

На правах рукописи



ГИЗАТУЛИНА Зиля Рафаэлевна

**МИКРОЭКСТРАКЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИКОВ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
Гармонов Сергей Юрьевич.

Официальные оппоненты: **Малкова Тамара Леонидовна,**
доктор фармацевтических наук, профессор,
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая
академия», кафедра токсикологической химии,
заведующий;

Медянцева Эльвина Павловна,
доктор химических наук, профессор,
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный
университет», кафедра аналитической химии,
профессор.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный
медицинский университет», г. Курск.

Защита состоится 19 мая 2023 года в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.2.312.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68, зал заседаний Ученого совета, А-330.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте <http://www.kstu.ru/servlet/contentblob?id=452518>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим направлять по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, КНИТУ, ученому секретарю диссертационного совета 24.2.312.03 и по e-mail: gulia_nn@yahoo.com.

Автореферат разослан « ____ » марта 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Нугуманова Гульнара Наилевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Метаболики и антибактериальные лекарственные препараты довольно часто назначаются для лечения заболеваний различной этиологии как у человека, так и животных. Бесспорно, разработка новых, совершенствование, унификация и валидация методов для контроля качества выпускаемых лекарственных препаратов является очень важной задачей. При этом в фармацевтической химии большое внимание уделяется поиску новых эффективных, в тоже время миниатюризированных и высокопроизводительных способов определения действующих веществ с целью обеспечения безопасности выпускаемой продукции в соответствии с требованиями стандартов серии GxP. В этом плане весьма перспективно использование методов жидкостной микроэкстракции, поскольку важным их достоинством является упрощение процедуры пробоподготовки с обеспечением высокой ее результативности при сокращении расходов экстрагентов, повышении их экологичности и коэффициентов концентрирования действующих веществ. Это имеет особенное значение в случае предотвращения перекрестного загрязнения, поскольку одно и то же оборудование используется для производства лекарственных препаратов различных фармакологических групп. При этом контроль чистоты фармацевтического оборудования осложняется тем, что действующие вещества находятся в анализируемой матрице в низких содержаниях, существенно ограничивающих применимость традиционных физико-химических методов без использования приемов концентрирования.

Цель работы состояла в разработке новых эффективных способов определения ряда метаболитов и антибактериальных лекарственных средств в лекарственных препаратах и контроле чистоты фармацевтического оборудования при использовании микроэкстракции и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для достижения цели решались следующие **задачи**:

- изучить возможность извлечения 17β -эстрадиола из лекарственных препаратов методом дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующим определением действующего вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ);
- обосновать возможность применения глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) на основе ментола и гептановой кислоты в качестве экстрагентов для реализации жидкостной микроэкстракции действующих веществ из гомогенного раствора;

Научным консультантом по диссертационной работе являлся доктор химических наук, профессор **Булатов Андрей Васильевич**

- разработать способ микроэкстракционного извлечения мелатонина из лекарственных препаратов в эвтектический растворитель для последующего определения лекарственного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ);

- оптимизировать условия хроматографического разделения и детектирования ветеринарных антибактериальных препаратов энрофлоксацина, колистина и тилмикозина в варианте обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с последующей валидацией;

- изучить возможность извлечения энрофлоксацина и тилмикозина из лекарственных препаратов методом жидкостной микроэкстракции с последующим определением действующего вещества методом ВЭЖХ;

- апробировать разработанные методы при фармацевтическом анализе лекарственных препаратов, контроле чистоты фармацевтического оборудования и подтвердить правильность получаемых результатов.

Научная новизна:

- обоснованы и оптимизированы условия извлечения 17β -эстрадиола из лекарственных препаратов методом дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующим его определением методом ВЭЖХ;

- впервые предложен и обоснован новый способ микроэкстракционного извлечения мелатонина из лекарственных препаратов, основанный на массопереносе в фазу ГЭР на основе ментола и гептановой кислоты и кристаллизации экстракта;

- оптимизированы условия хроматографического разделения и совместного определения ветеринарных антибактериальных препаратов энрофлоксацина, колистина и тилмикозина в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ и установлены валидационные параметры, соответствующие требованиям для фармацевтического анализа;

- впервые изучена возможность извлечения энрофлоксацина и тилмикозина из лекарственных препаратов методом жидкостной микроэкстракции с последующим определением действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ, включающим упрощенную процедуру их пробоподготовки при сокращении расхода используемых экстрагентов;

- разработан унифицированный подход к микроэкстракции 17β -эстрадиола, энрофлоксацина и тилмикозина фосфата.

Теоретическая и практическая значимость состоит в том, что разработаны новые способы высокочувствительного определения некоторых метаболитов (17β -эстрадиола, мелатонина), а также ветеринарных антибактериальных соединений (энрофлоксацина, колистина и тилмикозина) в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием с предварительным микроэкстракционным извлечением

действующих веществ. На этой основе предложен унифицированный подход к микроэкстракции 17β -эстрадиола, мелатонина, энрофлоксацина и тилмикозина фосфата, который может быть реализован и для других групп лекарственных веществ. Разработанные подходы были успешно валидированы и апробированы при контроле качества лекарственных препаратов, а также в оценке следовых количеств действующих веществ при контроле чистоты фармацевтического оборудования с подтверждением правильности получаемых результатов.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» при изучении дисциплин «Контроль качества и стандартизация лекарственных средств и биологически активных соединений», «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» и на фармацевтическом предприятии ООО «Ветлайн».

Методология и методы исследований. При проведении фармацевтического анализа использовали методы обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Предконцентрирование действующих веществ проводили в вариантах жидкостной микроэкстракции при использовании миниатюризированных систем.

Положения, выносимые на защиту:

- новый способ эффективного извлечения 17β -эстрадиола из лекарственных препаратов методом дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующим определением действующего вещества методом ВЭЖХ-УФ;

- обоснование применения и подбор глубоких эвтектических растворителей на основе ментола и гептановой кислоты в качестве экстрагентов для реализации жидкостной микроэкстракции лекарственных веществ из гомогенного раствора;

- способ эффективного микроэкстракционного извлечения мелатонина из лекарственных препаратов в ГЭР с последующим определением лекарственного вещества методом ВЭЖХ-УФ;

- условия хроматографического разделения и результаты определения ветеринарных антибактериальных препаратов энрофлоксацина, колистина и тилмикозина в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ и данные по валидации методик контроля их качества;

- обоснование и подбор оптимальных условий концентрирования энрофлоксацина и тилмикозина из лекарственных препаратов методом жидкостной микроэкстракции с последующим определением действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ;

- подходы по унификации методик микроэкстракционного извлечения гормональных препаратов и ветеринарных антибактериальных средств, метрологические характеристики разработанных способов анализа и результаты их применимости в фармацевтическом анализе.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов ВЭЖХ-УФ, спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, а также математической статистики при обработке экспериментальных данных.

