

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Белікова Анастасія Геннадіївна

УДК 502.175:543.544:543.544.3

ДИСЕРТАЦІЯ

Розробка методик одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у навколишньому середовищі

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. Г. Белікова

Науковий керівник: Сидоренко Людмила Василівна, доктор фармацевтичних наук, професор

Харків – 2024

АНОТАЦІЯ

Белікова А. Г. Розробка методик одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату для контролю у навколишньому середовищі. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2024.

Дисертаційна робота присвячена обґрунтуванню та розробці методик для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату; оцінці розроблених методик за аналітичною точністю, відповідністю принципам «зеленої хімії» та економічною собівартістю проведення аналізу; оцінці придатності розроблених методик для визначення досліджуваних речовин в ґрунті.

Перший розділ є оглядом існуючих літературних джерел з даної теми і описує накопичені дані щодо швидкого розвитку фармацевтичної галузі та стратегії євроінтеграції українського фармацевтичного ринку. Дані тенденції демонструють необхідність удосконалення виробництва вітчизняних лікарських засобів (ЛЗ), а саме гармонізацію регуляторних вимог агенцій з підходами «зеленої хімії», що є сучасним вектором для світової фармацевтичної індустрії.

Охоплює необхідність розробки для вітчизняних ЛЗ сучасних аналітичних методик визначення і контролю ЛЗ у навколишньому середовищі. На фармацевтичному ринку в останні роки великої популярності набули енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату, враховуючи останні прояви росту грипу та інших вірусних захворювань.

Враховуючи екоспрямованість стратегії розвитку підприємства, логічним є прагнення до максимальної екологічності не лише власного виробництва, але й аналізу субстанцій та лікарських форм. З цієї точки зору

актуальним завданням наукового дослідження стає формулювання підходів та розробка методик одночасного визначення та контролю якості енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату, що відповідають принципам «зеленої хімії» та будуть придатні для визначення і контролю у навколишньому середовищі.

У другому розділі було розроблено «дерево рішень» на основі оцінки ступеня придатності розроблених аналітичних методик ВЕРХ (високо-ефективна рідинна хроматографія) та ГХ-ПІД (газова хроматографія з полум'яно-іонізаційним детектором) для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у навколишньому середовищі, а саме їх екологічність та економічність.

Третій розділ присвячено розробці методу ВЕРХ з діодно-матричним детектором для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату.

Для розділення речовин використовували колонку SunFire C 18 (250×4,6 мм), як рухому фазу – ацетонітрил з буферним розчином натрію перхлорату та хлорною кислотою у співвідношенні (25:75). Для методики визначалися метрологічні параметри, а саме: лінійність, правильність, специфічність, LOD та LOQ. За допомогою запропонованої методики було одночасно ідентифіковано енісаміуму йодид, тілорону дигідрохлорид та морфолінію тіазотат.

Валідаційні характеристики методу було обрано та досліджено з урахуванням вимог ІСН Q2. Специфічність методики доведено відсутністю інтерференції піків плацебо енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату. Також доведено специфічність відсутністю інтерференції піків плацебо енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату при наявності антибіотиків наступних груп цефалоспорини (цефтріаксон), тетрацикліни (тетрациклін), пеніциліни (ампіцилін), фторхінолони (левофлоксацин).

Характеристики лінійності, прецизійності, точності та робасності вивчені відповідно до заданих критеріїв та знаходяться у їх межах. Розробку методики одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату було проведено згідно подальшої імплементації підходу «зеленої хімії».

У четвертому розділі наведено результати експериментальних досліджень з розроблення методики ГХ-ПД для більш «зеленого» підходу при визначенні енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату. Ця методика у порівнянні з ВЕРХ не використовує токсичні розчинники, полум'яно-іонізаційний детектор не генерує шкідливих відходів, економить енергію, адже використовує менші об'єми газу-носію, а також може використовуватися для визначення широкого спектру ЛЗ, що робить її універсальною для дослідження довкілля.

При виконанні дисертаційного дослідження застосовували обладнання: хроматограф GC-2010 Plus Shimadzu з детектором полуменевої іонізації та автодозатором АОС-20i+s (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan). Автоматичний дозатор та інжектор split/splitless. Температура інжектора підтримувалася на рівні 250 °С до кінця аналізу. Розділення аналітів проводилося на колонці Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA, капілярна колонка (довжина 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщина рідкої стаціонарної фази 0,25 мкм) із рідкою стаціонарною фазою (5 % дифенілу та 95 % полідиметилсилоксану) з гелієм чистотою 99,999 % як газ-носії у постійному потоці 1,49 мл/хв. Температура печі програмувалася на 75 °С протягом 5 хв, потім підвищувалася до 290 °С зі швидкістю 10 °С/хв і далі до 320 °С зі швидкістю 20 °С/хв, де витримувалася протягом 10 хв. Загальний час становив 41 хв. Об'єм інжекції – 1,0 мкл, режим інжекції – поділ (співвідношення поділу 10), газ-носії – гелій.

Проведено порівняльну оцінку обох розроблених хроматографічних методик для аналізу енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату на «зеленість» за допомогою аналітичної еко-шкали, з

метою вибору методу з найменшим впливом на навколишнє середовище та виробничий персонал. Крім того, враховувалися різні умови попередньої обробки для кожного зразка. Виявлено, що метод ГХ-ПД має переваги перед методом ВЕРХ. Зокрема, ВЕРХ має відповідно 16 штрафних балів, тоді як метод ГХ-ПД – 9 балів. Перерахунок в еко-бали дає 78 балів для ВЕРХ і 35 балів для ГХ.

Обидва методи забезпечують чудовий аналіз з точки зору екологічності, але різниця є суттєвою. Детектор ГХ-ПД з огляду на принципи «зеленої хімії» має значну перевагу. Отже, метод ГХ-ПД визнано більш екологічним порівняно з ВЕРХ і був використаний для подальшого визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у ґрунті.

П'ятий розділ присвячений підтвердженню придатності раніше розробленого методу ГХ-ПД для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у ґрунті і дослідженню їх поведінки.

Були підібрані оптимальні концентрації енісаміуму йодиду, морфолінію тіазотату та тілорону дигідрохлориду таким чином, що чим вище початкова концентрація сполук в ґрунті, тим нижча швидкість розпаду і, отже, довший час розкладання. Розчини досліджуваних ЛЗ поміщали у ґрунт в пластикових контейнерах та витримували певний час згідно експерименту. Після чого відбирали проби та визначали вміст речовин по розробленій методиці одночасного визначення ГХ-ПД.

В аеробних умовах більша частина енісаміуму йодиду залишалася в ґрунті через 45 днів, що свідчить про незначне розсіювання і стійкість до мікробної деградації. Після початкового зниження кількість енісаміуму йодиду в подальшому залишалася незмінною в ґрунті аеробних умовах.

Рівень тілорону дигідрохлориду демонстрував зниження в основному впродовж перших 8 днів. Після початкового зниження надалі рівень залишався в ґрунті незмінним. Тілорону дигідрохлорид продемонстрував очевидне

розсіювання в ґрунті, з відповідними значеннями $t^{\frac{1}{2}}$ – 12, 16 і 20, 30 днів відповідно. Після 45 днів інкубації рівень тілорону дигідрохлориду в ґрунті становить 100 %.

У випадку з морфолінію тіазотатом зниження не відбувалося, але він дуже швидко розсіявся і продемонстрував очевидне розсіювання в ґрунті зі значеннями $t^{\frac{1}{2}}$ – 3, 3 і 10 днів відповідно. Після 45 днів інкубації рівень морфолінію тіазотату в ґрунті становить 100 %.

Не зважаючи на те, що для аналізу були обрані оптимально низькі концентрації досліджуваних ЛЗ, методика виявилася придатною тому, що встановлена закономірність, чим вище початкова концентрація ЛЗ в ґрунті, тим нижча швидкість розпаду і спостерігається довший час розкладання.

Вищі концентрації ЛЗ, як показали результати внесення, будуть зменшувати швидкість розпаду ЛЗ і подовжувати стійкість сполук у ґрунті, оскільки це буде пригнічувати активність мікроорганізмів, що деградують.

Також провели порівняння методик ВЕРХ та ГХ-ПД на екологічність за методом ComplexGAPI і виявили, що результати оцінки вибраних процедур визначення субстанцій енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату у ґрунті краще проводити методом ГХ-ПД, який має очікувані переваги для визначення субстанцій у навколишньому середовищі.

Метод ГХ-ПД виявився придатним для одночасного визначення енісаміуму йодиду, морфолінію тіазотату та тілорону дигідрохлориду у навколишньому середовищі. Було проведено валідаційні дослідження методики: специфічність, лінійність та точність.

Ключові слова: енісаміум йодид, тілорону дигідрохлорид, морфолінію тіазотат, зелена хімія, ВЕРХ, ГХ-ПД.

Список публікацій здобувача:

1. Development of method for detection of amixin and amazon by HPLC on SunFire C18 column / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, O. Chorna, D. Burdulis, V. Georgiyants. *Chemija*. 2022. Vol. 33, № 3. P. 79–86. (*Scopus, Q 4*) <https://doi.org/10.6001/chemija.v33i3.4750> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
2. Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, V. Chorny, Iu. Korzh, L. Kucherenko, A. Kotvitska, D. Burdulis, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 37, № 3. P. 4-11. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.259879> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Greening of the method for simultaneous determining the enisamium iodide and tilorone dihydrochloride using GC-FID assay / A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, V. Chorny, A. Kononenko, A. Koval, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 46, № 6. P. 47–52. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.295120> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Study of the degradation behavior of Enisamium iodide, Tilorone dihydrochloride, Morpholinium thiazotate in the soil by the GC-FID method/ A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, O. Goncharov, O. Golovchenko, Z. Kovalenko, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 47, № 2. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.300209> https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/300209 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

5. Порівняльна характеристика нормативного забезпечення екологічного менеджменту фармацевтичної галузі та наявних затверджених методів контролю фармацевтичних забруднень / А. Г. Белікова, А. С. Матерієнко, Л. В. Сидоренко, В. А. Георгіянец. *Управління якістю в фармації* : матеріали XIV наук.-практ. конф., м. Харків, 22 травня 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 13–15.
6. Беликова А. Г., Сидоренко Л. В., Материенко А. С. Выбор методики определения амизона и амиксина в объектах окружающей среды. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : сборник материалов IX Международной науч.-практ. конф. посвящ. памяти проф. Кияшева Д.К., в рамках «90-летия Казахского национ. мед. ун-та им. С. Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы, 27 ноября 2020 р. Алматы, 2020. С. 134.
7. Розробка методики одночасного визначення енісаміуму йодиду та тілорону методом ВЕРХ / А. Г. Белікова, А. С. Матерієнко, В. А. Георгіянец, Л. В. Сидоренко. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної наук.-практ. конф. молодих учених та студентів присв. 150-річчю з дня народж. М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 118-119.
8. Belikova A., Sidorenko L. Determination of amizone and thiotriazoline by gas chromatography / mass Spectrometry. *100 years of success and quality* : materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy. Kharkiv, October, 18, 2021. Харків : НФаУ, 2021. Р. 51.
9. Разработка методики ГХ-МС для определения амизона и тиотриазолина / А. Г. Беликова, А. С. Материенко, В. А. Георгиянец, Л. В. Сидоренко, Л. Иванаускас. Вестник ЮКМА. VIII международная научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития

биологии, медицины и фармации». Казахстан, г. Шимкент, 9-10 декабря 2021. 2021, №4(94), Т. 3. С. 8.

10. Белікова А. Г., Георгіянц В. А., Сидоренко Л. В. Порівняння аналітичних та економічних характеристик хроматографічних методик визначення амізону, аміксину та тіотриазоліну. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матер. II Міжнар. наук.-практ. дистанц. конф., м. Харків, 1 лютого 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 79.
11. Белікова А. Г., Сидоренко Л. В., Георгіянц В. А. Розробка методу визначення енісаміуму йодиду та Тілорону дигідрохлориду за допомогою ГХ/МС. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines», м. Харків, 18 травня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 114.

ANNOTATION

Belikova, A. G. Development of methods for simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate for environmental control. – Qualifying scientific work with manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 "Pharmacy, industrial pharmacy" (22 – Health care). – National Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2024.

The dissertation is devoted to the development and validation of methods for the simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate. The developed methods were evaluated for analytical accuracy, compliance with the principles of "green chemistry", and economic efficiency. The applicability of the developed methods for the determination of the studied substances in soil was also evaluated.

The *first chapter* presents a review of the existing literature on the topic and describes the accumulated data on the rapid development of the pharmaceutical industry and the strategy of Euro-integration of the Ukrainian pharmaceutical market. These trends demonstrate the need to improve the production of domestic pharmaceuticals (DPs), namely the harmonization of regulatory requirements of agencies with "green chemistry" approaches, which is a modern vector for the global pharmaceutical industry.

Covers the need for the development of modern analytical methods for the determination and control of pharmaceuticals in the environment for domestic pharmaceutical companies. In recent years, enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate have become very popular on the pharmaceutical market, given the recent outbreaks of influenza and other viral diseases.

Given the eco-oriented development strategy of the enterprise, it is logical to strive for maximum environmental friendliness of not only its own production, but also the analysis of substances and dosage forms. From this point of view, the formulation of approaches and development of methods for the simultaneous determination and quality control of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate, which comply with the principles of "green chemistry" and will be suitable for determination and control in the environment, becomes an urgent task of scientific research.

In the *second chapter*, a "decision tree" was developed based on the assessment of the suitability of the developed analytical methods HPLC (high performance liquid chromatography) and GC-FID (gas chromatography with flame ionization detector) for the simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate in the environment, namely their environmental friendliness and cost-effectiveness.

In the *third chapter*, an HPLC method with a diode array detector was developed for the simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate.

For the separation of substances, a SunFire C 18 column (250×4.6 mm) was used, with acetonitrile with sodium perchlorate buffer solution and hydrochloric acid in a ratio of (25:75) as the mobile phase. Metrological parameters were determined for the method, namely: linearity, accuracy, specificity, LOD and LOQ. Using the proposed method, enisamium iodide, tilorone dihydrochloride and morpholine thiazotate were simultaneously identified.

The validation characteristics of the method were selected and studied according to the requirements of ICH Q2. The specificity of the method was proven by the absence of interference from the placebo peaks of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate. The specificity was also proven by the absence of interference from the placebo peaks of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate in the presence of antibiotics of the

following groups: cephalosporins (ceftriaxone), tetracyclines (tetracycline), penicillins (ampicillin), and fluoroquinolones (levofloxacin).

The characteristics of linearity, precision, accuracy, and robustness were studied according to the specified criteria and are within their limits. The development of the method for the simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate was carried out in accordance with the further implementation of the "green chemistry" approach.

In the *fourth chapter*, a GC-FID method was developed for a greener approach to the determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate. This method, compared to HPLC, does not use toxic solvents, the flame ionization detector does not generate harmful waste, saves energy by using smaller volumes of carrier gas, and can be used to determine a wide range of pharmaceuticals, making it versatile for environmental research.

The following equipment was used in the dissertation research: a GC-2010 Plus Shimadzu chromatograph with a flame ionization detector and an AOC-20i+s autosampler (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan). Autosampler and split/splitless injector. The injector temperature was maintained at 250 °C until the end of the analysis. The analytes were separated on an Rxi-5 ms column (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA, 30 m long, 0.25 mm outer diameter and 0.25 µm liquid stationary phase film thickness) with a liquid stationary phase (5% diphenyl and 95% polydimethylsiloxane) with helium of 99.999% purity as the carrier gas at a constant flow rate of 1.49 mL/min. The oven temperature was programmed to 75 °C for 5 min, then increased to 290 °C at a rate of 10 °C/min and then to 320 °C at a rate of 20 °C/min, where it was held for 10 min. The total time was 41 min. The injection volume was 1.0 µL, the injection mode was split (split ratio 10), and the carrier gas was helium.

A comparative assessment of both developed chromatographic methods for the analysis of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholinium thiazotate for "greenness" was performed using the analytical eco-scale, with the aim of choosing the method with the least impact on the environment and production

personnel. In addition, different pre-treatment conditions were considered for each sample. It was found that GC-FID has advantages over the HPLC method. In particular, HPLC has 16 penalty points, respectively, while the GC-FID method has 9 points. Conversion to eco-points gives 78 points for HPLC and 35 points for GC.

Both methods provide excellent analysis in terms of environmental friendliness, but the difference is significant. The GC-PID detector has a significant advantage from the perspective of the principles of "green chemistry". Thus, the GC-FID method was recognized as more environmentally friendly than HPLC and was used for further determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate in soil.

The *fifth chapter* is devoted to the confirmation of the suitability of the previously developed GC-FID method for the simultaneous determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholine thiazotate in soil and to the study of their behavior.

Optimal concentrations of enisamium iodide, morpholinium thiazotate, and tilorone dihydrochloride were selected in such a way that the higher the initial concentration of the compounds in the soil, the lower the rate of decay and, therefore, the longer the decomposition time. Solutions of the studied pharmaceuticals were placed in soil in plastic containers and incubated for a certain time according to the experiment. After that, samples were taken and the content of substances was determined using the developed method of simultaneous determination by GC-PID.

Under aerobic conditions, most of the enisamium iodide remained in the soil after 45 days, indicating low dissipation and resistance to microbial degradation. After an initial decrease, the amount of enisamium iodide in the soil remained constant under aerobic conditions.

The level of tilorone dihydrochloride showed a decrease mainly during the first 8 days. After the initial decrease, the level remained unchanged in the soil. Tilorone dihydrochloride showed obvious dissipation in the soil, with corresponding values of 12, 16, and 20, 30 days, respectively. After 45 days of incubation, it was completely dissipated.

In the case of morpholine thiazotate, there was no decrease, but it dissipated very quickly and showed obvious dissipation in the soil, with corresponding values of 3, 3, and 10 days, respectively. After 45 days of incubation, it was completely dissipated.

Even though the optimally low concentrations of the studied pharmaceuticals were chosen for the analysis, the method proved to be suitable because of the established pattern: the higher the initial concentration of the pharmaceutical in the soil, the lower the rate of decay and the longer the decomposition time is observed.

Higher concentrations of pharmaceuticals, as the results of application showed, will reduce the rate of decay of pharmaceuticals and prolong the persistence of the compounds in the soil, since this will suppress the activity of degrading microorganisms.

The HPLC and GC-FID methods were also compared for their "greenness" using the ComplexGAPI method and it was found that the results of the evaluation of the selected procedures for the determination of enisamium iodide, tilorone dihydrochloride, and morpholinium thiazotate in soil are better performed by the GC-FID method, which has the expected advantages for the determination of substances in the environment.

The GC-FID method was found to be suitable for the simultaneous determination of enisamium iodide, morpholinium thiazotate, and tilorone dihydrochloride in the environment. Validation studies of the method were performed: specificity, linearity, and accuracy.

Keywords: enisamium iodide, morpholine thiazotate, tilorone dihydrochloride, green chemistry, HPLC, GC-FID.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ I. СУЧАСНИЙ СТАН, ПЕРСПЕКТИВИ ТА ПІДХОДИ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ТА КОНТРОЛЮ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ (огляд літератури)	25
1.1 Сучасний стан визначення та контролю лікарських засобів у навколишньому середовищі	25
1.2 Шляхи потрапляння лікарських засобів у навколишнє середовище	27
1.3 Важливість визначення лікарських засобів українських виробників на шляху Євроінтеграції	30
1.4 Характеристика енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату	32
1.4.1 Енісаміуму йодид	33
1.4.2 Тілорону дигідрохлорид	36
1.4.3 Морфолінію тіазотат	38
1.5 Обґрунтування вибору екологічних методів для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату	41
Висновки до розділу I	43
РОЗДІЛ II. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	44
2.1 Обґрунтування методології досліджень	44
2.2 Обладнання	47
2.2.1 Обладнання та реактиви ВЕРХ	47
2.2.2 Обладнання та реактиви ГХ-МС та ГХ-ПІД	48

2.3. Характеристика методик дослідження	49
2.3.1 Високоєфективна рідинна хроматографія	49
2.3.2 Газова хроматографія з мас-детектором та полум'яно- іонізаційним детектором	50
2.4. Методологія проведення експерименту в ґрунті	52
Висновки до розділу II	52
РОЗДІЛ III. РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИК ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ ...	54
3.1. Розробка методики ВЕРХ для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду	54
3.2 Валідація аналітичної методики ВЕРХ для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду	57
3.3 Перевірка придатності методики ВЕРХ для визначення морфолінію тіазотату	68
3.4 Валідація методики ВЕРХ для визначення морфолінію тіазотату	71
Висновки до розділу III	79
РОЗДІЛ IV. РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ГХ-ПІД МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ	82
4.1 Розробка ГХ-ПІД методики визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду	82
4.1.1 Валідація	84
4.1.2 Розрахунки еко-шкали	87
4.1.3 Оцінка «зеленості»	90
4.2 Розробка ГХ-ПІД методики визначення морфолінію тіазотату ...	91
4.2.1 Валідація	92
4.2.2 Розрахунки еко-шкали	95

	17
4.2.3 Оцінка «зеленості»	96
4.3 Економічний аналіз аналітичних методик	97
4.4. Визначення екологічності методик ВЕРХ та ГХ-ПІД за методом ComplexGAPІ	101
Висновки до розділу ІV	103
РОЗДІЛ V. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ГХ-ПІД ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ У ҐРУНТІ	106
5.1 Збір ґрунту та визначення його властивостей	107
5.2 Визначення розсіювання та напіврозпаду субстанцій в ґрунті	109
Висновки до розділу V	117
ВИСНОВКИ	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	121
ДОДАТКИ	133
Додаток А	134
Додаток Б	138

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

БАР – біологічно активні речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГХ – газова хроматографія

ГХ-МС – газова хроматографія з мас-детектором

ГХ-ПІД – газова хроматографія з полум'яно-іонізаційним детектором

ДФУ – Державна Фармакопея України

ЛЗ – лікарський засіб

ЛФ – лікарська форма

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

FDA – Управління продовольства та медикаментів

ЄФ – Європейська Фармакопея

ЛОС – леткі органічні сполуки

РРСР – фармацевтичні препарати та засоби особистої гігієни

GDP – Належна практика дистриб'юції

GMP – Належна виробнича практика

GLP – Належна лабораторна практика

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Глобальний розвиток фармацевтичної галузі та євроінтеграція українського фармацевтичного ринку ставлять перед нами нові виклики сьогодення. Зростаюча потреба у лікарських засобах веде до посилення конкуренції на ринку виробництва препаратів та субстанцій, що, в свою чергу, зумовлює жорсткіші вимоги до якості продукції.

Євроінтеграційні процеси в Україні стали поштовхом в тому числі до виведення на європейський фармацевтичний ринок лікарських засобів українських виробників. Серед таких препаратів, зокрема, енісаміуму йодид (виробник ПАТ «Фармак»), тілорону дигідрохлорид (Товариство з додатковою відповідальністю «ІНТЕРХІМ») та морфолінію тіазотат (ПАТ «Київмедпрепарат»). Популярності цих препаратів сприяли тотальний дефіцит лікарських засобів та відомості про ефективність названих препаратів як допоміжної терапії COVID-19 та інших вірусних захворювань.

Одночасно з появою на європейському ринку нових ЛЗ виникають ризики щодо забруднення навколишнього середовища новими об'єктами під час транспортування або залишків, що не утилізують пацієнти. Оскільки в літературі відсутні відомості щодо методик визначення цих речовин у ґрунті чи стічних водах, неможливо оцінити і екологічні характеристики цих субстанцій, передбачити наслідки їх знаходження у ґрунті. З огляду на це розробка таких методик є важливою в розрізі контролю навколишнього середовища країн, де застосовуються енісаміуму йодид, тілорону дигідрохлорид та морфолінію тіазотат. Враховуючи екоспрямованість сучасної стратегії розвитку підприємства та забезпечення якості, логічним є прагнення до максимальної екологічності не лише власного виробництва, але й в навколишньому середовищі.

Підвищення стандартів якості призводить до збільшення кількості дослідів, які проводяться під час фармацевтичної розробки та рутинного

контролю при виробництві. Це, в свою чергу, несе ризики негативного впливу на довкілля, що стає предметом занепокоєння фармацевтичних компаній.

Для пошуку балансу між високими стандартами та екологічною відповідальністю все більшого значення набувають принципи та підходи "зеленої хімії". В контексті контрольних лабораторій, "зелена хімія" передбачає мінімізацію часу, дій та операцій контролерів якості, уникнення або зменшення контакту зі шкідливими речовинами та заощадження енергетичних ресурсів.

Актуальні питання якості та "зеленого" підходу зумовлюють потребу в нових методах розробки та валідації аналітичних методик, а також в придатності їх для аналізу у навколишньому середовищі.

З цієї точки зору актуальним завданням наукового дослідження стає формулювання підходів та розробка методик контролю якості лікарських форм з енісаміуму йодидом, тілорону дигідрохлоридом та морфолінію тіазотатом, що відповідають принципам «зеленої хімії» та будуть придатні для визначення і контролю сполук у навколишньому середовищі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного і промислового виробництва» (№ державної реєстрації НДР: 0114U000949).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є обґрунтування вибору, розробка та валідація альтернативних екологічно чистих методик для контролю якості та визначення у навколишньому середовищі енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- ✓ сформулювати підходи щодо вибору методик для контролю якості енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату з урахуванням принципів «зеленої хімії», потенційно придатних для визначення речовин в навколишньому середовищі;

- ✓ розробити методику ВЕРХ одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату;
- ✓ розробити методику ГХ-ПД одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату;
- ✓ за результатами досліджень оцінити та вибрати найбільш екологічну та економічну методику для визначення у навколишньому середовищі енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату;
- ✓ визначити придатність методики ГХ-ПД для оцінки наявності та кількісної характеристики енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у ґрунті;
- ✓ з використанням розробленої методики оцінити деякі екологічні характеристики розсіяння та напіврозпаду енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату.

Об'єкт дослідження – розробка та валідація методик ВЕРХ та ГХ-ПД аналізу лікарських засобів у навколишньому середовищі.

Предмет дослідження – розробка та валідація методик для кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату, перевірка придатності розроблених методик ВЕРХ та ГХ-ПД для одночасного визначення суміші сполук, моделювання зберігання речовин у ґрунті та оцінка їх стабільності, визначення екологічних характеристик запропонованих методик та їх застосування для аналізу противірусних ЛЗ у ґрунті.

Методи дослідження. Для реалізації мети та вирішення поставлених завдань було використано методи вискоєфективної рідинної хроматографії, газової хроматографії з детектором іонізацією полум'я. Процедура валідації методик проведена за вимогами ДФУ та ІСН, обробку результатів проводили методами математичної статистики у відповідності до рекомендацій ЄФ та ДФУ, дослідження та порівняння екологічності методик методами здійснювали за допомогою GREENness (AGREE) та ComplexGAPI.

Наукова новизна отриманих результатів. Шляхом узагальнення та імплементації принципів «зеленої хімії» запропоновано авторське «дерево рішень» для вибору «зеленої» методики аналізу та надано обґрунтування його застосування при виборі методик контролю якості лікарських форм з енісаміуму йодидом, тілорону дигідрохлоридом та морфолінію тіазотатом.

Вперше розроблено оригінальну методику одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методом ВЕРХ, що дає коректні результати у наявності інших забруднювачів (антибіотики), проведено вивчення економічності та екологічності розроблених методик.

Вперше розроблено оригінальну методику одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методом ГХ-ПД без дериватизації. Вперше методику застосовано для визначення досліджуваних речовин у модельних зразках ґрунту. Вперше досліджено екологічні характеристики (розсіювання та напіврозпад) енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених досліджень теоретично обґрунтовано «дерево рішень», що має практичне значення як алгоритм для вибору «зелених» методик контролю якості при фармацевтичній розробці. Розроблені та валідовані методики кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату та його супутніх домішок можуть бути використані в рутинному фармацевтичному та судово-хімічному аналізі цих речовин як у сумішах, так і індивідуально як альтернативні або арбітражні.

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено в наукову роботу та навчальний процеси кафедр Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 18.03.2024 р.), Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 19.03.2024 р.), Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (акт впровадження від 19.03.2024 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною науковою завершеною працею. Постановка мети, завдання та методологія досліджень сформульовані дисертантом разом з науковим керівником.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з В. А. Георгіянц, Л. В. Сидоренко, В. А. Чорним, О. Чорною, D. Burdulis, L. Ivanauskas, А.С. Матерієнко, А. В. Кононенко, А. О. Коваль, О. В. Гончаровим, О. С. Головченко, З. І. Коваленко.

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені експериментальні дослідження. За результатами досліджень, над якими працювали співавтори наукових публікацій, особисто дисертантом проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, аналіз стану українського ринку енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату; розроблено та валідовано методику одночасного кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методом ВЕРХ; розроблено та валідовано методику одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методом ГХ-ПД; розроблено та валідовано методику одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методом ГХ-ПД у ґрунті. Проведено експеримент у ґрунті для визначення придатності методики ГХ-ПД та визначення екологічних характеристик (розсіювання та напіврозпад) енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, здобувачу належить основний творчий доробок та наведені в дисертації результати експериментальних досліджень. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, виконані автором особисто.

