебединцем В. О., Богомол Н. П., Костіною Т. А., Шкарлат Г. Л., Савченком М. А., Улановою В. А., Шпичаком О. С., Микитенко О. Є., Гриценком І. С., Щетко А., Ель Хардузі С., Кізь О. В., Хмельницькою О.) наведено за текстом дисертації, а також в авторефераті у списку публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні результати та положення дисертаційної роботи викладено і обговорено на XXIII, XXIV та XXV Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 21 квітня 2016 р., 20 квітня 2017 р., 18 – 20 квітня 2018 р.), Научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Медицинская наука: достижения и перспективы» (Душанбе, 29 ап-

реля 2016 г.), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами» (Пермь, 12 – 14 мая 2016 г.), VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13 – 16 вересня 2016 р.), VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 25 – 26 апреля 2016 г.), LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Минск, 17 – 19 апреля 2017 г.), 69-ой итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 19 – 20 апреля 2017 г.), Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених, присвяченому 60-річчю Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України (Тернопіль, 24 – 26 квітня 2017 р.), IV та V Международной научно-практической конференции «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Алматы, 20 – 21 апреля 2017 г., 19 – 20 апреля 2018 г.), XIX Науковій молодіжній конференції «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (Одеса, 26 – 28 квітня 2017 р.), IX та X Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, 18 – 20 квітня 2017 р., 23 – 25 квітня 2018 р.), XII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием «Роль молодежи в развитии медицинской науки» (Душанбе, 28 апреля 2017 г.), XI та XII Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 19 травня 2017 р., 18 травня 2018 р.), I та II Всеукраїнській науковій конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, 17 – 18 травня 2017 р., 16 травня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно-активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченій 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (Харків, 12 – 13 квітня 2018 р.), XIII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Харків, 2 – 4 травня 2018 р.), XVI Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії (Дніпро, 21 – 24 травня 2018 р.), II Всеукраїнській конференції студентів, аспірантів та молодих науковців з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної хімії» (Миколаїв, 24 – 25 травня 2018 р.), I Науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 18 жовтня 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 33 наукові роботи, у тому числі 7 статей у наукових фахових виданнях, з яких 4 статті в іноземних виданнях (3 – в журналах, що індексуються міжнародною наукометричною базою Scopus) та 26 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 308 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту дисертації – 159 сторінок); робота складається із вступу, огляду літератури (розділ 1) та 5 експериментальних розділів (розділи 2 – 6), висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Роботу ілюстровано 99 таблицями, 23 рисунками та 19 схемами. Список використаних джерел містить 168 найменувань, з них 85 кирилицею та 83 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Секнідазол як об'єкт хіміко-токсикологічних досліджень (огляд літератури). В огляді літератури узагальнено інформацію щодо фармакологічних та токсикологічних властивостей лікарських речовин з групи похідних 5-нітроімідазолу (антимікробні препарати широкого спектру дії для системного лікування інфекцій, викликаних облигатними анаеробами, деякими факультативними анаеробами і найпростішими) і, зокрема, секнідазолу (рис. 1) як їх представника. Показано, що на сьогодні цю групу препаратів на світовому ринку представлено більше, ніж 10 діючими речовинами, проте в Україні зареєстровано торгівлі найменування лише для метронідазолу, орнідазолу, секнідазолу, німоразолу та тинідазолу.

Висвітлено сфери застосування похідних 5-нітроімідазолу, зокрема в ветеринарії та сільському господарстві; описано побічні реакції, що можуть виникати при терапії секнідазолом: з боку ШКТ – неприємний смак і сухість у роті, нудота, діарея, болі в животі, блювота; з боку ЦНС – головний біль, запаморочення, порушення сну і координації рухів, атаксія; при передозуванні – депресивні реакції, периферичні невротатії, судомні реакції. Наведено дані відносно несумісності секнідазолу з алкоголем – може розвиватися гострий токсичний синдром, так звана «дисульфірамоподібна реакція», що проявляється інтенсивною блювотою, постійною нудотою, різким головним болем, відчуттям жару, сильним болем в животі, пригніченням психосоматичного стану, тахікардією і задишкою – навіть до повного паралічу дихальної системи та смерті. Токсичність терапевтичних доз секнідазолу на фоні алкоголю робить необхідним розробку методик виявлення та визначення секнідазолу для ХТА, орієнтуючись на його терапевтичні концентрації в біологічних рідинах.

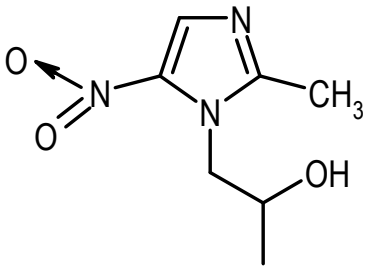


Рис. 1. Хімічна структура секнідазолу

Систематизовано інформацію відносно методик виявлення та кількісного визначення секнідазолу в лікарських формах та різноманітних біологічних матрицях (продуктах харчування, крові та сечі тварин і людини тощо) з використанням оптичних та хроматографічних методів аналізу з акцентом на концентраційні діапазони застосування методик та їх метрологічні параметри, на основі чого запропоновано проводити ХТА біологічних рідин на секнідазол з використанням методів ВЕРХ, ГРХ, СФ та ТШХ за нативною речовиною.

Розділ 2. Виявлення та кількісне визначення секнідазолу методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області спектра. Для дослідження можливостей застосування методу СФ для виявлення та кількісного визначення секнідазолу досліджено закономірності його світлопоглинання в УФ-області спектра з використанням різних розчинників, встановлено максимуми поглинання і розраховано питомі та молярні показники світлопоглинання (рис. 2).

Проведено розробку методик кількісного визначення секнідазолу паралельно з їх валідацією одночасно в трьох варіантах – МКГ, МС та МД – за такими валідаційними параметрами: стабільність, діапазон застосування, лінійність/калібрувальна модель, правильність, прецизійність, межа кількісного визначення, а також прогноз загальної невизначеності методики за методом ТАЕ.

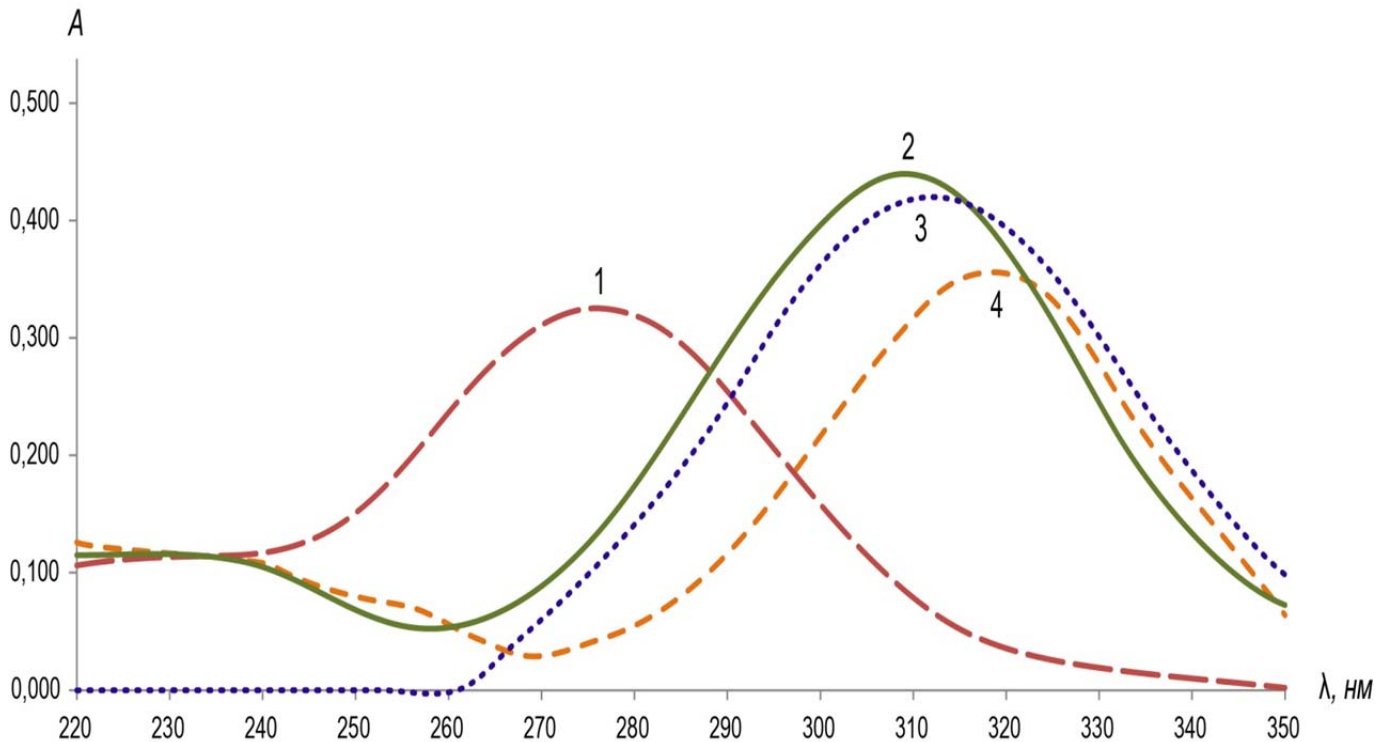


Рис. 2. УФ-спектри секнідазолу ($l = 10$ мм; концентрація 10 мкг/мл):

