

# РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-ЭСИ-МС МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОЛИНИЙ 2-(5-(ПИРИДИН-4-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛТИО)АЦЕТАТА В ЯЙЦАХ ПТИЦЫ

Борис А. Варинский, Владимир В. Парченко, Евгений Г. Кныш,  
Александр И. Панасенко, Андрей Г. Каплаушенко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-ЭСИ-МС, морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат, «Авесстим», яйца птицы, валидация

## Введение

Производные 1,2,4-триазола проявляют различные виды биологической активности. В настоящее время разработан ряд лекарственных препаратов, содержащих производные 1,2,4-триазола в качестве активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Они обладают антиоксидантной, гепатопротекторной и другими видами активности, некоторые из них зарегистрированы и активно используются в ветеринарии («Авесстим») [1]).

Применение препарата «Авесстим» в оптимальных дозах активизирует отдельные биохимические процессы в клетках, оказывает антиоксидантное, иммуномодулирующее, противовоспалительное, гепатопротекторное и детоксикационное действие, нормализует обмен веществ. Препарат усиливает специфический иммунный ответ на введение вакцин, повышает резистентность организма к заболеваниям вирусной этиологии. Препарат назначают цыплятам, молодняку кур-несушек, индюшатам, утятам, гусятам, перепелам для повышения общей резистентности организма, активизации иммунного ответа в ходе вакцинации, ослабления поствакцинальных осложнений, а также для неспецифической профилактики вирусных и смешанных респираторных заболеваний.

Активным фармацевтическим ингредиентом противовирусного препарата «Авесстим» является морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат.

Различные методики с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрической (МС) детекцией для количественного определения АФИ ветеринарных препаратов в яйцах птицы описаны в ряде публикаций [2 – 4].

Нами ранее было предложено определять остаточные количества АФИ препарата «Трифузол» в мясе птицы с помощью метода ВЭЖХ с диодноматричной и МС-детекцией [5].

Для определения АФИ препарата «Авесстим» в сыворотке крови, мясе и органах птицы авторами [6] была предложена спектрофотометрическая методика – она является малоселективной и низко чувствительной.

**Целью данного исследования** является разработка и валидация ВЭЖХ-МС-методики, позволяющей контролировать остаточные количества морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата в яйцах птицы.

## Материалы и методы исследования

*Вещества и реагенты.* В работе были использованы морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат фармакопейной чистоты, ацетонитрил квалификации «для градиентной ВЭЖХ» (Lab-Scan, Gliwice, Poland) и муравьиная кислота 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Высокоочищенная вода (18 MΩ при температуре 25°C) была получена с помощью системы очистки воды Direct Q 3UV (Millipore, Molsheim, France).

*Оборудование:*

- хроматограф Agilent 1260 Infinity HPLC System (дегазатор, бинарный насос, автосамплер);
- одноквадрупольный масс-спектрометр Agilent 6120 (ионизация API-ES);
- программное обеспечение – OpenLAB CDS.

*Условия хроматографирования:*

- колонка –  $\varnothing 4,6 \times 30$  мм, с соответствующей предколонкой –  $\varnothing 4,6 \times 5$  мм, обращенная фаза Zorbax SB C18, 1,8 мкм (Agilent Technologies),;
- температура колонки – 40°C;
- элюент А – 0,1% (v/v) HCOOH в H<sub>2</sub>O;
- элюент В – 0,1% (v/v) HCOOH в CH<sub>3</sub>CN;
- скорость подвижной фазы – 400 мкл/мин;
- режим элюирования – изократический, 5% В;
- объем инъекции – 5 мкл;
- общее время хроматографирования – 5 мин.

*Условия масс-спектрометрического детектирования:*

- режим селективного мониторинга ионов (SIM), сканирование в диапазоне m/z 237,0;
- позитивная полярность;
- газ-осушитель – азот (скорость – 10 л/мин);
- напряжение на капилляре – 4000 В;
- температура газа-осушителя – 300°C;
- напряжение на фрагментаторе – 144 В;
- давление на небулайзере – 50 psig.

*Процедура пробоподготовки (схема 1).* Исследуемые образцы яиц гомогенизируют с помощью миксера. К 200 мг яичного гомогената (точная навеска) добавляют 100 мкл воды, перемешивают в течение 15 мин на ультразвуковой ванне, добавляют 1,00 мл диметилсульфоксида (ДМСО), перемешивают и экстрагируют в течение 15 мин на ультразвуковой ванне, центрифугируют при 15000g в течение 10 мин и фильтруют через нейлоновый шприцевой фильтр (внутренний диаметр 13 мм, размер пор 0,2 мкм).

*Приготовление растворов и образцов.* Раствор А: 0,01000 г морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата переносили в мерную колбу емкостью 100,0 мл, растворяли в небольшом количестве воды и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (концентрация 100 мкг/мл).

*Раствор В:* 10,00 мл раствора А переносили в мерную колбу емкостью 100,0 мл и доводили объем раствора водой до метки (концентрация 10 мкг/мл).