Результаты работы и основные положения диссертации были представлены и обсуждены на следующих конференциях: XXVII, XXIX Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2020, 2022), 27-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Белые цветы» (Казань, 2021), XI Всероссийской научной конференцией студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2021), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2021» (Москва, 2021), Весенней школе-конференции ХимРар по медицинской химии (МедХимРар-21) (Химки, 2021), IV Школе-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2022), Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные решения приоритетных задач токсикологии и биотехнологии» (Казань, 2022).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области специальности по п.3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления».

Публикации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 печатных изданиях, включая 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых для размещения материалов диссертаций, и 8 статей в сборниках и тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, изложенных в двух главах, заключения, списка литературы, включающего 183 источника. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 56 рисунками и 23 таблицами. В приложении представлены акты внедрения результатов диссертационной работы.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в обсуждении цели и задач исследования, выборе и обосновании методик эксперимента. Экспериментальные исследования выполнены лично автором. Автор активно участвовал в анализе и обобщении полученных экспериментальных результатов, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей, подготовке и представлении докладов на конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении аргументируется актуальность работы и потребность в разработке новых микроэкстракционно-хроматографических методов для определения метаболитов и антибактериальных лекарственных средств. Рассматриваются возможности миниатюризированных способов жидкостной экстракции и определения действующих веществ, применимых с целью контроля качества и чистоты фармацевтического оборудования после производственного цикла. Формулируются цель и задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы, в котором дана общая характеристика некоторых метаболитов (17 β -эстрадиол, мелатонин) и антибактериальных лекарственных средств (энрофлоксацин, колистин, тилмикозина фосфат), описываются их химико-фармацевтические свойства и номенклатура препаратов, представленная на фармацевтическом рынке. Рассматриваются существующие подходы фармацевтического анализа к микроэкстракционному извлечению действующих веществ. Представлены основные методы определения действующих веществ в различных объектах. В заключении главы обосновывается актуальность создания новых методик микроэкстракционно-хроматографического определения метаболитов и антибактериальных лекарственных средств.

Глава 2. Экспериментальная часть

Во второй главе приведено описание средств измерений, оборудования, реактивов и материалов. Описаны процедуры приготовления растворов реагентов, схемы пробоподготовки и условия микроэкстракционного извлечения действующих веществ. Приведены условия и методики хроматографических определений отдельно для каждого соединения.

Глава 3. Микроэкстракционное извлечение метаболитов с последующим ВЭЖХ-УФ определением

Извлечение 17 β -эстрадиола микроэкстракцией с ВЭЖХ-УФ определением. Жидкостная хроматография на сегодняшний день - наиболее универсальный инструмент для фармацевтического анализа, который обеспечивает достаточную селективность, чувствительность и производительность. Однако, в силу того, что лекарственные препараты содержат помимо действующих веществ и вспомогательные, требуется дополнительное включение в общую схему фармацевтического анализа стадии пробоподготовки, которая кроме растворения проб может предполагать извлечение и концентрирование действующих веществ из твердофазных проб и/или их экстракцию из приготовленных растворов.

Для сокращения расходов экстрагентов и повышения коэффициентов концентрирования предложен способ дисперсионной микроэкстракции в каплю экст-

рагента с последующей кристаллизацией экстракта, предусматривающий диспергирование экстрагента в водной фазе. При этом происходит образование гидрофильной эмульсии и массоперенос действующего вещества в диспергированную фазу экстрагента.

В качестве экстрагента для извлечения 17β -эстрадиола был выбран длинноцепочечный спирт - 1-додеканол, который имеет ограниченную растворимость в водной фазе (0,004 г/л), низкую летучесть и температуру кристаллизации близкую к комнатной (температура плавления 24 ± 2 °С). Перечисленные свойства позволили его применять в дисперсионной жидкостной микроэкстракции с кристаллизацией экстракта.

С целью достижения максимальной степени извлечения 17β -эстрадиола были оптимизированы такие параметры как, температура нагрева, объем экстрагента и объем раствора пробы. Температура играет ключевую роль для фазового перехода и диспергирования экстрагента. Удовлетворительное извлечение гормона и минимальное значение относительного СКО (5 %) обеспечила температура 70°С (рис. 1).

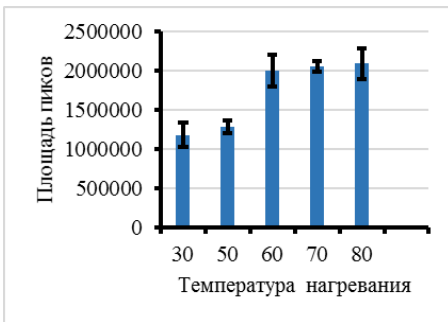


Рисунок 1 – Влияние температуры на эффективность микроэкстракции 17β -эстрадиола (10 мг/л, объем водной фазы – 3 мл, объем органической фазы – 60 мкл, время перемешивания 15 мин, 700 об/мин)

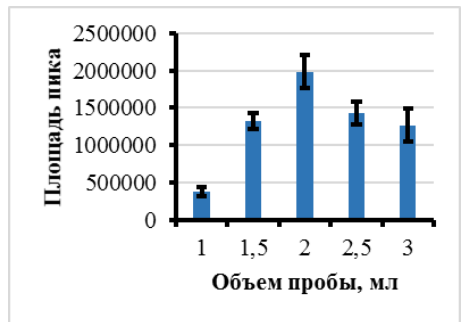


Рисунок 2 – Влияние объема раствора пробы на эффективность микроэкстракции 17β -эстрадиола (10 мг/л, объем органической фазы – 60 мкл, время перемешивания 15 мин, 700 об/мин)

Было изучено влияние объема раствора пробы и экстрагента на эффективность микроэкстракции (рис. 2). Объем экстрагента 50 мкл обеспечивал самые высокие значения площади хроматографических пиков при перемешивании фаз в течение 10 мин.