Апробація матеріалів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи представлено та обговорено на міжнародних науково-практичних конференціях: 10th International Pharmaceutical conference «Science and

practice» (15 листопада 2019 р., м. Каунас, Литва), XIV науково-практична конференція «Управління якістю в фармації» (м. Харків, 22 травня 2020 р.), Міжнародна науково-практична конференція «Пріоритети фармації і стоматології», (Казахстан, м. Алмати, 27 листопада 2020 р.), Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development», присвячена 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка (м. Харків, 18-19 березня 2021 р.), Міжнародний науково-практичний симпозиум «100 years of success and quality», присвячений 100- річному ювілею кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків, 18 жовтня 2021 р.), VIII міжнародна наукова конференція молодих учених та студентів «Перспективи розвитку біології, медицини і фармації» (Казахстан, м. Шимкент, 9-10 грудня 2021 р.), II Міжнародна науково-практична дистанційна конференція «Сучасні аспекти створення лікарських засобів» (м. Харків, 1 лютого 2022 р.), Міжнародна інтернет-конференція «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 18 травня 2023 р.), IV Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE» (Харків, 6-7 грудня 2023 р.).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 140 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг основного тексту складає 120 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 33 таблицями та 28 рисунками. Список використаних джерел містить 113 найменувань, з них 85 кирилицею, 28 латиницею.

РОЗДІЛ І
СУЧАСНИЙ СТАН, ПЕРСПЕКТИВИ ТА ПІДХОДИ
ДО ВИЗНАЧЕННЯ ТА КОНТРОЛЮ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У
НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ
(Огляд літератури)

1.1 Сучасний стан визначення та контролю лікарських засобів у навколишньому середовищі

Забруднення довкілля лікарськими засобами стає все більш серйозною проблемою. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно в навколишнє середовище потрапляє близько 3000 тонн ЛЗ [1]. Ці речовини можуть мати негативний вплив на екосистему, здоров'я людей і тварин.

Темпи розвитку сучасних технологій фармацевтичного виробництва та виробництва нових лікарських форм, а також новітніх методів діагностики та лікування захворювань ускладнюють вирішення екологічних проблем, пов'язаних зі зниженням ризику проникнення ліків у навколишнє середовище і, як наслідок, прояв їх негативного впливу на людину [2].

Зростання населення, зростання добробуту та розширення доступу до ліків призвели до збільшення навантаження фармацевтичними активними інгредієнтами, які потрапляють у каналізацію. На територіях, де земля зрошується очищеними, частково очищеними або неочищеними стічними водами та біотвердими речовинами стічних вод, певна кількість фармацевтичних препаратів може накопичуватися в ґрунті. Стічні води, що використовуються для зрошення, наразі не охоплюються хімічними стандартами, включаючи оцінку екологічного ризику. Фармацевтичні препарати можуть розкладатися під час біологічного очищення стічних вод, а також у водоймах, у ґрунті та в ході абіотичних реакцій. Ці процеси

зменшують потенційно шкідливу дію ліків, однак деякі продукти їхнього розпаду мають таку ж токсичність, як і вихідна речовина [3].

«Зелена хімія» пропонує альтернативний підхід до розробки та виробництва лікарських засобів, який мінімізує негативний вплив на довкілля. Цей напрям хімії ґрунтується на 12 принципах, які сприяють:

1. Запобіганню утворенню відходів: розробка методів синтезу, які не генерують або мінімізують утворення відходів (розробка синтезу ліків без використання токсичних розчинників) [4].

2. Використанню екобезпечних розчинників та реагентів: заміна небезпечних хімічних речовин на безпечні та екологічно чисті аналоги (використання води як розчинника замість органічних розчинників) [5].

3. Енергоефективності: розробка енергоефективних хімічних процесів (використання мікрохвильового опромінення для прискорення хімічних реакцій) [6].

4. Розробці безпечних для довкілля та людей продуктів: створення хімічних продуктів, які не шкодять довкіллю та людям (розробка біорозкладних лікарських засобів).

5. Заміні небезпечних хімічних речовин: пошук безпечних альтернатив для небезпечних хімічних речовин (наприклад, заміна хлорофторвуглеводнів (CFCs) на озонобезпечні аналоги).

6. Створенню дизайну хімічних продуктів для їх безпечної утилізації: розробка хімічних продуктів, які легко та безпечно утилізуються (розробка біорозкладних полімерів).

7. Запобіганню хімічним аваріям: розробка хімічних процесів, які мінімізують ризик хімічних аварій (впровадження систем контролю та запобігання аваріям на хімічних заводах) [7].

8. Розширенню використання «зеленої хімії» в освіті: навчання хіміків принципам «зеленої хімії» (включення курсів «зеленої хімії» до навчальних програм хімічних факультетів).

9. Розширенню досліджень в галузі «зеленої хімії»: фінансування досліджень та розробок в галузі «зеленої хімії» (створення державних програм підтримки зелених хімічних технологій) [8].

10. Співпраці між хіміками, промисловістю та урядами: створення партнерських відносин між хіміками, промисловістю та урядами для розвитку «зеленої хімії» (створення Міжнародного товариства «зеленої хімії» ISC Green Chemistry).

11. Розширенню доступності інформації про «зелену хімію»: поширення інформації про принципи та практики «зеленої хімії» (створення веб-сайтів та онлайн-ресурсів, присвячених «зеленій хімії»).

12. Заохоченню етичного розвитку «зеленої хімії»: розробка зелених хімічних технологій з урахуванням етичних принципів (розробка зелених хімічних технологій, які не шкодять людям і довкіллю) [9, 10].

Реальні приклади покращення екологічного стану фармацевтичної галузі завдяки зеленій хімії за останні 10 років: принципи «зеленої хімії» вже довели свою практичність, так у 2014 році був розроблений новий метод синтезу протипухлинного препарату лапатинибу, який не використовує токсичні розчинники. Цей метод екологічно безпечніший, адже не генерує небезпечних відходів [12].

Також у 2016 році був розроблений новий метод синтезу антибіотика амоксициліну, який не використовує ізопропіловий спирт. Цей метод екологічно безпечніший, адже не потребує використання шкідливих летких органічних сполук (ЛОС) [13].

1.2 Шляхи потрапляння лікарських засобів у навколишнє середовище

Після використання фармацевтичні препарати та засоби особистої гігієни (РРСР) можуть потрапити в навколишнє середовище, де вони можуть накопичуватися та завдавати шкоди довкіллю та здоров'ю людини [14 -18].

Одним з завдань при випуску нових ЛЗ стає розробка методик та підходів не тільки для контролю якості, але й для їх визначення в навколишньому середовищі [15-16]. Для цього зазвичай використовують газові хроматографічні методи [17-18].

За оцінками експертів, від 35% до 50% виготовлених ліків виявляються непотрібними і викидаються на смітник [19-21].

ЛЗ можуть потрапляти в довкілля різними шляхами, включаючи:

- Скидання стічних вод: очисні споруди не завжди здатні повністю очистити стічні води від ЛЗ. В результаті, ЛЗ можуть потрапляти у водойми з очищеними стічними водами [22].
- Внесення гною тварин, які приймали ЛЗ: ЛЗ, які приймають тварини, можуть виводитися з організму з гноєм. При внесенні гною на поля ЛЗ можуть потрапляти в ґрунт.
- Використання забруднених компостів: компост може бути забруднений ЛЗ, якщо він містить гній тварин або харчові відходи, які містять ЛЗ.
- Застосування ЛЗ в сільському господарстві: деякі ЛЗ використовуються в сільському господарстві для лікування тварин або для стимуляції росту рослин. При внесенні ЛЗ в ґрунт вони можуть накопичуватися в ньому.
- Неправильна утилізація ЛЗ: ЛЗ, які не використовуються або прострочені, часто викидаються у сміттєві баки. Зі сміттєвих баків ЛЗ можуть потрапляти на звалища, де вони можуть просочуватися в ґрунт.

Значний внесок у ці процеси роблять і споживачі ЛЗ. При цьому 15% споживачів викидають непотрібні ліки в каналізацію, а близько 75% населення викидають їх у сміттєвий бак, не усвідомлюючи небезпеки [23].

Різноманітні дослідження повідомляють про сліди антидепресантів, антибіотиків, наркотичних речовин, контрацептивів, гормональних препаратів і багато іншого в природі (в тому числі в річках, озерах і ставках). Так, наприклад, тільки в масштабах США, за даними Національного товариства фармацевтичних асоціацій, щорічно в каналізацію виливається понад 220 тис. тонн ліків, з них щорічно утилізується до 100 тис. тонн лише населенням.

Більше 120 000 тонн ліків щорічно викидається або скидається в каналізацію лікарень і медичних закладів США [24].

ЛЗ можуть мати негативний вплив на довкілля, серед яких:

- Зміна мікробіоценозу ґрунту: ЛЗ можуть пригнічувати або стимулювати ріст певних груп мікроорганізмів в ґрунті.
- Загибель тварин: ЛЗ можуть бути токсичними для тварин, що може призвести до їх загибелі.
- Забруднення водних ресурсів: ЛЗ можуть забруднювати водойми, що може призвести до загибелі риби та інших водних організмів.
- Негативний вплив на репродуктивну систему тварин: деякі ЛЗ можуть негативно впливати на репродуктивну систему тварин.
- Зміна поведінки тварин: деякі ЛЗ можуть змінювати поведінку тварин.

До фармацевтичних препаратів, що порушують роботу ендокринної системи, відносяться статеві гормони, глюкокортикоїди, ветеринарні гормони росту та кілька нестероїдних фармацевтичних речовин. Крім того, токсичність, що виникає через складні суміші фармацевтичних препаратів та засобів особистої гігієни (РПСР) у низьких концентраціях, може призвести до синергічної взаємодії. Це означає, що хоча окремі РПСР можуть бути присутніми в низьких концентраціях, які не викликають значних токсичних ефектів при індивідуальній дії. Суміші РПСР все ще можуть виявляти значну екотоксичність [27].

Яскравим прикладом екофармацевтичного забруднення водного середовища, яке негативно впливає на людину, є вплив на споживачів водного середовища навіть порівняно невеликих концентрацій 0–1,0 мкг/л нестероїдного протизапального препарату диклофенаку [111]. Ще один несприятливий екологічний фактор – антибіотики у водному середовищі.

Причиною цього є широке використання цих препаратів у ветеринарії. Це призводить до порушення процесу самоочищення у водоймах і ґрунті, а

при менших концентраціях у водоймах можуть з'явитися бактерії, стійкі до антибіотиків, які можуть спричинити захворювання людини [27].

На сьогодні підтверджено наявність понад 200 лікарських засобів та їх метаболітів у поверхневих і підземних водах [28]. Перший список виявлених фармацевтичних контамінантів включає антибіотики, нестероїдні протизапальні препарати, анальгетики, гіпоглікемічні та гормональні препарати [29, 30].

1.3 Важливість визначення лікарських засобів українських виробників на шляху Євроінтеграції

Євроінтеграція України відкриває нові можливості для вітчизняних виробників лікарських засобів. Ринок ЄС, який налічує понад 450 мільйонів людей, може стати значним джерелом доходу для українських фармацевтичних компаній [31].

Україна знаходиться на шляху до євроінтеграції, що вимагає від неї відповідності стандартам та вимогам Європейського Союзу у всіх сферах економіки, включаючи фармацевтичну промисловість. Вступ України до ЄС передбачає гармонізацію її законодавства з європейським, а це означає, що українські фармацевтичні компанії повинні відповідати вимогам якості, безпеки та ефективності продукції, що вони випускають.

Визначення лікарських засобів у навколишньому середовищі є важливим аспектом забезпечення безпеки людей та довкілля. Невідповідність вмісту лікарських речовин у ґрунті, воді або повітрі може призвести до негативних наслідків для здоров'я людей та екосистеми в цілому.

Розвиток та використання ефективних методів визначення лікарських засобів в українському навколишньому середовищі є важливою передумовою для забезпечення відповідності продукції українських фармацевтичних компаній європейським стандартам якості та безпеки. Це також дозволить

уникнути можливих проблем, пов'язаних із забрудненням довкілля лікарськими речовинами та забезпечити здоров'я населення.

Проте, для виходу на ринок ЄС вітчизняні фармацевтичні компанії повинні відповідати жорстким стандартам ЄС:

- GMP : виробництво лікарських засобів в Україні має відповідати вимогам GMP, які гарантують високу якість продукції.
- GLP : контроль якості лікарських засобів в Україні має відповідати вимогам GLP, які гарантують достовірність результатів досліджень.
- GDP: дистрибуція лікарських засобів в Україні має відповідати вимогам GDP, які гарантують збереження якості продукції протягом усього ланцюжка постачання.

Утилізація ЛЗ так і не набула належного рівня у нашій країні, тому визначення ЛЗ у навколишньому середовищі у зв'язку з євроінтеграцією є актуальним. Наявність у навколишньому середовищі залишків лікарських засобів, їх біоактивних метаболітів та інших продуктів трансформації може мати негативний вплив як на людину так і на організми, які живуть у навколишньому середовищі [32].

Антибіотики є однією з найбільш актуальних груп лікарських засобів, потрапляння у навколишнє середовище та негативний вплив яких вивчаються по всьому світу. На даний час у світі найбільш визначуваними групами антибіотиків у навколишньому середовищі є цефалоспоріни, тетрацикліни, пеніциліни, фторхінолони [33, 34].

В Україні лікування вірусних захворювань відбувається за допомогою власних лікарських засобів, що виробляються вітчизняними виробниками. Серед таких є енісаміум йодид та тілорону дигідрохлорид.

Визначення залишків фармацевтичних речовин у навколишньому середовищі є дуже актуальним завданням як для всього світу, так і для окремих країн зокрема. Необхідною є розробка нових методів кількісного визначення концентрації речовин, що виробляються на території України, з метою вивчення їх розподілу в навколишньому середовищі та дослідження

параметрів їх біодеградації, що, в свою чергу, є необхідним для відпрацювання регулювання безпечної кількості знаходження препаратів і їх величини у навколишньому середовищі. Крім того, логічно аналізувати енісаміум йодид і тілорон дигідрохлорид спільно під час одного аналізу, оскільки застосування цих препаратів передбачає певну сезонність. Актуальним є вивчення даних речовин у присутності антибіотиків з метою дослідження їх можливої взаємодії, а також з метою доказовості вивчення саме досліджуваних препаратів.

1.4. Характеристика енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату

Українська фармацевтична промисловість заслужено вважається однією з найбільш розвинених в Європі. І це не тільки завдяки великій кількості виробників, що здатні забезпечити громадян генеричними препаратами. Фармацевтичні підприємства України прагнуть розробляти власні інноваційні лікарські засоби і успішно виводять їх на світовий ринок. Прикладами таких препаратів є енісаміум йодид (Амізон, «Фармак»), тілорону дигідрохлорид (Аміксин, «Інтерхім») та морфолінію тіазотат (Тіотріазолін, «Київмедпрепарат»).

Ці препарати вже зареєстровані в різних країнах [34, 36] і використовуються при вірусних захворюваннях, зокрема, під час пандемії коронавірусу досліджено перспективи їх використання як альтернативна терапія [37, 38]. Також їх вивчають європейські вчені щодо ефективності у відношенні до інших вірусів [39, 40].

Разом з перспективою збільшення використання цих препаратів постає проблема збільшення їх відходів і вони стають частиною понад двадцяти мільйонів тонн РРСР щорічно. Тому одним з завдань при випуску нових ЛЗ стає розробка методик та підходів не тільки для контролю якості, але й для їх визначення в навколишньому середовищі [42, 43].

1.4.1 Енісаміум йодид

Енісаміум йодид – N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид (рис. 1.1) отримують у результаті реакції ізонікотинової кислоти з бензиламіном, розроблений в Інституті фармакології і токсикології АМН України, пройшов повний цикл експериментальних і клінічних досліджень і згідно з рішенням Фармакологічного комітету МОЗ України (протокол № 8 від 31.10.1996 р) дозволений до застосування як противірусний, протизапальний і жарознижувачий засіб [44, 45]. Молекулярна формула $C_{14}H_{15}IN_2O$. Молекулярна маса: 354.19 г/моль. CAS номер 201349-37-3.

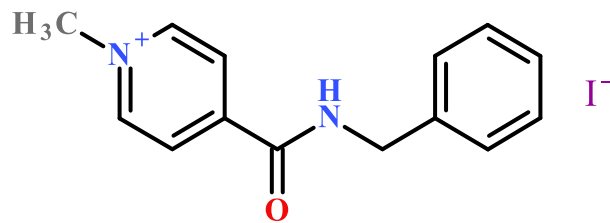


Рис. 1.1 Формула енісаміуму йодиду

На сьогодні Енісаміум йодид зареєстрований в Україні під торговими назвами АМІЗОН (у формі таблеток, вкритих оболонкою, по 0,125 та 0,25 г) [35, 36], АМІЗОН МАКС (у формі капсул по 0,5 г) [24] та «Амізончик» (у формі сиропу 10 мг/мл) [46] і застосовується для лікування і профілактики цілої низки інфекційних захворювань, зокрема, ГРВІ, грип, кір, краснуха, вітряна віспа тощо, представлений на ринках 11 країн світу, зокрема Білорусі, Казахстану, Узбекистану та інших [44, 50-52].

Хімічні властивості енісаміуму йодиду наведено в таблиці 1.1.

Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з енісаміуму йодидом.

Ідентифікацію енісаміуму йодиду ДФУ регламентує здійснювати абсорбційною спектрофотометрією в ультрафіолетовій області.

Хімічні властивості енісаміуму йодиду

АФІ	Розчинність у воді (mg/mL)	Розчинність	Log KOW*
Енісаміуму йодид	39.3 mg /mL	у буферних розчинах від рН 1,2 до 7,5 приблизно 60 мг/мл при 25 °С	1.8

Примітка. * Log KOW та розчинність у воді були отримані з Syracuse Research Corporation–Physprop Database [113]

У науковій літературі описано значну кількість методик кількісного визначення енісаміуму йодиду: титриметрія, абсорбційна спектрофотометрія, ВЕРХ.

Українським вченим Бурмака О. В. [51] розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення енісаміуму йодиду в таблетках з використанням рухомої фази, що складалася з буферний розчин рН 2,5 – вода – ацетонітрил (30:35:35) та хроматографічної колонки Zorbax Eclipse XDB – C18 розміром 150 × 4,6 мм. Детектування проводили за довжини хвилі 225 нм та швидкості рухомої фази 0.5 мл/хв. Методика була лінійною в діапазоні з рН 1.5/4.5/6.8. Розроблена методика валідована та може бути використана при рутинному контролі таблетованих форм та субстанції енісаміуму йодиду.

У розробленій методиці спектрофотометричного визначення в ультрафіолетовій ділянці, як розчинник використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти. Вимірювання випробовуваного розчину та розчину порівняння (концентрація обох становила 0,02 мг/мл) проводили у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин застосовано розчинник (0,1 М розчин хлористоводневої кислоти). Встановлено, що енісаміум йодид має два максимуми поглинання: при довжинах хвиль 223 нм та 267 нм.

Кушніруком В. М. із співавторами [52] розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду із застосуванням кислотного-основного титрування у неводному середовищі. Метод кислотного-основного титрування вибрано у зв'язку з тим, що у енісаміуму йодиду наявний третинний атом нітрогену. Запропоновано наступну методику: 0,200 г АФІ розчиняють у суміші 20 мл ацетону та 5 мл розчину ртуті (II) ацетату, додають 1 мл розчину метилового оранжевого Р і титрують 0,1 М розчином кислоти хлорної до появи малинового забарвлення. Паралельно проводили контрольний дослід. Ацетон використаний як розчинник для підсилення основних властивостей енісаміуму йодиду. Ртуті (II) ацетат додавали з метою зв'язування йодидів. Отримані результати дозволяють рекомендувати методику для аналізу АФІ за показником «Кількісне визначення» з допуском вмісту діючої речовини $\pm 1\%$.

Проведено валідацію аналітичної методики: правильність, прецизійність, лінійність. Підтверджено відповідність всіх валідаційних характеристик, в тому числі коефіцієнту кореляції (r), який становив 0,99994.

Вченими з Вінниці [55] розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в плазмі крові із застосуванням методу ВЕРХ. В роботі [10] описано наступну методику: до 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Суміш центрифугували, надосадову рідину зливали і додавали до неї 3,5 мл хлороформу. Суміш рідин струшували протягом 30 с, потім центрифугували. Верхній рідкий шар після фільтрування хроматографували на колонці Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Застосовано ізократичне елюювання. Склад мобільної фази (за об'ємом): 40 % метанол на 0,04 М фосфатному буфері (рН 3,0) з додаванням гептансульфонату натрію (0,1 мг/мл). Детектування проводили при довжині хвилі 268 нм. У діапазоні концентрацій енісаміуму йодиду від 0,1 до 50 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піка та кількістю препарату в пробі.

Бухтіаровою Т. А. та співавторами [53] запропоновано методику ТШХ, яка застосовується для оцінки чистоти амідів піридинкарбоксільних кислот,

до яких і відноситься енісаміум йодид, де було застосовано хроматографічну пластинку «Silufol» виробництва «Kavalier», а в якості рухомої фази суміш н-бутанол – аміак (5 %) – оцтова кислота – вода у співвідношенні (6:1:1:2, об/об/об/об) та рухому фазу етанол – аміак (25 %) у співвідношенні (10:1 об/об). В цій же роботі [8] було вивчено ІЧ- та УФ-спектри. УФ-спектри проявляють максимуми при 266–280 нм та 206–220 нм. ІЧ-спектри, отриманого зразка із калію бромідом (диск) мають наступні характеристичні смуги (cm^{-1}): 1705, 1670–1690, 1540–1550, 3400–3500.

Вченими Георгіянц В. А., Кушніруком В. М. та Гарною Н. В. [54] проведено валідацію методики визначення супровідних домішок в капсулах, що містять енісаміум йодид. В роботі наведено дані по валідації методики визначення супровідних домішок із застосуванням методу ТШХ. Вивчено такі валідаційні характеристики як специфічність, діапазон застосування, придатність хроматографічної системи, межа виявлення. В методиці [49] застосовано хроматографічну пластину Silica gel 60 фірми «Merck», а в якості рухомої фази використано суміш ацетон – метанол – вода, у співвідношенні (8:2:1 об/об/об), пари йоду використано для виявлення плям досліджуваних речовин. Відповідно до описаної методики, МВ домішки становить 0,4 %.

1.4.2 Тілорону дигідрохлорид

Тілорону дигідрохлорид – 2,7-біс-[2(диметиламіно)-етокси]-флуорен-9-ону дигідрохлорид (рис. 1.2) – низькомолекулярний синтетичний індуктор інтерферонів, розроблений в 70-ті роки минулого століття в фізико-хімічному інституті ім. В. А. Богатського (Одеса) АН УРСР. Він володіє імуномодулюючою активністю, зареєстрований у Фармакологічному Комітеті МОЗ України й застосовується для профілактики та лікування інфекційних вірусних захворювань, представлений на ринках 10 країн світу.

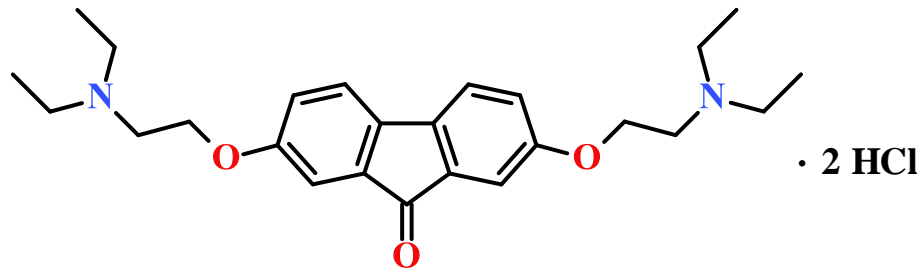


Рис. 1.2 Формула тілорону дигідрохлориду

Тілорону дигідрохлорид – це новий клас противірусних препаратів, схвалений FDA. Тілорон є [56] перорально активним індуктор інтерферону. Тілорон — порошок оранжевого кольору, добре розчинний у метанолі, воді та помірно розчинний у етанолі, диметилсульфоксиді та диметилформаміді. Молекулярна формула $C_{25}H_{34}N_2O_3$. Молекулярна маса: 410,55 г/моль. CAS номер 27591-69-1.

Хімічні властивості тілорону дигідрохлориду наведено в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Хімічні властивості тілорону дигідрохлориду

АФІ	Розчинність у воді (mg/ mL)	Розчинність	Log KOW*
Тілорону дигідрохлорид	96 mg/mL	В етанолі 96 mg/mL, DMSO 43 mg/mL	4.7

Примітка. * Log KOW та розчинність у воді були отримані з Syracuse Research Corporation–Physprop Database [113]

Тілорону дигідрохлорид є амфіфільною катіонною сполукою, яка індукує накопичення сульфатованих глікозаміногліканів в фібробластах, а також підсилює секрецію попередників лізосомальних ферментів [57]. Лізосомотропний механізм також може відігравати важливу роль, оскільки аміксин блокує проникнення вірусу. Катіонні амфіфільні препарати

нещодавно були запропоновані в якості корисної відправної точки для противірусних препаратів широкого спектра дії [58]. Тілорону дигідрохлорид був раніше ідентифіковано *in vitro* як кандидат проти SARS-CoV-2. В дослідженнях тілорону дигідрохлорид неодноразово показав противірусну активність проти SARS-CoV-2 [57].

Annapurna M. M., Valli D. S. [59] було розроблено три різні спектрофотометричні методики кількісного визначення з використанням натрій-ацетатного буфера (рН 4), боратного буфера (рН 9) і фосфатного буфера (рН 2,0 і рН 5,0). Тілорон показав максимуми поглинання при 270 нм і лінійність у діапазоні концентрацій 0,4–14 мкг/мл у всіх трьох методах та у всіх чотирьох буферних розчинах, всі методи були валідовані згідно з рекомендаціями ІСН.

Красних Л. М. [60] зі співавторами було розроблено метод ВЕРХ із застосуванням оберненофазних сорбентів. У дослідженні була обрана оберненофазна колонка Діасорб 130-С16Т (150x4 мм, 7 мкм). Рухливі фази модифікувалися за допомогою фосфатних буферів. При невеликому розподілі складу рідкої фази за рахунок ацетонітрилу оптимізувалося за хроматографічними показниками визначення тілорону дигідрохлориду. Швидкість потоку мобільної фази 1 мл/хв. Детектування зразків здійснювали на аналітичній довжині хвилі 270 нм.

1.4.3 Морфолінію тіазотат

Морфолінію тіазотат – [(5-метил-1Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)]ацетат (рис. 1.3) став першим вітчизняним українським оригінальним препаратом. Молекулярна формула $C_9H_{16}N_4O_3S$. Молекулярна маса: 260.32 г/моль. CAS номер 357172-63-5.

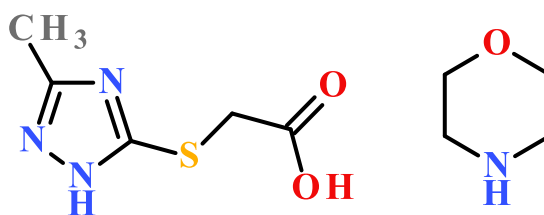


Рис. 1.3 Формула морфолінію тіазотату

Зараз Морфолінію тіазотат і його лікарські форми випускають фармацевтичні виробники, які мають відповідні ліцензії та сертифікати відповідності умов GMP: ДП «Завод хімічних реактивів» НТК, «Інститут монокристалів» НАНУ (субстанція), корпорація «Артеріум» (2,5% розчин для парентерального застосування, таблетки), ТОВ Дослідний завод ГЦНЛС (очні краплі), ПрАТ «Лекхім-Харків» (супозиторії) [61].

Доклінічні дослідження, виконані відповідно до вимог Фармакологічного комітету МОЗ і Державного експертного центру МОЗ України, показали, що морфолінію тіазотат проявляє високі антиоксидантні, протиішемічні, кардіопротекторні і протигіпоксичні властивості.

Препарат випускається та вживається населенням у великих кількостях. Тому на даний час є необхідність розробки удосконаленої методики визначення, яка буде використана для визначення морфолінію тіазотату у навколишньому середовищі.

Хімічні властивості морфолінію тіазотату наведено в таблиці 1.3.

Таблиця 1.3

АФІ	Розчинність у воді (mg/ mL)	Розчинність	Log KOW*
Морфолінію тіазотат	0.007 mg/mL	Легкорозчинний у воді, помірно розчинний у 96 % спирті, від 5.5 до 6.7	-0.9

Примітка. * Log KOW та розчинність у воді були отримані з Syracuse Research Corporation–Physprop Database [113]

Морфолінієва сіль тіазотної кислоти є представником групи засобів, що впливають на серцевосудинну систему. Фармакологічний ефект морфолінієвої солі тіазотної кислоти зумовлений протиішемічною, мембраностабілізуючою, антиоксидантною та імуностимулюючою дією [62-64].

Паралельно з використанням препарату в кардіології, через високі гепатопротекторні властивості морфолінієву сіль тіазотної кислоти призначають для лікування захворювань печінки та інших внутрішніх органів. Препарат запобігає руйнуванню гепатоцитів, знижує ступінь жирової інфільтрації та поширення централобулярних некрозів печінки, сприяє процесам репаративної регенерації гепатоцитів, нормалізує в них білковий, вуглеводневий, ліпідний та пігментний обміни. Збільшує швидкість синтезу та виділення жовчі, нормалізує її хімічний склад [66, 67].

На даний момент існують різні фармакопейні методи визначення морфолінію тіазотату. До них відносяться: спектроскопія у видимій області, УФ-, ІЧ-, хромато-маспектроскопія; ТСХ, ВЕРХ, потенціометрія.