- 1 – 0,1 М НСІ, $\lambda_{\max} = 277$ нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 320 \pm 7$, $\varepsilon = 5920 \pm 130$);
- 2 – 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\lambda_{\max} = 310$ нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 433 \pm 8$, $\varepsilon = 8025 \pm 140$);
- 3 – 0,1 М КОН в CH_3OH , $\lambda_{\max} = 314$ нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 414 \pm 13$, $\varepsilon = 7670 \pm 230$);
- 4 – 0,1 М NaOH, $\lambda_{\max} = 319$ нм ($A_{1\text{CM}}^{1\%} = 365 \pm 5$, $\varepsilon = 6760 \pm 100$)

Валідацію виконували за модельними розчинами із застосуванням нормалізованих координат, аналітичний діапазон застосування методики $D = 25 - 125\%$, $25 - 150\%$ або $25 - 175\%$ (для МД – лише $25 - 175\%$); кількість концентраційних рівнів $g = 5, 6$ або 7 відповідно (для МД – лише 7) з постійним кроком 25% . Критерії прийнятності валідаційних параметрів сформовано на підставі систематичного застосування принципу незначущості, виходячи з величини максимально допустимої невизначеності методики (20%) в межах двох підходів – припущення щодо незначущості невизначеності кількісного визначення аналіту в модельних розчинах $\Delta_{\text{As}}^{\text{model}}$ у порівнянні з повною невизначеністю результатів аналізу Δ_{As} (Підхід 1) та рівності невизначеностей процедури пробопідготовки та кількісного визначення аналіту в модельних розчинах (Підхід 2).

У разі застосування МКГ критерії прийнятності лінійної залежності і прецизійності встановлювали виходячи з положення про рівність невизначеності побудови калібрувального графіка Δ_{cal} і невизначеності аналізу досліджуваного зразка Δ_{sample} .

Критичним параметром розроблених методик є стабільність – вона задовольняє критеріям прийнятності для всіх періодів часу тільки при використанні як розчинника 0,1 М НСІ. Розчини секнідазолу в 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ стабільні протягом 36 – 48 годин після їх приготування, у 0,1 М NaOH – лише протягом 12 – 24 годин, а вимірювання з використанням 0,1 М КОН в CH_3OH необхідно проводити лише безпосередньо після приготування розчинів.

Отримані результати було враховано при визначенні основних валідаційних параметрів методик – результати наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Результати валідації УФ-спектрофотометричних методик кількісного визначення секнідазолу (діапазон застосування $D = 25 - 175\%$)

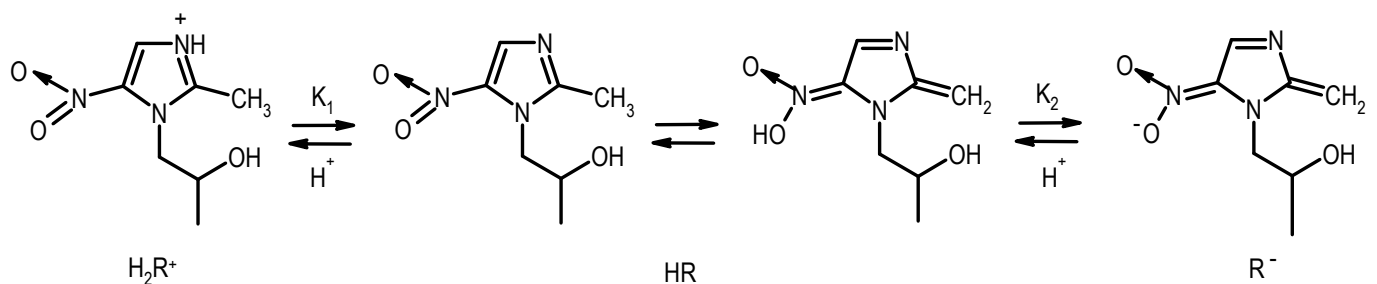
Розчинник	Валідаційні параметри та критерії прийнятності (Підхід1 / Підхід2)				
	лінійність		правильність	прецизійність	прогноз невизначеності
МКГ	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	Δ_{RR}^{model}	Δ_{As}^{model}
	$\leq 2,25 / 4,96\%$	$\geq 0,9991 / 0,9958$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 4,52 / 10,00\%$	$\leq 4,52 / 10,00\%$
0,1 М НСІ	2,282% (-/+)	0,9992 (+/+)	0,39% (+/+)	4,40% (+/+)	6,61% (-/+)
96% C ₂ H ₅ ОН	0,836% (+/+)	0,9999 (+/+)	0,25% (+/+)	2,31% (+/+)	3,52% (+/+)
0,1 М КОН в CH ₃ ОН	1,890% (+/+)	0,9995 (+/+)	0,64% (+/+)	7,05% (-/+)	10,61% (-/-)
0,1 М NaOH	1,337% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,41% (+/+)	4,15% (+/+)	6,28% (-/+)
МС	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	Δ_Z^{model}	Δ_{As}^{model}
	$\leq 3,18 / 7,02\%$	$\geq 0,9983 / 0,9915$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$
0,1 М НСІ	2,282% (+/+)	0,9992 (+/+)	1,13% (+/+)	4,66% (+/+)	5,79% (+/+)
96% C ₂ H ₅ ОН	0,836% (+/+)	0,9999 (+/+)	1,45% (+/+)	3,77% (+/+)	5,22% (+/+)
0,1 М КОН в CH ₃ ОН	1,890% (+/+)	0,9995 (+/+)	1,64% (+/+)	6,48% (-/+)	8,12% (-/+)
0,1 М NaOH	1,337% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,48% (+/+)	3,01% (+/+)	3,49% (+/+)
МД	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	Δ_{RR}^{model}	Δ_{As}^{model}
	$\leq 3,18 / 7,02\%$	$\geq 0,9983 / 0,9915$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$
0,1 М НСІ	2,282% (+/+)	0,9992 (+/+)	0,52% (+/+)	4,04% (+/+)	4,56% (+/+)
96% C ₂ H ₅ ОН	0,836% (+/+)	0,9999 (+/+)	0,11% (+/+)	3,52% (+/+)	3,63% (+/+)
0,1 М КОН в CH ₃ ОН	1,890% (+/+)	0,9995 (+/+)	0,81% (+/+)	5,53% (+/+)	6,34% (+/+)
0,1 М NaOH	1,337% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,04% (+/+)	2,97% (+/+)	3,01% (+/+)

Для подальшого застосування в ХТА з метою розробки методик аналізу біологічних рідин на наявність і вміст секнідазолу рекомендовано три методики – з використанням 0,1 М НСІ, 96% C₂H₅ОН та 0,1 М NaOH як розчинників.

Розділ 3. Визначення констант іонізації секнідазолу у водних розчинах і сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1). Дослідження екстракції секнідазолу з водних розчинів. З метою підбору оптимальних умов екстракції секнідазолу з водних розчинів досліджено його кислотно-основні рівноваги у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1).

Протолітичні перетворення секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками наведено на запропонованій нами схемі (схема 1):

Схема 1



Для дослідження кислотно-основних рівноваг було зареєстровано УФ-спектри секнідазолу у відповідних середовищах з різними значеннями рН та розглянуто зміни, що відбуваються при поступовому збільшенні рН розчину. Для створення необхідних значень рН було використано універсальні буферні розчини в інтервалі рН від 2 до 12 (з дискретністю 0,2 одиниці рН), а також розчини хлоридної кислоти (до 4 М) для створення рН нижче 2 і розчини натрій гідроксиду (до 8 М) для створення рН вище 12. Для дослідження рівноваг у змішаних розчинниках готували суміші універсальних буферних розчинів, кислот або лугів та ізопропанолу, ацетонітрилу або етанолу у співвідношенні 1:1. Результати наведено на рис. 3.