В данной работе для определения 17β -эстрадиола был реализован новый подход к диспергированию и выделению органической фазы. Способ предполагает *in-situ* генерирование фазы экстрагента и его диспергирование в результате вращения диска. В водную эмульсию препарата помещают вращающийся хлопковый диск с интегрированным вкладышем магнитной мешалки и удерживающий

в закристаллизованном виде 1-додеканол (рис. 3). Поскольку плотность экстракта меньше плотности водной фазы, органическая фаза выделялась в форме капли в центральном вихре в водной фазе при нагревании экстракционной системы (70°C). Для кристаллизации экстракта стеклянный флакон помещали в криостат (-5°C, 5 мин). После этого твердую фазу экстракта (в форме капли) переносили в другой сосуд, растворяли в 100 мкл метанола при комнатной температуре и вводили приготовленный раствор в систему ВЭЖХ-УФ. Схематичное изображение изготовления хлопковых дисков для проведения процедуры микроэкстракции представлено на рисунке 4.

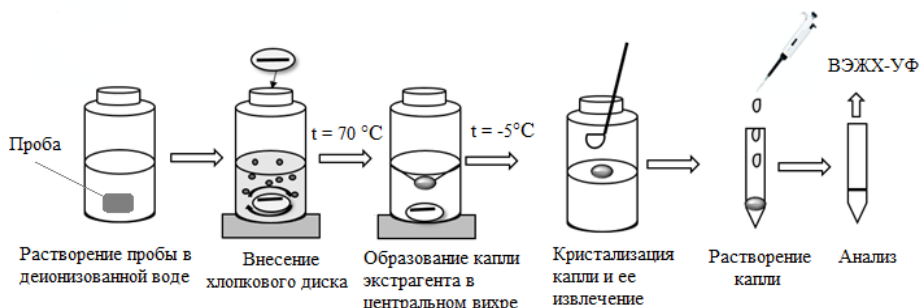


Рисунок 3 – Схема проведения дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующей кристаллизацией экстракта

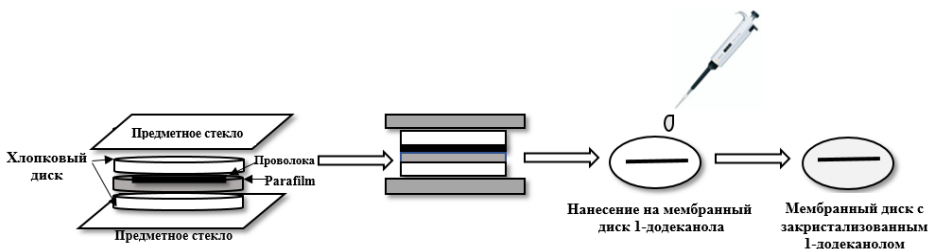


Рисунок 4 – Схематичное изображение изготовления хлопкового диска

На основе полученных результатов разработан оригинальный способ определения 17 β -эстрадиола в трансдермальных гелях. Для количественного определения обоснованы и подобраны условия хроматографического разделения 17 β -эстрадиола в изократическом режиме (ацетонитрил – вода 60:40, об.%). Предложенный способ ВЭЖХ-УФ определения 17 β -эстрадиола в лекарственных препаратах позволяет упростить процедуру пробоподготовки, сократить расход экстрагентов (на одно определение требуется 50 мкл экстрагента). Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» (табл. 1). Градуировочный график для 17 β -эстрадиола линеен в диапазоне концентраций от 0,1 до 15,0 мг/л ($S = 64,4\text{C}$, $r^2=0,9996$). Достигнут предел обнаружения (3σ) 0,03 мг/л.

Таблица 1 – Результаты определения 17 β -эстрадиола в лекарственных препаратах (n=3, P=0,95)

Лекарственный препарат	Введено, мг/г	Найдено, мг/г	Степень извлечения, %
Дивигель (1,0 мг/г)	0	1,11 \pm 0,16	-
	0,80	1,68 \pm 0,65	71,3
	1,60	2,52 \pm 0,93	88,1
Эстрожель (0,6 мг/г)	0	0,57 \pm 0,28	-
	1,60	1,98 \pm 0,59	88,8

Микроэкстракционное извлечение мелатонина при использовании глубоких эвтектических растворителей. ГЭР представляют собой смеси, состоящие из акцептора и донора водородной связи, благодаря чему находятся в жидком состоянии при комнатной температуре. В качестве акцептора водородной связи наиболее часто выступают четвертичные аммониевые соли (хлорид холина, хлорид тетраметиламмония), а донорами являются органические соединения, имеющие карбоксильную, карбамидную, гидроксильную или аминогруппу (карбоновые кислоты, амины, спирты, сахараиды). ГЭР нашли широкое применение благодаря простоте приготовления, экологической безопасности и биоразлагаемости.

Были изучены экстракционные свойства гидрофобных эвтектических растворителей по отношению к мелатонину. При этом оценивалась возможность применения ГЭР, приготовленных при сплавлении ментола, высших карбоновых кислот и спиртов (рис. 5). Выбранные прекурсоры имеют ограниченную растворимость в водной фазе, поэтому образующиеся эвтектические растворители проявляют гидрофобные свойства и являются устойчивыми при контакте с водным раствором аналита. Ментол образует гидрофобный ГЭР в смеси с гексановой, гептановой, октановой кислотами, а также с гексанолом-1, гептанолом-1, октанолом-1.

Механизм экстракции может быть обусловлен образованием водородных связей между прекурсорами ГЭР и мелатонином. Извлечение мелатонина проводили при pH 6,0. Были приготовлены ГЭР на основе гептановой кислоты и ментола в разных мольных соотношениях (рис. 6). Как видно, наибольшая степень извлечения наблюдается в ГЭР, содержащий гептановую кислоту и ментол при соотношении 3:1. Установлено, что система гептановая кислота:ментол с соотношением 1:3 кристаллизуется при температуре -4 $^{\circ}$ C в течение 2 мин, в то время как непосредственно гептановая кислота не обладает такими свойствами.

В ходе исследований были оптимизированы следующие параметры: состав ГЭР, влияние объема экстрагента, времени экстракции, объема пробы (рис. 7). Объем экстрагента, равный 25 мкл, обеспечивал наиболее эффективную экстракцию, минимальный расход экстрагента и высокую воспроизводимость результатов (ОСКО 2%). При изучении влияния времени экстракции на ее эффективность было установлено, что при ее продолжительности 3 мин наблюдается высокая степень извлечения и хорошая воспроизводимость результатов (ОСКО 2%).