Визначення морфолінію тіазотату згідно ДФУ (2 Вид., п. 2.2.29, с. 86-88). Дослідження проводили з використанням модульної системи для ВЕРХ (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Німеччина) зі спектрофотометричним детектором Lambda 1010 з використанням обернено-фазового режиму хроматографування [68-70]. Для проведення кількісного визначення діючих речовин методом ВЕРХ, використовували: колонку Prontosil Eurobond C 18 розміром 250 × 4,6 мм, з діаметром часток 5 мкм чи аналогічну, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»; елюент: 10 % метанолу – 90% фосфатного буферу, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калію та фосфатну кислоту (рН 3).

Кучеренко Л. І. із співавторами [71] запропоновано методику ВЕРХ у модельній суміші з триптофаном. Використовували колонку Prontosil Eurobond C 18 розміром 250×4,6 мм, з діаметром часток 5 мкм чи аналогічну, як елюент: 20 % метанолу – 80 % фосфатного буферу, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калію та фосфатну кислоту (рН 3); швидкість рухомої фази 1

мл/хв.; довжина хвилі детектування 220 нм; об'єм введеної проби 10 мкл; температура термостату колонки + 25 °С. В ході роботи визначили вміст L-триптофану, який знаходиться в межах від 197,2 до 204,9 мг, тіотриазоліну – від 48,9 мг до 50,5 мг.

Кучеренко Л. І. та співавторами [71] була розроблена методика ВЕРХ у модельній суміші з L-аргініном. Використовували колонку Hypersil ODS-C18-5ц, 4,6 × 250 мм, діаметр часток 5 мкм, як елюент – водний розчин 3,4 г/л тетра-*трет*-бутілазаній гідроген сульфат та 0,05 % трифтороцтової кислоти; швидкість рухомої фази – 1 мл/хв; аналітична довжина хвилі детектора – 220 нм; об'єм проби – 20 мкл.

1.5 Обґрунтування вибору екологічних методів для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату

Під час фармацевтичного аналізу частіше використовують хімічні і зокрема органічні речовини, реактиви, розчинники, які безперечно негативно впливають на навколишнє середовище. Відповідно, зростаюча тенденція сучасного виробництва вимагає розробки більш екологічних методів і запровадження обмежень на застосування токсичних речовин, які забруднюють довкілля [72-73].

Існуючий ВЕРХ метод фармацевтичного аналізу передбачає використання токсичних розчинників, таких як ацетонітрил. Окрім негативного впливу розчинників і органічних речовин на довкілля, необхідно також підкреслити значні енерговитрати, які пов'язані з роботою обладнання. Саме тому одним з принципів «зеленої хімії» є мінімізація ресурсовитрат. Перехід до експрес-методик аналітичного визначення, використання мікроколонок, спектральних методів на заміну хроматографічних – головні пріоритети аналітичної хімії майбутнього [75-76].

Планування роботи на базі 12 принципів «зеленої хімії» дозволить мінімізувати вплив на навколишнє середовище. Підходи до розробки «зелених» аналітичних методик [73-76]:

1. Розробка прямого аналізу, уникаючи пробопідготовки.
2. Зменшення об'єму зразку.
3. Аналіз *in situ*.
4. Використання інтегрованих процесів з метою економії енергії та запобігання витратам великої кількості реагентів.
5. Автоматизація та мініатюризація.
6. Зменшення або відсутність дериватизації.
7. Зменшення відходів.
8. Розробка методів одночасного аналізу декількох аналітів.
9. Зменшення енерговитрат.
10. Використання відновлюваних ресурсів.
11. Заміна токсичних реагентів або зменшення їх використання.
12. Зменшення впливу на оператора аналітики.

Виходячи з принципів наведених вище, методика ВЕРХ не може розглядатись як основний метод при розробці нових препаратів і аналітичних методик, а лише за відсутності альтернативних методів аналізу.

В якості альтернативного методу, розглянуто метод газорідинної хроматографії, який має багато переваг перед методом ВЕРХ, насамперед з точки зору збереження навколишнього середовища, а також вимог «зеленої хімії» [76, 75]. У якості детекторів у ГХ, особливо у розрізі фармацевтичної промисловості, використовують детектор іонізаційно-полум'яний детектор, який селективний до атомів карбону органічних молекул і сигнал якого пропорційний їх кількості. Детектор ГХ-ПДД може надійно виявляти низькі концентрації аналітів в пробі (до 10^7) [76-77].

Рухомою фазою у методі газорідинної хроматографії служить інертний газ (газ-носіє), що протікає через нерухому фазу, яка має велику поверхню. В якості газу-носія використовують гелій, водень або азот. Газ-носіє забезпечує

перенесення аналітів через хроматографічну колонку. Завдяки інертній природі газу-носія, взаємодія його з аналітами і нерухомою фазою відсутня. Для газової хроматографії (ГХ) існують спеціальні вимоги щодо нерухомих фаз. Так, нерухома фаза має бути хімічно та термічно стійкою, рівномірно розподіленою на внутрішній поверхні колонки [76-78].

Висновки до розділу 1

Узагальнюючи дані літературного огляду можна зробити наступні висновки:

1. Темпи розвитку сучасних технологій фармацевтичного виробництва потребують вдосконалення методів аналізу ЛЗ та євроінтеграція України передбачає гармонізацію її законодавства з європейським, а це означає, що українські фармацевтичні компанії та лабораторії повинні відповідати вимогам якості, безпеки та ефективності продукції, що вони випускають.
2. На теперішній час енісаміуму йодид, тілорону дигідрохлорид, морфолінію тіазотат випускається та вживається населенням у великих кількостях, тому є необхідність розробки удосконаленої методики їх кількісного визначення, яка у майбутньому може бути використана для визначення як індивідуальних сполук, так і їх суміші у навколишньому середовищі.
3. Аналіз існуючих методів визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату показав, що найбільш використовуваними методами є ВЕРХ та УФ-спектрофотометрія. Проте, ці методи мають ряд недоліків для екології: необхідність використання великої кількості органічних розчинників, а також відносна тривалість аналізу методом ВЕРХ; недостатня селективність УФ-спектрофотометрії.
4. Ґрунтуючись на тенденціях «зеленої хімії» та з урахуванням недоліків існуючих методів визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату передбачається розробка і валідація нових методик їх кількісного аналізу придатних як для кількісного одночасного визначення субстанцій та їх ЛФ, так і у навколишньому середовищі.

РОЗДІЛ II

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Обґрунтування методології досліджень

Для експериментального підтвердження теоретичних підходів, які пропонуються нами у роботі, на підставі аналітичних оглядів обрано енісаміуму йодид, тілорону дигідрохлорид та морфолінію тіазотат, що відображає чітке розуміння питання щодо необхідності розробки методик визначення у навколишньому середовищі для фармацевтичного виробництва та стандартизації ЛЗ з використанням принципів «зеленої хімії»; розробити ряд оригінальних методик кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату в субстанціях і ЛЗ, та у ґрунті. Дизайн експерименту наведено на рис. 2.1.



Рис. 2.1 Дизайн експерименту

На рис. 2.2 представлено «дерево рішень» щодо розробки методики одночасного аналізу енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату, яка у майбутньому може бути використана для контролю цих ЛЗ у навколишньому середовищі. Як видно з рис. 2.2, то саме методика ГХ-ПД найбільше підходить для екологічного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату. Щодо використання методики аналізу ВЕРХ для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату в навколишньому середовищі, то існують певні нюанси пов'язані з використанням додаткових розчинників та великою кількістю відходів.

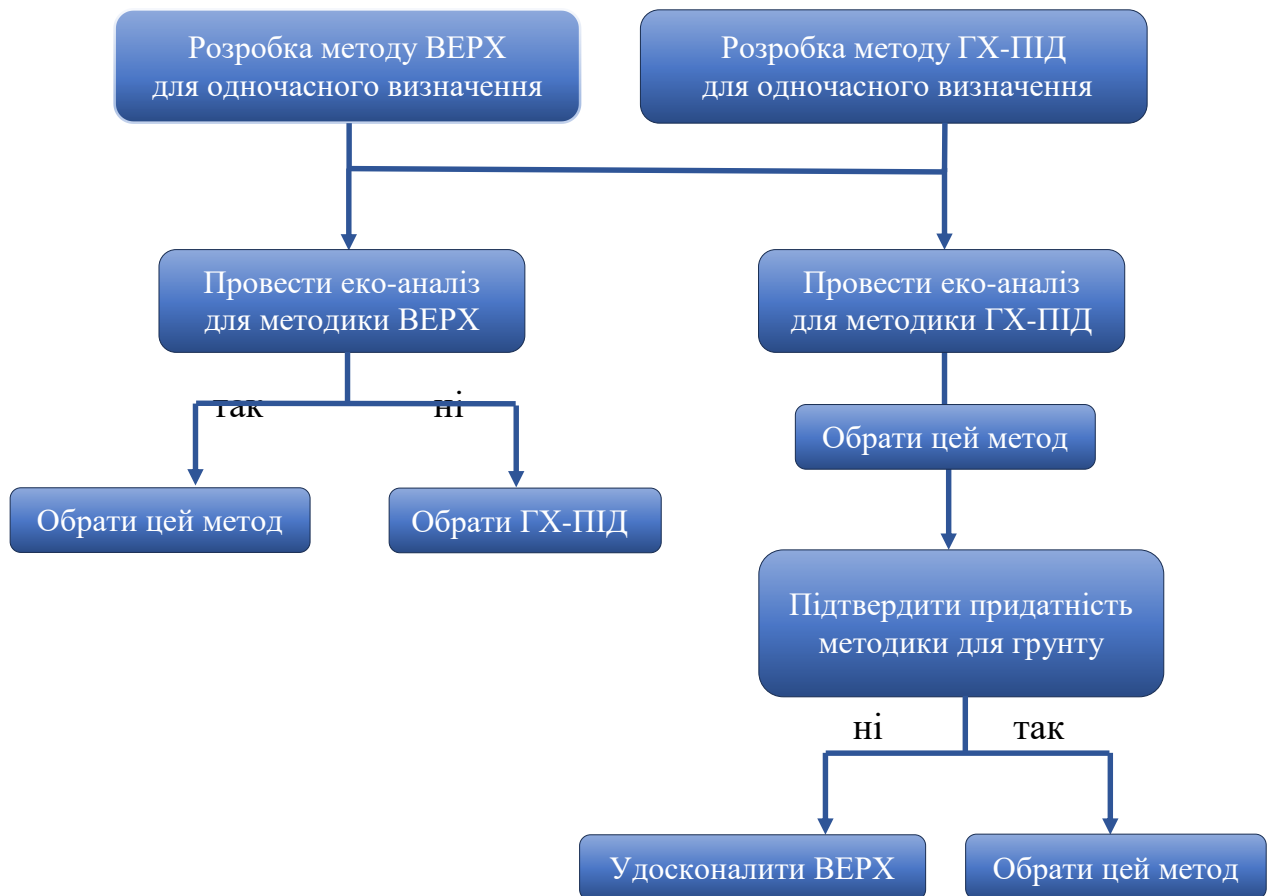


Рис. 2.2 «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу у навколишньому середовищі енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату

Нами опрацьована схема етапів розробки аналітичних методик у розрізі використання підходу «зеленої хімії», яка наведена на рис. 2.2. Це дерево рішень, яке включає в собі етапи та послідовність дій розробника в залежності від отриманих експериментальних даних в процесі розробки аналітичного методу. Для енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату кількісне визначення є обов'язковими показниками якості. Для АФІ – енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату, метод ВЕРХ є найбільш поширеним для кількісного визначення [51, 52, 60, 71, 79].

Для вирішення завдання одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату найбільш зручним є метод ВЕРХ [51, 52, 60, 71, 79], проте при визначенні методом ГХ-ПД за даними літератури дотримуються майже всі пункти «зеленої хімії» [80]. З точки зору принципів «зеленої хімії» (принцип 8 – Розробка методів одночасного аналізу декількох аналітів), найкращим рішенням, у нашому випадку, є одночасне визначення АФІ в одному зразку. Такий підхід дозволяє зменшити споживання енергії на експлуатацію обладнання (принцип 9 – Скорочення споживання енергії), зменшення відходів, що утворюються з мобільної фази (принцип 7 – Зменшення відходів), та токсичних речовин (принцип 11 – Заміна токсичних реагентів або зменшення їх використання), а також мінімізація часу негативного впливу на оператора аналітичного обладнання (принцип 12 – Велика стурбованість безпекою аналітичного оператора).

Відповідно до «дерева рішень», спершу ми запланували оцінити можливість використання методу ВЕРХ. Однак він не є економічним та при його використанні застосовуються токсичні розчинники.

Тому наступним кроком було заплановано оцінити можливість використання методу ГХ-ПД. Метод дозволяє кількісно оцінити декілька аналітів за допомогою однієї інжекції, однак не завжди дає гарну селекцію. До того ж на сьогодні немає описаних у літературі методик для окремих компонентів з використанням ГХ, тому було заплановано паралельне дослідження із застосуванням мас-детектора. Метод ГХ-ПД при можливості

одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату дозволить мінімізувати затрату реагентів, отже буде ще більш економічним ніж ВЕРХ та очікувано більш «зеленим».

На основі аналізу наукових публікацій щодо методик кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату в субстанціях та ЛЗ, а також власних попередніх досліджень обрано методи ВЕРХ та ГХ-ПД.

2.2 Обладнання

2.2.1 Обладнання та реактиви ВЕРХ

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: хроматограф з діодно-матричним детектором SPD-M20A, насос LC-20AD, термостат колонок CTO20AC і автоматичний дозатор проб SIL-20A ("Shimadzu", Японія) [81].

Реактиви. У процесі приготування проб і рухомої фази використовували такі реактиви та стандарти: натрію перхлорат (чистота 98,0%, Sigma-Aldrich) (кат. № 76863); кислота хлорна Sigma-Aldrich (чистота 37,0–38,0 %, Merck, Німеччина); ацетонитрил (чистота 99.8%, Sigma-Aldrich); вода очищена, отримана на установці Milli Q виробництва Millipore Corporation (Німеччина); стандартний зразок енісаміуму йодиду виробництва ПАТ «Фармак» (партія 07-16); стандартний зразок тілорону гідрохлориду (№ 2922197000), стандартний зразок морфолінію тіазотат виробництва ПАТ «Кіївмедпрепарат» (№ UA/5819/01/02).

При валідації аналітичних методик використано хроматографічну колонку Waters SunFire C18 Column розміром 150 × 4,6 мм, заповнену сорбентом з розміром часток 5 мкм, виробництва Waters Corporation, США.

При розробці та валідації методик визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату було використано наступне додаткове обладнання:

- рН-метр Seven Compact «Mettler Toledo», Швейцарія;
- Ваги електронні MSA1202S-000-D0 «Sartorius AG», Німеччина;
- Ваги аналітичні AB54-S «Mettler Toledo», Швейцарія.

2.2.2 Обладнання та реактиви ГХ-МС та ГХ-ПД

ГХ-МС методику проводили за допомогою хроматографічної системи SHIMADZU GC/MS-QP2010nc Ultra (підключеної до джерела іонізації електронами (EI) та одинарного квадрупольного мас-спектрометра (Shimadzu Technologies, Кіото, Японія)). Використовували робочий автосамплер та інжектором з split/splitless.

Для розробки ГХ-ПД методики використовували хроматограф GC-2010 Plus Shimadzu з детектором полум'яної іонізації та автодозатором AOC-20i+s (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan). Розділення аналітів здійснювалося на колонці Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA), капілярна колонка (довжина 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщина рідкої стаціонарної фази 0,25 мкм), автоматичний дозатор та інжектор split/splitless.

Реактиви, розчинники. Стандартні зразки енісаміуму йодиду виробництва ВАТ «Фармак» (партія 07–16); еталонний препарат тілорону дигідрохлорид виробництва Інтерхім, Україна (№ 2922197000), морфолінію тіазотат виробництва ПАТ «КиївМедпрепарат» Україна (№ UA/5819/01/02). Ацетонітрил (чистота 99,8 %, Sigma–Aldrich Co., Великобританія). ГХ-обладнання працювало з гелієм (чистота 5,0), оскільки газ-носіє був придбаний у Gazchema (Литва) [82,83].

При розробці та валідації методик визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату було використано наступне додаткове обладнання:

- рН-метр Seven Compact «Mettler Toledo», Швейцарія;
- Ваги електронні MSA1202S-000-D0 «Sartorius AG», Німеччина;
- Ваги аналітичні AB54-S «Mettler Toledo», Швейцарія.

2.3 Характеристика методик дослідження

2.3.1 Високоєфективна рідинна хроматографія

Взяття наважок досліджуваних зразків, речовин проводили з точністю ± 0.2 мг.

Для вимірювання об'ємів досліджуваних розчинів, зразків тощо використовували піпетки, циліндри та мірні колби. Для досліджень використовували розчинники класу ч.д.а (Chromasolv).

Буферний розчин рН 2,5. 2,033 г натрію перхлорату розчиняють в 900 мл води очищеної, доводять рН розчину хлорною кислотою до $(2,5 \pm 0,05)$ та доводять об'єм розчину водою очищеною до 1000,0 мл.

Рухома фаза. До 750 мл буферного розчину рН 2,5 додають 250 мл ацетонітрилу, перемішують та фільтрують через фільтр із розміром пор 0,45 мкм (25:75).

Випробовуваний розчин. Наважку 60,0 мг субстанції енісаміуму йодиду, 60,0 мг субстанції тілорону дигідрохлориду та 60,0 мг субстанції морфолінію тіазотату або порошку таблеток з вмістом діючих речовин 60,0 мг розчиняють в рухомій фазі, доводять об'єм розчину до 100,0 мл тією самою рухомою фазою та перемішують.

Розчин порівняння А. 1,0 мл *випробованого розчину* поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки рухомою фазою та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним або діодно-матричним детектором за таких умов:

- колонка SunFire C18, розміром або 150×4,6 мм, або 150×3,9 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічної якості;
- рухома фаза: ацетонітрил Р та вода Р у співвідношенні (25:75), дегазована будь-яким зручним способом;
- швидкість рухомої фази: 0,8 мл/хв;
- детектування за довжинах хвилі: 205 нм та 265 нм;

- температура термостату колонки: (25 ± 1) °C;
- об'єм інжекції: 20 мкл.

Хроматографують розчин порівняння А та випробуваний розчин.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- коефіцієнт розділення, розрахований для піків енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду з хроматограм *розчину порівняння А* має бути не менше 1,5.

2.3.2 Газова хроматографія з мас-детектором та полум'яно-іонізаційним детектором

Хроматографічні умови методу ГХ-МС. Температуру інжекційного порту підтримували на рівні 250 °C до кінця аналізу. Температура інжектора підтримувалася на рівні 250 °C до кінця аналізу. Розділення аналітів проводилося на колонці Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA), капілярна колонка (довжина 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщина рідкої стаціонарної фази 0,25 мкм) із рідкою стаціонарною фазою (5 % дифенілу та 95 % полідиметилсилоксану) з гелієм чистотою 99,999 % як газ-носій у постійному потоці 1,49 мл/хв. Температуру печі програмували на 75 °C протягом 5 хв, потім підвищували до 290 °C зі швидкістю 10 °C/хв і до 320 °C зі швидкістю 20 °C/хв і витримували протягом 10 хв. Загальний час становив 41 хв. Температури інтерфейсу МС та джерела іонів були встановлені на 280, 200 °C відповідно. МС працював у позитивному режимі (енергія електронів 70 eV). Повне сканування проводили з діапазоном детектування мас 35-500 м/z для визначення часів утримання аналітів, оптимізації градієнта температури печі та спостереження за характерними масовими фрагментами для кожної сполуки. Збір та аналіз даних виконували за допомогою LabSolution GC/MS (версія 5.71) (Shimadzu Corporation). Для ідентифікації та кількісного визначення аналітів використовували режим моніторингу одного іона (SIM).

Хроматографічні умови методу ГХ-ПД. Температура інжектора підтримувалася на рівні 250 °С до кінця аналізу. Розділення аналітів проводилося на колонці Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA), капілярна колонка (довжина 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщина рідкої стаціонарної фази 0,25 мкм) із рідкою стаціонарною фазою (5 % дифенілу та 95 % полідиметилсилоксану) з гелієм чистотою 99,999 % як газ-носії у постійному потоці 1,49 мл/хв. Температура печі програмувалася на 75 °С протягом 5 хв, потім підвищувалася до 290 °С зі швидкістю 10 °С/хв і далі до 320 °С зі швидкістю 20 °С/хв, де витримувалася протягом 10 хв. Загальний час становив 41 хв. Об'єм інжекції становив 1,0 мкл, режим інжекції – поділ (співвідношення поділу 10), газ-носії – гелій.

Приготування проб і стандартних розчинів для ГХ-МС.

1 мл підготовленого розчину зразка випаровували до сухості потоком азоту. 0,1 г сухого випарованого концентрату розбавляли до 0,1 мл в ампулі 2 мл ацетонітрилу, додавали 0,1 мл дериватизуючого агента (MTBSTFA). Флакони закривали, збовтували протягом 1 хвилини, а потім поміщали на гліцеринову баню на 60 хвилин при кімнатній температурі (25 °С). Отриманий розчин переносили в 200 мкл поміщали в автосамплер, і 1 мкл аліквоту вприскували в ГХ-МС систему для аналізу. Оцінювали та оптимізували параметри ефективності екстракції, включаючи час дериватизації, температуру екстракції та кількість реагенту при дериватизації. Для оцінки ефективності екстракції використовували порівняння хроматографічних відгуків.

Приготування проб і стандартних розчинів для ГХ-ПД. Наважку тілорону дигідрохлориду та енісаміуму по 60,0 мг кожної речовини розчиняють у 10 мл ацетонітрилу, доводять об'єм розчину до 100,0 мл тим самим розчинником і перемішують. Одержаний розчин переносять у флакони з автоматичним пробовідбірником об'ємом 200 мкл, а аліквоту 1 мкл вводять в систему ГХ-МС для аналізу. Для оцінки ефективності екстракції використовують порівняння хроматографічних відгуків.

2.4. Методологія проведення експерименту в ґрунті

Готували базові розчини енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату шляхом розчинення кожної з таблеток в 10,00 мл ацетонітрилу та доводили до кінцевого об'єму 25,00 мл. Для рівномірного розподілу ЛЗ у ґрунті кожен препарат додавали у вигляді розчину у ґрунт.

Тривалий період напіврозпаду фармацевтичних препаратів у стерильних ґрунтах свідчить про те, що мікробіологічна активність зіграла важливу роль у деградації цих сполук. Тому для експерименту було обрано час проведення 45 днів.

Відбирали п'ять грамів висушеного та просіяного на повітрі ґрунту поміщали в окремий пластиковий контейнер об'ємом 10,0 мл і додавали кожний із розчинів (у перерахунку 0,002 мг/мл речовини) попередньо профільтрованого крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Пластикові контейнери інкубували в темряві при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 45 днів. Досліди проводили при 25°C . Відбирали відповідно з встановленим часом відбору проб після струшування контейнерів.

Перед вимірюванням вміст контейнеру доводили об'єм водою до 10,0 мл, центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Супернатанти фільтрували через фільтр з розміром пор 0,45 мкм і декантували.

Висновки до розділу II

1. Запропоновано «дерево рішень» щодо розробки методики одночасного аналізу енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату для контролю у навколишньому середовищі.
2. Наведено перелік використаних в дисертаційній роботі реактивів, обладнання та зразків для дослідження енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату методами ВЕРХ, ГХ-МС та ГХ-ПД.

3. Наведено методики приготування розчинів для дослідження методами ВЕРХ, ГХ-МС та ГХ-ПД.
4. Запропоновано методику проведення експерименту з визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату в ґрунті.

РОЗДІЛ III

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИК ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ

3.1 Розробка методики ВЕРХ для одночасного визначення енісаміуму йодиду і тілорону дигідрохлориду

У літературі описано методики визначення енісаміуму йодиду і тілорону дигідрохлориду і морфолінію тіазотату [52-55, 59]. Вони відрізняються між собою. Наприклад, для визначення енісаміуму йодиду використовували метод ВЕРХ колонку Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм), ізократичне елюювання з рухомою фазою (за об'ємом): 40 % метанол на 0,04 М фосфатному буфері (рН 3,0) з додаванням гептансульфонату натрію (0,1 мг/мл), детектування проводили при довжині хвилі 268 нм з фосфатним буфером, а для визначення морфолінію тіазотату використовували колонку Prontosil Eurobond C 18, як елюент: 20 % метанолу – 80 % фосфатного буферу (рН 3); швидкість рухомої фази 1 мл/хв.; довжина хвилі детектування 220 нм.

Основним завданням було підібрати умови для одночасного визначення досліджуваних речовин. На першому етапі ми відібрали енісаміуму йодид та тілорону дигідрохлорид для одночасного визначення так, як вони мають близький діапазон поглинання хвилі 260-270 нм.

На даний час немає опублікованих методик про спільне визначення енісаміуму йодиду і тілорону дигідрохлориду методом вискоєфективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням.

Доцільність розробки методики визначення обумовлена подальшим застосуванням розробленої методики при здійсненні для контролю знаходження у навколишньому середовищі.

З метою оптимізації ВЕРХ методики зосередилися на виборі селективної та простої рухомої фази і відповідної хроматографічної колонки для досягнення успішного, ефективного, експресного та відтворюваного розділення.

При розробці методики необхідно було підібрати оптимальні хроматографічні умови для ефективного поділу речовин: тип колонки, склад рухомої фази, умови елюювання.

При аналізі ВЕРХ протонованих аміносполук широко застосовують іон-парний агент – аніон трифторацетат у вигляді трифтороцтової кислоти (ТФО), концентрацію якої в елюенті вибирають зазвичай в діапазоні 0.01-0.05 М. Єдиним недоліком ТФО є те, що вона істотно поглинає УФ-випромінювання при 200-210 нм, що в нашому випадку не прийнятне тому, що енісаміум йодид має максимум поглинання при 205 нм [40]. Альтернатива трифтороцтової кислоті – перхлорат-аніон, який практично не поглинає в короткохвильовій області УФ-спектра. Перхлорати натрію і літію добре розчинні в ацетонітрилі, метанолі, етанолі і не володіють буферною ємністю, що дозволяє застосовувати їх у високих концентраціях в широкому діапазоні значень рН рухомої фази.

Енісаміуму йодид є іонною молекулою, тому застосування таких хроматографічних колонок, як ZORBAX StableBond C18 Analytical, 4.6 м x 150 мм з розміром частинок 5 мкм (рис. 3.1 а-б), ZORBAX Gemini-C18 Analytical, 4.6 м x 250 мм x 5 мкм з розміром частинок 5 мкм (рис. 3.2 а-б), з використанням рухомої фази (вода-ацетонітрил) виявилися незадовільними для проведення точного кількісного визначення за отриманими часами утримування і формою піків.

Одним із способів вирішення даної перешкоди виявилось застосування гідрофільної колонки Waters SunFire C18, 5 мкм, 250 x 4.6 мм з розміром частинок 5 мкм (рис. 3.3 а-б), яка сприяє розділенню іонних молекул, в тому числі молекул, що містять аміногрупу.

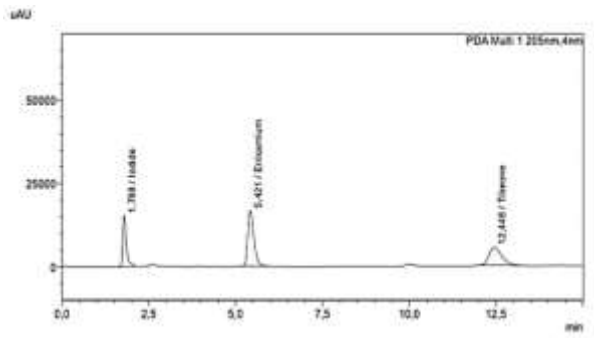


Рис. 3.1 а Хроматограма з використанням колонки Zorbax SB-C18 при 205 нм.

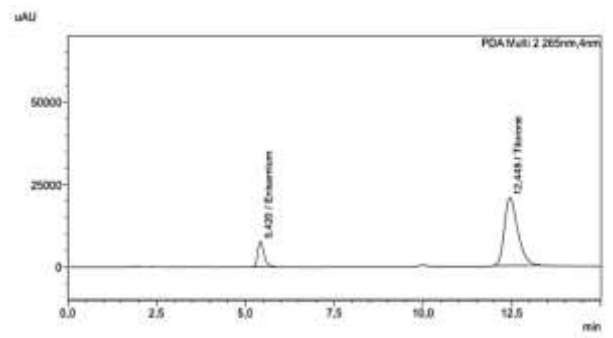


Рис 3.1 б Хроматограма з використанням колонки Zorbax SB-C18 при 265 нм.

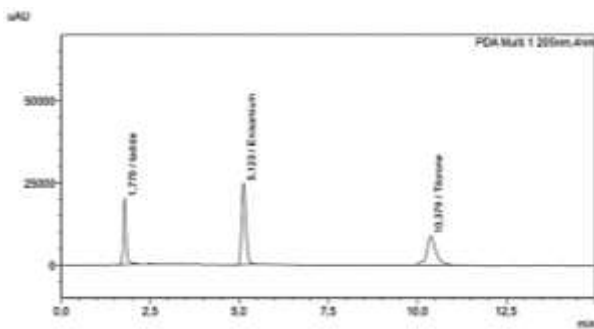


Рис. 3.2 а Хроматограма з використанням колонки Gemini NX-C18 при 205 нм.