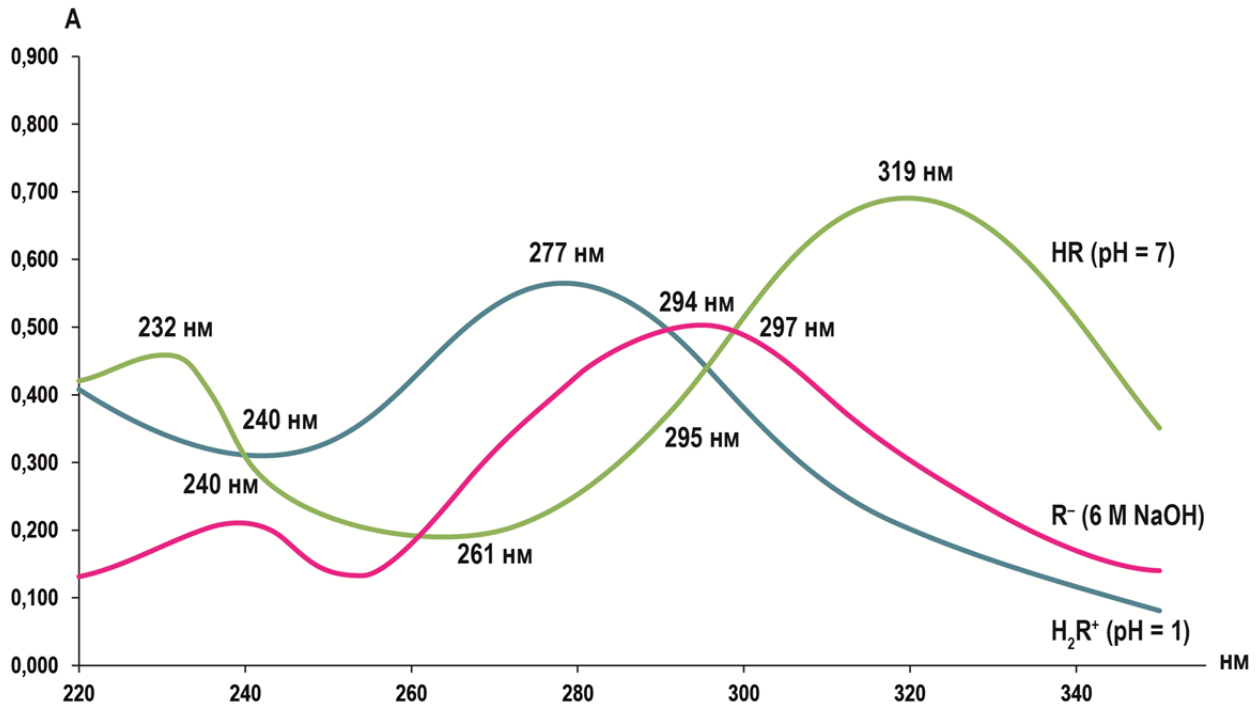


Рис. 3. УФ-спектри кислотно-основних форм секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфифільними розчинниками ($l = 10$ мм; концентрація 20 мкг/мл)

В сильно лужному середовищі (вище 4 М NaOH) існує аніонна форма секнідазолу R^- (максимуми поглинання при 240 і 294 нм), при подальшому зменшенні значення рН з'являється молекулярна форма HR (максимуми поглинання при 232 і 319 нм), в сильно кислому середовищі (рН < 1,7) існує кінцевий продукт перетворень – протонувана форма H_2R^+ (максимум поглинання при 277 нм).

На спектрах поглинання секнідазолу у воді та сумішах води і амфифільних розчинників в інтервалі кислотності від рН 2 до рН 12 (буферні розчини), а також в розчинах кислоти хлоридної (до 4 М) і натрій гідроксиду (до 8 М) спостерігаються чотири ізобестичні точки, що характеризують дві протолітичні рівноваги (рівновага 1 – 240 і 295 нм, рівновага 2 – 261 і 297 нм). Положення ізобестичних точок рівноваги 2 коливається в діапазоні ± 3 нм, що, на наш погляд, пов'язано з наявністю таутомерних перетворень для молекулярної форми секнідазолу.

Константу рівноваги 1 визначено методом спектрофотометричного титрування, її показник становить 2,31 для води, 2,46 – для суміші води та ізопропанолу (1:1), 2,63 – для суміші води і ацетонітрилу (1:1), 2,40 – для суміші води і етанолу (1:1). Визначити константу рівноваги 2 зазначеним методом неможливо.

Для обґрунтування процедур пробопідготовки біологічних рідин для визначення в них секнідазолу змодельовано схему дослідження екстракції секнідазолу з водних розчинів в двох напрямках – рідинно-рідинна екстракція органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та рідинна екстракція амфіфільними розчинниками, а також обґрунтовано схему обробки відповідних експериментальних даних.

Традиційно залежність ступеня екстракції аналіту з водних розчинів від рН середовища досліджують експериментально з використанням буферних розчинів з певними значеннями рН, проте в ХТА в ході пробопідготовки біологічних об'єктів необхідне значення рН створюють за допомогою кислот, розчину амоніаку та лугів, тому в експерименті рН середовища створювали за допомогою 6 М НСІ (рН = 2), 0,1 М НСІ (рН = 5), 25% NH₃ (рН = 9) або 10% NaOH (рН = 12).

У всіх випадках ступінь екстракції визначали для одноразової обробки водного розчину органічним розчинником протягом 15 хвилин. Кількість екстрагованого секнідазолу визначали за допомогою трьох розроблених УФ-СФ-методик з використанням 0,1 М НСІ, 96% C₂H₅ОН та 0,1 М NaOH.

Досліджено ефективність екстракції секнідазолу з водних розчинів в залежності від рН середовища із застосуванням рідинно-рідинної екстракції хлороформом та сумішшю хлороформ – ізопропанол (8:2) після попереднього висолювання амоній сульфатом та без нього, а також ізопропанолом, ацетонітрилом та етанолом з подальшим висолюванням та після попереднього висолювання амоній сульфатом.

Результати досліджень наведено на рис. 4.

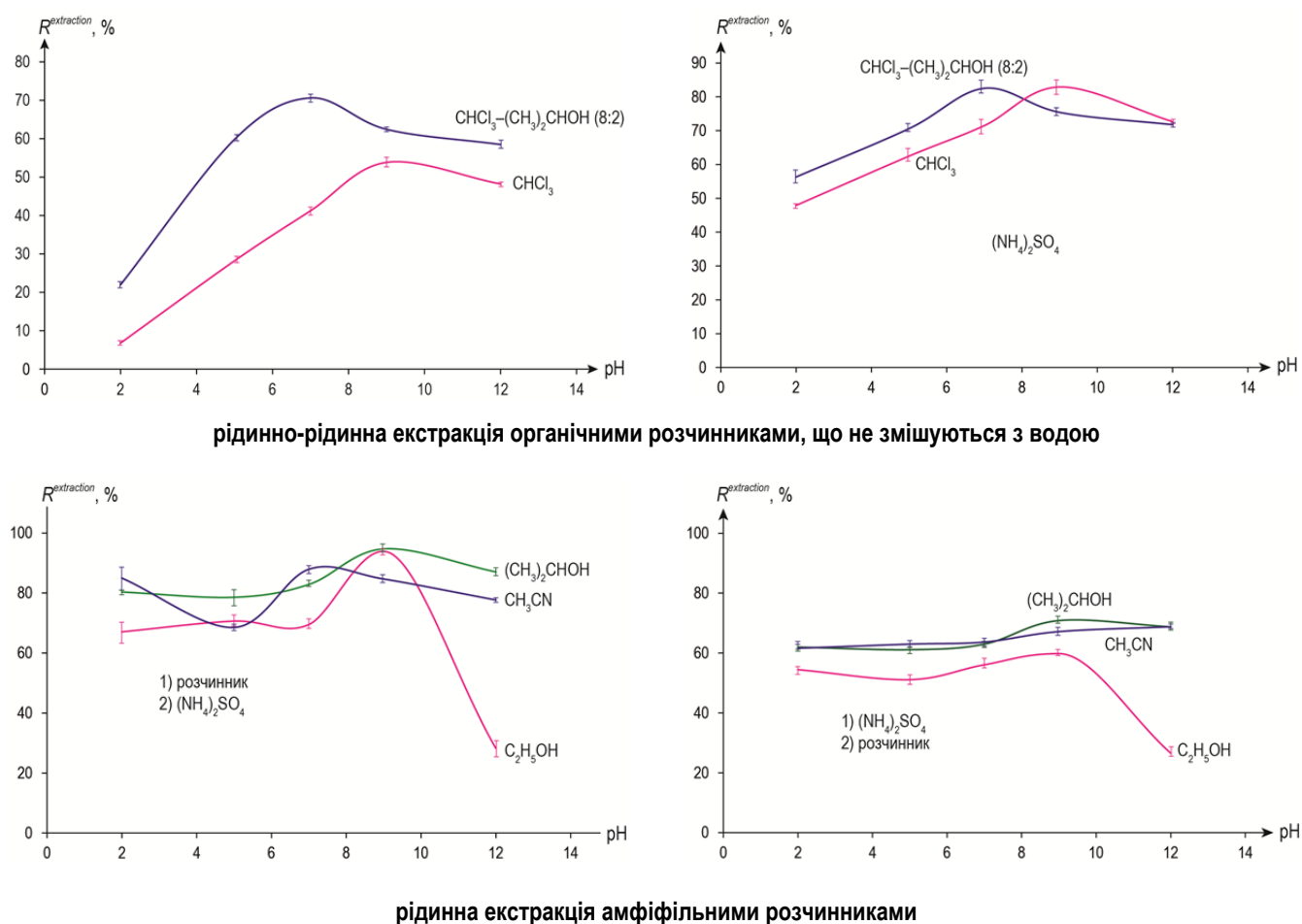


Рис. 4. Графіки залежності ступеня екстракції секнідазолу з водних розчинів від рН середовища

Рідинно-рідинна екстракція секнідазолу хлороформом є максимально ефективною у слабо лужному середовищі, додавання ізопропанолу зміщує максимум екстракції у нейтральне середовище, попереднє висолювання амоній сульфатом дозволяє збільшити ступінь екстракції на 10 – 30%. Хлороформ у сильно кислому середовищі може бути використаний для екстракційної очистки.

Екстракція амфифільними розчинниками є ефективною при будь-яких значеннях рН, проте максимальних значень ступінь екстракції сягає у нейтральному та слабо лужному середовищі.

Для найбільш ефективних варіантів екстракції підтверджено специфічність та відтворюваність ступеня екстракції секнідазолу з водних розчинів в передбачуваному концентраційному діапазоні застосування методик кількісного визначення.