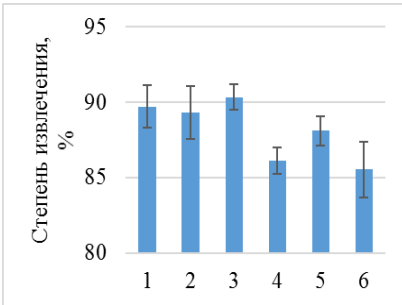


Рисунок 5 – Влияние природы ГЭР на извлечение мелатонина: 1 - гексановая кислота:ментол, 2 - 1-гексанол:ментол, 3 - гептановая кислота:ментол, 4 - 1-гептанол:ментол, 5 - октановая кислота:ментол, 6 - 1-октанол:ментол (соотношения 1:1, $n=3$, $V_{\text{раствора}}=100$ мкл, $V_{\text{ГЭР}}=100$ мкл, $C_{\text{мелатонина}}=10$ мг/л)

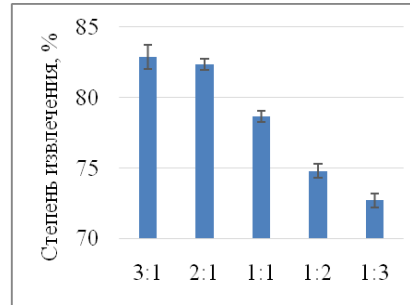
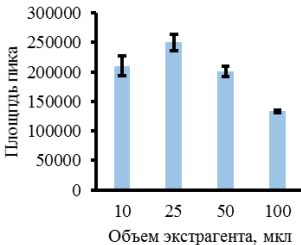
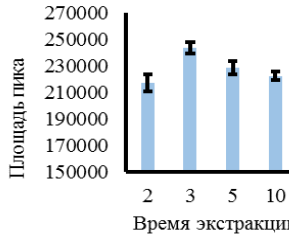


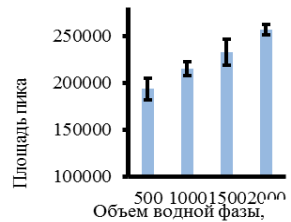
Рисунок 6 – Влияние соотношения компонентов ГЭР (гептановая кислота:ментол) на извлечение мелатонина ($n=3$, $V_{\text{раствора}}=100$ мкл, $V_{\text{ГЭР}}=100$ мкл, $C_{\text{мелатонина}}=10$ мг/л)



А



Б



В

Рисунок 7 – Влияние на извлечение мелатонина: объема экстрагента (А), времени экстракции (Б) и объема водной фазы (В) ($n=3$, $V_{\text{раствора}}=1$ мл, $V_{\text{ГЭР}}=25$ мкл, $C_{\text{мелатонина}}=10$ мг/л)

Также выявлено, что при объеме водной фазы 2000 мкл наблюдается максимальный аналитический сигнал при минимальном ОСКО (меньше 2 %). Условия хроматографического анализа были подобраны экспериментально, для разделения вспомогательных веществ и действующего вещества в составе лекарственного препарата использовали хроматографическую колонку Supelco C18, 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм и градиентный режим элюирования (рис. 8).

На основании проведенных исследований была разработана новая миниатюрная процедура предварительного концентрирования для фармацевтического анализа, основанная на микроэкстракции в ГЭР (рис. 9). Показано, что магнитное перемешивание фазы ГЭР в водной фазе образца позволяет обеспечить быстрый массоперенос без использования каких-либо диспергирующих растворителей. Для микроэкстракции мелатонина было показано, что перемешивание фаз в течение 1 мин обеспечивает достижение равновесия с извлечением до 90,0 %. Более

того, способ кристаллизации экстракта позволил воспроизводимо извлекать его небольшой объем (25 мкл).

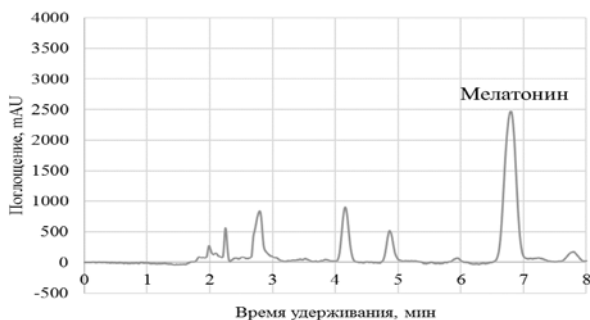


Рисунок 8 - Хроматограмма пробы препарата «Меларена» (концентрация мелатонина – 10 мг/л). Градиентный режим – 0,1% ортофосфорная кислота-ацетонитрил с увеличением содержания CH_3CN от 30 до 90 об.%.

Изучены гидрофобные ГЭР на основе ментола, среднецепочечных жирных кислот и длинноцепочечных спиртов для извлечения мелатонина. ГЭР на основе ментола и гептановой кислоты характеризовался стабильностью в водной фазе и превосходными свойствами для извлечения мелатонина. Процедура микроэкстракции для выделения мелатонина из матриц образцов была объединена с методом ВЭЖХ-УФ и применена для его определения в реальных образцах лекарственных препаратов. Градуировочная зависимость, построенная по площадям пиков мелатонина линейна в диапазоне концентраций 0,1 – 50 мг/л ($S = 25195C - 5664$, $r^2 0,9999$). Предел обнаружения (3σ) равен 0,03 мг/л. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» и при использовании референтных методик (табл. 2).