Для приготовления модельных смесей получали гомогенат яиц с помощью миксера.

Для проверки специфичности/селективности готовили 5 бланк-образцов: 100 мкл воды добавляли с помощью пипет-дозатора к 200 мг яичного гомогената и взвешивали. Выполняли анализ бланк-образцов в соответствии со схемой 1, начиная с этапа 3.

Для проверки линейности готовили 6 калибровочных образцов: 10 мкл, 20 мкл, 40 мкл, 50 мкл, 80 мкл или 100 мкл раствора В добавляли с помощью пипет-дозатора к 200 мг яичного гомогената и взвешивали, затем к этим смесям добавляли 90 мкл, 80 мкл, 60 мкл, 50 мкл, 20 мкл или 0 мкл воды соответственно. Выполняли анализ калибровочных образцов в соответствии со схемой 1, начиная с этапа 3.

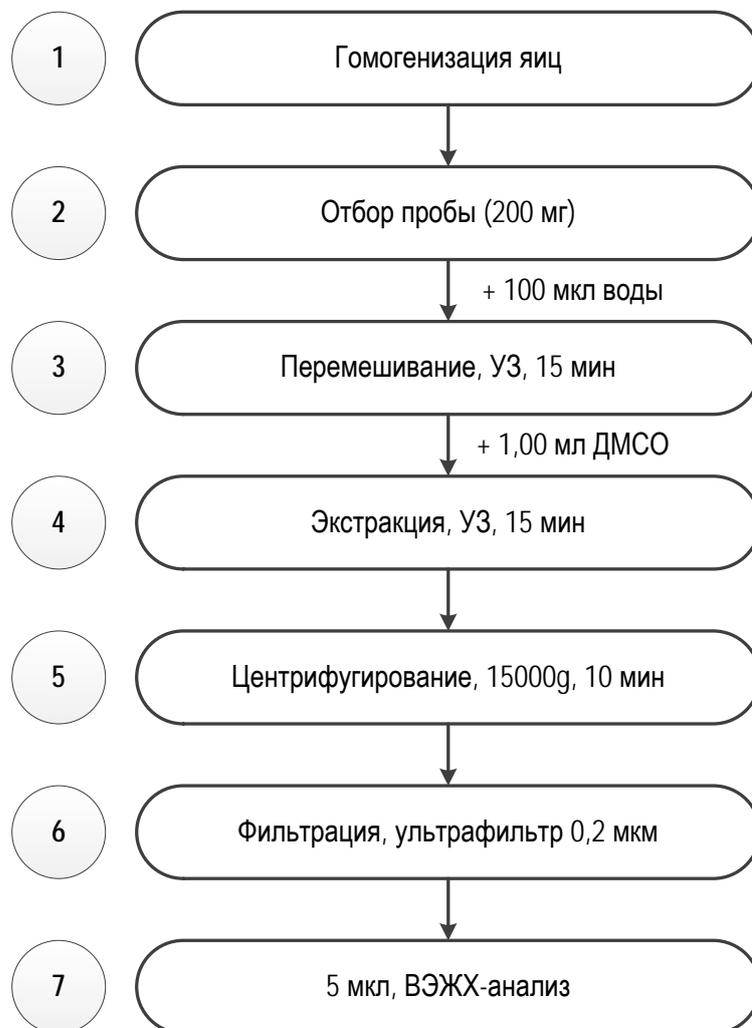


Схема 1. Процедура пробоподготовки исследуемых образцов

Для проверки прецизионности и правильности готовили 20 модельных образцов (5 серий по 4 образца): 10 мкл, 20 мкл, 50 мкл или 80 мкл раствора В добавляли с помощью пипет-дозатора к 200 мг яичного гомогената и взвешивали, затем к этим смесям добавляли 90 мкл, 80 мкл, 50 мкл или 20 мкл воды соответственно. Выполняли анализ калибровочных образцов в соответствии со схемой 1, начиная с этапа 3.

Для проверки степени извлечения вещества готовили модельные растворы морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата путем смешивания 10 мкл, 20 мкл, 50 мкл или 80 мкл раствора В с 90 мкл, 80 мкл, 50 мкл или 20 мкл воды соответственно. Выполняли анализ калибровочных образцов в соответствии со схемой 1, начиная с этапа 3.

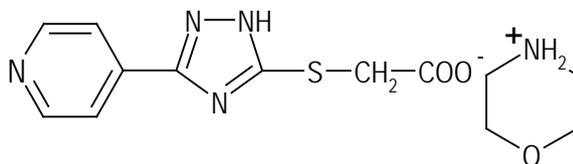
Все растворы и образцы хранили при 5°C.

*Применение аналитической методики.* Определение остаточных количеств морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата в яйцах птиц, получавших «Авесстим» в течение 3 дней, проводили в соответствии с разработанной методикой пробоподготовки (схема 1) в предложенных условиях ВЭЖХ-анализа.