Розділ 4. Застосування тонкошарової хроматографії в аналізі секнідазолу. Оскільки секнідазол за своїми властивостями є сполукою амфотерної природи і в ході ізолювання з об'єктів біологічного походження екстрагується як в кислому, так і в лужному середовищі, необхідно мати інформацію щодо його поведінки за умов ТШХ-скринінгу, що використовують як для речовин основної природи, так і для речовин кислого і нейтрального характеру, та результатів взаємодії з кольоровими реагентами, на підставі яких роблять висновки про присутність/відсутність певних фармакологічних або хімічних груп речовин.

Досліджено поведінку секнідазолу та деяких інших похідних 5-нітроїмідазолу при проявленні загальноприйнятими хромогенними реагентами на пластинах для ТШХ з двома типами підложки та з УФ-індикатором і без нього (А – Sorbfil, з УФ-індикатором; В – Merck, без УФ-індикатора) із застосуванням 4 режимів проявлення – безпосередньо після обробки речовин реактивом та після висушування пластин за кімнатної температури, в УФ-світлі за двох довжин хвиль – 254 нм та 365 нм, після нагрівання пластин протягом 5 – 15 хв. при 110°C та в УФ-світлі за двох довжин хвиль після нагрівання.

Всі досліджувані речовини флуоресціюють фіолетовим кольором в короткохвильовому УФ-світлі (254 нм) на пластинах з УФ-індикатором, а при 365 нм на обох типах пластин спостерігаються коричневі плями.

Позитивні результати зафіксовано при обробці секнідазолу та препаратів порівняння на пластинах реактивами, що використовують в аналізі похідних барбітурової кислоти – меркурій (II) хлорид/дифенілкарбазон і 0,1% розчин кобальт (II) нітрату в метанолі – утворюються плями різних відтінків фіолетового кольору.

Застосування більшості «загальноалкалоїдних» реактивів дозволяє візуалізувати на пластинах тільки німоразол, який забарвлюється концентрованою сульфатною кислотою, реактивом Маркі та реактивом Драгендорфа. Реактив Манделіна забарвлює плями всіх досліджуваних речовин у світло-жовтий колір; модифіковане використання реактиву Манделіна – після витримування пластин в парах формаліну – не призводить до отримання чіткіших результатів. Обробка пластин парами йоду, а також реактивами Вагнера та Бушарда, призводить до утворення коричневих плям для всіх досліджуваних речовин.

При обробці досліджуваних препаратів за схемою ТШХ-скринінгу речовин основного характеру отримано світло-коричневі плями для всіх речовин при застосуванні підкисленого розчину KMnO_4 . Використання розчину нінгідрину в традиційній для ТШХ-скринінгу модифікації (розчин в ацетоні, підкислений HCl) призво-

дять до нестійких та погано відтворюваних результатів. Поверх обробки розчином нінгідрину пластини відповідно до загальноприйнятих рекомендацій було послідовно обприскано реактивом ФПН – без візуальних проявів, потім реактивом Драгендорфа – лише орнідазол і німоразол забарвлюються при цьому в оранжевий колір, і потім кислим розчином калій йодоплатинату – зберігаються попередні результати.

Для отримання більш стабільних і відтворюваних результатів при роботі з нінгідрином та йодоплатинатом ми запропонували певні модифіковані схеми обробки досліджуваних речовин – див. табл. 2.

Таблиця 2

**Результати проявлення секнідазолу
розчинами нінгідрину та йодоплатинату у різних модифікаціях**

Хромогенний реактив	Пластини	Речовина			
		секнідазол	орнідазол	тинідазол	німоразол
розчин нінгідрину, t°C	A	світло-коричневе	світло-коричневе	світло-коричневе	світло-коричневе
	B	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе
+ пари HCl	A	жовто-зелене	жовто-зелене	жовто-зелене	жовто-зелене
	B	світло-коричневе	світло-коричневе	світло-коричневе	світло-коричневе
розчин нінгідрину + розчин йодоплатинату, t°C	A, B	коричневе	коричневе	коричневе	коричневе
0,2% розчин нінгідрину в бутанолі	A, B	світло-рожеве	світло-рожеве	світло-рожеве	світло-жовте
0,2% розчин нінгідрину в бутанолі, t°C	A, B	рожево-коричневе	рожево-коричневе	світло-рожеве	червоно-коричневе
розчин йодоплатинату	A, B	–	–	–	–
розчин йодоплатинату підкислений	A	світло-жовте	світло-жовте	світло-жовте	світло-жовте
	B	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе
пари формаліну + розчин йодоплатинату підкислений	A, B	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе

Обробка досліджуваних препаратів за схемою ТШХ-скринінгу речовин кислотного характеру (5% розчин FeCl₃ та реактив Ван Урка (розчин *n*-ДМАБ в 96% етанолі, підкислений HCl)) не отримано позитивних результатів.

Нами запропоновано дві модифікації використання реактиву Ван Урка (табл. 3).

За результатами проявлення похідних 5-нітроімідазолу розчинами нінгідрину та *n*-ДМАБ у запропонованих нами модифікаціях подано 2 заявки на патенти України на корисну модель та отримано позитивні рішення.

Як специфічний проявник для речовин, що містять нітрогрупу, нами запропоновано розчин лугу. Проведено виявлення похідних 5-нітроімідазолу шляхом обробки пластин спиртовим і водним розчинами лугів – результати наведено в табл. 4.

Встановлено значення R_f секнідазолу в присутності деяких інших похідних 5-нітроімідазолу за умов хроматографування в стандартних системах розчинників, застосовуваних ПІАФТ та у вітчизняних судово-токсикологічних лабораторіях для ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного, нейтрального та основного характеру, а також в деяких окремих рухомих фазах (табл. 5).

**Результати проявлення секнідазолу
розчином *n*-диметиламінобензальдегіду у різних модифікаціях**

Хромогенний реактив	Пластини	Речовина			
		секнідазол	орнідазол	тинідазол	німоразол
пари HCl + 2% розчин <i>n</i> -ДМАБ в етанолі	А, В	світло-жовте	світло-жовте	світло-жовте	світло-жовте
2% розчин <i>n</i> -ДМАБ в етанолі + пари HCl	А	коричневе	коричневе	коричневе	коричневе
	В	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе	темно-коричневе
+ розчин йодоплатинату	А, В	чорно-коричневе	чорно-коричневе	чорно-коричневе	чорно-коричневе
2% розчин <i>n</i> -ДМАБ в етанолі + розчин йодоплатинату	А, В	оранжеве	оранжеве	оранжеве	оранжеве

Таблиця 4

**Результати візуалізації секнідазолу
на хроматографічних пластинах розчинами лугів**

Хромогенний реактив	Пластини	Речовина			
		секнідазол	орнідазол	тинідазол	німоразол
20% розчин КОН в CH ₃ OH	А, В	рожеве	світло-коричневе	жовте	—
20% розчин КОН в CH ₃ OH, t°C	А	коричневе	коричневе	жовте	жовте
	В	коричневе	коричневе	жовте	—
5 М NaOH	А, В	коричневе	сіро-коричневе	жовте	оранжеве

Підібрано некорелюючі рухомі фази для ідентифікації секнідазолу (препарати порівняння – тинідазол і німоразол) – система хлороформ – метанол (9:1) на пластинах без попередньої обробки, в якій секнідазол має гіршу рухомість за препарати порівняння, та системи етилацетат – метанол – 25% NH₃ (85:10:5), метанол – *n*-бутанол (6:4), ацетон або хлороформ – метанол – CH₃COOH конц. (90:10:1), в яких секнідазол має вищі значення *R_f* за препарати порівняння.

Розділ 5. Виявлення та кількісне визначення секнідазолу методами газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії. Для виявлення та визначення секнідазолу методом ГРХ/МС (рис. 5 та 6) було підібрано такі умови: прилад – Agilent 6890N Gas Chromatograph; колонка – 1) HP-5МС Ø0,25 мм × 30 м, 0,25 мкм, 5% дифенілполісілоксан / 95% диметилполісілоксан; 2) DB-17MS Ø0,25 мм × 30 м, 0,15 мкм, 50% дифенілполісілоксан / 50% диметилполісілоксан; колонки підключено послідовно через перемикач Діна; температура термостату колонки – 70°C (2 хв.), підвищення температури зі швидкістю 45°C/хв. до 210°C, підвищення температури зі швидкістю 6°C/хв. до 320°C (витримують 12,56 хв.); інжектор – Agilent 7683 Injector/Autosampler; температура інжектора – 250°C; детектор – мас-спектрометр Agilent 5973N MSD с турбо-насосом; режим іонізації – електронний удар, енергія електрона – 70 eV; діапазон сканування – 40 – 750 *m/z*; поріг – 110; температура інтерфейса мас-спектрометра – 280°C; температура джерела іонів – 230°C; температура квадруполя

Значення R_f секнідазолу ($n=3$)