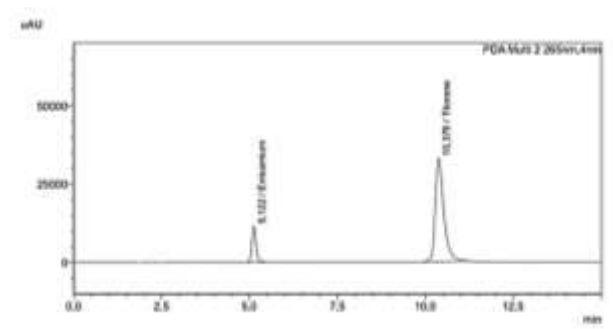


Рис. 3.2 б Хроматограма з використанням колонки Gemini NX-C18 при 265 нм.

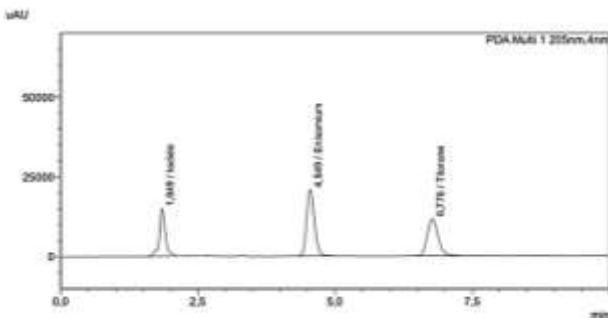


Рис. 3.3 а Хроматограма з використанням колонки SunFire C18 при 205 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,6 мг/мл.

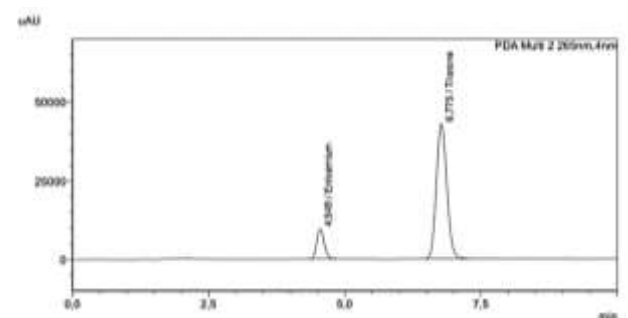


Рис. 3.3 б Хроматограма з використанням колонки SunFire C18 при 265 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,6 мг/мл.

3.2 Валідація аналітичної методики ВЕРХ для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду

Отримані результати дозволяють оцінити параметри хроматографічної системи як задовільні (табл. 3.1) і зробити висновок про придатність хроматографічної системи, що використовується, для одночасного аналізу енісаміуму йодиду і тілорону дигідрохлориду.

Таблиця 3.1

Характеристики придатності хроматографічної системи

Субстанція	Коефіцієнт асиметрії піку, T	Коефіцієнт поділу піків, Rs	Ефективність хроматографічної колонки т.т., N
Енісаміуму йодид	1,16	9,13	4445
Тілорону дигідрохлорид	1,10	7,02	5724
Рекомендовані значення	$T \leq 2,0$	$R_s > 2,0$	$N \geq 3000$

Так як у ґрунті та ґрунтових водах на даний час наявна велика кількість різних антибіотиків, актуальним завданням є проведення аналізу досліджуваних речовин у присутності найпоширеніших антибіотиків. Нами було обрано по 1 представнику із 4 різних груп антибіотиків: цефалоспорини (цефтріаксон), тетрацикліни (тетрациклін), пеніциліни (ампіцилін), фторхінолони (левофлоксацин).

Хроматографування проводилося в умовах розробленої методики аналізу енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид. Концентрації антибіотиків були підбрані відповідно до концентрацій аналізованих субстанцій. Метою даного дослідження було показати, що при аналізі забруднення об'єктів навколишнього середовища досліджуваними речовинами, наявність у досліджуваних зразках ґрунту або ґрунтових вод антибіотиків не буде заважати визначенню основних субстанцій.

У результаті дослідження було показано, що піки антибіотиків не накладаються на піки досліджуваних речовин (рис. 3.4 а-б). Методика є універсальною та дозволяє відкривати не тільки досліджувані речовини, а і найбільш поширені забруднювачі для ґрунту та ґрунтових вод на даний час, а саме антибіотики наступних груп цефалоспорини (цефтріаксон), тетрацикліни (тетрациклін), пеніциліни (ампіцилін), фторхінолони (левофлоксацин).

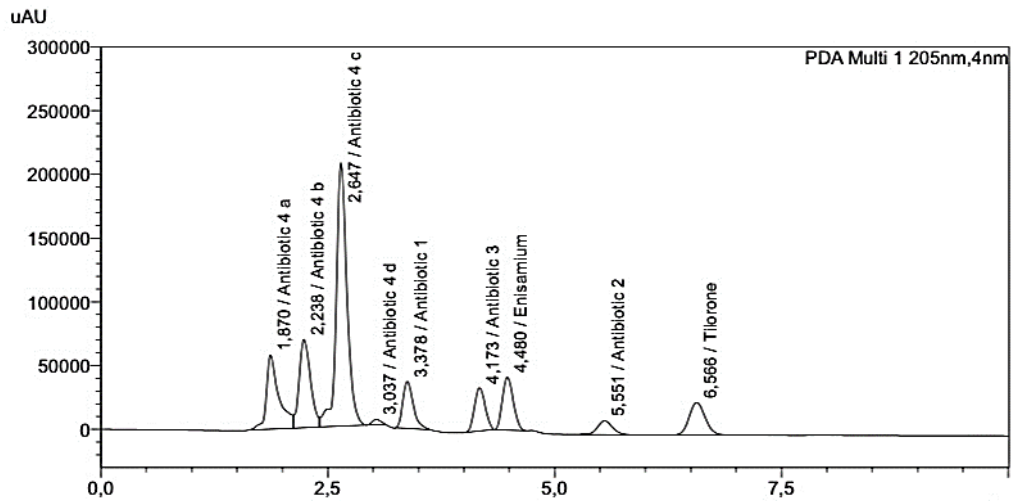


Рис. 3.4 а Хроматограма досліджуваних субстанцій у наявності антибіотиків при довжині хвилі 205 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,6 мг/мл.

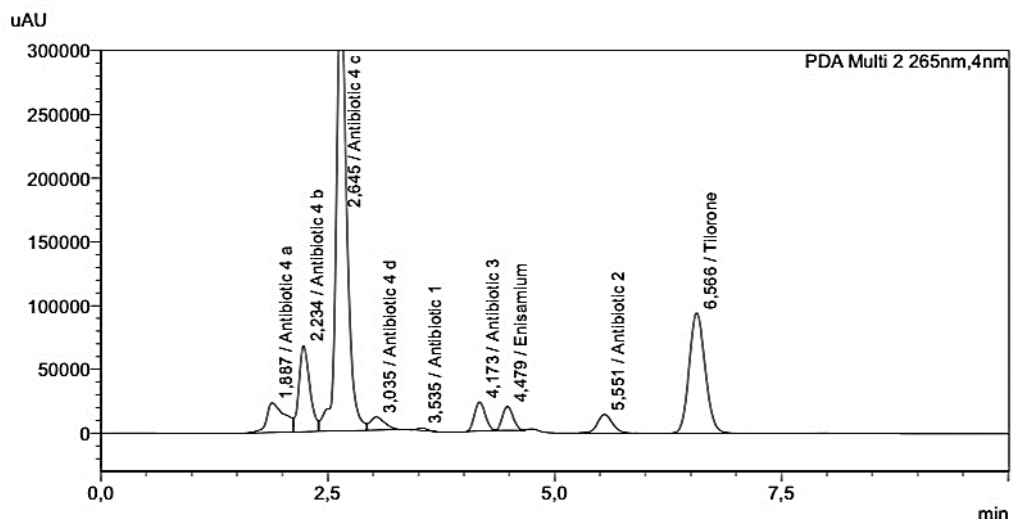


Рис. 3.4 б Хроматограма досліджуваних субстанцій у наявності антибіотиків при довжині хвилі 265 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 6 мг/мл.

Процедуру валідації розробленої методики здійснювали за такими параметрами: лінійність, правильність, специфічність, збіжність і внутрішньо-лабораторна прецизійність.

При дослідженні специфічності методики хроматографували розчин порівняння, випробовуваний розчин та розчинник (рухої фази), в результаті чого встановлено, що на хроматограмі рухої фази відсутні піки з часами утримування досліджуваних речовин. Отримані результати показують, що запропоновані умови хроматографування забезпечують специфічність визначення енісаміуму йодиду та тілорону. Хроматограми рухої фази, розчину порівняння та випробовуваного розчину наведено на рисунках 3.5-3.6.

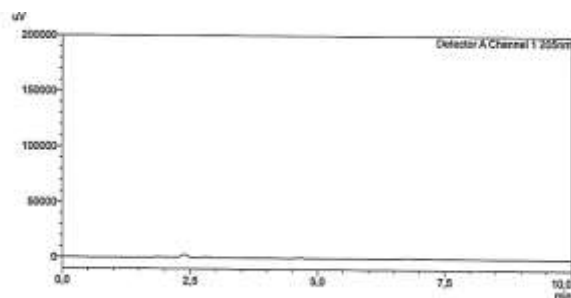


Рис. 3.5 а Типова хроматограма рухої фази при 205 нм.

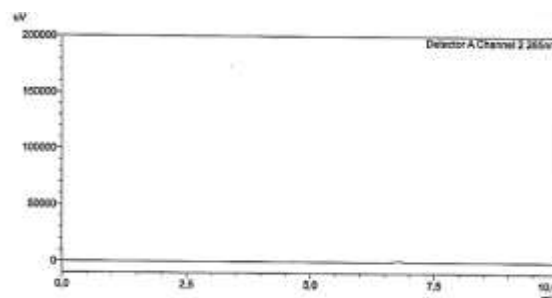


Рис. 3.5 б Типова хроматограма рухої фази при 265 нм.

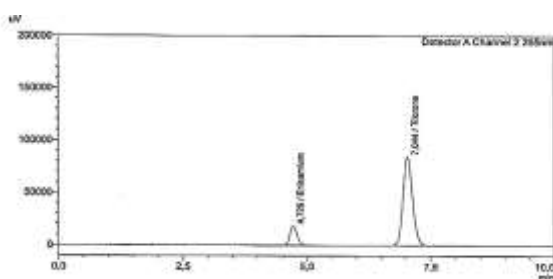


Рис. 3.6 а Типова хроматограма випробовуваного розчину при 205 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,6 мг/мл.

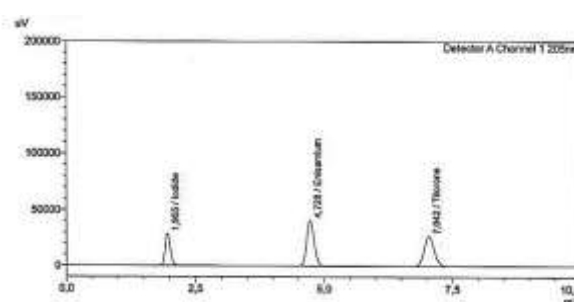


Рис. 3.6 б Типова хроматограма випробовуваного розчину при 265 нм, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,6 мг/мл.

Лінійність методики характеризується наявністю лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації або кількості речовини, що визначається, в аналізованій пробі в межах аналітичної області методики.

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енсаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду лінійно змінювалася в діапазоні від 10 до 150 % відносно номінальної концентрації досліджуваних речовин у випробовуваному розчині. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів. Графік лінійної залежності наведено на рисунках 3.7-3.8.

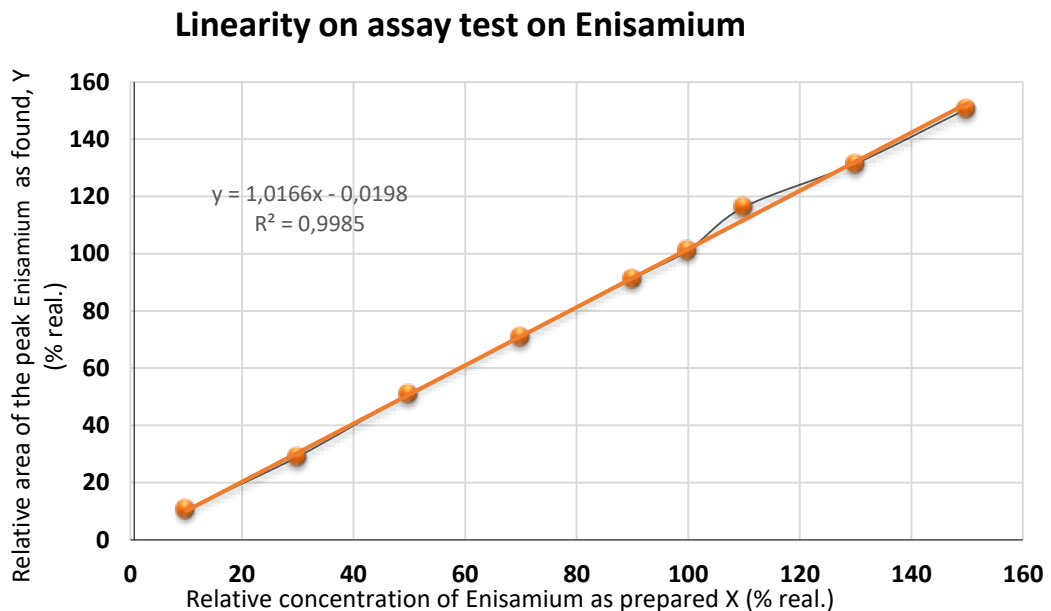


Рис 3.7 Графік лінійної залежності площі другого піка енсаміуму йодиду від концентрації (в нормалізованих координатах).

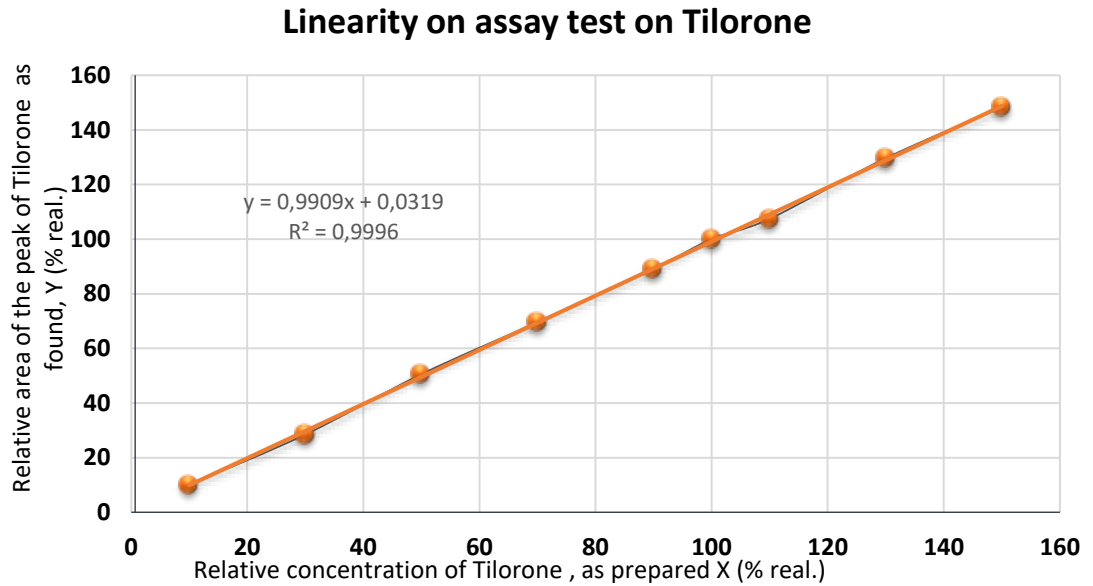


Рис. 3.8 Графік лінійної залежності площі піка тілорону дигідрохлориду від концентрації (в нормалізованих координатах).

Результати вивчення лінійності методики наведено в таблиці 3.2. Як впливає із представлених даних, метрологічні характеристики лінійності відповідають вимогам прийнятності, рекомендованим ДФУ [83].

Таблиця 3.2

Метрологічні характеристики лінійності методики кількісного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії

Величина	Критерії прийнятності	Отримане значення	
		Енісаміуму йодид	Тілорону дигідрохлорид
b	-	1,0166	0,9909
s_b	-	0,0148	0,0074
a	$\leq 2,6$	0,0198	0,0319
s_a	-	1,3754	0,6873
s_0	$\leq 3,38$	1,9351	0,9670

Продовження табл. 3.2

s_b/b	-	1,9035	0,9758
$ r $	0,9981	0,9992	0,9998

Прецизійність вивчена на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності. Для оцінювання збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид в концентрації 0,06 % щодо концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині. Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували в порівнянні результатів різних аналітиків, аналізуючи 6 додаткових модельних сумішей наступного дня [90-91].

Результати перевірки прецизійності аналітичної методики наведені в таблиці 3.3. Відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 5,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Таблиця 3.3

Результати вивчення прецизійності методики визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії

Розчин	Знайдено енісаміуму йодиду від введеного, %		Знайдено тілорону дигідрохлорид від введеного, %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	100,7	101,2	100,3	101,8
2	101,5	100,5	100,4	101,7
3	100,3	100,6	101,8	98,6
4	100,2	99,6	101,6	100,5
5	99,8	100,8	100,5	100,7
6	100,8	101,3	99,9	100,1

Продовження табл. 3.3

Середнє Z%	100,6	100,7	100,8	100,6
Відносне стандартне відхилення, Sz%	0,59	0,61	0,76	1,17
Відносне стандартне відхилення внутрішньо-лабораторної прецизійності, %	0,6		0,96	
Відносна різниця середніх значень	0,12		0,18	

Для оцінювання правильності готували 9 модельних розчинів зі змінною концентрацією енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид щодо концентрації енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид у випробовуваному розчині в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня. Результати наведені в таблиці 3.4. Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для всіх домішок, які визначали, становить не більше ніж 5 %. Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 95,0–105,0 %.

Таблиця 3.4

Результати вивчення правильності методики визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом вискоелективної рідинної хроматографії

№ досліду	Енісаміум йодид			Тілорон дигідрохлорид		
	Ci, % X задано	Ci знайдено	Z-- Y/X*100%	Ci, % X задано	Ci знайдено	Z-- Y/X*100%
<i>1</i>	2	3	4	5	6	7
1	10,00	10,55	105,11	10,00	10,15	94,83
2	30,00	28,96	96,20	30,00	28,53	103,60
3	50,00	50,85	101,36	50,00	50,58	98,33
4	70,00	70,85	100,87	70,00	69,65	98,81

Продовж. табл. 3.4

5	90,00	91,07	100,85	90,00	89,16	98,83
6	100,00	100,98	100,64	100,00	100,04	99,03
7	110,00	116,05	105,15	110,00	107,49	94,79
8	130,00	131,24	100,62	130,00	129,61	99,05
9	150,00	150,38	99,92	150,00	148,33	99,75
Середнє Z%	101,19			98,56		
Відносне стандартне відхилення, Sz%	2,70			2,64		
RSD	2,67			2,68		
$\Delta_{As}\%$	1,8595			1,8595		
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z\% = t(95\%, 8) * Sz$	5,02			4,9		
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}\%$	$\Delta_{As} < 5\%$			$\Delta_{As} < 5\%$		
Систематична погрішність $\delta\%$	1,19			-1,44		
Критерій статистичної невизначеності систематичної погрішності $\delta\%$	1,67			1,63		
Критерій практичної невизначеності систематичної погрішності $\delta\%$	4,27			4,27		

В таблиці 3.5 наведено дані щодо робасності аналітичної методики. Надійність хроматографічної процедури перевіряли за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази. Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння, модельної суміші, що містила по 0,06 % кожної субстанції.

Таблиця 3.5

Результати вивчення робасності методики визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії

Досліджуваний ЛЗ	Умови, що змінювались		Результати вмісту, %
Енісаміуму йодид	Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,6	101,06
		0,8	101,15
		1,0	101,08
		RSD,%	0,05
Тілорону дигідрохлорид		0,6	100,32
		0,8	100,38
		1,0	100,94
		RSD,%	0,34
Енісаміуму йодид	Температура термостату колонки, в °С	20°C	100,90
		25°C	101,15
		30°C	101,08
		RSD,%	0,13
Тілорону дигідрохлорид		20°C	100,33
		25°C	100,38
		30°C	100,00
		RSD,%	0,21
Енісаміуму йодид	Склад рухомої фази:	20%	101,18
		25%	101,15

Тілорону дигідрохлорид	буферний розчин рН 2.5 : ацетонітрил (об/об)	30%	100,18
		RSD,%	0,56
	20%	100,38	
	25%	100,38	
	30%	99,76	
	RSD,%	0,36	

Варіабельність результатів кількісного вмісту енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду для кожної із умов відповідно до початкових умов становить не більше 1,0 %. Варіабельність площ піків аналітів для кожної з умов порівняно з початковими умовами становить не більше ніж 5 %. Отже, аналітичну методику можна вважати робасною.

Стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння вивчали за зміною площ піків під час зберігання розчинів при температурі 25 °С. Було встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки виконали, виходячи з даних, що наведені в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Розрахунок невизначеності пробопідготовки

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність,%
Розчин порівняння		
Зважування стандартного зразка	з точністю до $\pm 0,0002$ г	0,2
Доведення до об'єму 100,0 мл	100 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,0 мл	0,98, 0,98

Випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0002$ г	0,2
Доведення до об'єму 100,0 мл	100 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,0 мл	0,98, 0,98

Розрахунок сумарної невизначеності Δ_{Sp} для розчину порівняння:

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{0,2^2 * 0,16^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,10^2 * 0,10^2} = 0,36\%$$

Розрахунок сумарної невизначеності Δ_{Sp} для випробовуваного розчину:

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{0,2^2 * 0,16^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,10^2 * 0,10^2} = 0,36\%$$

Розрахунок невизначеності зважування

$$m_H^2 = \frac{0,1}{m_H} * 100\%$$

$$m_H^2 = \frac{0,1}{60,1} * 100\% = 0,16$$

$$m_H^2 = \frac{0,1}{60} * 100\% = 0,16$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\sqrt{0,36^2 + 0,36^2} = 0,51\%$$

Невизначеність пробопідготовки не перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 5 = 1,6\%$ ($0,51 < 1,6$) [7].

Прогноз загальної невизначеності аналізу Δ_{As} зробили за співвідношенням:

$$\Delta_{As} = \Delta_{Sp}^2 + \Delta_{FAO}^2$$

Δ_{Sp} : невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} : невизначеність кінцевої аналітичної операції (у цьому випадку – ВЕРХ).

Δ_{FAO} розраховується зі співвідношення:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} * \frac{RSD_{max} * t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}}$$

$\sqrt{2}$: враховує наявність розчину порівняння та випробовуваного розчину;
 RSD_{max} : відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи; $t(95\%, n-1)$: односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %; n : число паралельних хроматограм.

Виходячи із даних RSD , Δ_{FAO} становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} * \frac{2 * 1,8595}{\sqrt{9}} = 3,03\%$$

Тоді Δ_{As} дорівнює $\sqrt{0,51^2 + 3,03^2} = 3,03\% < 5\%$

Отже, методика коректна та може бути відтворена в інших лабораторіях із необхідною точністю.

3.3 Перевірка придатності методики ВЕРХ для визначення морфолінію тіазотату

У методі ВЕРХ основними змінними параметрами є нерухома фаза, рухома фаза, вміст органічного розчинника, довжина хвилі детектування та робоча температура елюювання.

Нами було прийнято рішення ідентифікувати морфолінію тіазотат за вже розробленою методикою ВЕРХ, якою ідентифікували яку використали для розділення суміші енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду (рис. 3.9 та 3.10). Час утримування енісаміуму склав 5,5 хвилини, йодиду 1,8 хвилини та тілорону дигідрохлориду 12,5 хвилин.

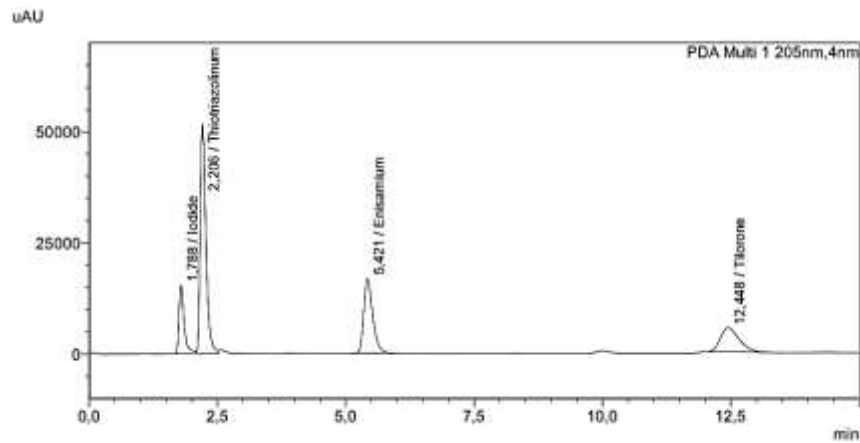


Рис. 3.9 Хроматограма в суміші морфолінію тіазотату, енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду при 205 нм, де концентрація становила 0,6 мг/мл.

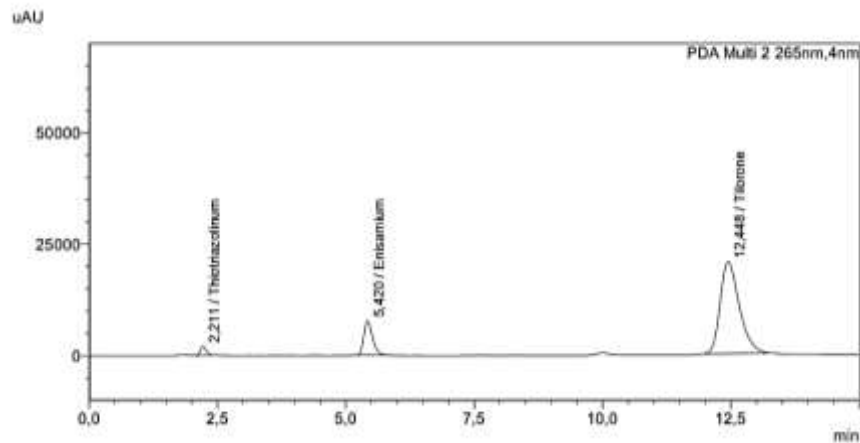


Рис. 3.10 Хроматограма в суміші морфолінію тіазотату, енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду при 265 нм, де концентрація становила 0,6 мг/мл.

Хроматографування проводили за допомогою рідинного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автоматичним дозатором, дегазатором та насосом для чотирикомпонентних сумішей. Для обробки даних використовували програмне забезпечення LC Solution software.

Буферний розчин рН 2,5. 2,033 г натрію перхлорату розчиняють в 900 мл води очищеної, доводять рН розчину хлорною кислотою до $(2,5 \pm 0,05)$ та доводять об'єм розчину водою очищеною до 1000,0 мл.

Рухома фаза. До 750 мл буферного розчину рН 2,5 додають 250 мл ацетонітрилу, перемішують та фільтрують через фільтр із розміром пор 0,45 мкм (25:75).

Випробовуваний розчин. 60,0 мг субстанції морфолінію тіазотату розчиняють в 100 мл рухомої фази, доводять об'єм розчину до 100,0 мл тим самим розчинником та перемішують.

Розчин порівняння А. 1,0 мл *випробованого розчину* поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки рухомою фазою та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним або діодно-матричним детектором за таких умов:

- колонка SunFire C18, розміром або 150×4,6 мм, або 150×3,9 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічної якості;
- рухома фаза: ацетонітрил Р та вода Р у співвідношенні (25:75), дегазована будь-яким зручним способом;
- швидкість рухомої фази: 0,8 мл/хв;
- детектування за довжинах хвилі: 205 нм та 265 нм;
- температура термостату колонки: (25±1) °С;
- об'єм інжекції: 20 мкл.

Хроматографують розчин порівняння А та випробовуваний розчин.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- коефіцієнт розділення, розрахований для піків морфолінію тіазотату з хроматограм *розчину порівняння А*, має бути не менше 1,5.

У методі ВЕРХ з ізократичним елююванням час аналізу для морфолінію тіазотату склав 3 хвилини. Час утримування 2,5 хвилини (рис. 3.11).

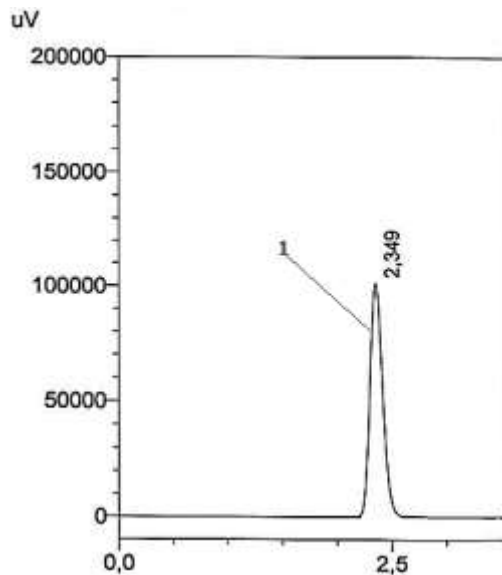


Рис. 3.11 Хроматограма морфолінію тіазотату (1) при 205 нм, де концентрація морфолінію тіазотату становила 0,6 мг/мл.