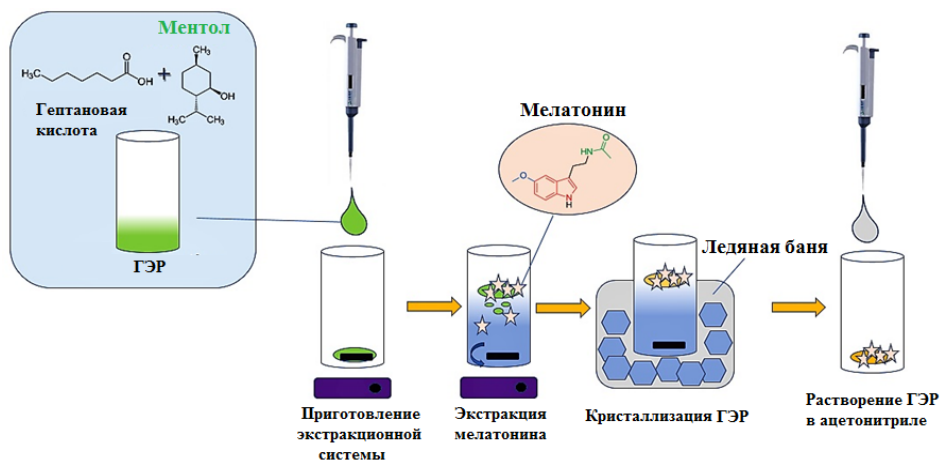


Рисунок 9– Схема микроэкстракционного извлечения мелатонина

Таблица 2 – Результаты определения мелатонина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках методом «введено-найдено» (n = 3; P = 0,99)

Проба	Уровень концентрации, мг/г	Найдено, мг/г		F-критерий	t-критерий	Открываемость, %
		Разработанный способ	Метод сравнения			
БАД 1	8,3	8,6±0,4	9,1±0,2	2,14	4,37	104±4
БАД 2	8,3	7,1±1,4	8,4±0,5	4,91	4,37	85±14
Лекарственный препарат «Меларена»	12,0	11,8±1,8	10,2±0,9	3,80	3,57	98±4
Лекарственный препарат «Меларена»	0,3	0,32±0,05	0,30±0,02	5,32	1,43	105±16

Глава 4. Микроэкстракционно-хроматографическое определение антибактериальных лекарственных средств в ветеринарных фармацевтических препаратах

Микроэкстракционно-хроматографическое определение энрофлоксацина.

Разработана экспрессная методика совместного количественного определения антибиотиков энрофлоксацина и колистина сульфата методом ВЭЖХ-УФ. Валидацию методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в рамках повторяемости (сходимости) и внутрилабораторной воспроизводимости. Правильность разрабатываемой методики оценивали методом «введено-найдено» (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты валидации по параметру «Правильность»

Энрофлоксацин				Колистина сульфат		
№	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Степень извлечения, %	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Степень извлечения, %
1	101,8	101,54	99,74	52,4	51,84	98,92
2	101,8	102,03	100,22	52,4	52,21	99,65
3	101,8	102,38	100,57	52,4	53,22	101,57
4	101,8	102,98	101,16	52,4	52,12	99,46
5	101,8	102,52	100,71	52,4	52,27	99,74
6	101,8	103,77	101,94	52,4	52,37	99,95
Среднее содержание, %			102,54	52,34		
Стандартное отклонение, %			0,76	0,90		
Относительное стандартное отклонение, %			0,74	1,72		

Согласно полученным данным, параметр «Специфичность» соответствует заявленным критериям приемлемости и на хроматограмме растворителя и плацебо отсутствуют пики при времени удерживания энрофлоксацина и колистина сульфата. Линейные зависимости площади пика от концентрации описываются уравнением регрессии для:

энрофлоксацина $S = 3703,9 C$ (мг/мл)

($r^2 = 0,9999$);

колистина сульфата E1 $S = 3737,2 C$ (мг/мл)

($r^2 = 0,9996$);

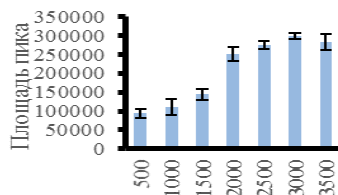
колистина сульфата E2: $S = 1607,6 C$ (мг/мл)

($r^2 = 0,9987$).

Относительное стандартное отклонение согласно результатам испытания «Внутрилабораторная воспроизводимость» составляет 0,0076 для энрофлоксацина и 0,009 для колистина сульфата. Валидированная методика в дальнейшем была использована для определения энрофлоксацина после процедуры микроэкстракции.

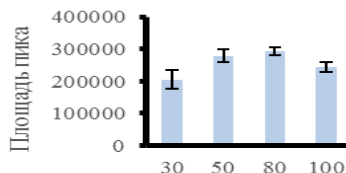
С целью повышения коэффициентов концентрирования энрофлоксацина в промывных водах после очистки производственного оборудования предложен способ дисперсионной микроэкстракции в каплю экстрагента с последующей кристаллизацией экстракта. Для микроэкстракционного выделения энрофлоксацина показана возможность применения 1-додеканола в качестве экстрагента.

Было изучено влияние температуры на процесс экстракции, времени, объема пробы и экстрагента на эффективность экстракции (рис. 10). По итогам исследований разработан вариант дисперсионной жидкостной микроэкстракции, предполагающий диспергирование экстрагента в водном растворе пробы при вращении хлопкового диска, оснащенного вкладышем магнитной мешалки, с последующей кристаллизацией экстракта.



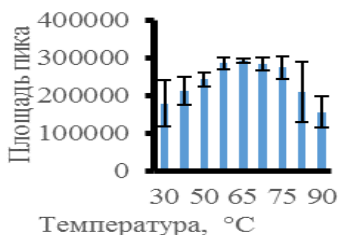
Объем водной фазы, мкл

A



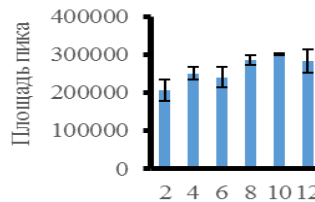
Объем экстрагента, мкл.

B



Температура, °C

B



Время экстракции, мин.

Г

Рисунок 10 – Влияние объема водной фазы (А), объема экстрагента (Б), температуры (В), времени экстракции (Г) на эффективность микроэкстракции энрофлоксацина ($n=3$, объем экстрагента 80 мкл, объем раствора 3000 мкл, время перемешивания 10 мин, 650 об/мин)

Хроматограмма лекарственного препарата после микроэкстракционного выделения представлена на рис. 11. Предложенный способ ВЭЖХ-УФ определения энрофлоксацина в водных пробах позволяет упростить процедуру пробоподготовки, сократить расход экстрагентов (на одно определение требуется 80 мкл экстрагента), не требует предварительного центрифугирования образцов. Градуировочный график линейен в диапазоне концентраций от 42 до 996 мкг/мл и описывается уравнением регрессии ($S=372С$; $r^2=0,9992$). Предел обнаружения (3σ) составил 0,03 мг/мл. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» (табл. 4).