Рухома фаза		Пластини	Речовина			
			секнідазол	орнідазол	тинідазол	німоразол
1	хлороформ – ацетон (8:2)	A	0,13	0,41	0,18	0,05
		B	0,14	0,44	0,20	0,06
2	етилацетат	A	0,23	0,46	0,28	0,09
		B	0,24	0,49	0,33	0,12
3	хлороформ – метанол (9:1)	A	0,62	0,67	0,79	0,76
		B	0,64	0,69	0,73	0,72
3-1*	хлороформ – метанол (9:1)	A	0,75	0,75	0,80	0,80
		B	0,72	0,73	0,77	0,78
4	етилацетат – метанол – 25% NH ₃ (85:10:5)	A	0,80	0,84	0,71	0,70
		B	0,77	0,80	0,68	0,69
5	метанол	A	0,81	0,75	0,79	0,66
		B	0,79	0,73	0,75	0,64
6	метанол – <i>n</i> -бутанол (6:4)	A	0,75	0,80	0,63	0,55
		B	0,72	0,78	0,64	0,57
7	метанол – 25% NH ₃ (100:1,5)	A	0,78	0,80	0,78	0,67
		B	0,75	0,76	0,79	0,64
7-1*	метанол – 25% NH ₃ (100:1,5)	A	0,85	0,85	0,79	0,79
		B	0,82	0,83	0,74	0,76
8	циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10)	A	0,13	0,13	0,00	0,06
		B	0,11	0,12	0,00	0,01
8-1*	циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10)	A	0,13	0,00	0,00	0,06
		B	0,06	0,00	0,00	0,00
9	ацетон	A	0,75	0,90	0,78	0,50
		B	0,72	0,92	0,79	0,48
9-1*	ацетон	A	0,84	0,87	0,83	0,74
		B	0,85	0,89	0,86	0,76
10	хлороформ – діоксан – ацетон – 25% NH ₃ (47,5:45:5:2,5)	A	0,65	0,55	0,66	0,53
		B	0,65	0,53	0,68	0,55
11	толуен – ацетон – етанол – 25% NH ₃ (45:45:7,5:2,5)	A	0,66	0,66	0,69	0,58
		B	0,68	0,67	0,70	0,55
12	хлороформ – <i>n</i> -бутанол – 25% NH ₃ (70:40:5)	A	0,79	0,80	0,84	0,80
		B	0,77	0,81	0,85	0,79
13	хлороформ	A	0,00	0,00	0,00	0,00
		B	0,00	0,00	0,00	0,00
14	хлороформ – метанол (1:1)	A	0,84	0,79	0,83	0,76
		B	0,81	0,76	0,77	0,72
15	толуен – CH ₃ COOH конц. (3:1)	A	0,22	0,00	0,21	0,00
		B	0,12	0,00	0,09	0,00
16	хлороформ – метанол – CH ₃ COOH конц. (90:10:1)	A	0,80	0,83	0,78	0,69
		B	0,78	0,81	0,71	0,65
17	толуен – метанол – CH ₃ COOH конц. (9:1:1)	A	0,31	0,46	0,33	0,10
		B	0,29	0,42	0,30	0,06

Примітка:

* попередня обробка пластин – 0,1 КОН в CH₃OH, 110°C, 30 хв.

– 150°C; газ-носієй – гелій; тиск газу-носія на вході – 1-а колонка – 26,06 psi, 2-а колонка – 19,30 psi; режим без розділення потоку; об'єм проби – 1 мкл. Розділення секнідазолу з метронідазолом, орнідазолом, тинідазолом та німоразолом задовільне.

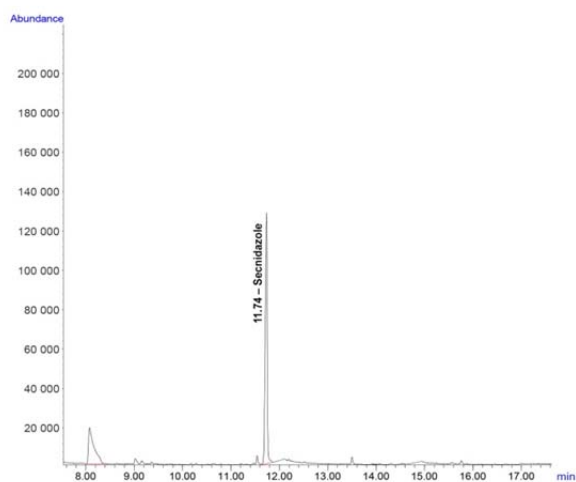


Рис. 5. Типова ГРХ/МС-хроматограма секнідазолу

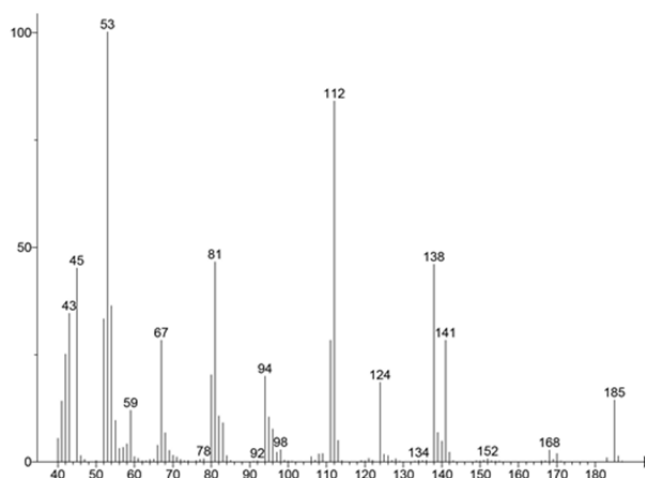


Рис. 6. Мас-спектр секнідазолу за умов ГРХ/МС-хроматографування

Для виявлення та визначення секнідазолу методом ГРХ/ПД було підібрано умови, що дозволяють розділити його з деякими іншими препаратами з групи похідних 5-нітроїмідазолу (рис. 7): прилад – HP 6890 Hewlett Packard; колонка – HP-1 Ø0,32 мм × 30 м,

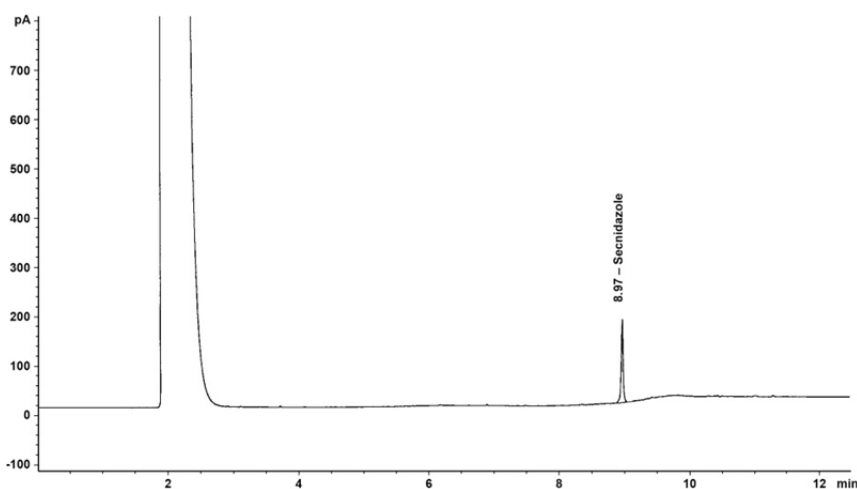


Рис. 7. Типова ГРХ/ПД-хроматограма секнідазолу

0,25 мкм, 100% диметилполісілоксан; газ-носієй – гелій; швидкість газу-носія – 1,5 мл/хв.; розділення потоку – 1:2; температура термостату колонки – 70°C (3 хв.), підвищення температури, 40°C/хв. до 180°C (2 хв.), підвищення температури, 40°C/хв. до 250°C (3 хв.); температура інжектора – 280°C; температура детектора – 280°C; об'єм проби – 2 мкл.

Розробку методики виявлення та визначення секнідазолу методом ВЕРХ/УФ (рис. 8) проводили із застосуванням системи ВЕРХ-аналізатора MiLiChrome® A-02: прилад – рідинний хроматограф високого тиску MiLiChrome® A-02 (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ, РФ); програмне забезпечення – Analitika-Chrom® (НВФ «Аналітика», Україна); колонка – Ø2 × 75 мм, обернена фаза ProntoSIL 120-5-C18 AQ, 5 мкм (BISCHOFF Analysentechnik und -geräte GmbH, Німеччина); температура термостату колонки – 40°C; елюент А – 0,2 М LiClO₄ – 0,005 М HClO₄; елюент Б – CH₃CN; потік – 100 мкл/хв.; режим елюювання – градієнтний; градієнт – лінійний від 5% до 100% CH₃CN за 40 хв., потім 100% CH₃CN протягом 3 хв.; детектор –

УФ-спектрофотометричний, 277 нм; об'єм проби – 2 мкл. Розділення секнідазолу з деякими іншими препаратами з групи похідних 5-нітроімідазолу задовільне.

Для виявлення та визначення секнідазолу методом ВЕРХ/МС (рис. 9) було підібрано умови, що дозволяють розділити його з іншими препаратами з групи похідних 5-нітроімідазолу: прилад – Agilent 1260 Infinity HPLC System; колонка – $\varnothing 4,6 \times 150$ мм, обернена фаза Inertsil ODS-3 C18, 100 Å, 5 мкм; температура – 40°C; елюент А – H₂O – 0,1% HCOOH; елюент Б – CH₃CN – 0,1% HCOOH; потік – 400 мкл/хв.; градієнт – лінійний від 5% до 100% елюента Б за 10 хв.; детектор – одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 (джерело іонів – API-ES; полярність – позитивна, режим SIM) – t_R становить 6,51 хв., детектування проводять при $m/z = 186$ а.о.м. (напруга на фрагментаторі 100 В).