Раніше розроблена методика ВЕРХ виявилася придатною і хроматографічні умови оптимальні для ефективного поділу речовини: тип колонки, склад рухомий фази, умови елюювання.

3.4. Валідація методики ВЕРХ для визначення морфолінію тіазотату

Розроблений метод був перевірений щодо специфічності, лінійності, точності, стабільності та точності, крім того, були розраховані межа виявлення (LOD) та межа визначення (LOQ).

Специфічність. Рухому фази, розчинник, розчин плацебо, модельний розчин плацебо, стандартний та випробуваний розчини вводили в умовах методики. Специфічність методу була продемонстрована відсутністю інтерференції між піками аналітів та піками плацебо на хроматограмах випробуваного розчину. Приклади хроматограм рухомої фази та випробуваного розчину при довжинах хвиль 205 нм наведено на рис. 3.11 та 3.12. Таким чином, методика є специфічною для визначених аналітів [81].

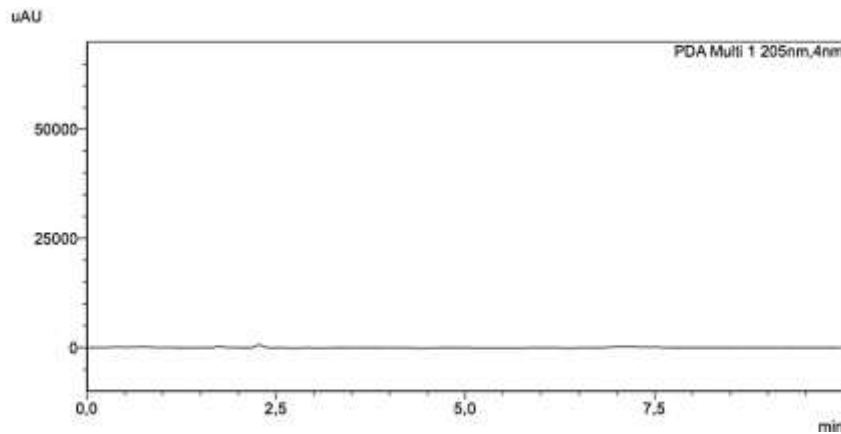


Рис. 3.12 Типова хроматограма рухомої фази при 205 нм.

Лінійність (LOD, LOQ). Лінійність методики характеризується наявністю лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації або кількості речовини, що визначається, в аналізованій пробі в межах аналітичної області методики.

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація морфолінію тiazотату лінійно змінювалася в діапазоні від 10 до 150 % відносно номінальної концентрації досліджуваних речовин у випробовуваному розчині. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів. Графік лінійної залежності наведено на рис. 3.13.

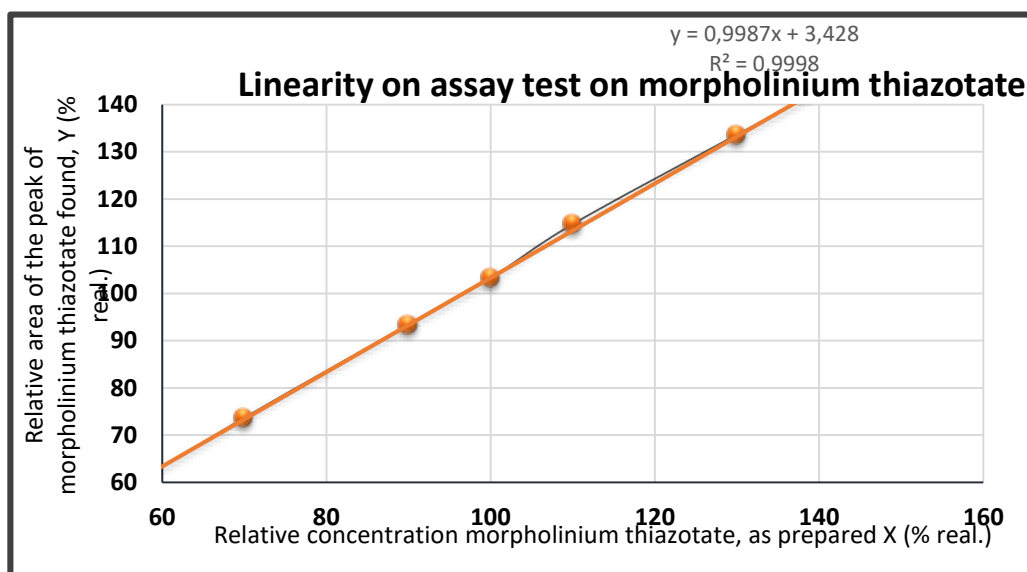


Рис 3.13 Графік лінійної залежності площі піка морфолінію тiazотату від концентрації (в нормалізованих координатах).

Результати вивчення лінійності методики наведено в таблиці 3.7. Як випливає із представлених даних, метрологічні характеристики лінійності відповідають вимогам прийнятності, рекомендованим ДФУ [90].

Таблиця 3.7

Метрологічні характеристики лінійності методики кількісного визначення морфолінію тіазотату методом високоефективної рідинної хроматографії

Величина	Критерії прийнятності	Отримане значення
		Морфолінію тіазотат
b	-	0,9907
s_b	-	0,0074
$ a $	$\leq 2,6$	0,0316
s_a	-	0,6870
s_0	$\leq 3,38$	0,9669
s_b/b	-	0,9756
$ r $	0,9981	0,9998

Прецизійність вивчена на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності. Для оцінювання збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей морфолінію тіазотату в концентрації 0,06 % щодо концентрації морфолінію тіазотату у випробовуваному розчині. Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували в порівнянні результатів різних аналітиків, аналізуючи 6 додаткових модельних сумішей наступного дня (табл. 3.8).

Як видно з таблиці 3.8, відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 5,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Таблиця 3.8

Результати вивчення прецизійності методики визначення морфолінію тіазотату методом високоефективної рідинної хроматографії

Розчин	Знайдено морфолінію тіазотату від введеного, %	
	1 аналітик	2 аналітик
1	100,3	101,3
2	101,3	100,5
3	100,3	100,7
4	100,2	99,6
5	99,8	100,7
6	100,8	101
Середнє Z%	100,5	100,6
Відносне стандартне відхилення, Sz%	0,52	0,58
Відносне стандартне відхилення внутрішньо-лабораторної прецизійності, %	0,55	
Відносна різниця середніх значень	0,18	

Результати перевірки точності аналітичної методики наведені в таблиці 3.9.

Для оцінювання правильності готували 9 модельних розчинів зі змінною концентрацією морфолінію тіазотату щодо концентрації морфолінію тіазотату у випробовуваному розчині в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня. Результати наведені в таблиці 3.10. Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня

для всіх домішок, які визначали, становить не більше ніж 5 %. Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 95,0-105,0 %.

Таблиця 3.9

Результати перевірки точності аналітичної методики визначення морфолінію тіазотату

Метод	Калібрувальна крива	Коефіцієнт кореляції r^2 (n = 3)	Лінійність ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
ВЕРХ	$y = 0.9987x + 3.428$	0.9998	10-150	1.57	2.74	7.5

Таблиця 3.10

Результати вивчення правильності методики визначення морфолінію тіазотату методом високоефективної рідинної хроматографії

№ дослідю	Морфолінію тіазотат		
	Сі, % X задано	Сі знайдено	Z--Y/X*100%
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	10,00	10,05	100,11
2	30,00	29,96	100,20
3	50,00	50,85	105,26
4	70,00	70,75	103,87
5	90,00	91,20	98,77
6	100,00	100,08	100,63
7	110,00	112,05	105,15
8	130,00	131,24	100,62
9	150,00	159,38	99,92
Середнє Z%	101,19		
Відносне стандартне відхилення, Sz%	2,55		

Продовж. табл. 3.10

RSD	2,52
$\Delta_{As} \%$	1,8595
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z \% = t(95\%, 8) * S_z$	4,07
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As} \%$	$\Delta_{As} < 5\%$
Систематична погрішність $\delta \%$	1,43
Критерій статистичної невизначеності систематичної погрішності $\delta \%$	1,58
Критерій практичної невизначеності систематичної погрішності $\delta \%$	4,27

У таблиці 3.11 наведено дані щодо робасності аналітичної методики. Надійність хроматографічної процедури перевіряли за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази. Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння, модельної суміші, що містила по 0,06 % кожної субстанції.

Варіабельність результатів кількісного вмісту морфолінію тіазотату для кожної із умов відповідно до початкових умов становить не більше 1,0 %. Варіабельність площ піків аналітів для кожної з умов порівняно з початковими умовами становить не більше ніж 5 %. Отже, аналітичну методику можна вважати робасною.

Стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння вивчали за зміною площ піків під час зберігання розчинів при температурі 25 °С. Було

встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Таблиця 3.11

Результати вивчення робастності методики визначення морфолінію тіазотату методом вискоєфективної рідинної хроматографії

Досліджуваний ЛЗ	Умови, що змінювались		Результати вмісту, %
Морфолінію тіазотату	Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,6	101,06
		0,8	101,15
		1,0	101,08
		RSD,%	0,05
	Температура термостату колонки, в °С	20°С	100,90
		25°С	101,15
		30°С	101,08
		RSD,%	0,13
	Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2.5 : ацетонітрил (об/об)	20%	100,90
		25%	101,15
		30%	101,08
		RSD,%	0,13

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки виконали, виходячи з даних, що наведені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12

Розрахунок невизначеності пробопідготовки

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність,%
Розчин порівняння		
Зважування стандартного зразка	з точністю до $\pm 0,0002$ г	0,2
Доведення до об'єму 100,0 мл	100 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12

Продовж. табл. 3.12

Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,0 мл	0,98, 0,98
Випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0002$ г	0,2
Доведення до об'єму 100,0 мл	100 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,0 мл	0,98, 0,98

Розрахунок сумарної невизначеності Δ_{Sp} для розчину порівняння:

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{0,2^2 * 0,16^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,10^2 * 0,10^2} = 0,36\%$$

Розрахунок сумарної невизначеності Δ_{Sp} для випробовуваного розчину:

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{0,2^2 * 0,16^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,12^2 * 0,10^2 * 0,10^2} = 0,36\%$$

Розрахунок невизначеності зважування

$$m_H^2 = \frac{0,1}{m_H} * 100\%$$

$$m_H^2 = \frac{0,1}{60,1} * 100\% = 0,16$$

$$m_H^2 = \frac{0,1}{60} * 100\% = 0,16$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\sqrt{0,36^2 + 0,36^2} = 0,51\%$$

Невизначеність пробопідготовки не перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 5 = 1,6\%$ ($0,51 < 1,6$) [7].

Прогноз загальної невизначеності аналізу Δ_{As} зробили за співвідношенням:

$$\Delta_{As} = \Delta_{Sp}^2 + \Delta_{FAO}^2$$

Δ_{Sp} : невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} : невизначеність кінцевої аналітичної операції (у цьому випадку – ВЕРХ).

Δ_{FAO} розраховується зі співвідношення:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} * \frac{RSD_{max} * t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}}$$

$\sqrt{2}$: враховує наявність розчину порівняння та випробовуваного розчину;

RSD_{max} : відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи; $t(95\%, n-1)$: однобічний коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %; n : число паралельних хроматограм.

Виходячи із даних RSD, Δ_{FAO} становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} * \frac{2 * 1,8595}{\sqrt{9}} = 3,03\%$$

Тоді Δ_{As} дорівнює $\sqrt{0,51^2 + 3,03^2} = 3,03\% < 5\%$

Отже, методика коректна та може бути відтворена в інших лабораторіях із необхідною точністю.

Висновки до розділу III

1. Розроблено та проведено валідацію методики кількісного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид із застосуванням методу ВЕРХ з УФ-детектуванням при наявності антибіотиків. Для досягнення найкращих хроматографічних характеристик запропоновано використовувати колонку SunFire C18 (Waters, США).
2. Підтверджено специфічність аналітичної методики. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значенням для енісаміуму йодиду становить 0,9992, для тілорону дигідрохлориду – 0,9998. Підтверджено правильність, прецизійність та робасність аналітичної методики. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння при їх зберіганні при кімнатній температурі щонайменше протягом 24 год.

3. Методика ВЕРХ кількісного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду є придатною для контролю якості енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду за показником «Кількісне визначення». Можливість застосування розробленої методики для здійснення одночасного визначення препаратів встановлена за підсумками проведення валідації.
4. Розроблена методика виявилася придатною для кількісного визначення морфолінію тіазотату із застосуванням методу ВЕРХ з УФ-детектуванням. Для досягнення найкращих хроматографічних характеристик запропоновано використовувати колонку SunFire C18 (Waters, США). Підтверджено специфічність аналітичної методики. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значенням для морфолінію тіазотату становить 0,9998. Підтверджено правильність, прецизійність аналітичної методики. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння при їх зберіганні при кімнатній температурі щонайменше протягом 24 год.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

- 1) Development of method for detection of amixin and amizon by HPLC on SunFire C18 column / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, O. Chorna, D. Burdulis, V. Georgiyants. *Chemija*. 2022. Vol. 33, № 3. P. 79–86. (*Scopus, Q 4*) <https://doi.org/10.6001/chemija.v33i3.4750> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
- 2) Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, V. Chorny, Iu. Korzh, L. Kucherenko, A. Kotvitska, D. Burdulis, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 37, № 3. P. 4-11. (*Scopus, Q 3*)

<https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.259879> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

- 3) Беликова А. Г., Сидоренко Л. В., Материенко А. С. Выбор методики определения амизона и амиксина в объектах окружающей среды. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : сборник материалов IX Международной науч.-практ. конф. посвящ. памяти проф. Кияшева Д.К., в рамках «90-летия Казахского национ. мед. ун-та им. С. Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы, 27 ноября 2020 р. Алматы, 2020. С. 134.
- 4) Розробка методики одночасного визначення енісаміуму йодиду та тілорону методом ВЕРХ / А. Г. Белікова, А. С. Матерієнко, В. А. Георгіянц, Л. В. Сидоренко. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної наук.-практ. конф. молодих учених та студентів присв. 150-річчю з дня народж. М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 118-119.

РОЗДІЛ IV

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ГХ-ПІД МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ

4.1 Розробка ГХ-ПІД методики визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду

Розробку методики розпочинали так само як і у випадку з методикою ВЕРХ, спочатку розробили метод для визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом ГХ-МС (рис. 4.1 і 4.2) і ГХ-ПІД, а потім підтвердили придатність методики для морфолінію тіазотату.

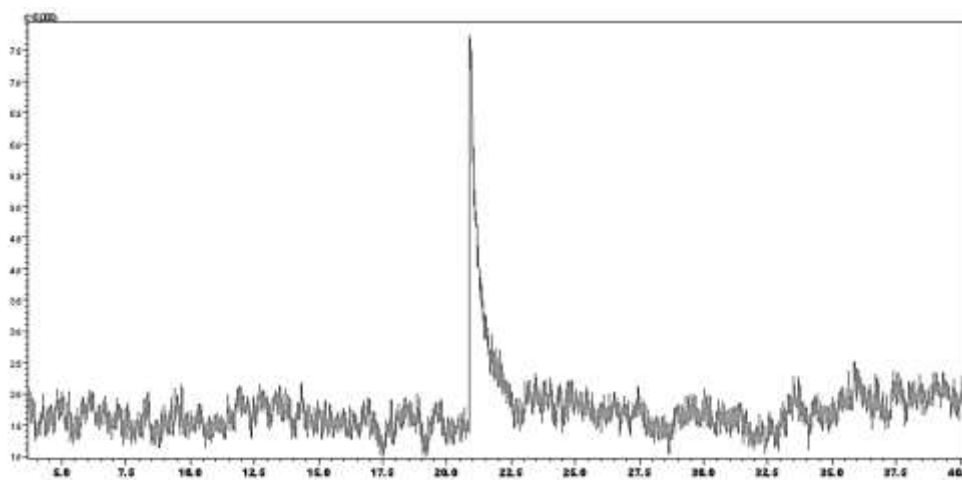


Рис 4.1 Хроматограма ГХ-МС визначення енісаміуму йодиду, де концентрація енісаміуму йодиду становила 0,3 мг/мл.

Склад рухомої фази ГХ-МС був оптимізований шляхом тестування різних агентів для дериватизації. Таким чином, час утримування основних речовин енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становив відповідно 21.25 хв та 31.5 хв. Серед різних комбінацій дериватизуючих агентів найкращим виявився *N*-трет-бутилдиметилсіліл-*N*-метилтрифторацетамід

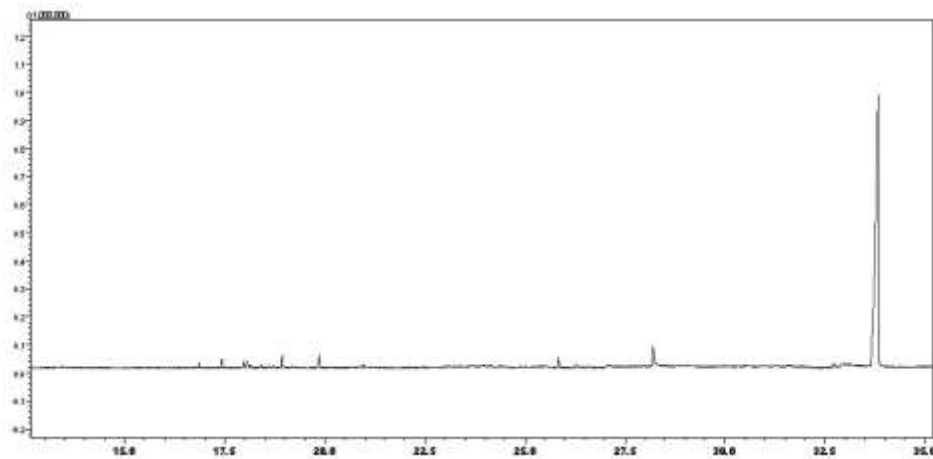


Рис. 4.2 Хроматограма ГХ-МС визначення тілорону дигідрохлориду, де концентрація тілорону дигідрохлориду становила 0,3 мг/мл.

(MTBSTFA) з ацетонітрилом (ACN). У раніше розробленій методиці ВЕРХ спостерігається нижча селективність, чутливість та використання не екологічних розчинників.

У ГХ-МС аналізі основою для вимірювання служить іонізація компонентів, що дозволяє фізично розрізняти компоненти завдяки тому, що характеризує їх відношення маси до заряду i , вимірюючи інтенсивність іонного струму, робити окремий підрахунок частки кожного з компонентів (отримувати мас-спектр речовини).

Оскільки маса будь-якої молекули складається з мас її атомів, мас-спектр завжди дискретний, хоча при низькій роздільній здатності мас-спектрометра піки різних компонентів можуть перекриватися або навіть зливатися. Тому нами були удосконалені умови методу ГХ-МС та адаптовані для ГХ-МС з ПІД детектором, оскільки метод ГХ-ПІД має надзвичайно високий лінійний динамічний діапазон (до 10^7), що дає йому ряд переваг при проведенні кількісного аналізу. Полум'яно-іонізаційний детектор чутливий до більшості органічних сполук і практично не чутливий до води в газі-носії та пробі, у зв'язку з чим його досить широко використовують при аналізі проб, що містять воду, у тому числі проб навколишнього середовища.

Нами було проведено дослідження знаходження різних концентрацій досліджуваних речовин і побудовано калібровочний графік. При спробі провести диференціацію концентрацій на ГХ-МС ми отримали незадовільний результат так, як без ПІД детектору ми втрачаємо необхідну чутливість аналізу і з 8 можливих точок ми отримали лише 3, що свідчить про кращу чутливість та відклик аналізу на ГХ-ПІД (рис. 4.3). Підібрані умови для ГХ-ПІД аналізу забезпечують гарне розділення речовин, час утримування енісаміуму йодиду склав 21 хвилину та тілорону дигідрохлориду 14 хвилин.

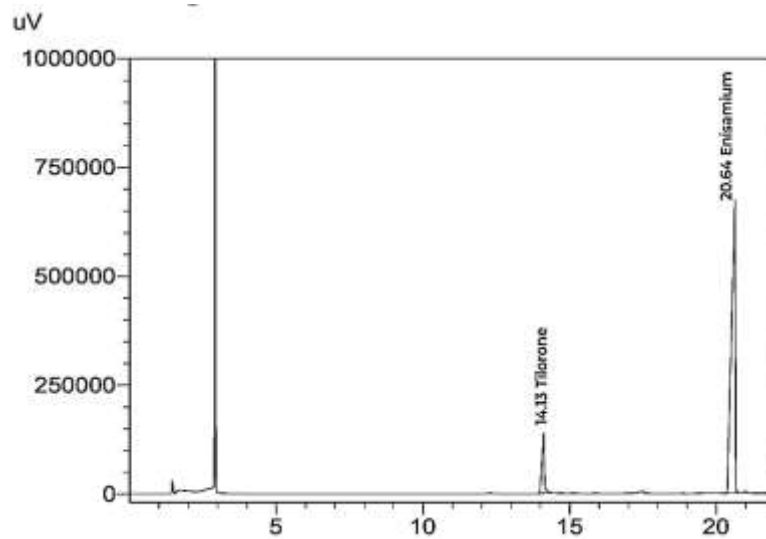


Рис. 4.3 Хроматограма визначення енісаміуму йодиду і тілорону дигідрохлориду методом ГХ-ПІД, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,016 мг/мл.

4.1.1 Валідація

Валідацію методу ГХ-ПІД проводили відповідно до міжнародних настанов з аналітичних методів контролю якості лікарських засобів (ICH guidelines) [95-96].

Перевірка методу була проведена для оцінки лінійності та калібрувальних кривих діапазонів. Що стосується лінійності, суміш стандартного розчину готували наступним чином: точний об'єм стандартного розчину (розділ 2.3.2) поміщали в мірну колбу (200 μ L) і готували шість окремих модельних розчинів з концентрацією тілорону дигідрохлориду та

енісаміуму йодиду від 0,005 мг/мл до 0,016 мг/мл відносно номінальної концентрації тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду. Кожен розчин вводили тричі.

Точність методу оцінювали шляхом розрахунку повторюваності (r). Точність методики перевіряли повторенням процедури зі стандартними розчинами суміші шість разів. Провели визначення верхніх та нижніх меж. Аліквоту кожного зразка потім вводили та кількісно визначали. Точність хроматографічної системи перевіряли шляхом перевірки %RSD часу утримування та площ піків. Щодня робили шість ін'єкцій протягом трьох днів поспіль.

Статистична обробка результатів. Результати були проаналізовані за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), за яким слідував багатократний порівняльний тест Тьюкі з використанням програмного забезпечення Prism v. 5.04 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Ми оцінили середнє значення вимірювання (AVG), вибіркоче стандартне відхилення (S_x), стандартне відхилення середнього (SD), коефіцієнт варіації (CV), та статистичну значущість результатів (p). Значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим.

LOD та LOQ визначалися на основі стандартного відхилення (SD) зсуву початку регресії (s) та нахилу калібрувальної кривої (S) за формулою:

$$\text{LOD} = 3,3 \times (s/S) \text{ та } \text{LOQ} = 10 \times (s/S) \quad (4.1)$$

Вивчення лінійності проводилося шляхом аналізу серії розчинників з різними концентраціями тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду. Результати вивчення лінійності разом з обчисленими значеннями LOD та LOQ показані в таблиці 4.1.

Прецизійність досліджували впродовж двох днів різними аналітиками. Аналізували тестовий розчин з концентрацією 100%. Результати відхилень RSD визначення вмісту, а також похибок методу, показані в таблиці 4.2.

Таблиця 4.1

Результати вивчення лінійності, LOD та LOQ.

Досліджуваний ЛЗ	Калібрувальна крива	Коефіцієнт кореляції r^2 (n = 3)	Лінійний діапазон (мг/мл)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Енісаміуму йодид	$y = -24968.5075 + 5185810.9453x$	0.9987	0.05–0.016	1.29	0.047	0.110
Тілорону дигідрохлорид	$y = -35058.9008 + 381686954.4267x$	0,9999	0.05–0.016	2.65	0.035	0.095

Таблиця 4.2

Результати вивчення прецизійності ГХ-ПД

Досліджуваний ЛЗ	Концентрація ($\mu\text{g/mL}$)	За день (n = 6)			За день (n = 12)		
		Знайдено \pm S.D., %	RSD, %	Похибка, %	Знайдено \pm S.D., %	RSD, %	Похибка, %
Тілорону дигідрохлорид	16	100.12 \pm 0.24	0.52	0.45	100.25 \pm 0.34	0.63	0.63
Енісаміуму йодид	16	100.1 \pm 0.20	0.55	0.48	100.5 \pm 0.18	0.50	0.46

Дослідження точності проводили методом добавок, під час яких відомі кількості еталонної сполуки додавали до зразків. Кількості аналітів, які були додані, відповідали 50%, 100% та 200% тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду у зразках. Розраховані дані наведено в таблиці 4.3.

Стабільність тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду вивчалася протягом 24 годин для стандартного розчину. Було встановлено, що збережені розчини залишалися стабільними протягом до 24 годин у випадку методу ГХ-ПД, а відхилення піків речовин складали 0,395% та 0,387%, відповідно. Розраховані дані наведено в таблицях 4.4 та 4.5.

Таблиця 4.3

Вивчення точності тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду

Довідкове значення (%)	Виміряна сума (%)		Відносне стандартне відхилення (%)		Відновлення (%)	
	Тілорону дигідрохлорид	Енісаміуму йодид	Тілорону дигідрохлорид	Енісаміуму йодид	Тілорону дигідрохлорид	Енісаміуму йодид
50%	50.08	49.91	0.13	0.06	100.16	99.82
100%	100.21	99.80	0.07	0.11	100.21	99.80
200%	196.70	199.83	0.21	0.15	98.35	99.92

Таблиця 4.4

Результати вивчення стабільності розчину енісаміуму йодиду

Термін зберігання	Отримане відхилення	Критерій прийнятності
Контрольний розчин	-	-
24 годин	0.395%	≤5%

Таблиця 4.5

Результати вивчення стабільності розчину тілорону дигідрохлориду

Термін зберігання	Отримане відхилення	Критерій прийнятності
Контрольний розчин	-	-
24 годин	0.387%	≤5%

4.1.2 Розрахунки еко-шкали

Усі розроблені хроматографічні методи для аналізу тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду були оцінені за ступенем екологічності за допомогою аналітичної екологічної шкали для вибору методу з найменшим

впливом на навколишнє середовище. Крім того, враховувалися різні умови пробопідготовки для кожного зразка. Результати методу ВЕРХ були взяті з раніше розробленої методики для визначення тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду [81].

Хроматографічний аналіз передбачає використання різноманітних технік, а також попередню обробку зразків. Крім того, зазвичай при оцінці зразка прийнято використовувати кілька методів визначення. Вибір аналітичних методів зазвичай базується на таких факторах, як точність, відтворюваність, вартість і потенційні впливи на навколишнє середовище та здоров'я. Ми розробили методику ГХ-ПД так як вважали її більш екологічною у порівнянні з розробленою раніше ВЕРХ та більш точною у порівнянні з ГХ-МС.

Ми передбачали, що можливо прийдеться використовувати дериватизацію, тоді як раніше у випадку з морфолінію тіазотатом [66] нам вдалось уникнути дериватизації. Рішенням було спробувати розробити методику ГХ-ПД без дериватизації і таким чином збільшити її екологічність. Експериментально було встановлено, що суміш досліджуваних речовин найкраще розчиняється в хлороформі та ацетонітрилі. З точки зору «зеленої хімії» був обраний як розчинник для пробопідготовки ацетонітрил. Для проведення аналізу нами були використані умови хроматографування апробовані раніше [82], що дали гарний результат розділення і симетрії піків тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду.

При проведенні валідаційних досліджень встановлено коректність методики для поставлених задач. У всіх досліджуваних речовин коефіцієнти лінійної регресії (R^2) були вищими за 0,9981, що свідчить про гарну лінійність калібрувальних кривих. Метод може бути застосовано для контролю якості та виявлення відходів за межею визначення. Це узгоджується з рекомендаціями Європейської агенції з хімічних речовин (ЕСНА) [95] (припустимий вміст речовин в межах 0,1-0,5 мг/л). Таким чином, отримані результати попередньо свідчать про те, що дану методику можна використовувати для визначення тілорону дигідрохлориду і енісаміуму йодиду в навколишньому середовищі.

Результати демонструють хорошу точність методу, при цьому відносні стандартні відхилення (RSD) для повторності та проміжної точності становлять менше 6,4% для визначення більшості речовин (див. табл. 4.2). Розроблений метод є коректним, оскільки вимоги до критерію похибки становлять $\leq 5,0\%$. Відновлення були отримані в діапазоні 98,13–100,12%, що свідчить про те, що запропоновані методи є точними для визначення тілорону дигідрохлориду та енасаміуму йодиду. Всі процедури показали задовільні результати в даних і можуть бути рекомендовані для аналізу тілорону дигідрохлориду та енасаміуму йодиду в суміші і можливі для аналізу відходів.

За отриманими результатами за методами ВЕРХ і ГХ-ПД (таблиця 4.6), спостерігаються значні відмінності в балах еко-шкали. Зокрема, ВЕРХ для тілорону дигідрохлориду та енасаміуму йодиду має відповідно 16 штрафних балів, тоді як метод ГХ-ПД – 9 балів. Перерахунок в еко-бали дає 78 балів для ВЕРХ і 35 балів для ГХ.