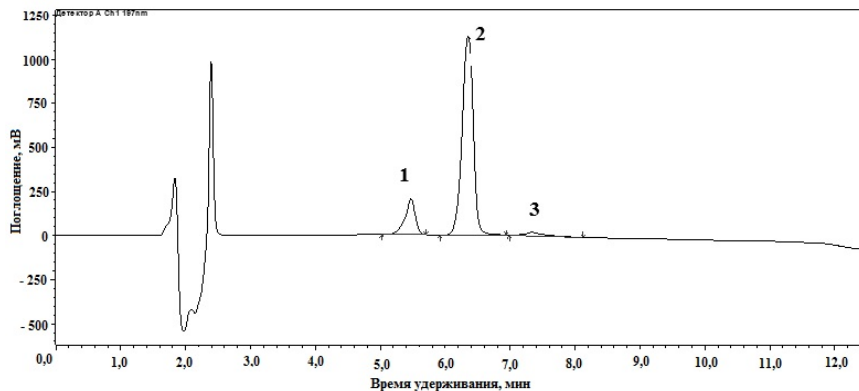


Рисунок 11 – Хроматограмма лекарственного препарата после микроэкстракционного выделения при длине волны 197 нм (энрофлоксацин (1), бензиловый спирт (2), колистин сульфат E1 (3). Концентрация энрофлоксацина – 1000 мкг/мл, колистина сульфата E1 – 500 мкг/мл. Градиентный режим: 0,05% трифторуксусная кислота - ацетонитрил с увеличением содержания CH_3CN от 20 до 30 об.%.

Таблица 4 – Результаты определения энрофлоксацина в водных пробах ($n=3$, $P=0,95$)

№ пробы	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Степень извлечения, %
1	1,73	1,72±0,18	99,51
2	1,79	1,67±0,20	93,89
3	1,74	1,67±0,21	95,82
Среднее			96,41
Стандартное отклонение, %			2,86
Относительное стандартное отклонение, %			2,96

Микроэкстракция тилмикозина фосфата с последующим хроматографическим определением. Разработана методика количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-УФ с целью обеспечения контроля качества выпускаемой продукции.

Были подобраны условия хроматографического анализа для хорошего разрешения пиков *транс*- и *цис*-изомеров тилмикозина фосфата. Разделение проводили при изократическом режиме элюирования (2,5% триэтиламин - ацетонитрил, 70:30 об.%), при этом время одного анализа составило не более 5 минут. Методика была валидирована по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Результаты валидации по параметру «правильность» представлены в таблице 5. Подтверждение специфичности проводили сравнением хроматограмм растворителя, раствора плацебо и стандартного раствора. Вспомогательные компоненты не оказывали мешающего влияния при определении действующего вещества. При оценке внутрилабораторной воспроизводимости относительное стандартное отклонение результатов шести определений составило не более 2,0 %.

Градуировочные зависимости описывались уравнениями $S = 20625 C$ (мг/мл) + 105370 ($r^2=0,9996$) для *цис*-изомера тилмикозина и $S = 2969C$ (мг/мл) + 10166 ($r^2=0,9997$) для *транс*-изомера тилмикозина.

Методика была апробирована для количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственном препарате «Тилмикозин ВЛ 25» и в дальнейшем использована после микроэкстракционного выделения тилмикозина фосфата из водных проб.

Таблица 5 – Результаты валидации по параметру «Правильность»

Введено					Найдено		Метрологические характеристики
<i>С цис</i> -изомера, мг/мл	<i>С транс</i> -изомера, мг/мл	<i>С цис</i> -изомера	<i>С транс</i> -изомера	ΣS_i	<i>С цис</i> -изомера, мг/мл	<i>С транс</i> -изомера мг/мл	
214	36,5	2140867	320437	2461304	214	36,7	$x = 250$
214	36,5	2114662	330563	2445225	214	36,7	$S = 0,99$
214	36,5	2085032	314352	2399384	213	36,4	$Sx = 0,39$
214	36,5	2084385	312011	2396396	213	36,5	$\varepsilon\alpha = 1,73$
214	36,5	2087975	317515	2405490	213	36,4	$A = \pm 1,73\%$
214	36,5	2130745	327552	2458297	215	36,7	$\Delta = 250,35 \pm 1,73\%$

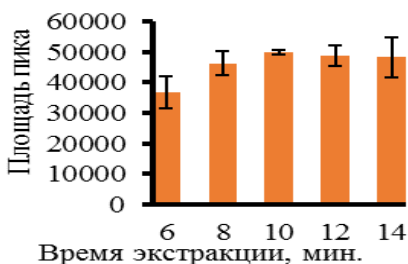
С целью повышения коэффициентов концентрирования тилмикозина фосфата в растворах предложен метод дисперсионной микроэкстракции в каплю экстрагента с последующей кристаллизацией экстракта. Способ предполагает диспергирование экстрагента в водной фазе.

В ходе исследований удалось создать унифицированный подход к экстрагированию 17 β -эстрадиола, энрофлоксацина и тилмикозина. Все вышеупомянутые соединения являются достаточно гидрофобными, как и сам длинноцепочечный спирт - 1-додеканол. Log P (октанол/вода) для 17 β -эстрадиола – 4,01, энрофлок-

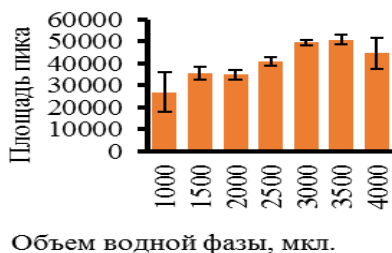
сация -4,7, тилмикозина фосфата – 4,19, экстрагента 1-додеканол – 5,36. В данном случае выбранный экстрагент универсален для этих соединений и применим в дисперсионной жидкостной микроэкстракции.

Для приготовления хлопковых дисков использовали схему, аналогичную для энрофлоксацина и 17 β -эстрадиола. На заранее подготовленные хлопковые диски наносили 1-додеканол и замораживали его для дальнейшей процедуры микроэкстракционно-хроматографического определения тилмикозина фосфата. Поиск условий экстракции проводился по таким параметрам как: время экстракции, объем пробы, температура, объем экстрагента.