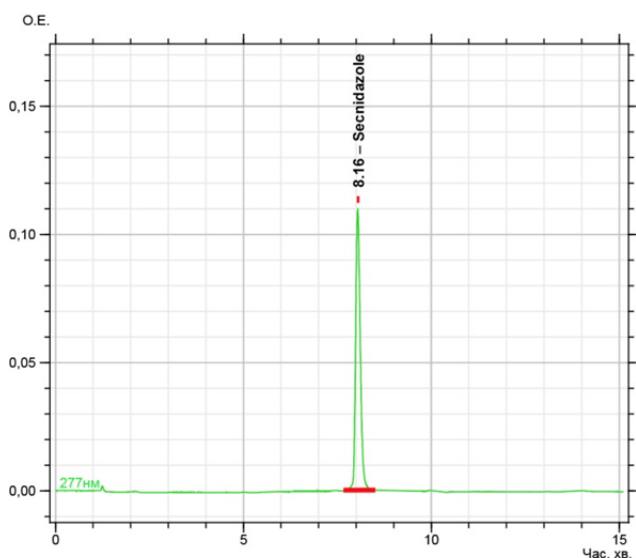


Рис. 8. Типова ВЕРХ/УФ-хроматограма секнідазолу

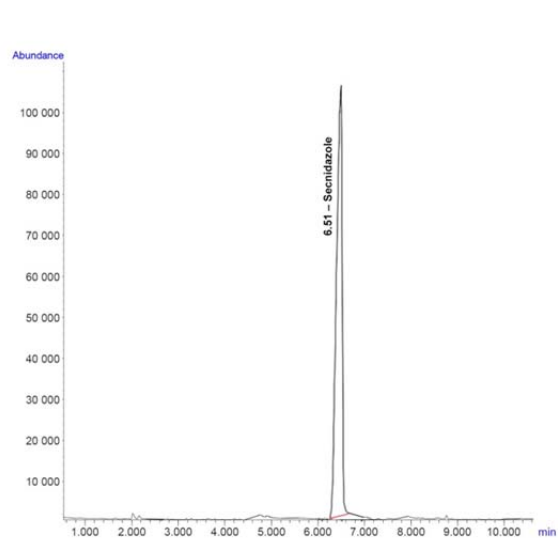


Рис. 9. Типова ВЕРХ/МС-хроматограма секнідазолу

Розробку ГРХ- та ВЕРХ-методик кількісного визначення секнідазолу проводили паралельно з їх валідацією одночасно в трьох варіантах – МКГ, МС та МД – за такими валідаційними параметрами: стабільність, діапазон застосування, лінійність/калібрувальна модель, правильність, прецизійність, межа кількісного визначення, а також прогноз загальної невизначеності методики за методом ТАЕ (табл. 6).

Розділ 6. Розробка методик пробопідготовки біологічних рідин для їх аналізу на наявність та вміст секнідазолу. З урахуванням результатів дослідження рідинної екстракції секнідазолу з водних розчинів виділено три оптимальні напрямки проведення пробопідготовки біологічних рідин (крові та сечі) для подальшого виявлення та визначення в них секнідазолу (табл. 7).

З використанням розроблених УФ-СФ методик оцінено специфічність/селективність запропонованих процедур пробопідготовки по відношенню до компонентів біологічної матриці та встановлено величини ступеня ізолювання секнідазолу з крові та сечі на нижній межі діапазону застосування методик кількісного визначення секнідазолу (табл. 7). Експериментально підтверджено можливість застосування запропонованих ТШХ-умов та кольорових реагентів для виявлення секнідазолу в отриманих органічних витягах з біологічних рідин.

**Результати валідації ГРХ- та ВЕРХ-методик
кількісного визначення секнідазолу (діапазон застосування $D = 25 - 175\%$)**

Методика	Валідаційні параметри та критерії прийнятності (Підхід1/Підхід2)				
	лінійність		правильність	прецизійність	прогноз невизначеності
МКГ	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	Δ_{RR}^{model}	Δ_{As}^{model}
	$\leq 2,25 / 4,96\%$	$\geq 0,9991 / 0,9958$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 4,52 / 10,00\%$	$\leq 4,52 / 10,00\%$
ГРХ/ПД	1,045% (+/+)	0,9998 (+/+)	0,44% (+/+)	4,32% (+/+)	6,55% (-/+)
ГРХ/МС	1,540% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,27% (+/+)	3,82% (+/+)	5,67% (-/+)
ВЕРХ/УФ	2,304% (-/+)	0,9992 (+/+)	0,24% (+/+)	3,93% (+/+)	5,80% (-/+)
ГРХ/ПД	1,045% (+/+)	0,9998 (+/+)	0,44% (+/+)	4,32% (+/+)	6,55% (-/+)
МС	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	Δ_Z^{model}	Δ_{As}^{model}
	$\leq 3,18 / 7,02\%$	$\geq 0,9983 / 0,9915$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$
ГРХ/ПД	1,045% (+/+)	0,9998 (+/+)	0,45% (+/+)	2,57% (+/+)	3,02% (+/+)
ГРХ/МС	1,540% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,93% (+/+)	3,44% (+/+)	4,37% (+/+)
ВЕРХ/УФ	2,304% (+/+)	0,9992 (+/+)	3,31% (-/+)	3,58% (+/+)	6,89% (-/+)
ВЕРХ/МС	1,358% (+/+)	0,9997 (+/+)	1,54% (+/+)	4,34% (+/+)	5,88% (+/+)
МД	RSD_0^{model}	R_c^{model}	δ^{model}	$\Delta_{RR}^{model МД}$	Δ_{As}^{model}
	$\leq 3,18 / 7,02\%$	$\geq 0,9983 / 0,9915$	$\leq 2,05 / 4,52\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$	$\leq 6,40 / 14,14\%$
ГРХ/ПД	1,045% (+/+)	0,9998 (+/+)	0,75% (+/+)	3,84% (+/+)	4,59% (+/+)
ГРХ/МС	1,540% (+/+)	0,9997 (+/+)	0,25% (+/+)	3,83% (+/+)	4,08% (+/+)
ВЕРХ/УФ	2,304% (+/+)	0,9992 (+/+)	0,79% (+/+)	5,08% (+/+)	5,87% (+/+)
ВЕРХ/МС	1,358% (+/+)	0,9997 (+/+)	1,31% (+/+)	4,45% (+/+)	5,76% (+/+)

В кожній групі методик обрано процедури пробопідготовки, що характеризуються найвищими показниками ступеня ізолювання та найменшими показниками фоновому поглинання (методики 1-1, 2-2, 3-1), для яких було підтверджено стабільність аналіту в кінцевому аналізованому розчині, специфічність/селективність та відтворюваність ступеня ізолювання в рамках діапазону застосування розроблених методик кількісного визначення з використанням методів УФ-СФ, ВЕРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ГРХ/ПД, ГРХ/МС після додаткової ТШХ- або ТФ-очистки органічних витягів з біологічних рідин за розроблених нами умов (попередній етап валідації методик).

На завершальному етапі проведено основний етап валідації УФ-СФ-, ВЕРХ/МС-, ВЕРХ/УФ-, ГРХ/ПД- та ГРХ/МС-методик кількісного визначення секнідазолу в крові та сечі за такими параметрами, як лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність з використанням зразків матриці у варіантах МКГ, МС та МД; спрогнозовано загальну невизначеність методик за методом ТАЕ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено практичне вирішення наукового завдання, що полягає в обґрунтуванні та розробці методик хіміко-токсикологічного аналізу біологічних рідин на наявність та вміст секнідазолу, що включає валідовані методики його ізолювання з крові та сечі, очистки отриманих витягів із біологічних рідин, ідентифікації за допомогою комплексу кольорових реакцій, методів ТШХ, ГРХ/ПД, ГРХ/МС, ВЕРХ/УФ та ВЕРХ/МС, а також кількісного визначення методами УФ-СФ, ГРХ/ПД, ГРХ/МС, ВЕРХ/УФ та ВЕРХ/МС.

Критичні параметри запропонованих методик пробопідготовки біологічних рідин для визначення в них секнідазолу

Методика	Умови пробопідготовки	Специфічність A_{blank} (0,1 М НСІ / 0,1 М NaOH)	Ступінь ізолювання $\bar{R}, \%$
напрямок 1 – пробопідготовка біологічних рідин із застосуванням рідинно-рідинної екстракції органічними розчинниками, що не змішуються з водою			
1-1 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2; (NH ₄) ₂ SO ₄ ;	0,086/0,042	86%
1-1 сеча	25% NH ₃ до рН = 7; СНСІ ₃ – (СН ₃) ₂ СНОН при рН = 7	0,091/0,051	94%
1-2 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2; (NH ₄) ₂ SO ₄ ;	0,057/0,034	73%
1-2 сеча	25% NH ₃ до рН = 9; СНСІ ₃ при рН = 9	0,062/0,035	82%
напрямок 2 – пробопідготовка біологічних рідин із застосуванням рідинної екстракції амфіфільними розчинниками			
2-1 кров	6 М НСІ до рН = 2; СН ₃ CN при рН = 2;	0,087/0,067	94%
2-1 сеча	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,092/0,057	96%
2-2 кров	6 М НСІ до рН = 2; (СН ₃) ₂ СНОН при рН = 2;	0,068/0,041	95%
2-2 сеча	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,069/0,035	98%
2-3 кров	6 М НСІ до рН = 2; 25% NH ₃ до рН = 9;	0,098/0,074	94%
2-3 сеча	(СН ₃) ₂ СНОН при рН = 9; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,094/0,078	96%
2-4 кров	6 М НСІ до рН = 2; 25% NH ₃ до рН = 9;	0,084/0,057	92%
2-4 сеча	C ₂ H ₅ ОН при рН = 9; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,091/0,062	95%
2-5 кров	6 М НСІ до рН = 2; 25% NH ₃ до рН = 7;	0,097/0,071	91%
2-5 сеча	СН ₃ CN при рН = 7; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,091/0,075	94%
напрямок 3 – пробопідготовка біологічних рідин із комбінованим застосуванням рідинної екстракції органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та амфіфільними розчинниками			
3-1 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2;	0,047/0,031	92%
3-1 сеча	СН ₃ CN при рН = 2; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,056/0,038	94%
3-2 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2;	0,049/0,041	94%
3-2 сеча	(СН ₃) ₂ СНОН при рН = 2; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,052/0,031	98%
3-3 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2; 25% NH ₃	0,068/0,049	92%
3-3 сеча	до рН = 9; (СН ₃) ₂ СНОН при рН = 9; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,072/0,051	97%
3-4 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2;	0,081/0,064	86%
3-4 сеча	25% NH ₃ до рН = 9; C ₂ H ₅ ОН при рН = 9; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,086/0,061	89%
3-5 кров	6 М НСІ до рН = 2; СНСІ ₃ при рН = 2;	0,062/0,041	92%
3-5 сеча	25% NH ₃ до рН = 7; СН ₃ CN при рН = 7; (NH ₄) ₂ SO ₄	0,075/0,051	94%