Таблиця 4.6

**Розрахунок штрафних балів для аналізу
методом ВЕРХ та ГХ-ПД під час аналізу одного зразка
тілорону дигідрохлориду та енасаміуму йодиду [65]**

Реагент/Прилад	Штрафні бали (ВЕРХ)	Штрафні бали (ГХ-ПД)
Реактиви		
Ацетонітрил 2,9 (мл)	4	0
Вода (мл)	-	-
Обладнання		
ВЕРХ/ ГХ-МС	1	3
Відходи	8	4
Виробнича небезпека	3	0
Зразок	-	1

Продовж. табл. 4.6

Транспорт	-	1
Досліджуваний розчин		
Вода 50 мл	0	-
Ацетонітрил (мл)	-	-
<i>Загальна кількість штрафних балів:</i>	16	9
<i>Загальний бал за аналітичною еко-шкалою:</i>	78	35

Обидва методи забезпечують чудовий аналіз з точки зору екологічності, але різниця є суттєвою. Тому детектор ГХ-ПДД матиме переваги з огляду на принципи «зеленої хімії». Отже, метод ГХ-ПДД визнано більш екологічним порівняно з ВЕРХ.

4.1.3 Оцінка «зеленості»

Екологічна безпечність розробленого ГХ-ПДД була оцінена за допомогою калькулятора AGREE [94].

Ми використали “AGREE methodology” [97-98] так як лише вона використовує всі 12 принципів GAC («зелена аналітична хімія»). Розрахунки було проведено за допомогою “AGREE Calculator”.

На рисунку 4.4 показано результати AGREE та оцінку для кожного окремого принципу GAC. Загальна шкала AGREE для розробленого аналітичного підходу (рис. 4.4 б) для ГХ-ПДД склала 0,73, що у порівнянні з ВЕРХ 0,62 (рис. 4.4 а) є більш зеленим, звідки ми робимо висновки що запропонований аналітичний підхід для аналізу тілорону дигідрохлориду і енісаміуму йодиду є більш зеленим і відповідає принципам GAC.

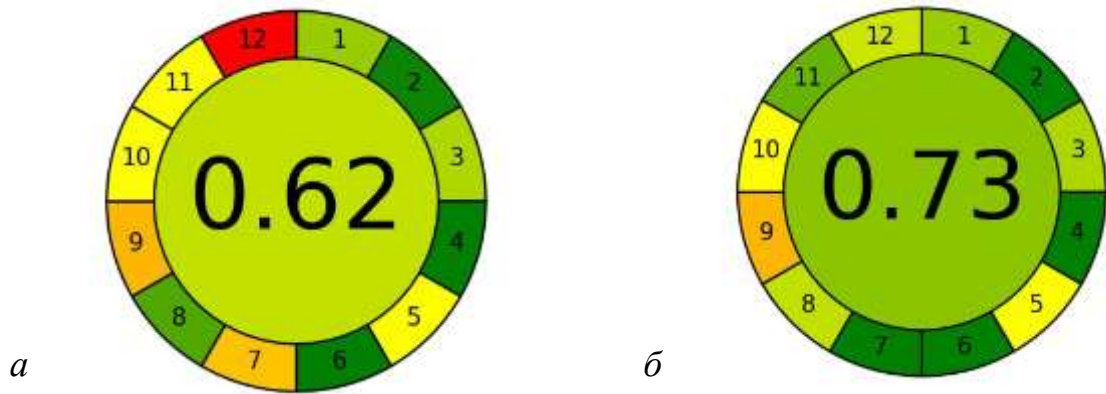


Рис. 4.4 Аналітична шкала GREENess (AGREE): *a* – ВЕРХ, *б* – ГХ-ПД

4.2 Розробка ГХ-ПД методики визначення морфолінію тіазотату

Після розробки методу є логічним провести порівняльний та економічний аналіз розроблених методик для встановлення найбільш вигіднішої з існуючих методик ВЕРХ та ГХ-ПД. Розроблена методика має бути достатньо конкретною, щоб давати точні результати та забезпечувати хороший поділ піків, мінімізувати витрати на розчинники та час аналізу.

Розробку методики ми так само, як і у випадку з енісаміуму йодидом та тілорону дигідрохлоридом почали з ГХ-МС методу. Склад рухомої фази ГХ-МС був оптимізований шляхом тестування різних агентів для дериватизації. Тестуючи різні комбінації дериватизуючих агентів найкращим виявився *N*-трет-бутилдиметилсіліл-*N*-метилтрифторацетамід (MTBSTFA) з ацетонітрилом (ACN). При спробі визначення лінійності морфолінію тіазотату не спостерігалось розділення піків (рис. 4.5).

Було проведено підтвердження придатності розробленого методу ГХ-ПД для морфолінію тіазотату, який дозволяє скоротити час і вартість аналізу, а також одночасно забезпечити селективність, чутливість і точність для аналітів. ГХ-ПД метод аналізу з детектором ПД (рис. 4.6) має надзвичайно високий лінійний динамічний діапазон (до 10^7), що дає йому ряд переваг при проведенні кількісних аналізів. Час утримування морфолінію тіазотату склав 33 хвилини.

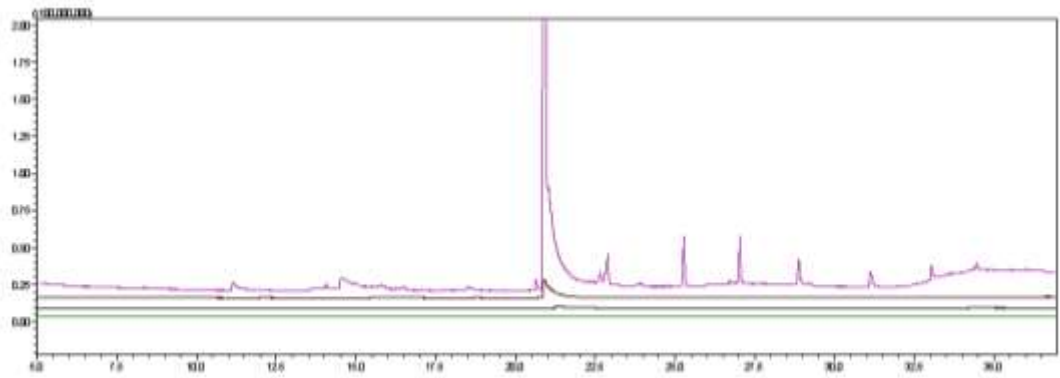


Рис. 4.5 Хроматограма ГХ-МС визначення лінійності морфолінію тіазотату (три різні концентрації).

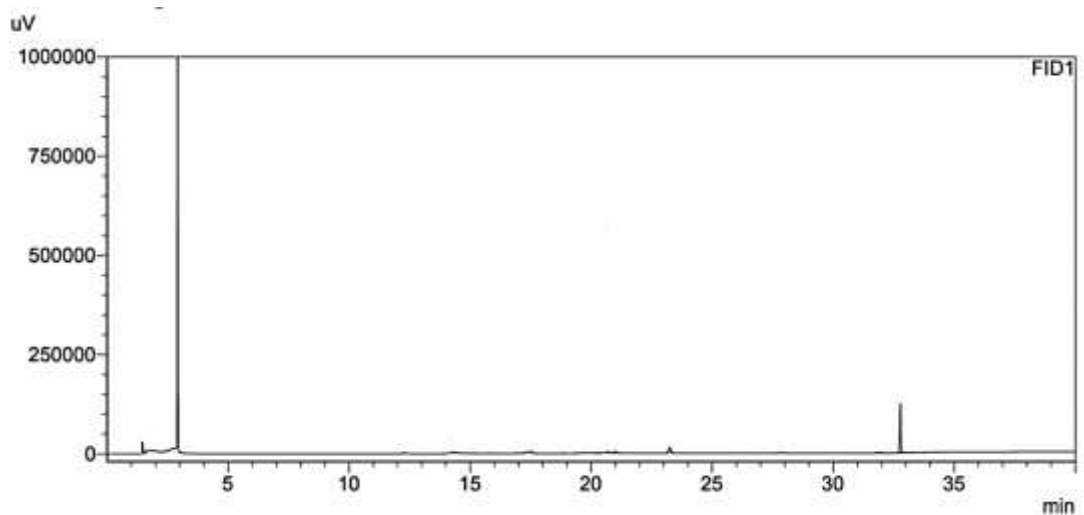


Рис 4.6 Хроматограма ГХ-ПД зразків морфолінію тіазотату, де концентрація становила 0,016 мг/мл.

Дане дослідження демонструє, що метод ГХ-ПД для кількісного аналізу морфолінію тіазотату був розроблений і затверджений відповідно до Міжнародної конференції з гармонізації та Державної фармакопеї України [93].

4.2.1 Валідація

Розроблений метод був валідований по значенням специфічності, лінійності, прецизійності, стабільності та точності, крім того, для методу були розраховані межа виявлення (LOD) і межа кількісного визначення (LOQ).

Дослідження лінійності проводилося в результаті аналізу серії розчинників з різними концентраціями морфолінію тіазотату. Результати дослідження лінійності разом з розрахованими значеннями LOD і LOQ представлені в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Дослідження лінійності морфолінію тіазотату

Досліджуваний ЛЗ	Калібрувальна крива	Коефіцієнт кореляції r^2 (n = 3)	Лінійний діапазон ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Морфолінію тіазотат	$y=(5.51858e+007)x-24968.4$	0.9987	0.12-16	2.2	0.046	0.115

Прецизійність. Дослідження проводилося протягом двох днів різними аналітиками. Було проаналізовано тестовий розчин з концентрацією 100%. Результати відхилення RSD визначення вмісту, а також помилки методу, показані в таблиці 4.8. Розроблений метод є правильним, оскільки вимоги до критерію помилок становлять $\leq 6,4\%$.

Таблиця 4.8

Дослідження прецизійності морфолінію тіазотату

Досліджуваний ЛЗ	Концентрація ($\mu\text{g/mL}$)	За день (n = 6)			За день (n = 12)		
		Знайдено \pm S.D., %	RSD, %	Похибка, %	Знайдено \pm S.D., %	RSD, %	Похибка, %
Морфолінію тіазотат	16	100.12 \pm 0.24	0.52	0.45	100.25 \pm 0.34	0.63	0.63

Дослідження точності було оцінено за допомогою методу добавок, які проводилися шляхом додавання відомих кількостей еталонної сполуки до розчинів зразків. Кількості доданих аналітів відповідали 50%, 100% і 200% морфолінію тіазотату у зразках. Розраховані дані показані в таблиці 4.9.

Відновлення було отримано в діапазоні від 98,13% до 100,12%, що свідчить про те, що запропоновані методи є точними для визначення морфолінію тіазотату.

Таблиця. 4.9

Розрахунки точності морфолінію тіазотату

Довідкове значення (%)	Виміряна сума (%)	Відносне стандартне відхилення (%)	Відновлення (%)
50%	49.91	0.06	99.82
100%	99.80	0.07	99.80
200%	199.83	0.21	99.92

Стабільність розчинів морфолінію тіазотату досліджували шляхом введення одних і тих же розчинів протягом 24 годин. Результати дослідження стабільності розчину наведені в таблиці 4.10. Встановлено, що розчини стабільні протягом до 24 годин, тому відхилення піків речовини складало 0,387%.

Таблиця 4.10

Результати вивчення стабільності розчину морфолінію тіазотату

Термін зберігання	Отримане відхилення	Критерій прийнятності
Контрольний рзчин	-	-
24 годин	0.387%	≤5%

Всі процедури показали задовільні результати і можуть бути рекомендовані для аналізу морфолінію тіазотату у різних лікарських формах як точні та відтворювані методи контролю якості.

4.2.2 Розрахунки еко-шкали

Хроматографічний аналіз передбачає використання різних процедур та попередню обробку аналізованих зразків. Крім того, для аналізу зразка, як правило, прийнято декілька методів визначення. Вибір аналітичних методів зазвичай базується на їх точності, відтворюваності, вартості, а також на впливі на навколишнє середовище та здоров'я [98].

Усі розроблені хроматографічні методи для аналізу морфолінію тіазотату були оцінені на їх "зеленість" за допомогою аналітичної еко-шкали, щоб вибрати метод з найменшим впливом на навколишнє середовище. Крім того, враховувалися різні умови попередньої обробки для кожного зразка. Виявлено, що ВЕРХ (табл. 4.11) і ГХ-ПД (табл. 4.12) мають різні значення еко-шкали.

Таблиця 4.11

Розрахунок штрафних балів для аналізу методом ВЕРХ під час аналізу одного зразка морфолінію тіазотату

Показник	Штрафні бали
Реагент	
Ацетонітрил 2.0 мл	
Вода 8 мл	
Інструмент	
ВЕРХ	
Відходи	
Професійний ризик	
Приготування зразка	
Вода 50 мл	
<i>Загальна кількість штрафних балів:</i>	
<i>Загальний бал аналітичної екологічної шкали:</i>	

Таблиця 4.12

**Розрахунок штрафних балів для аналізу методом ГХ-ПД під час
аналізу одного зразка морфолінію тіазотату**

Показник	Штрафні бали
Реагент	
Вода 8 мл	
Інструмент	
ГХ-ПД	
Відходи	
Професійний ризик	
Зразок	
Транспортування	
Приготування зразка	
Вода 50 мл	
<i>Загальна кількість штрафних балів:</i>	
<i>Загальний бал аналітичної екологічної шкали:</i>	

Таким чином, для морфолінію тіазотату при визначенні методом ВЕРХ має 16 балів, відповідно, порівняно з ГХ-ПД, який має 9 балів, відповідно. Обидва методи забезпечують відмінний «зелений аналіз», але різниця значна, тому детектор ГХ-ПД матиме переваги з точки зору «зеленої хімії». Таким чином, метод ГХ-ПД визнано більш «зеленим» способом порівняно з ВЕРХ.

4.2.3 «Оцінка зеленості»

Незважаючи на багату кількість підходів для визначення екологічної природи аналітичних процедур [74], лише методологія "AGREE" [94] використовує всі 12 принципів GAC. Відповідно, екологічна природа поточного підходу була оцінена за допомогою "AGREE Calculator". На рисунку 4.8 а, б наведено звіт AGREE та оцінку AGREE для кожного окремого

принципу GAC. Загальна шкала AGREE для запропонованих аналітичних методів ВЕРХ, ГХ-ПІД була розрахована як 0,62 та 0,73 відповідно, що свідчить про те, що запропоновані аналітичні методи для аналізу морфолінію тіазотату є екологічними, але метод ГХ-ПІД ще є більш екологічно чистим.

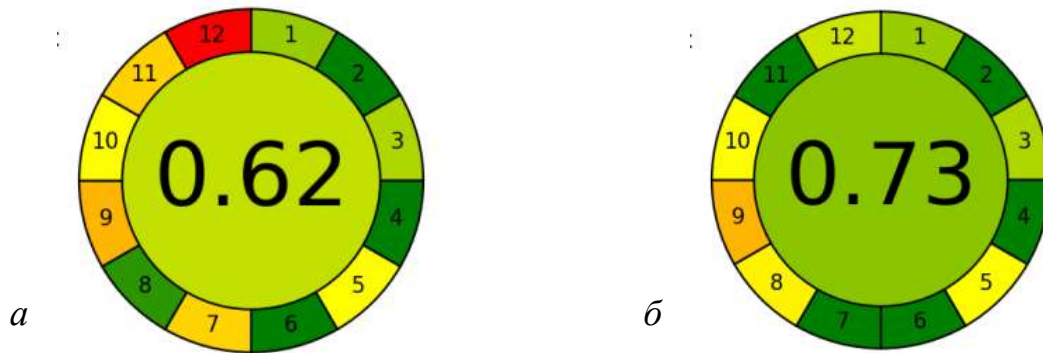


Рис. 4.7 Аналітична шкала GREENess (AGREE): *а* – ВЕРХ, *б* – ГХ-ПІД

4.3 Економічний аналіз аналітичних методик

Вартість необхідних реагентів для аналітичних досліджень проводилася на основі офіційної бази даних компанії Sigma-Aldrich [51]. Процедура розрахунку вартості представлена в таблиці 4.13.

Витрати на "електроенергію" – це витрати, які безпосередньо витрачаються в технологічному процесі під час виконання аналітичних досліджень. Витрати на електроенергію для технологічних цілей розраховуються згідно з фактичними витратами енергії на основі показань вимірювальних приладів. Тому вартість електроенергії була розрахована на основі технічних характеристик обладнання (споживання енергії на 1 кВт·год), періоду аналітичного дослідження та національного тарифу на електроенергію для домогосподарств та малих непромислових споживачів у розмірі 0,12 євро за кВт·год з ПДВ. Встановлено, що кількість витрат за статтею "електроенергія" під час проведення аналітичних досліджень методом ВЕРХ складає 0,05 євро, методом ГХ-ПІД — 0,21 євро.

Таблиця 4.13

Витрати підприємства на "основні сировину та матеріали" та "вторинні матеріали". Одиниця розрахунку — аналіз 1 зразка

Сировина і матеріал	Ціна,	Кількість для аналізу 1 тестового зразка	Вартість, євро
ВЕРХ метод			
Основна сировина і матеріали			
Ацетонітрил 2.5 L	€332.00		
К о	€610.00		
Вода для хроматографії 1 літр	€31.90	8 мл	
Мембранний фільтр 0,45 мкм № 100	€250.00		
Натрію перхлорат моногідрат 250 гр	€63.90	2 гр	
Віали об'ємом 2 мл, № 100	€23.50		
Разом			
Допоміжні матеріали			
Рукавички латексні з пудрою № 100	€12.56		
Одноразова неткана шапочка медична № 100	€2.50		
Бахіли медичні стерильні № 50	€3.5		
Разом			
ГХ-ПД метод			
Основна сировина і матеріали			
Мембранні фільтри 0,45 мікрон № 100	€223.00		
Гелій, 9100 L	€480.00	0.615 л	
Віали об'ємом 2 мл, № 100	€23.50		
Разом			

Допоміжні матеріали			
Рукавички латексні з пудрою № 100	€12.56		
Одноразова неткана шапочка медична № 100	€2.50		
Бахіли медичні стерильні № 50	€3.5		
Разом			

Транспортні та закупівельні витрати за різними даними можуть становити від 1% до 15% від загальної вартості сировини, основних і допоміжних матеріалів. Для розрахунку витрат на аналітичні дослідження для методів аналізу ВЕРХ, ГХ-ПІД ми взяли мінімальні значення транспортних та закупівельних витрат, а саме 1% [99].

Розрахунок витрат за статтею "заробітна плата" був здійснений на основі офіційних даних Державної служби статистики станом на 01.12.2021 року щодо середньої заробітної плати на місяць Старшого Наукового Співробітника, яка становила 281 євро. На місяць роботи Старший Науковий Співробітник працює 176 годин. Доплати за соціальні заходи становлять 38,5% від заробітної плати основних працівників.

Для розрахунку "Амортизація основних засобів" ми використовували прямолінійний метод розрахунку амортизації. Згідно з цим методом, щорічна сума амортизації (СА) визначається шляхом ділення амортизованої вартості (АВ) на корисний термін (КТ). Згідно зі стандартами бухгалтерського обліку, амортизована вартість предмета обладнання – це початкова або переоцінена вартість (ПВ) активів, за вирахуванням ліквідаційної вартості (ЛВ) за наступною формулою розрахунку:

$$AB = PV - LB \quad (4.2)$$

Згідно з положенням пункту 138.3.3 Податкового кодексу України, мінімальні допустимі строки амортизації для основних засобів для обладнання становлять п'ять років. Тому, враховуючи дані початкової та ліквідаційної

вартості обладнання, яке необхідно для аналітичного дослідження, та мінімальний корисний термін, ми розрахували амортизацію основних засобів. Встановлено, що сума витрат за статтею "амортизація основних засобів" під час проведення аналітичних досліджень методом ВЕРХ становить 1,05 євро, методом ГХ-ПД – 0,17 євро.

Вплив хімічних реагентів на навколишнє середовище є серйозною проблемою як у глобальному масштабі, так і у фармацевтичній галузі світового рівня. Захист довкілля від негативних впливів лікарських засобів потребує негайного вирішення. Лабораторія укладає договір з організацією, яка має ліцензію на утилізацію відходів реагентів. Відповідно до комерційних пропозицій ТОВ «Харків-Еко», вартість послуг з утилізації відходів органічних розчинників становить 0,55 євро за 1 л. Встановлено, що витрати на утилізацію при дослідженні методом ВЕРХ складають 0,01 євро, а для методу ГХ-ПД – 0,0003 євро.

Результати розрахунку статей витрат різними методами аналітичного дослідження наведені в таблиці 4.14.

Таблиця 4.14

**Результати розрахунку статей витрат різними методами
аналітичного дослідження**

Статті витрат	ВЕРХ (10 хв)		ГХ-ПД (41 хв)	
	Сума, євро	Питома вага, %	Сума, євро	Питома вага, %
Основна сировина і матеріали				
Допоміжні матеріали				
Електроенергія				
Транспортно-заготівельні витрати				

Продовж. табл. 4.14

Відрахування на соціальні заходи				
Заробітна плата				
Амортизація основних засобів				
Переробка хімічних відходів				
Повна собівартість				

"Основні сировинні матеріали" складають найбільшу частку у структурі загальних витрат. Так, для дослідження методом ВЕРХ їх специфічна вага становить 91,10%, а для ГХ-ПД – 57,70%. Треба зауважити, що стаття "амортизація основних засобів" є значним витратним пунктом у вартості аналітичних досліджень за різними методиками. Це може бути пояснено високою вартістю обладнання. Згідно з результатами, метод ГХ-ПД мав найнижчі витрати. Витрати на застосування методу ГХ-ПД були на 2,3 та 1,6 рази нижчі, відповідно, ніж для ВЕРХ.

4.4. Визначення екологічності методик ВЕРХ та ГХ-ПД за методом ComplexGAPI

Зростання забруднення довкілля лікарськими засобами є серйозною проблемою, що потребує ефективних методів контролю. Традиційні методи аналізу ЛЗ часто мають екологічні недоліки, такі як використання токсичних розчинників та утворення шкідливих відходів. Існує потреба в нових, екологічних методах аналізу ЛЗ, які б забезпечували високу точність та селективність [109].

ComplexGAPI – це новий метод оцінки аналітичних процедур, який розширює популярний індекс GAPI (Green Analytical Procedure Index) за рахунок додаткових параметрів, що враховують етапи, що передують аналітичній процедурі.

ComplexGAPI оцінює екологічність аналітичної процедури за 12 параметрами, 5 з яких стосуються етапів пробопідготовки, 3 – етапів аналізу, 2 – етапів поводження з відходами, та 2 – додаткових параметрів. Кожному параметру присвоюється бал, а загальний бал використовується для ранжування аналітичних процедур за їх екологічністю. ComplexGAPI також включає програмне забезпечення, яке полегшує розрахунок індексу та порівняння різних аналітичних процедур.

Переваги методу ComplexGAPI:

- дає більш комплексну оцінку екологічності аналітичних процедур, ніж традиційні методи.
- може допомогти хімікам-аналітикам вибрати більш екологічні методи аналізу ЛЗ.
- може стимулювати розробку нових, екологічних методів аналізу ЛЗ.

Ми порівняли розроблені нами методи ВЕРХ та ГХ-ПІД і прийшли до наступних висновків (рис. 4.8).

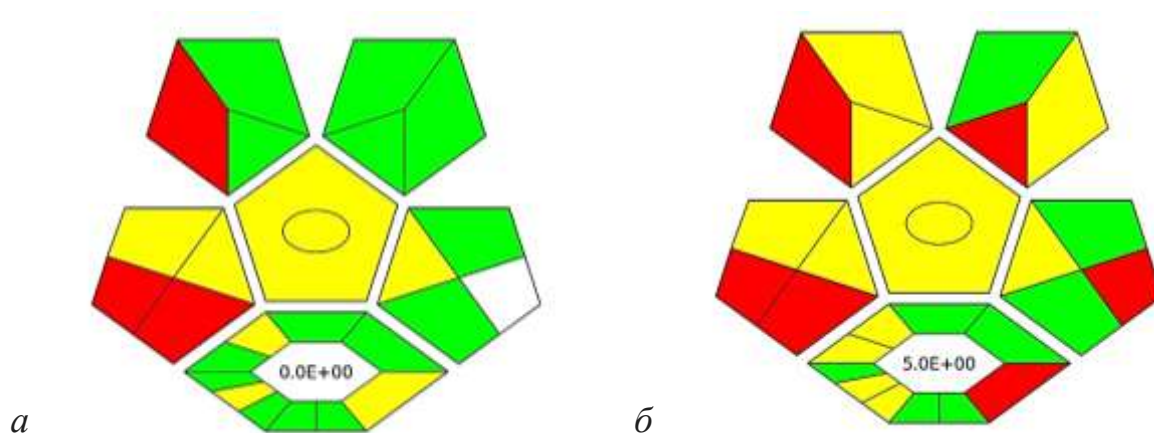


Рис. 4.8 ComplexGAPI для методик *a* – ВЕРХ, *б* – ГХ-ПІД

Для методу ВЕРХ перед аналізом проводилась пробопідготовка субстанцій із застосуванням розчинників, які є токсичними.

У другому методі ГХ-ПД як екстрагент застосовували ацетонітрил, фільтрували, жодних подальших дій не потрібно.

Оцінюючи результати оцінки вибраних процедур визначення субстанцій енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату, стає очевидним, чому метод ГХ-ПД має переваги для визначення субстанцій у навколишньому середовищі.

Метод ГХ-ПД вимагає невеликих кількостей реагентів для аналітичного поділу, внаслідок чого утворюється кілька мілілітрів відходів. Критичною точкою методу ВЕРХ є кількість відходів, що утворюються, які не переробляються. Метод ВЕРХ не підтримує «зелену економіку» і характеризується вищим Е-фактором.

ComplexGAPI має перевагу у порівнянні з методом AGREE, оскільки дозволяє не тільки оцінити аналітичну процедуру з точки зору її екологічності, але й тих процесів, які передують самій аналітичній процедурі. До піктограми GAPI було додано додаткове шестикутне поле, щоб відобразити зелений аспект наступних параметрів: вихід та умови, реагенти та розчинники, прилади та обробка, а також очищення.

Висновки до розділу IV

1. Розроблено та валідовано методику ГХ-ПД для одночасного визначення тілорону дигідрохлориду і енісаміуму йодиду, яка виключає стадію дериватизації та мінімізує час та використання розчинника у порівнянні з попередньо розробленою ВЕРХ-методикою.
2. Розроблено та валідовано методику ГХ-ПД для одночасного визначення морфолінію тіазотату, яка виключає стадію дериватизації та мінімізує час та використання розчинника у порівнянні з попередньо розробленою ВЕРХ-методикою.

3. Методики валідовано та визначено межі виявлення (LOD) і кількісного визначення (LOQ). За одержаними результатами розроблена методика ГХ-ПІД може служити для визначення тілорону дигідрохлориду та енісаміуму йодиду, морфолінію тіазотату в різних зразках навколишнього середовища.
4. У порівнянні з раніше розробленим методом ВЕРХ, метод ГХ-ПІД виявився більш екологічним, оскільки його оцінка за аналітичною шкалою GREENness (AGREE) склала 0,73 ($< 0,70$) більше, ніж у ВЕРХ 0,62, що демонструє хорошу екологічну природу запропонованого аналітичного підходу.
5. Відповідно до отриманих результатів метод ГХ-ПІД було визнано найбільш придатним для аналізу, оскільки він має менший вплив на навколишнє середовище, ніж метод ВЕРХ, потребує менших витрат на проведення аналізу, ніж ГХ-МС, і демонструє задовільну точність.
6. Провели порівняння методик ВЕРХ та ГХ-ПІД на екологічність за методом ComplexGAPI. Результати оцінки вибраних процедур визначення субстанцій енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату, що метод ГХ-ПІД має переваги для визначення субстанцій у навколишньому середовищі.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, V. Chorny, Iu. Korzh, L. Kucherenko, A. Kotvitska, D. Burdulis, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 37, № 3. P. 4-11. (Scopus, Q 3) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.259879> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

2. Greening of the method for simultaneous determining the enisamium iodide and tilorone dihydrochloride using GC-FID assay / A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, V. Chorny, A. Kononenko, A. Koval, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 46, № 6. P. 47–52. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.295120> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Belikova A., Sidorenko L. Determination of amizone and thiotriazoline by gas chromatography / mass Spectrometry. *100 years of success and quality: materials of the international scientific and practical symposium, dedicated to the 100th anniversary of pharmaceutical chemistry department of National University of Pharmacy*. Kharkiv, October, 18, 2021. Харків : НФаУ, 2021. P. 51.
4. Разработка методики ГХ-МС для определения амизона и тиотриазолина / А. Г. Беликова, А. С. Материенко, В. А. Георгиянц, Л. В. Сидоренко, Л. Иванаускас. Вестник ЮКМА. VIII международная научная конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации». Казахстан, г. Шимкент, 9-10 декабря 2021. 2021, №4(94), Т. 3. С. 8.
5. Белікова А. Г., Георгіянц В. А., Сидоренко Л. В. Порівняння аналітичних та економічних характеристик хроматографічних методик визначення амізону, аміксину та тіотриазоліну. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матер. II Міжнар. наук.-практ. дистанц. конф., м. Харків, 1 лютого 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 79.
6. Белікова А. Г., Сидоренко Л. В., Георгіянц В. А. Розробка методу визначення енісаміуму йодиду та Тілорону дигідрохлориду за допомогою ГХ/МС. *Modern chemistry of medicines* : матеріали Міжнародної Internet-конференції «Modern chemistry of medicines», м. Харків, 18 травня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 114.