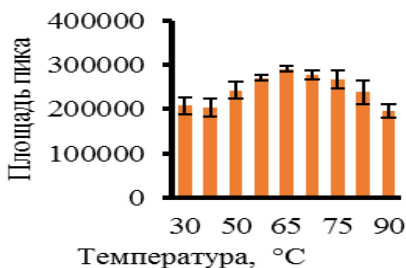
При изучении влияния времени экстракции на эффективность извлечения установлено, что при ее продолжительности 10 мин наблюдается высокая степень извлечения и хорошая воспроизводимость результатов (рис. 12А). Было также изучено влияние объема раствора пробы на процедуру микроэкстракции тилмикозина фосфата (рис. 12Б). Экспериментально показано, что при температуре +65 $^{\circ}$ C (рис. 12В) достигаются наибольшие площади пиков и значения СКО при этом были менее 2,0 %. Установлен объем экстрагента, достаточный для полного экстрагирования действующего вещества. При его значении 80 мкл, обеспечивается наиболее высокая эффективность экстракции и воспроизводимость результатов (рис. 12Г).



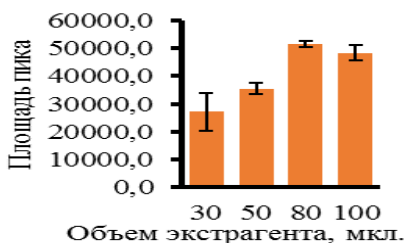
А



Б



В



Г

Рисунок 12 – Влияние времени экстракции (А), объема водной фазы (Б), температуры (В) и объема экстрагента (Г) на эффективность микроэкстракции тилмикозина фосфата (n=3, объем пробы 3000 мкл, время перемешивания 10 мин, 640 об/мин)

На основе полученных результатов был разработан способ микроэкстракционно-хроматографического определения тилмикозина фосфата в водных пробах. Правильность полученных результатов подтверждали методом «введено-найдено» (табл. 6). Хроматограмма после микроэкстракционного извлечения тилмикозина фосфата представлена на рисунке 13.

Градуировочные графики, построенные по площадям тилмикозина фосфата, линейны в диапазоне концентраций от 2 до 250 мкг/мл (для *цис*-изомера: $S = 471C$, $r^2 = 0,9984$, для *транс*-изомера: $S = 73,7C$, $r^2 = 0,9984$).

Таблица 6 – Результаты определения тилмикозина фосфата в водных пробах ($n=3$, $P=0,95$)

Проба №	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения, %
1	108,33	98,72±9,62	91,13
2	91,67	88,09±5,15	96,09
3	100,00	93,89±7,32	93,89
Среднее			93,70
Стандартное отклонение, %			2,49
Относительное стандартное отклонение, %			2,65

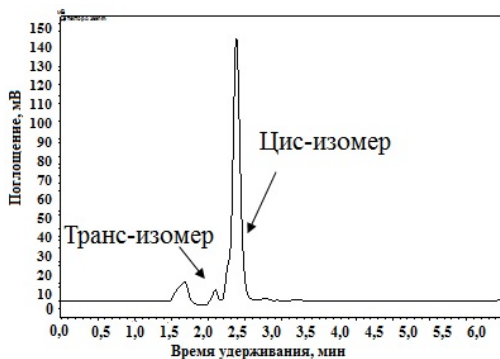


Рисунок 13 – Хроматограмма тилмикозина фосфата после микроэкстракционного выделения (концентрация тилмикозина фосфата – 100 мкг/мл, длина волны – 289 нм)

Предложенные способы микроэкстракционного выделения энрофлоксацина и тилмикозина фосфата с последующим определением действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ были апробированы для оценки остаточного содержания антибактериальных лекарственных препаратов на поверхности оборудования.

После завершения очистки оборудования производили отбор проб с поверхности оборудования методом мазков и промывных вод. Отобранные пробы подвергались процедуре микроэкстракции с 1-додеканолом в качестве экстрагента для действующих веществ. Затем затвердевшую органическую каплю пробы рас-

творяли в метаноле и анализировали методом ВЭЖХ-УФ (рис. 14). Экспериментальные результаты с использованием референтных способов представлены в таблице 7. Полученные результаты удовлетворяют заявленному критерию приемлемости и свидетельствует о приемлемой степени очистки поверхности оборудования, контаминирующих с продуктами.

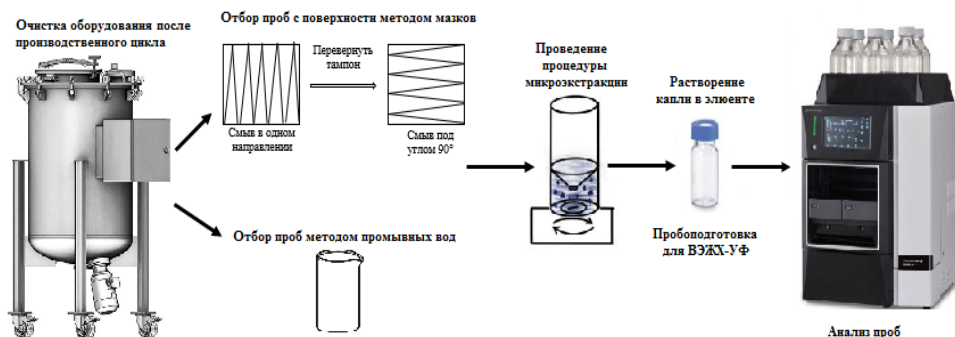


Рисунок 14 – Процедура контроля чистоты технологического оборудования

Таблица 7 – Результаты определения тилмикозина фосфата в смывах с оборудования после производства (n=3, P=0,95)

Проба	Найдено <i>цис</i> -изомера по разработанной методике, мкг/мл	Найдено <i>цис</i> -изомера по методике сравнения, мкг/мл
1, метод мазков	6,09 ± 0,71	5,14 ± 2,67
2, метод мазков	5,54 ± 2,74	5,17 ± 2,87
3, метод мазков	5,29 ± 1,55	4,35 ± 1,47
Метод промывных вод	2,26 ± 4,27	-

Таким образом, экспериментально была показана применимость унифицированного подхода к микроэкстракции энрофлоксацина и тилмикозина фосфата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенных исследований, можно сделать следующие выводы и заключения:

1. Обоснованы и оптимизированы условия извлечения 17β-эстрадиола из лекарственных препаратов методом дисперсионной жидкостной микроэкстракции с последующим его определением методом обращено-фазовой ВЭЖХ с пределом

обнаружения (3σ) 0,03 мг/л. При этом степень извлечения 17β -эстрадиола составила 90 %, а коэффициент концентрирования 36. Аналитические возможности разработанного способа продемонстрированы на примере определения 17β -эстрадиола в трансдермальных гелях.