1. Досліджено поведінку секнідазолу та ряду інших похідних 5-нітроімідазолу при проявленні загальноприйнятими хромогенними реагентами на пластинках для ТШХ, встановлено значення R_f секнідазолу в присутності деяких інших похідних 5-нітроімідазолу за умов хроматографування в стандартних системах, підібрано некорелюючі рухомі фази для ідентифікації секнідазолу (препарати порівняння – тинідазол і німоразол).
2. Досліджено УФ-спектри секнідазолу в різних розчинниках, показано, що зі збільшенням значення рН спостерігається поетапне зміщення максимуму поглинання секнідазолу вправо (277 нм → 310 нм → 314 нм → 319 нм),

- розраховано значення питомих і молярних показників поглинання; запропоновано чотири нові методики кількісного визначення секнідазолу методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області спектра та проведено їх валідацію у варіантах методу калібрувального графіка, методу стандарту та методу добавок.
3. Досліджено кислотно-основні рівноваги секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1); досліджено екстракцію секнідазолу з водних розчинів в двох напрямках – рідинно-рідинна екстракція органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та рідинна екстракція амфіфільними розчинниками.
 4. Проведено виявлення та розроблено ВЕРХ/УФ-методику визначення секнідазолу з використанням системи ВЕРХ-аналізатора Milichrome® A-02; час утримування секнідазолу становить 8,16 хв., розділення з метронідазолом, тинідазолом, орнідазолом та німоразолом задовільне. Підібрано умови виявлення та розроблено методику кількісного визначення секнідазолу з використанням методу ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням за молекулярним іоном; t_r для секнідазолу становить 6,51 хв., при цьому досягнуто розділення з іншими препаратами з групи похідних 5-нітроїмідазолу.
 5. Підібрано умови виявлення секнідазолу з використанням методу ГРХ/ПІД у присутності метронідазолу, тинідазолу, орнідазолу та німоразолу; час утримування секнідазолу за підібраних умов становить 8,97 хв.; розроблено ГРХ/ПІД-методику кількісного визначення секнідазолу. Підібрано умови виявлення та розроблено ГРХ/МС-методику кількісного визначення секнідазолу; час утримування секнідазолу за підібраних умов становить 11,74 хв.
 6. Запропоновано шляхи ізолювання секнідазолу з біологічних рідин (реагенти для розриву зв'язків секнідазолу з компонентами біологічної матриці та осадження білків та формених елементів крові, розчинники для настоювання та екстракції тощо), умови екстракційної очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, шляхи концентрування секнідазолу, методики ТШХ- та ТФ-очистки органічних витягів із біологічного матеріалу.
 7. Підтверджено відтворюваність величин ступеня ізолювання секнідазолу з крові та сечі в межах діапазону застосування методик кількісного визначення секнідазолу; проведено основний етап валідації методик кількісного визначення секнідазолу в крові та сечі за такими параметрами, як лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність з використанням зразків матриці у варіантах методів калібрувального графіка, стандарту та добавок.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Kovalenko S. M., Zhukova T. V. Development and validation of UV-spectrophotometric procedures for secnidazole quantitative determination. *J. Pharm. Sci. Res.* 2017. № 9(4). P. 338–348. (Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті).

2. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Shovkova Z. V., Lebedynets V. O., Bohomol N. P. Study of secnidazole extraction from aqueous solutions. *J. Pharm. Sci. Res.* 2018. № 10(8). P. 2056–2064. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
3. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Shovkova Z. V., Kostina T. A. Development and validation of HPLC/UV-procedure of secnidazole determination. *J. Org. Pharm. Chem.* 2018. № 16(63). P. 30–38. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
4. Klimenko L. Yu., Shkarlat G. L., Shovkova O. V., Shovkova Z. V., Kostina T. A. Validation of UV-spectrophotometric procedures for metronidazole and secnidazole quantitative determination in the variant of the method of additions. *Наука и инновация.* 2018. № 1. С. 171–180. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
5. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Shovkova Z. V., Savchenko M. O. Development and validation of GLC/FID- and GLC/MS-procedures of secnidazole determination by the method of additions. *J. Org. Pharm. Chem.* 2018. № 16(64). P. 40–47. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
6. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Shovkova Z. V., Ulanova V. A., Shpychak O. S. Application of thin layer chromatography in analysis of secnidazole, ornidazole, tinidazole and nimorazole. *J. Pharm. Sci. Res.* 2018. № 10(12). P. 3411–3416. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
7. Shovkova O. V., Klimenko L. Yu., Shovkova Z. V., Mykytenko O. Ye. Development and validation of HPLC/UV-procedures of secnidazole determination in blood and urine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2018. № 6(16). P. 26–34. (*Особистий внесок здобувача – виконання однієї з трьох аналітичних послідовностей експериментальних досліджень, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних, написання статті*).
8. Шовковая О. В. Экстракция секнидазола из водных растворов. *Роль молодежи в развитии медицинской науки: материалы XII науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международ. участием, посвящ. «Году молодежи», Душанбе, 28 апр. 2017 г. Душанбе, 2017. С. 334.*
9. Шовковая О. В., Щетко А. Д. Разработка и валидация УФ-спектрофотометрических методик определения секнидазола. *Проблеми та досягнення сучасної хімії: зб. тез доп. XIX Наук. молодіж. конф., Одеса, 26 – 28 квіт. 2017 р. Одеса: Бондаренко М. О., 2017. С. 93.*
10. Шовковая О. В. Применение методов ВЭЖХ и ГЖХ для обнаружения секнидазола. *XXI Міжнарод. мед. конгрес студ. та молодих вчен., присвяч. 60-річчю Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського*

МОЗ України: матеріали, Тернопіль, 24 – 26 квіт. 2017 р. Тернопіль: Укрмедкнига, 2017. С. 242.

11. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В. Экстракция секнидазола из водных растворов амфифильными растворителями. *Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи*: матеріали Всеукр. наук. конф., Житомир, 17 – 18 трав. 2017 р. Житомир: Вид-во Житомирського державного університету імені Івана Франка, 2017. С. 41–42.
12. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В., Хмельницкая А., Гриценко И. С. Изучение констант ионизации секнидазола в водных растворах. *Синтез і аналіз біологічно-активних речовин і лікарських субстанцій*: тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12 – 13 квіт. 2018 р. Харків: НФаУ, 2018. С. 196.
13. Шовкова О. В., Шкарлат Г. Л., Клименко Л. Ю., Шовкова З. В. Дослідження екстракції метронідазолу та секнидазолу з водних розчинів. *Хімічні Каразінські читання – 2018 (ХКЧ'18)*: тези доп. X Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, Харків, 23 – 25 квіт. 2018 р. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. С. 83–84.
14. Шовковая О. В., Шкарлат Г. Л., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В. Изучение поведения производных 5-нитроимидазола в условиях общего ТСХ-скрининга лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе. *XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії*: зб. праць, Харків, 2 – 4 трав. 2018 р. Харків: Ексклюзив, 2018. С. 83.
15. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В., Шкарлат Г. Л. Визуализация производных 5-нитроимидазола в методе тонкослойной хроматографии. *Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи*: зб. матеріалів конф., Житомир, 16 трав. 2018 р. Житомир: Вид-во Житомирського державного університету імені Івана Франка, 2018. С. 68–69.
16. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В., Костина Т. А. Разработка и валидация ВЭЖХ-методики количественного определения секнидазола для целей химико-токсикологического анализа. *Управління якістю в фармації*: матеріали XII Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 18 трав. 2018 р. Харків, 2018. С. 201.
17. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю. Разработка и валидация ВЭЖХ/ДМД-МС-методики количественного определения секнидазола. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція*: тези доп. I Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, Харків, 18 жовт. 2018 р. Харків: Вид-во НФаУ, 2018. С. 271.
18. Шовковая О. В., Клименко Л. Ю., Шовковая З. В., Костина Т. А. Разработка и валидация методики количественного определения секнидазола методом газовой хроматографии. *XVI Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії*, Дніпро, 21 – 24 трав. 2018 р. Дніпро, 2018. С. 64–65.