РОЗДІЛ V

ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИКИ ГХ-ПІД ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ, ТІЛОРОНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ ТА МОРФОЛІНІЮ ТІАЗОТАТУ У ҐРУНТІ

В останнє десятиліття виникло серйозне занепокоєння з приводу появи РРСР у різних частинах екосистеми у кількостях здатних викликати несприятливі наслідки для довкілля.

Одним із найпоширеніших шляхів попадання у довкілля ЛЗ – це не правильна утилізація відходів. Коли ми викидаємо використані ліки, вони можуть потрапити в ґрунт або водойми. ЛЗ можуть завдавати шкоди довкіллю і здоров'ю людини: впливати на рослини, тварин і мікроорганізми, потрапляти в їжу і воду, що може призвести до отруєння людини [101].

У останні роки проведено ряд досліджень, присвячених накопиченню лікарських препаратів у ґрунті. Ці дослідження показали, що лікарські засоби можуть накопичуватися в ґрунті і тривалий час перебувати в ньому. Одним із ключових факторів, що впливає на накопичення лікарських засобів у ґрунті, є їхня стійкість. Сстійкі лікарські засоби можуть перебувати в ґрунті протягом багатьох років, не розкладаючись [102].

Попередньо нами була розроблена кількісна методика визначення методом ВЕРХ енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату [65], але ГХ є найпоширенішим методом для визначення ЛЗ у довкіллі, тому що є найбільш екологічним та економічним, ніж ВЕРХ-МС/МС у екологічних лабораторіях. ГХ має значні переваги в порівнянні з методами ВЕРХ – краща роздільна здатність, чутливість, специфічність, відсутність необхідності в органічних розчинниках для рухомих фаз в порівнянні з вимірюваннями ВЕРХ-МС/МС [103-105].

Нами була розроблена методика ГХ-ПД для одночасного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату (рис. 5.1). Використовували колонку Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA, капілярна колонка (довжиною 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщиною рідкої нерухомої фази 0,25 мкм), рухома фаза що складається з розчину ацетонітрилу, зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Запропонована нами методика характеризується гарним розділенням субстанцій та придатністю для використання в «еко-фармації» з точки зору «зеленості», визначеної з використанням шкали AGREE [82, 83].

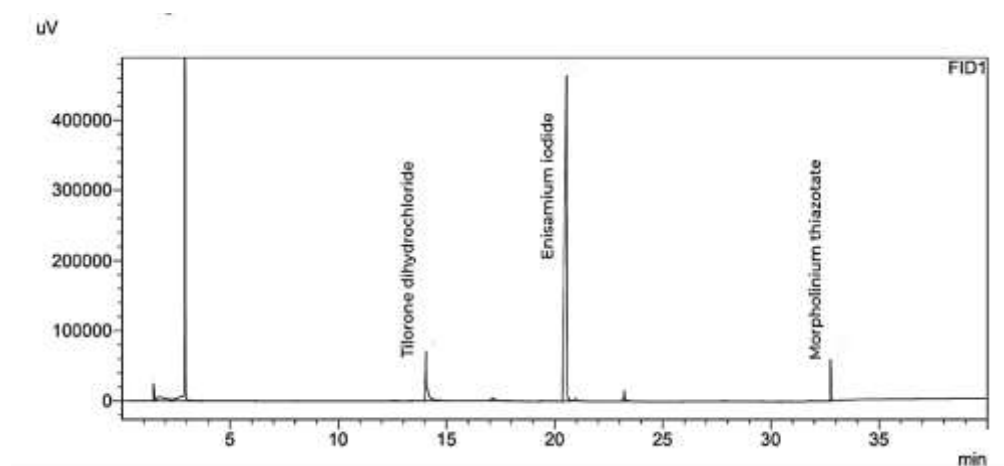


Рис. 5.1. Хроматограма модельної суміші ґрунту з субстанціями енісаміуму йодидом, тілорону дигідрохлоридом, морфолінію тіазотатом, де концентрація становила 0,016 мг/мл.

5.1 Збір ґрунту та визначення його властивостей

Для експерименту було обрано український ґрунт, який являє собою чорнозем. Ґрунт був відібраний з верхнього шару глибиною 20 см у місті Харків (Україна) у вересні 2021 року. Підпроби ґрунту ретельно перемішували та склали в чистий контейнер.

Після збору ґрунт просіювали до 2 мм та висушували. Властивості ґрунту м. Харків охарактеризовані у таблиці 5.1. Зразки ґрунту зберігалися при кімнатній температурі менше ніж місяць до початку дослідження [106].

Таблиця 5.1

Характеристика властивостей ґрунтів Харків, Україна [106]

Ґрунт	Структура ґрунту	pH	Мул	Мікроелементи
Ґрунт міста Харків	чорноземи типові	6,0-6,5	$4.6 \pm 0.5\%$	вміст вуглецю $2,84 \pm 0.35\%$, азоту $0.2 \pm 0.03\%$.

Дані щодо визначення у ґрунті pH електродним pH-метром наведені у таблиці 5.1.

Визначали гранулометричний склад ґрунту ситовим методом. Ґрунт просушували у сушильній шафі при температурі 105°C протягом 24 годин. Охолоджений ґрунт подрібнювали у фарфоровій ступці. Зважували 100 г ґрунту і просівали через набір сит протягом 10 хвилин. Частинки ґрунту, що залишилися на кожному ситі, зважували.

Вміст фракцій ґрунту розраховують за формулою:

$$X = (m / M) * 100\%, \text{ де:} \quad (5.1)$$

X – вміст фракції ґрунту, %;

m – маса ґрунту, що залишилася на ситі, г;

M – загальна маса ґрунту, г.

Ґрунт м. Харків має супіщаний гранулометричний склад (таблиця 5.2). Вміст піщаних фракцій (2-0,05 мм) становить 85%. Вміст глинистих фракцій (< 0,05 мм) становить 10 %. Ґрунт має хорошу водопроникність та повітропроникність і має низьку ємність поглинання катіонів.

Таблиця 5.2

Гранулометричний склад ґрунту м. Харків

Розмір частинок ґрунту, мм	Вміст фракції ґрунту, %
> 2	10
2 - 1	20
1 - 0,5	30
0,5 - 0,25	20
0,25 - 0,1	10
0,1 - 0,05	5
< 0,05	5

5.2. Визначення розсіювання та напіврозпаду субстанцій в ґрунті

Базові розчини енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату готували шляхом розчинення кожної з таблеток 0,125 мг енісаміуму йодиду, 0,125 мг тілорону дигідрохлориду, 0,200 мг морфолінію тіазотату в 10,0 мл ацетонітрилу та доводили до кінцевого об'єму 25,00 мл. Для рівномірного розподілу ЛЗ у ґрунті кожен препарат додавали у вигляді розчину у ґрунт.

Yu et al. [107], вивчали процеси сорбції та деградації карбамазепіну, гемфіброзилу, октилфенолу, триклозану та бісфенолу у трьох різних ґрунтах. Ізотерми адсорбції всіх лікарських засобів у ґрунті описані за допомогою рівняння Фрейндліха. Для триклозану та октилфенолу визначено помірну або сильну сорбцію, а для гемфіброзилу та карбамазепіну – незначну. Період напіврозпаду фармацевтичних препаратів у ґрунті коливався від 9,8 до 39,1 дня [108]. Тривалий період напіврозпаду фармацевтичних препаратів у стерильних ґрунтах свідчить про те, що мікробіологічна активність зіграла важливу роль у деградації цих сполук. Тому для експерименту було обрано час проведення 45 днів.

Експеримент планували за раніше вже вивченими методами [109, 110]: п'ять грамів висушеного та просіяного на повітрі ґрунту поміщали в окремий 10,0 мл пластиковий контейнер і додавали кожний із розчинів (у перерахунку 0,002 mg/ml речовини) попередньо профільтрованого крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Прозорий пластиковий контейнер ізолює ґрунт від навколишнього середовища і дозволяє досліджувати вплив лікарських засобів на ґрунт без впливу інших факторів, а також контролювати умови досліду і візуально спостерігати за експериментом.

Пластикові контейнери інкубували в темряві при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 45 днів. Досліди проводили при 25°C . Відбирали відповідно з встановленим часом відбору проб після струшування контейнерів.

Перед вимірюванням вміст контейнеру доводили об'єм водою до 10,0 мл, центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Центрифугували задля видалення твердих частинок із зразків ґрунту, а також для концентрування і покращення розділення зразків під час хроматографічного аналізу.

Супернатанти фільтрували через фільтр з розміром пор 0,45 мкм і декантували.

Обладнання. Аналізували методом ГХ-ПД за допомогою газового хроматографа GC-2010 Plus Shimadzu з вогнетривким детектором і автозавантажувачем АОС-20i+s (Shimadzu Technologies, Кіото, Японія). Розділення аналітів виконувалося на капілярній колонці зі стаціонарною рідиною Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, США) довжиною 30 метрів, зовнішнім діаметром 0,25 мм та товщиною рідинної стаціонарної фази 0,25 мкм. Використовувалися роботизований автозавантажувач та порт для split/splitless проби.

Методи (хроматографічні умови, приготування стандартів і зразків). Хроматографічні умови методу ГХ-ПД. Температура вводу зразка витримували на рівні 250°C протягом всього часу аналізу. Розділення аналітів

проводили на капілярній колонці Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, PA, США) довжиною 30 метрів, зовнішнім діаметром 0,25 мм та товщиною рідинної стаціонарної фази 0,25 мкм, яка містила 5 % дифенілу та 95 % полідиметилсилоксану. В якості газу-носія використовувався гелій з чистотою 99,999% при постійній швидкості потоку 1,49 мл/хв. Температурний режим печі був програмований на рівні 75 °C протягом 5 хвилин, потім збільшувався до 290 °C зі швидкістю 10 °C/хв та до 320 °C зі швидкістю 20 °C/хв, і утримувався на цьому рівні протягом 10 хвилин. Загальний час аналізу складав 41 хвилину. Об'єм введення зразка становив 1,0 мкл, режим введення був роздільним (співвідношення розділення 10), газ-носії – гелій [82].

Були підібрані оптимальні концентрації лікарських засобів так, як чим вище початкова їх концентрація в ґрунті, тим нижча швидкість розпаду і, отже, довший час розкладання. Обираючи концентрації досліджуваних АФІ відштовхувались від раніше мінімальних визначених концентрацій по методиці ГХ-ПД [82] в діапазоні визначення 0.12-16 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). При приготуванні розчинів для перевірки придатності методики ГХ-ПД брали мінімальні концентрації, які ми експериментально визначили відштовхуючись від маси діючої речовини в лікарських формах відповідно.

Розроблена раніше методика [82] придатна для визначення енісаміуму йодиду, морфолінію тіазотату та тілорону дигідрохлориду в ґрунті.

Для підтвердження специфічності методики проводили хроматографування наступних розчинів: модельний розчин чистого ґрунту, розчин з АФІ таблеток.

Хроматограма розчину чистого ґрунту та випробовуваного розчину наведені на рис. 5.2 і 5.3.

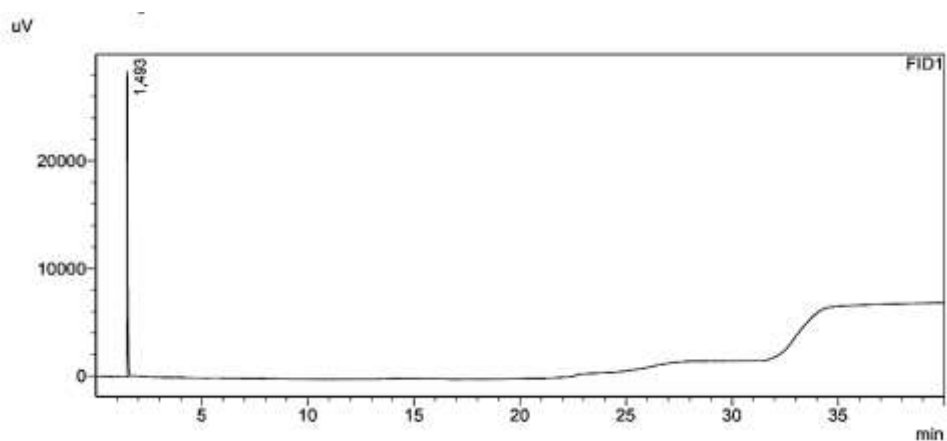


Рис. 5.2 Чистий ґрунт без компонентів

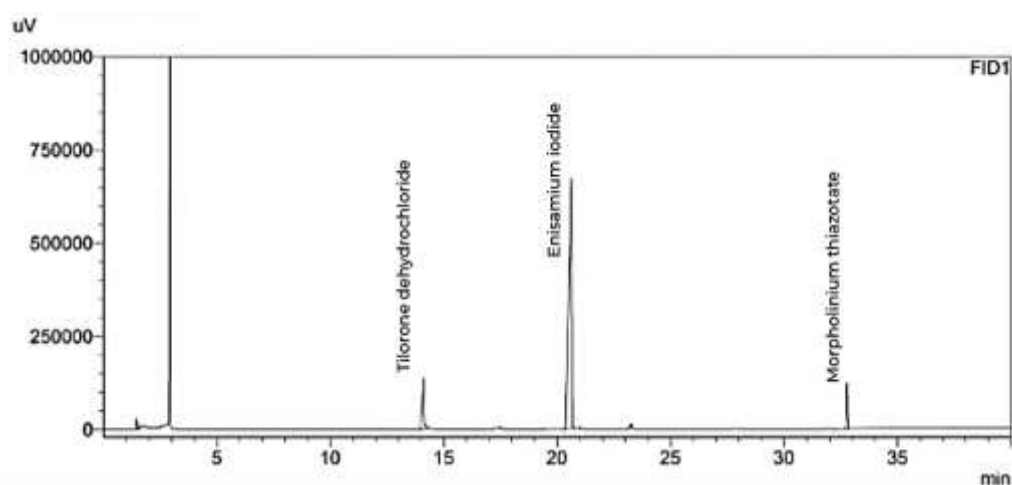
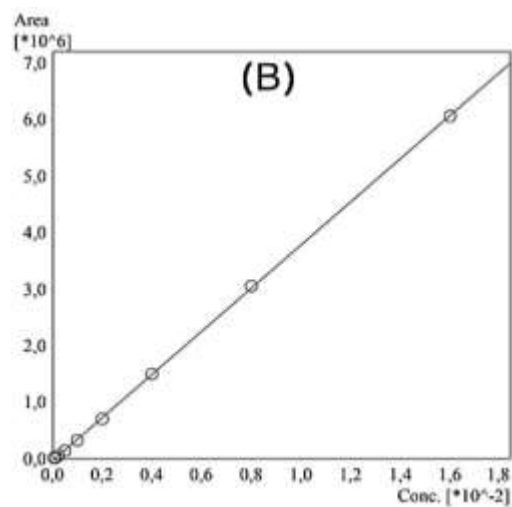
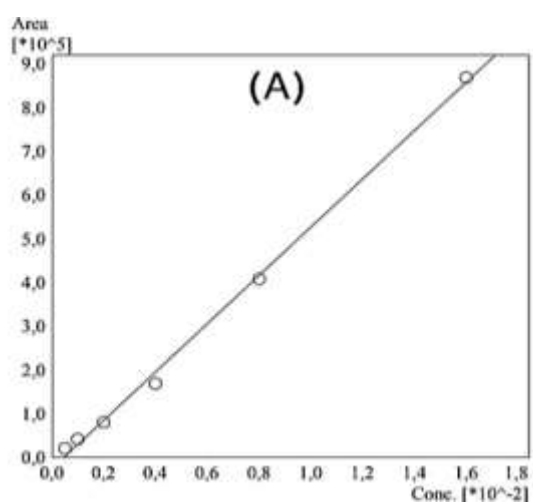


Рис. 5.3. Хроматограма модельної суміші ґрунту з таблетками енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тiazотату, де концентрація енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду становила 0,013 мг/мл.



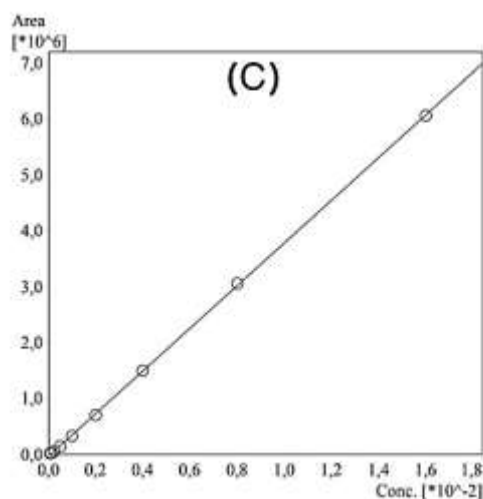


Рис. 5.4 Графіки лінійної залежності площі піків від концентрації аналітів (А – енісаміуму йодиду, В – тілорону дигідрохлориду, С – морфолінію тіазотату)

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведені на рис. 5.4., метрологічні характеристики лінійної залежності – у таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

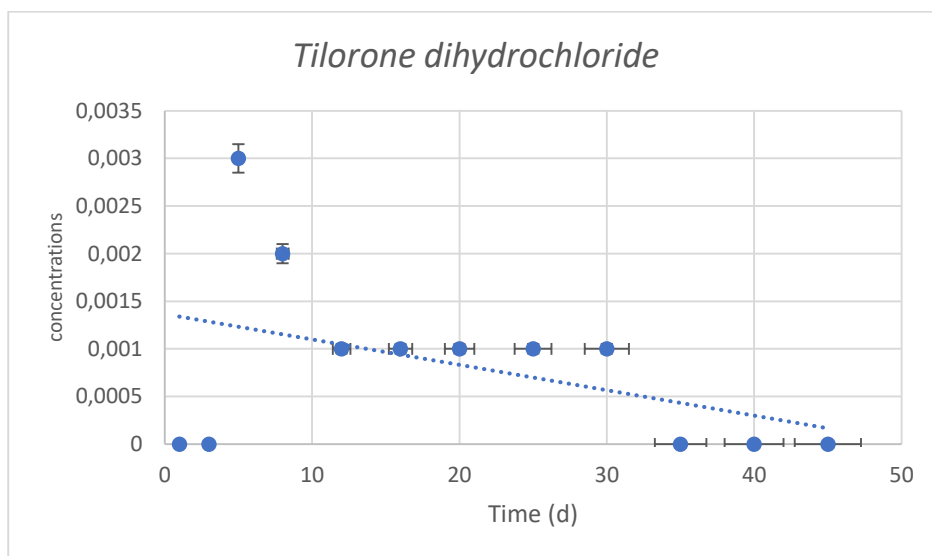
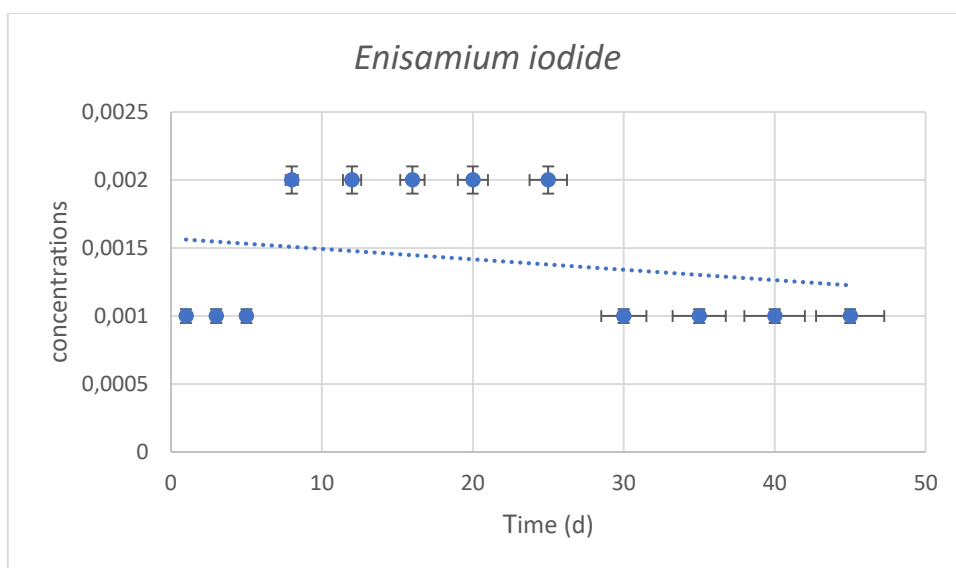
Метрологічні характеристики лінійної залежності

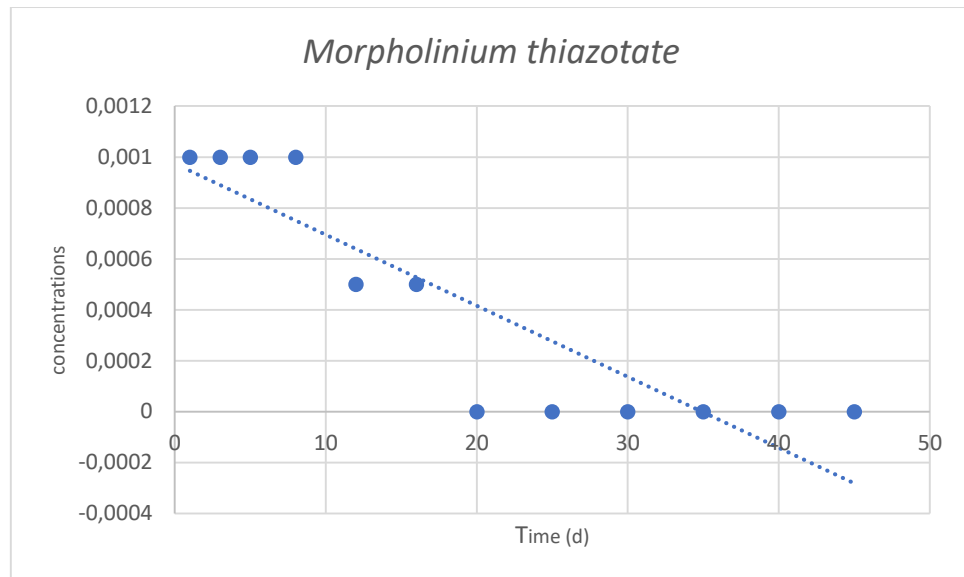
Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення		
		Енісаміуму йодид	Тілорону дигідрохлорид	Морфолінію тіазотат
$a \pm (S_a)$	$a \leq \Delta a = t(95\%; 3) \cdot S_a = 141$	- 221.014	- 10892,7	- 288.34
S_b	$\leq \Delta A_s (\%)/t(95\%; 3) = 1,36$	0,52571	0,799	0,0004
r^2	$\geq 0,990$	0,9999	0,9987	0,9999

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ. Високі значення коефіцієнтів кореляції підтверджують лінійність залежності між «введеною» та

«знайденою» кількістю введеної АФІ. Вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої не перевищує 5,0.

Проведене дослідження показало, що розсіювання відібраних препаратів у ґрунті відбувалося – час зображено на рис. 5.4. Криві на рис. 5.4 представляють підгонку експериментальних даних до моделі лінійного розпаду, регресія була успішною. Відповідні значення константи швидкості деградації k (d1) і періоду напіврозпаду $t^{\frac{1}{2}}$ (d) наведені в таблиці 5.4.





в

р

Використані невеликі концентрації є екологічно важливими для визначення періоду напіврозпаду як функції початкової концентрації в ґрунті, а використання нереалістично високих концентрацій має тенденцію до переоцінки періодів напіввиведення, що відхилятиметься від реальних ситуацій.

Таблиця 5.4

Константи швидкості розпаду (k^{d-1}) і періоди напіврозпаду ($t^{1/2}$, d) для досліджуваних лікарських засобів у ґрунті

Субстанція	Умови інкубації	k^{d-1}	$t^{1/2}$ (d)	R^2
енісаміуму йодид	Аеробний ґрунт	0,001 мг/мл	45	0,9908
тілорону дигідрохлорид	Аеробний ґрунт	0,001 мг/мл	30	0,9802
морфолінію тiazотат	Аеробний ґрунт	0,0005 мг/мл	7	0,9891

В аеробних умовах більша частина енісаміуму йодиду залишалася в ґрунті через 45 днів (рис. 5.4 а), що свідчить про незначне розсіювання і

у

стійкість до мікробної деградації. У той же час енісаміуму йодид не продемонстрував помітного зниження концентрації в ґрунті, що свідчить про те, що мікроорганізми відіграють важливу роль у розпаді в аеробних умовах.

Початкове зниження, ймовірно, було спричинене утворенням неекстрагованих залишків, як було продемонстровано за допомогою сполук, мічених ^{14}C [111]. Після початкового зниження кількість енісаміуму йодиду залишалася незмінною в аеробних умовах ґрунту.

Спостережуване незначне зниження концентрації тілорону дигідрохлориду також в основному відбувалося впродовж перших 8 днів (рис. 5.4 б). Після початкового зниження рівень тілорону дигідрохлориду залишався надалі незмінним в ґрунті.

Тілорону дигідрохлорид продемонстрував очевидне розсіювання в ґрунті, з відповідними значеннями $t^{\frac{1}{2}}$ – 12, 16 і 20, 30 днів відповідно (таблиця 5.4). Після 45 днів інкубації період напіврозпаду становить 100 %.

У випадку з морфолінію тіазотатом зниження не відбувалося (рис. 5.4 в), але він дуже швидко розсіявся і продемонстрував очевидне розсіювання в ґрунті зі значеннями $t^{\frac{1}{2}}$ – 3, 3 і 10 днів відповідно (таблиця 5.4). Після 45 днів інкубації період напіврозпаду становить 100 %.

Не зважаючи на те, що для аналізу були обрані оптимальні низькі концентрації досліджуваних ЛЗ, методика виявилася придатною. Встановлено, що чим вище початкова концентрація ЛЗ в ґрунті, тим нижча швидкість розпаду і, отже, довший час розкладання.

Вищі концентрації ЛЗ у результаті їх внесення зменшують швидкість розпаду ЛЗ і подовжують їх стійкість у ґрунті, оскільки вони пригнічують активність мікроорганізмів, що деградують [112].

Результати цього дослідження чітко свідчать про те, що на розпад досліджуваних фармацевтичних препаратів у ґрунті впливають мікробна активність, кисневий статус у ґрунті, тип ґрунту, а також властивості сполуки.

За винятком морфолінію тiazотату, всі інші фармацевтичні препарати продемонстрували відносно тривалу стійкість в аеробних умовах, з $t^{\frac{1}{2}} > 45$ днів.

Висновки до розділу V

1. Провели експеримент з визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тiazотату у ґрунті. Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ. Високі значення коефіцієнтів кореляції підтверджують лінійність залежності між «введеною» та «знайденою» кількістю введеної АФІ. Вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої не перевищує 5,0.
2. Підтвердили придатність розробленої раніше нами методики ГХ-ПДД для визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду і морфолінію тiazотату у ґрунті. Після 45 днів інкубації період напіврозпаду становить 100 % у тілорону дигідрохлорид та морфолінію тiazотату, а у енісаміуму йодиду відбулося початкове зниження і надалі концентрація залишалася незмінною в аеробних умовах ґрунту.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Study of the degradation behavior of Enisamium iodide, Tilorone dihydrochloride, Morpholinium thiazotate in the soil by the GC-FID method/ A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, O. Goncharov, O. Golovchenko, Z. Kovalenko, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 47, № 2. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.300209> https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/300209 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

ВИСНОВКИ

Розроблено методики ВЕРХ та ГХ-ПД одночасного визначення тілорону дигідрохлориду, енісаміуму йодиду та морфолінію тіазотату, проведено оцінку екологічності та економічності розроблених методик та обрано найбільш прийнятну для експерименту у ґрунті, проведено підтвердження придатності методики ГХ-ПД для визначення у навколишньому середовищі.

1. Розроблено «дерево рішень» по вибору розробки аналітичних процедур з точки зору «зеленої хімії», яке дає змогу визначити методи для розробки методів одночасного кількісного визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду та морфолінію тіазотату у субстанціях та об'єктах навколишнього середовища.
2. Розроблено та проведено валідацію методики кількісного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлорид із застосуванням методу ВЕРХ з УФ-детектуванням у присутності антибіотиків. Для досягнення найкращих хроматографічних характеристик запропоновано використовувати колонку SunFire C18 (Waters, США). Підтверджено специфічність аналітичної методики ВЕРХ. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становить 0,9992, а для тілорону дигідрохлориду 0,9998. Підтверджено правильність, прецизійність та робасність аналітичної методики. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння при їх зберіганні при кімнатній температурі щонайменше протягом 24 год.
3. Встановлено, що методика ВЕРХ кількісного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду є придатною для контролю якості енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду за показником «Кількісне визначення». Можливість застосування розробленої методики для здійснення кількісного контролю у процесі одночасного визначення препаратів встановлена за результатами проведеної валідації.

Підтверджено придатність розробленої методики ВЕРХ та проведено валідацію методики кількісного визначення для морфолінію тіазотату. Підтверджено специфічність аналітичної методики ВЕРХ. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значеннями для морфолінію тіазотату становить 0,9998. Підтверджено правильність, прецизійність аналітичної методики. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння при їх зберіганні при кімнатній температурі щонайменше протягом 24 год.