2. Обоснована возможность применения глубоко эвтектических растворителей (ГЭР) на основе ментола и гептановой кислоты в качестве экстрагентов для реализации жидкостной микроэкстракции мелатонина. Разработан способ микроэкстракционного извлечения мелатонина из лекарственных препаратов в ГЭР с его последующим определением методом ВЭЖХ-УФ с пределом обнаружения (3σ) 0,03 мг/л. В оптимальных условиях диапазон определяемых концентраций мелатонина составляет 0,1 – 50 мг/л.

3. Оптимизированы условия хроматографического разделения и совместного определения ветеринарных антибактериальных препаратов энрофлоксацина, колистина и тилмикозина в варианте обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с УФ детектированием. Установлены валидационные параметры, соответствующие требованиям для фармацевтического анализа.

4. Изучена возможность извлечения энрофлоксацина и тилмикозина из лекарственных препаратов методом жидкостной микроэкстракции, с последующим определением действующих веществ методом ВЭЖХ-УФ. При этом разработана простая процедура их пробоподготовки, позволяющая сократить расход используемых экстрагентов (на одно определение требуется 80 мкл экстрагента), обеспечивающая высокую эффективность выделения (степени извлечения 94-96%) с пределом обнаружения 0,015-0,03 мг/мл.

5. Разработан унифицированный подход к микроэкстракции 17β -эстрадиола, энрофлоксацина и тилмикозина фосфата. Разработанные подходы были успешно апробированы при анализе лекарственных препаратов, в контроле чистоты фармацевтического оборудования с подтверждением правильности получаемых результатов.

Перечисленные методы микроэкстракционного выделения при использовании жидкостной микроэкстракции в ходе исследований продемонстрировали высокую эффективность. Согласно полученным данным, можно сделать заключение о том, что в рамках данной диссертационной работы реализованы новые способы микроэкстракционного извлечения ряда метаболитов и антибактериальных лекарственных препаратов с последующим ВЭЖХ определением, перспективные в плане применимости для контроля качества лекарственных препаратов и в рамках валидации очистки фармацевтического оборудования при производстве лекарственных средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций:

1. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Разработка и валидация методики количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-УФ / З.Р. Якупова, С.Ю. Гармонов, Н.Н. Насибов, И.М. Исламгалиева // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2022. – Т. 37. – № 3. – С.25-32.

2. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Микроэкстракционное выделение 17-β-эстрадиола из лекарственных препаратов для последующего ВЭЖХ-УФ-определения / З.Р. Якупова, С.А. Лебединец, К.С. Вах, С.Ю. Гармонов, А.В. Булатов // Журнал аналитической химии. –2022. – Т.77. – №.3. – С.263-268.

3. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Микроэкстракционное выделение энрофлоксацина для последующего определения в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ / З.Р. Якупова, С.Ю. Гармонов, К.С. Вах, А.В. Булатов // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2022. – Т. 38. – №.4. – С.4-14.

4. **Yakupova (Gizatulina), Z.** Solidified floating organic drop microextraction procedure based on deep eutectic solvent for the determination of melatonin in pharmaceuticals and dietary supplements / Z. Yakupova, A. Yakubenko, P. Bogdanova, P. Godunov, S. Vakh, S. Garmonov, A. Bulatov // Microchemical Journal. – 2023. – V.187. – P. 108373 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108373>

Статьи и тезисы докладов:

1. Гармонов, С.Ю. Методы оценки фенотипов метаболизма лекарственных средств для персонализированной медицины / С.Ю. Гармонов, **З.Р. Якупова (Гизатулина)**, Т.А. Киселева // Сборник материалов XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М.: Видокс, 2020. – С.6.

2. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Подходы по унификации методик контроля качества в процессе фармацевтической разработки лекарственных средств / З.Р. Якупова, Н.Н. Насибов, С.Ю. Гармонов // Сборник материалов школы-конференции по медицинской химии (МедХимРар-21). - Химки: Группа компаний ХимРар, 2021. – С. 86.

3. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** ВЭЖХ-УФ определение эстрадиола в лекарственных препаратах с предварительным микроэкстракционным выделением [Электронный ресурс] / З.Р. Якупова, С.А. Лебединец // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021». - М.: МАКС Пресс, 2021. https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2021/data/section_39_21986.htm (дата обращения: 08.01.2023).

4. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Современный подход к контролю качества лекарственных средств на основе 17- β -эстрадиола / З.Р. Якупова, С.А. Лебединец, К.С. Вах, С.Ю. Гармонов, А.В. Булатов // Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2021. – С.154-157.

5. **Якупова (Гизатулина), З. Р.** Фармацевтический анализ производных эстрадиола в трансдермальных лекарственных формах / З.Р. Якупова, К.С. Лебединец, С.Ю. Гармонов, А.В. Булатов // Сборник тезисов 27-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Белые цветы». – Казань, 2021. – С.1104.

6. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Унификация методик контроля качества лекарственных средств в процессе их фармацевтической разработки / З.Р. Якупова, Р.Ф. Фазлиев, С.Ю. Гармонов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т.21. – №.S2. – С.83-84.

7. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Применение глубокоэвтектических растворителей для микроэкстракции в фармацевтическом анализе замещённых триптамина / З.Р. Якупова, К.С. Вах, С.Ю. Гармонов, А.В. Булатов // Тезисы докладов IV Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) . – Казань: ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 2022. – С.115.

8. **Якупова (Гизатулина), З.Р.** Микроэкстракционное выделение энрофлоксацина с последующим хроматографическим определением / З.Р. Якупова, К.С. Вах, С.Ю. Гармонов, А.В. Булатов // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные решения приоритетных задач токсикологии и биотехнологии». – Казань: Альянс, 2022. – С.178 - 180.

Автор работы выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н., профессору С.Ю. Гармонову, научному консультанту д.х.н., профессору А.В. Булатову, к.х.н., доценту К.С. Вах за руководство и помощь при выполнении и написании работы; к.х.н. А.С. Почивалову, С.А. Лебединец, А.А. Якубенко за помощь при оптимизации микроэкстракционного выделения и хроматографического анализа; ресурсному центру «Методы анализа состава вещества» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» и компании ООО «Ветлайн».