Крім наведених публікацій, результати дисертаційних досліджень опубліковано ще у 15 тезах доповідей.

АНОТАЦІЯ

Шовкова О. В. Розробка та валідація методик визначення секнідазолу для хіміко-токсикологічного аналізу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертацію присвячено комплексному хіміко-токсикологічному аналізу біологічних рідин на секнідазол.

Досліджено поведінку секнідазолу в умовах систематичного токсикологічного ТШХ-аналізу в комбінації з кольоровими реакціями на пластинках. Розроблено методики виявлення та кількісного визначення секнідазолу за допомогою методів СФ, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ГРХ/ПД і ГРХ/МС, проведено їх валідацію за модельними розчинами у варіантах застосування МКГ, МС та МД.

Вивчено кислотно-основні рівноваги секнідазолу у водних розчинах та сумішах води з амфіфільними розчинниками (1:1) та досліджено ефективність екстракції секнідазолу з водних розчинів в двох напрямках – рідинно-рідинна екстракція органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та рідинна екстракція амфіфільними розчинниками.

Запропоновано методики пробопідготовки біологічних рідин для їх аналізу на секнідазол, проведено їх валідацію у варіантах МКГ, МС та МД; зроблено прогноз сумарної невизначеності методик.

Ключові слова: секнідазол, хіміко-токсикологічний аналіз, кров, сеча, валідація, УФ-спектрофотометрія, ГРХ/ПД, ГРХ/МС, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/МС, ТШХ.

АННОТАЦИЯ

Шовковая О. В. Разработка и валидация методик определения секнидазола для химико-токсикологического анализа. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена комплексному химико-токсикологическому анализу биологических жидкостей на секнидазол.

Исследовано поведение секнидазола и других производных 5-нитроимидазола при проявлении общепринятыми реагентами на пластинках для ТСХ.

Положительные результаты зафиксированы при обработке реактивами, использующимися в анализе производных барбитуровой кислоты. При обработке исследуемых препаратов по схемам ТСХ-скрининга веществ основного и кислотного характера положительные результаты получены только при применении подкисленного раствора KMnO_4 .

Предложены модифицированные схемы обработки исследуемых веществ нингидрином, *n*-ДМАБ и йодоплатинатом. В качестве специфического проявителя для веществ, содержащих нитрогруппу, предложены спиртовой и водный растворы щелочи.

Установлены значения R_f секнидазола в условиях хроматографирования в стандартных и частных подвижных фазах. Подобраны некоррелирующие подвижные фазы для идентификации секнидазола.

Исследованы закономерности светопоглощения секнидазола в УФ-области спектра с использованием различных растворителей. Разработаны три методики количественного определения секнидазола методом СФ с использованием 0,1 М HCl, 96% C₂H₅OH и 0,1 М NaOH в качестве растворителей, проведена их валидация в вариантах МКГ, МС и МД.

Проведено обнаружение и разработана ВЭЖХ/УФ-методика определения секнидазола с использованием системы ВЭЖХ-анализатора Milichrome® A-02; время удерживания секнидазола составляет 8,16 мин. Подобраны условия обнаружения и разработана методика количественного определения секнидазола с использованием метода ВЭЖХ/МС, время удерживания для секнидазола составляет 6,51 мин.

Предложены условия обнаружения секнидазола с использованием методов ГЖХ/ПИД и ГЖХ/МС; время удерживания секнидазола составляет 8,97 мин. и 11,74 мин. соответственно; разработаны ГЖХ/ПИД- и ГЖХ/МС-методики количественного определения секнидазола, проведена их валидация в вариантах МКГ, МС и МД.

Исследованы кислотно-основные равновесия секнидазола в водных растворах и смесях воды с амфифильными растворителями (1:1) – в сильно щелочной среде (выше 4 М NaOH) существует анионная форма секнидазола R⁻ (максимумы поглощения при 240 и 294 нм), при дальнейшем уменьшении значения рН появляется молекулярная форма RH (максимумы поглощения при 232 и 319 нм), в сильно кислой среде (рН < 1,7) существует конечный продукт преобразований – протонированная форма H₂R⁺ (максимум поглощения при 277 нм). На спектрах поглощения секнидазола наблюдаются четыре изобестические точки, характеризующие два протолитических равновесия (равновесие RH/H₂R⁺ – 240 и 295 нм, равновесие RH/R⁻ – 261 и 297 нм). Положение изобестических точек равновесия RH/R⁻ колеблется в диапазоне ± 3 нм, что, на наш взгляд, связано с наличием таутомерных преобразований для молекулярной формы секнидазола.

Константа равновесия RH/H₂R⁺ определена методом спектрофотометрического титрования, ее показатель составляет 2,31 для воды, 2,46 – для смеси воды и изопропанола (1:1), 2,63 – для смеси воды и ацетонитрила (1:1), 2,40 – для смеси воды и этанола (1:1). Определить константу равновесия RH/R⁻ указанным методом невозможно.

Для обоснования процедур пробоподготовки биологических жидкостей для определения в них секнидазола исследована эффективность экстракции секнидазола из водных растворов в зависимости от рН среды с применением жидкостно-жидкостной экстракции хлороформом и смесью хлороформ – изопропанол (8:2) после предварительного высаливания аммония сульфатом и без него, а также изопропанолом, ацетонитрилом и этанолом с последующим высаливанием и после предварительного высаливания аммония сульфатом.

С учетом результатов исследования экстракции выделены оптимальные пути изолирования секнидазола из биологических жидкостей (реагенты для разрыва связей секнидазола с компонентами биологической матрицы и осаждения белков и форменных элементов крови, растворители для настаивания и экстракции и т.д.),

условия экстракционной очистки полученных извлечений из биологического материала, пути концентрирования секнидазола, методики ТШХ- и ТФ-очистки органических извлечений из биологического материала.

Подтверждена воспроизводимость величин степени извлечения секнидазола из крови и мочи в пределах диапазона применения методик количественного определения; проведен основной этап валидации методик количественного определения секнидазола в крови и моче по таким параметрам, как линейность/калибровочная модель, правильность и прецизионность с использованием образцов матрицы в вариантах МКГ, МС и МД.

Ключевые слова: секнидазол, химико-токсикологический анализ, кровь, моча, валидация, УФ-спектрофотометрия, ГЖХ/ПИД, ГЖХ/МС, ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/МС, ТСХ.

SUMMARY

Shovkova O. V. Development and validation of the methods of secnidazole determination for chemical-toxicological analysis. – Qualifying thesis manuscript copyright.

Thesis for the Candidate of Pharmaceutical Science degree on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. National University of Pharmacy, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The thesis is devoted to complex chemical-toxicological analysis of biological liquids for secnidazole.

The behaviour of secnidazole under systematic toxicological TLC-analysis in combination with colour reactions on the plates has been investigated. The procedures for detection and quantitative determination of secnidazole by the methods of spectrophotometry, HPLC/UV, HPLC/MS, GLC/FID and GLC/MS have been developed, their validation in the variants of MCC, MS and MA has been carried out using model solutions.

Acid-base equilibria of secnidazole in aqueous solutions and mixtures of water with amphiphilic solvents (1:1) have been studied and efficiency of secnidazole extraction from aqueous solutions in two directions has been investigated – liquid-liquid extraction with organic solvents immiscible with water and liquid extraction by amphiphilic solvents.

The procedures of sample preparation of biological liquids for their analysis for secnidazole have been proposed, their validation in the variants of MCC, MS and MA has been carried out; the total uncertainty of the procedures has been calculated.

Key words: secnidazole, chemical-toxicological analysis, blood, urine, validation, UV-spectrophotometry, GLC/FID, GLC/MS, HPLC/UV, HPLC/MS, TLC.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія;
ВЕРХ/МС	– високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричною детекцією;
ВЕРХ/УФ	– високоефективна рідинна хроматографія з УФ-спектрофотометричною детекцією;
ГРХ	– газо-рідинна хроматографія;
ГРХ/МС	– газо-рідинна хроматографія з мас-спектрометричною детекцією;
ГРХ/ПІД	– газо-рідинна хроматографія з полум'яно-іонізаційною детекцією;
<i>n</i> -ДМАБ	– <i>пара</i> -диметиламінобензальдегід;
ДНЦЛЗ	– Державний науковий центр лікарських засобів;
ДП	– державне підприємство;
ДУ	– державна установа;
ЗАТ	– закрите акціонерне товариство;
МД	– метод добавок;
МКГ	– метод калібрувального графіка;
МКВ	– межа кількісного визначення;
МОЗ	– Міністерство охорони здоров'я;
МС	– метод стандарту;
НАМН	– Національна академія медичних наук;
НВФ	– науково-виробнича фірма;
ОБСМЕ	– обласне бюро судово-медичної експертизи;
РФ	– Російська Федерація;
СФ	– абсорбційна спектрофотометрія;
ТОВ	– товариство з обмеженою відповідальністю;
ТШХ	– тонкошарова хроматографія;
ТФ	– твердофазний;
УФ	– ультрафіолетовий;
ХТА	– хіміко-токсикологічний аналіз;
ТАЕ	– total allowable error.

Підписано до друку 15. 05. 2019 р.

Формат 60×84/16. Ум.-друк. арк. 0,9.

Наклад 100 пр. Зам. № б/н.

Надруковано з готового оригінал-макета

у друкарні СПД ФО Степанов В. В.

вул. Ак. Павлова, 311, м. Харків, 61168

Тел.: (057) 751-79-25