4. Розроблено та валідовано методику ГХ-ПД для визначення тілорону дигідрохлориду, енісаміуму йодиду та морфолінію тіазотату, яка виключає стадію дериватизації та мінімізує час та використання розчинника у порівнянні з попередньо розробленою ВЕРХ-методикою. Методику валідовано та визначено межі виявлення (LOD) і кількісного визначення (LOQ).
5. Встановлено, що метод ГХ-ПД виявився більш екологічним за аналітичною шкалою GREENness (AGREE) – має менший вплив на навколишнє середовище, ніж метод ВЕРХ, потребує менших витрат на проведення аналізу, ніж ГХ-МС, і демонструє задовільну точність. За допомогою методу ComplexGAPI встановлено, що метод ГХ-ПД має переваги при визначенні субстанцій енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату у навколишньому середовищі.
6. Підтверджено придатність аналітичної методики ГХ-ПД для визначення енісаміуму йодиду, тілорону дигідрохлориду, морфолінію тіазотату у ґрунті.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pharmaceuticals in source waters of 95 First Nations in Canada / H. Schwartz et al. *Can J Public Health*. 2021. Vol. 112, (Suppl 1). P. 133–153.
2. Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 2009. Vol. 90 (8). P. 2354–2366.
3. Halling-Sørensen B., Sengeløv G., Tjørnelund J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2002. Vol. 42 (3). P. 263–271.
4. Anastas P. T., Warner J. C. Green chemistry: Theory and practice. Oxford : Oxford University Press, 2000. 148 p.
5. Sheldon R. A. Green chemistry and catalysis. Wiley, 2007. 448 p.
6. Lancaster M. Green chemistry: An introductory text. Oxford : RSC Publishing, 2010. 398 p.
7. Clark J. H., Macquarrie D. J. Handbook of green chemistry and technology. Blackwell Publishing, 2010. 564 p.
8. Hanson C., Rowley C. Green chemistry: Fundamentals and applications. Royal Society of Chemistry, 2014. 396 p.
9. Andraos, J. Green chemistry in the pharmaceutical industry. Wiley, 2016. 289 p.
10. Dunn P. J., Galvin S. Green chemistry: An essential guide to the principles and applications. Royal Society of Chemistry, 2017. 318 p.
11. Anastas P. Eghbali N. Green Chemistry Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, 2010. Vol. 39. P. 301–312.
12. Discovery of a potent dual EGFR/HER-2 inhibitor L-2 (selatinib) for the treatment of cancer / L. Zhang et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 69. P. 833-41.
13. Sorkhabi T. S., Samberan M. F., Ostrowski K. A., Majka T. M. Novel Synthesis, Characterization and Amoxicillin Release Study of pH-Sensitive

- Nanosilica/Poly(acrylic acid) Macroporous Hydrogel with High Swelling. *Materials*. 2022. Vol. 15. P. 469.
14. Xia K., Bhandari A., Das K., Pillar G. Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in biosolids. *J Environ Qual*. 2005. Vol. 34, P. 91–104.
 15. Safe management of wastes from health-care activities / Ed. by Y. Chartier, J. Emmanuel, U. Pieper, A. Prüss, P. Rushbrook ; World Health Organization. New York, 2014. 396 p.
 16. Ternes T. A., Andersen H., Gilberg D., Bonerz M.. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal Chem*, 2002. Vol. 74, P. 3498–3504.
 17. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: A national reconnaissance / D. W. Kolpin et al. *Environ. Sci. Technol*. 2002. Vol. 36, P. 1202–1211.
 18. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms / S. M. Richards et al. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J*. 2004. Vol. 23. P. 1035–1042.
 19. Carter L., Harris E., Williams M., Ryan J., Kookana R., Boxall A.. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems. *J Agric Food Chem*. 2014. 62(4):816-25.
 20. Schlußener M. P., Bester K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environ Pollut*. 2006. Vol. 143. P. 565–571.
 21. Collucci M., Bork H., Topp E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils (I. 17-beta estradiol and estrone). *J Environ Qual*. 2001. Vol. 30. P. 2070–2076.
 22. Boxall A. B. A., Barceló D. Pharmaceuticals in the environment: current knowledge and future research. *Environmental Science & Technology*. 2003. Vol. 37 (20). P. 4277–4278.
 23. Hirsch R., Ternes T. A., Haberer K., Kratz K. L. Occurrence of antibiotics in the environment. *Science of the Total Environment*. 1999. Vol. 225 (1-2). P. 109–118.

24. Pouzol T., Lyon I. Metrologie et modelisation des flux horaires et journaliers de medicaments en entree de station d'epuration a l'aval d'un bassin versant urbain et d'un hopital. Lyon, 2018. 190 p.
25. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal*. 2001. L 311. 28/11/2001 P. 0067 - 0128
26. Directive 2010/75/EU of the European Parliament and of the Council of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention). *Special edition in Croatian*. 2010. Vol. 015, Ch. 15. P. 159–261.
27. Xu J., Wu L., Chang A. C. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*. 2009. Vol. 77, Is. 10. P. 1299-305.
28. Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review / B. Gworek et al. *Water Air Soil Pollut*. 2021. Vol. 232. P. 145.
29. Fent K., Weston A., Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2006. Vol. 76. P. 122–159.
30. Grossberger A., Hadar Y., Borch T., Chefetz B. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 2014. Vol. 185. P. 168–177.
31. Environmental risk assessment strategy for human and veterinary medicines. 2019. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/marketing-authorisation-veterinary-medicines/environmental-risk-assessment-veterinary-medicines>.
32. Xu P., Jiang S., Tao B., Zhang H. Determination and study on degradation dynamics of fungicide validamycin a residue in soil using pre-column derivatization and capillary gas chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 64 (8). P. 81–822.
33. Xu J, Wu L, Chang A. C. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*. 2009. Vol. 77(10). P. 1299–1305.

34. Lin K., Gan J. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*. 2011. Vol. 83 (3). P. 240–246.
35. Ekins S., Lane T. R., Madrid P. B. Tilorone: a Broad-Spectrum Antiviral Invented in the USA and Commercialized in Russia and beyond. *Pharm Res*. 2020. Vol. 37 (4). P. 71.
36. Gupta D. K., Gieselmann V., Hasilik A., Figura K. Isolation of the lysosomal cysteine protease cathepsin L from bovine spleen and preparation of its derivatives. *Physiol Chem*. 1984. Vol. 365 (8). P. 859–866.
37. Enisamium Reduces Influenza Virus Shedding and Improves Patient Recovery by Inhibiting Viral RNA Polymerase Activity / J. W. Aartjan et al. *Antimicrobial Chemotherapy*. 2021. Vol. 65, № 4. DOI: 10.1128/aac.02605-20.
38. Tilorone and Cridanimod Protect Mice and Show Antiviral Activity in Rats despite Absence of the Interferon-Inducing Effect in Rats / V. Keyer et al. *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15 (5). P. 17.
39. Chilamakuri R., Agarwal S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells*. 2021. Vol. 10 (2). P. 206.
40. Effect of Tilorone on the Dynamics of Viral Load and the Levels of Interferons and Interleukin-1 β in the Lung Tissue and Blood Serum of Mice with Experimental Influenza / O. V. Kalyuzhin et al. *Bull Exp Biol Med*. 2021. Vol. 171 (6). P. 736–740.
41. Repurposing existing medications for coronavirus disease 2019: protocol for a rapid and living systematic review / B. P. Geisler et al. *Syst Rev*. 2021. Vol. 10 (1). P. 143.
42. Daughton C. G. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as environmental pollutants: Pollution from personal actions. *Environ Health Perspect*. 2004. URL: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=76663.

43. European chemical agency. URL: <https://echa.europa.eu>.
44. Друге народження препарату Амізон®: результати міжнародних наукових досліджень підтверджують протівірусну дію / А. Ф. Фролов та ін. *Український медичний часопис*. 2018. № 1 (4). С. 70–73.
45. Клинические аспекты применения амизона / А. Ф. Фролов та ін. *Український медичний часопис*. 2004. № 1. С. 69–74.
46. Ефективність застосування препарату «Амізончик» при гострих респіраторних захворюваннях у дітей віком 3-6 років / Ю. В. Марушко та ін. *Современная педиатрия*. 2013. № 4 (52). С. 62–66.
47. Клиническая эффективность Амизона в терапии гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций / Т. И. Мельникова и др. *Здоров'я України*. 2013. № 17 (318). С. 40–41.
48. Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / D. Boltz et al. URL: <https://iitri.org/wp-content/uploads/2019/10/Farmak-Poster-Final.pdf>.
49. Antiviral effect of a derivative of isonicotinic acid enisamium iodide (FAV00A) against influenza virus / D. [Cocking](#) et al. *Acta Virol.* 2018. Vol. 62, № 2. P. 191–195. doi: 10.4149/av_2018_211
50. Anti-viral activity of enisamium iodide against viruses of influenza and ARVI's on different cell lines / ZarubaeV V. et al. *Terapevticheskii arkhiv*. 2020. 92(11):45-50.
51. Бурмака О. В. Валідація ВЕРХ-методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в активному фармацевтичному інгредієнті. *Pharmaceutical review*. 2019. № 1. P. 71-78.
52. Кушнірук В. М., Георгіянц В. А., Бевз Н. Ю. Розробка та валідація методики кількісного визначення амізону. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. № 24 (5). С. 332–336.
53. Structure and antiinflammatory activity of isonicotinic and nicotinic amides / Т. А. Bukhtiarova et al. *Pharmaceutical chemistry journal*. 1997. Vol. 31, № 11. P. 597–599.

54. Георгиянц В. А., Кушнирук В. Н., Гарная Н. В. Валидация методики определения сопутствующих примесей в капсулах, содержащих амизон. *Республиканский научный журнал*. 2014. № 3 (68). С. 27–30.
55. Кількісне визначення амізону в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії / Ільченко О. В. та ін. *Медична хімія*. 2007. № 2 (9). С. 130–132.
56. A polymeric nanogel formulation of combination small molecule therapeutics enhances inhibition of tumor angiogenesis and improves survival in a preclinical model of glioblastoma multiforme / D. Cocking et al. *Acta Virol*. 2018. Vol. 62 (2) P. 191–195.
57. Facile biocatalytic access to 9-fluorenylmethyl polyglycosides: evaluation of antiviral activity on immunocompetent cells / A. Tramice et al. *ChemMedChem*. 2008. Vol. 3 (9). P. 1419–1426.
58. Osińska A., Harnisz, M., Korzeniewska, E. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environ Sci Pollut Res*. 2016. Vol. 23, P. 10818–10831.
59. Annapurna M. M., Valli D. S. Development and Validation of a New Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for the Assay of Tilorone. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2021. Vol. 5, Is. 8. P. 2581–5423.
60. Красных Л. М., Савченко А. Ю., Раменская Г. В. Сравнительное фармакокинетическое изучение препаратов тилорона с помощью разработанной методики ВЭЖХ. *Клиническая фармакокинетика*. 2005. № 2. С. 30-34.
61. Беленичев И. Ф., Визир В. А., Мамчур В. И., Курята А. В. Место тиотриазолина в галерее современных метаболитотропных лекарственных средств. *Запорожский медицинский журнал*. 2019. Т. 21, № 1. С. 118-128.
62. Георгиевский Г. В. Биологическая активность производных 1,2,4-триазола. *Фармаком*. 2006. № 3. С. 27–31.

63. Дмитриева М. В., Леонтьев Д. А. Анализ критических факторов и стандартизация испытаний на растворении в соответствии с требованиями Дополнение 2 ГФУ. *Запорожский медицинский журнал*. 2008. № 4 (49). С. 103–107.
64. Механізм енерготропної та антиоксидантної дії тіотриазоліну / І. Ф. Беленічев та ін. *Клиническая фармакология*. 2008. № 13-14. С.10–12.
65. Механізм протиішемічної та антиоксидантної дії тіотриазоліну / І. Ф. Беленічев та ін. *Новости медицины и фармации*. 2007. № 2. С. 8–9.
66. Оценка фармакодинамических эффектов тиотриазолина при гиперлипидемии / В. В. Дунаев и др. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики* : зб. наук. ст. 2002. Вип. 8. С. 70–73.
67. Савченкова Л. В. Клінічна фармакологія тіотриазоліну (огляд літератури). *Український медичний альманах*. 2008. Т. 11, № 3. С. 212–217.
68. Гризодуб А. І., Леонтьев Д. А., Левін М. Г. Метрологічні аспекти офіційних методик контролю якості лікарських засобів. 1. Методики ВЕРХ. *Фізіологічно активні речовини*. 2001. № 1 (31). З. 32–44.
69. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. 556 с.
70. Державна Фармакопея України : в 3 т. Т. 1 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. 1126 с.
71. Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Борсук С. О., Портна О. О. Кількісне визначення L-триптофану та тіотриазоліну в модельній суміші. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 2. С. 54-58.
72. Samanidou V. F. Pharmaceutical Analysis from a Green Perspective. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2014. Vol. 1, № 4. P. 1016.

73. Koel M., Kaljurand M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2006. Vol. 78. № 11. P. 1993–2002.
74. Gałuszka A., Migaszewski Z., Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 50. P. 78–84.
75. de Marco, Bianca Aparecida et al. “Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review.” *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ* 27. 2018. 1 - 8.
76. Płotka-Wasyłka, Justyna et al. “Green analytical chemistry as an integral part of sustainable education development.” *Green and Sustainable Chemistry* 31. 2021. 100508.
77. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз : підруч. для студентів вищих навч. закладів. Черкаси : Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. 284 с.
78. Лисенко О. М., Ковальчук Т. В., Зайцев В. М. Основи газової хроматографії : навч. посіб. Київ : Київ нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2013. 166 с.
79. Хромильова О. В. Вивчення впливу допоміжних речовин на фармако-технологічні характеристики таблеток L-аргініну з тіотриазоліном. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 4. С. 35-41.
80. Levchyk V., Zui M. Gas Chromatographic determination of parabens after derivatization and dispersive microextraction. *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. 2015. Vol. 3, № 2. P. 72–79.
81. Development of method for detection of amixin and amazon by HPLC on SunFire C18 column / A. Belikova et al. *CHEMIJA*. 2022. Vol. 33, № 3. P. 79–86.
82. Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector. / A. Belikova et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. № 3. P. 4-11.

83. Greening of the method for simultaneous determining the enisamium iodide and tilorone dihydrochloride using GC-FID assay / A. Belikova et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 6. P. 47–52.
84. Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) In Pharmaceutical Analysis: A Review / I. Khan et al. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. 2015. Vol. 4, № 1. P. 19–27.
85. Siddiqui M. R., Alothman Z. A., Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 10. P. S1409–S1421.
86. Kosnik, Marissa B. et al. “Toward Assessing Absolute Environmental Sustainability of Chemical Pollution.” *Environmental Science & Technology* 56. 2022. 4776 - 4787.
87. Green chromatography / J. Płotka et al. *Journal of Chromatography*. 2013. Vol. 1307. P. 1–20.
88. Wardencki W., Namieśnik J. Some Remarks on Gas Chromatographic Challenges in the Context of Green Analytical Chemistry. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2002. Vol. 11, № 2. P. 185–187.
89. Лікарські засоби. Валідація процесів : Настанова 42-3.5:2016. URL: <https://compendium.com.ua/uk/clinicalguidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-5-2016/>
90. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів. – 2-ге вид. Харків : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
91. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів. – 2-ге вид. Харків : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 2. – 724 с.
92. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів. – 2-ге вид. Харків : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 3. – 732 с.

93. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Допов. 1. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. – 360 с.
94. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry / C. Hao et al. *Anal Bioanal Chem.* 2006. Vol. 384 (2). P. 505–513.
95. Pollution of the Mtkvari River by Pharmaceutical Drugs in the Nearby Areas of Tbilisi / D. Gurgenidze et al. GEN Ltd., Georgian Engineering News. Tbilisi, 2021. 296 p.
96. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R5) : International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements or the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Step 4, February 2011 URL: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C-R8_Guideline_Step4_2021_0422_1.pdf.
97. Pena-Pereira F., Wojnowski W., Tobiszewski M. AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92, 14, P. 10076–10082.
98. Raynie D., Driver J. L. Green assessment of chemical methods . In Proceedings of the 13th Green Chemistry & Engineering Conference. Washigton, 2009. 22 p.
99. Titenko L. V. Evaluation and Calculation in the Pharmaceutical Industry. Finance, Accounting and Audit. Kyiv : KNEU15, 2009. 123 p.
100. Baktiyar M. Z., Ishaq B. M., Reddy L. S. S., Sreenivasulu M. Method Development and Validation for Estimation of related Substances in Tilorone Dihydrochloride using RP-HPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2021. Vol. 14 (6). P. 3319–3324.
101. Pharmaceutical pollution of the world's rivers / J. L. Wilkinson et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2022. Vol. 119 (8). P. e2113947119. DOI: 10.1073/pnas.2113947119.

102. Monteiro S. C. Boxall A. B. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2010. Vol. 202, P. 53–154.
103. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant / M. Carballa et al. *Water Res*. 2004. Vol. 38 (12). P. 2918–2926.
104. Environmental aspects of using gas chromatography for determination of pharmaceutical residues in samples characterized by different composition of the matrix / J. Sadkowska et al. *Archives of Environmental Protection*. 2017. Vol. 43, № 3. P. 3–9.
105. Second interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drug analysis in environmental aqueous samples / E. Heath et al. *Talanta*. 2010. Vol. 81 (4-5). P. 1189–1196.
106. Магнітна сприйнятливність чорноземних ґрунтів Харківської області та її діагностичне значення / О. В. Круглов та ін. *Вісник аграрної науки*. 2019. № 10 (799). С. 12-17.
107. A multimodel assessment of the influence of regional anthropogenic emission reductions on aerosol direct radiative forcing and the role of intercontinental transport / H. Yu et al. *J. Geophys. Res. Atmos*. 2013. Vol. 118, № 2. С. 700–720.
108. The European Medicines Agency's scientific guidelines on the safety and residue levels of veterinary medicinal products help medicine developers prepare marketing authorisation applications. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-and-development-veterinary-medicines/scientific-guidelines-veterinary-medicines/safety-residues-guidelines/safety-residues-pharmaceuticals>
109. Płotka-Wasyłka J., Wojnowski W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chemistry*. 2021. URL: <https://www.rsc.org/suppdata/d1/gc/d1gc02318g/d1gc02318g1.pdf>.
110. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. / Salehi B. et al. *ACS Omega*. 2020. № 5. P. 11849–11872.

111. Schlußener, M.P., Bester, K.. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environ Pollut*, 2006, 143, P. 565–571.
112. Collucci, M., Bork, H., Topp, E.. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils (I. 17-beta estradiol and estrone). *J Environ Qual*, 2001, 30, P. 2070–2076.
113. Technical Appendix B. Physicochemical Properties for TRI Chemicals and Chemical Categories. URL: https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/tech_app_b_v21.pdf

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Development of method for detection of amixin and amazon by HPLC on SunFire C18 column / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, O. Chorna, D. Burdulis, V. Georgiyants. *Chemija*. 2022. Vol. 33, № 3. P. 79–86. (*Scopus, Q 4*) <https://doi.org/10.6001/chemija.v33i3.4750> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
2. Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, V. Chorny, Iu. Korzh, L. Kucherenko, A. Kotvitska, D. Burdulis, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 37, № 3. P. 4-11. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.259879> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Greening of the method for simultaneous determining the enisamium iodide and tilorone dihydrochloride using GC-FID assay / A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, V. Chorny, A. Kononenko, A. Koval, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 46, № 6. P. 47–52. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.295120> (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Study of the degradation behavior of Enisamium iodide, Tilorone dihydrochloride, Morpholinium thiazotate in the soil by the GC-FID method/ A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, O. Goncharov, O. Golovchenko, Z. Kovalenko, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 47, № 2. (*Scopus, Q 3*) <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.300209> https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/300209 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. 10th International Pharmaceutical conference «Science and practice» (Литва, м. Каунас, 15 листопада 2019 р., форма участі – постерна доповідь);
2. XIV науково-практична конференція «Управління якістю в фармації» (Харків, 22 травня 2020 р., форма участі – публікація тез);
3. Міжнародна науково-практична конференція «Пріоритети фармації і стоматології», (Казахстан, Алмати, 27 листопада 2020 р., форма участі – публікація тез);
4. Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development», присвячена 150-річчю з дня народж. М. О. Валяшка (Харків, 18-19 березня 2021 р., форма участі – публікація тез);
5. Міжнародний науково-практичний симпозіум «100 years of success and quality», присвячений 100- річному ювілею кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (Харків, 18 жовтня 2021 р., форма участі – публікація тез);
6. VIII міжнародна наукова конференція молодих учених та студентів «Перспективи розвитку біології, медицини і фармації» (Казахстан, Шимкент, 9-10 грудня 2021 р., форма участі – публікація тез);
7. II Міжнародна науково-практична дистанційна конференція «Сучасні аспекти створення лікарських засобів» (Харків, 1 лютого 2022 р., форма участі – публікація тез);
8. Міжнародна інтернет-конференція «Modern chemistry of medicines» (Харків, 18 травня 2023 р., форма участі – публікація тез);
9. IV Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE» (Харків, 6-7 грудня 2023 р., форма участі – усна доповідь). <https://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2023/12/prohrama-konferentsii-6-7-hrudnia-2023-r..pdf>

(Литва, м. Каунас, 15 листопада 2019 р.)



Necessity of the control methods development for the starting raw materials of Amizone synthesis in the working zone and atmospheric air

Anastasiia Belikova, Anna Materiienko, Liudmyla Sydorenko, Victoriya Georgiyants

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

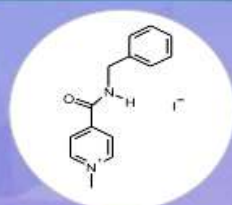


Introduction

Pharmaceutical manufacturing is characterized by usage of different types of chemical raw materials, the variety of intermediate products of the synthesis of medicines, the multi-stage and intermittent nature of technological processes, the imperfection in some cases of technological schemes, which can lead to significant emissions of harmful substances into the air of the working area and atmosphere. Therefore, hygienic standards and methods for the analytical determination of the content of harmful substances in the air of the working area and environmental objects should be developed at the pharmaceutical enterprises, taking into account hygienic criteria to justify the development of methods for monitoring the maximum permissible concentrations (MPC) of harmful substances.

Materials and methods

Existing methods and approaches to measuring the MPC of harmful substances, as well as approaches to normalizing their content in the air of the working area of pharmaceutical enterprises and atmospheric air, were studied by analyzing literature and Internet sources. For study and development methods for control the chemical and spectrophotometric methods were used.

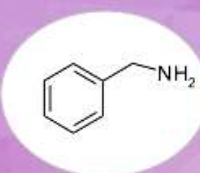
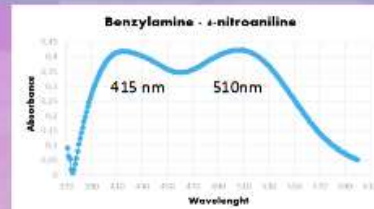
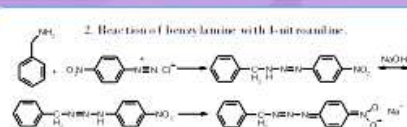
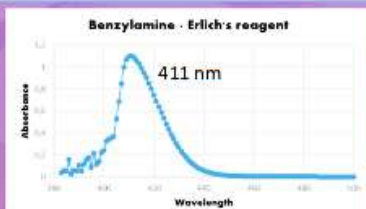
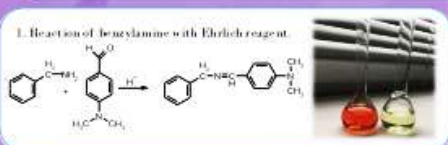


Results

Analysis of literary sources showed that a large number of different analysis methods are used to measure the MPC of harmful substances in the working area and atmospheric air. However, today there is no single approach to standardization and measurement of MPC in the air, each country and manufacturer are forced to develop their own approaches. For Ukraine, the development of modern methods of determining the MPC of harmful substances in the working area and atmospheric air it is highly relevant due to the constant increase in production technologies and the need for harmonization of the national approaches with the European requirements. Amizone relates to the preparation of large-scale production and consumption in Ukraine. Benzylamine, which belong to hazard class 2, is one of the starting raw materials for the Amizone synthesis. The toxicity of Benzylamine requires the development of control methods in the working area and atmospheric air.

The aim of our study is to develop methods for Benzylamine control in the in the working area and atmospheric air.

Along with using chromatographic methods for analysis, the development of more economical and simple, but no less sensitive and specific methods for its control, such as spectrophotometry and photocolometry, is relevant. To develop these methods, we have studied the possibility of using the reactions of Benzylamine interaction with diazonium salts, metal salts (cobalt, cuprum and iron), Ehrlich reagent and 4-aminoaniline. As a result of the studies, the most promising were: the reaction with the Ehrlich reagent - a yellow product of the reaction (Schiff base) is formed, which has an pronounced absorption maximum at a wavelength of 411 nm; and the reaction with 4-aminoaniline, as a product of which has red color 2, but less pronounced absorption maximums at 415 and 510 nm.



Conclusions

Based on the analysis of literary sources, the development of methods for measuring the MPC of harmful substances in the air of the working area of pharmaceutical enterprises and atmosphere is very relevant.

Studied reactions will be used in the further development of the method for determining Benzylamine in the air of the working area and atmospheric air.

1. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), United Nations Economic Commission for Europe, 2007:839-924
2. Georgiyants V.A., Kushniruk V.M., Bezgly P.O. "Greening" of Amizone synthesis when manufacturing. News Of Pharmacy, 2016;1(85):50-53.



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет

ГРАМОТА

нагороджується

БЕЛІКОВА
Анастасія

у секційному засіданні студентського
наукового товариства кафедри
фармацевтичної хімії

IV Всеукраїнська науково-практична
конференція з міжнародною участю

YOUTH PHARMACY SCIENCE



6-7 грудня, 2023 р.,
м. Харків, Україна

Ректор Факультету
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

Додаток Б

Акти впровадження

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
доктор медичних наук.

проф. Вікторія СЕРГІШКО

«18» березня 2024 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** матеріали експериментальних досліджень щодо розробки методики визначення амізону та аміксину методом високоефективної хроматографії.
2. **Установа, автори:** 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди (вул. Пушкінська) 53, Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії; А. Г. Белікова, професор Л. В. Сидоренко, проф. В. А. Георгіяниц.
3. **Джерела інформації:** Development of method for detection of amixin and amazon by HPLC on SunFire C18 column / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, O. Chorna, D. Burdulis, V. Georgiyants. *Chemija*. 2022. Vol. 33, № 3. P. 79–86. <https://doi.org/10.6001/chemija.v33i3.4750>.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, наукова робота.
6. **Результат впровадження:** поглиблення знань здобувачів вищої освіти та науковців з питань використання методу ВЕРХ з фотодіодним детектором для визначення амізону та аміксину.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, протокол № 14 від 13.03.2024.

Завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, доктор фармацевтичних наук, професор



Роман ЛЕСИК

Продовж. дод. Б

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
 Запорізького державного
 медико-фармацевтичного університету

доктор фізичних наук, проф. **Ванорій ІВАНСЬКИЙ**

« 19 » березня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозицій для впровадження: матеріали експериментальних досліджень щодо розробки методики одночасного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду методом газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором.

2. Установа, автори: 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди (вул. Пушкінська) 53, Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії;
 А. Г. Белікова, професор Л. В. Сидоренко, проф. В. А. Георгіянци.

3. Джерела інформації: Greening of the method for simultaneous determining the enisamium iodide and tilorone dihydrochloride using GC-FID assay / A. Belikova, L. Ivanauskas, L. Sidorenko, V. Chorny, A. Kononenko, A. Koval, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. Vol. 46, № 6. P. 47–52. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.295120>.

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

5. Форма впровадження: навчальний процес, наукова робота.

6. Результат впровадження: поглиблення знань здобувачів вищої освіти та науковців з питань використання методу ГХ-ПІД для одночасного визначення енісаміуму йодиду та тілорону дигідрохлориду.

7. Термін впровадження: 01.09.2023-01.03.2024 навчальний рік.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, протокол № 12 від 19.03.2024.

Завідувачка кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету,
 доктор фармацевтичних наук, професор



Людмила КУЧЕРЕНКО

Продовж. дод. Б

«Затверджую»

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи
Тернопільського національного

медичного університету ім. І. Я. Горбачевського

доктор біологічних наук,

проф. Іван КЛІЩ

2024 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозицій для впровадження: матеріали експериментальних досліджень щодо розробки методик визначення морфолінію тіазотату методами високоефективної та газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором.

2. Установа, автори: 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди (вул. Пушкінська) 53, Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії; А. Г. Белікова, професор Л. В. Сидоренко, проф. В. А. Георгіянци.

3. Джерела інформації: Development of A Method for Determining the Morpholinium Thiazotate Using More Economic and Green GC/MS Assay with an Fid Detector / A. Belikova, A. Materienko, L. Sidorenko, V. Chornyi, Iu. Korzh, L. Kucherenko, A. Kotvitska, D. Burdulis, V. Georgiyants. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 37, № 3. P. 4-11. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.259879>

4. Де впроваджено: кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського.

5. Форма впровадження: навчальний процес, наукова робота.

6. Результат впровадження: поглиблення знань здобувачів вищої освіти та науковців з питань використання методів ВЕРХ та ГХ-ПІД для визначення морфолінію тіазотату.

7. Термін впровадження: 2023-2024 навчальний рік.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, протокол № 3 від 11.03.2024.

Завідувачка кафедри фармацевтичної хімії
Тернопільського національного
медичного університету ім. І. Я. Горбачевського,
доктор фармацевтичних наук, професор

Лілія ЛОГОЙДА