## Результаты и обсуждение

### *Выбор условий ВЭЖХ-анализа и МС-детектирования*

Химическая структура аналита – морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата приведена на рис. 1.



$$m/z = 237,0$$

**Рисунок 1.** Химическая структура протонированной формы аналита и  $m/z$  для квазимолекулярного иона

Образование протонированной формы аналита позволяет увеличивать время его удерживания. Для образования положительно заряженных ионов в электроспрее [7] и для подавления ионизации силанольных групп неподвижной фазы во избежание ее взаимодействия с атомами азота триазолового цикла необходимо введение кислоты в состав подвижной фазы. В качестве кислотного агента была выбрана муравьиная кислота, поскольку она является летучей и подходит для режима ионизации в электроспрее.

Зависимость коэффициента емкости аналита от содержания ацетонитрила в подвижной фазе была изучена нами ранее [8] – содержание ацетонитрила в количестве 5% для АФИ «Авесстима» соответствует коэффициенту емкости 2,4 – 2,6 и времени анализа 5 минут.

При выборе условий МС-детектирования учтено, что аналит элюируется и детектируется в протонированной форме, поэтому величина  $m/z$  в SIM-режиме была принята равной 237,0, что соответствует относительной молекулярной массе соответствующей кислоты (рис. 1). Температура газа-осушителя, давление на небулайзере и напряжение на фрагментаторе были предложены нами ранее [7].

Пик исследуемого аналита – морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата – на хроматограммах модельных растворов в предложенных условиях анализа характеризуется временем удерживания в диапазоне 2,3 – 2,6 мин при общем времени хроматографирования 5 мин. Селективность МС-детектирования АФИ в отношении примесей обеспечивается использованием SIM-режима при величине  $m/z$ , соответствующей специфической характеристике аналита – моноизотопной массе квазимолекулярного иона, полученного присоединением протона к молекуле аналита.

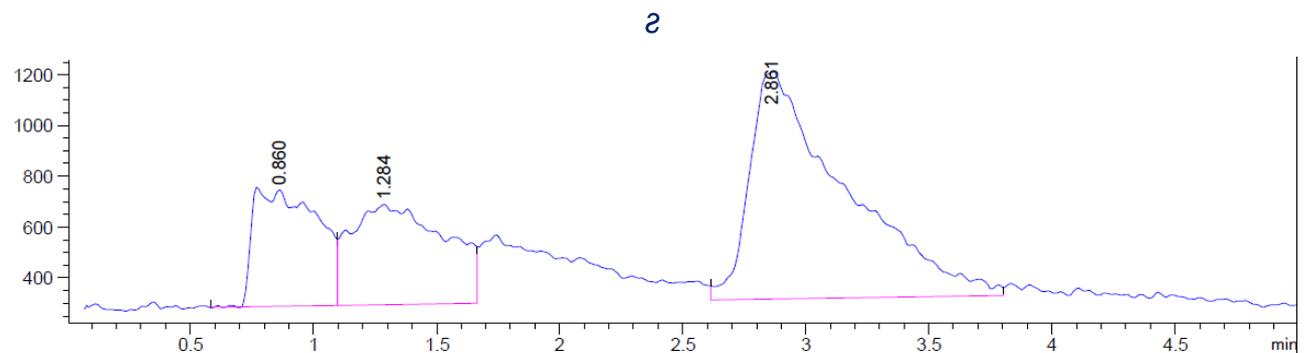
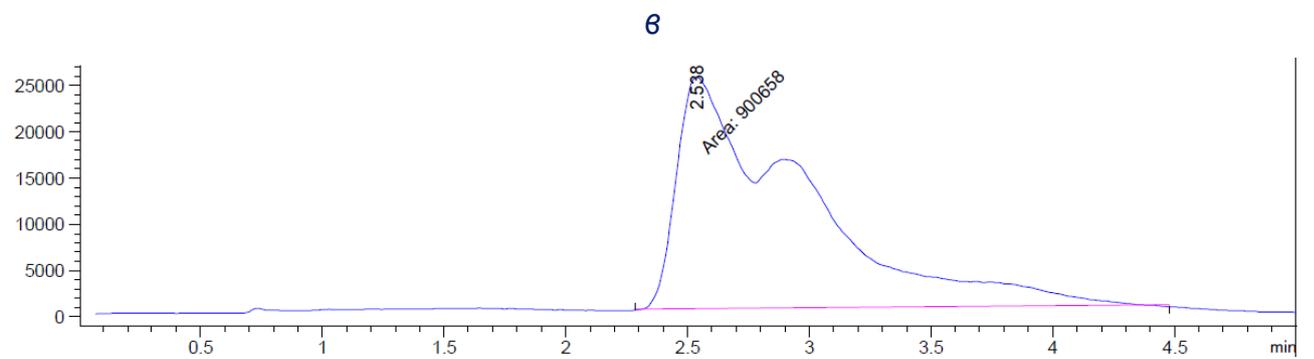
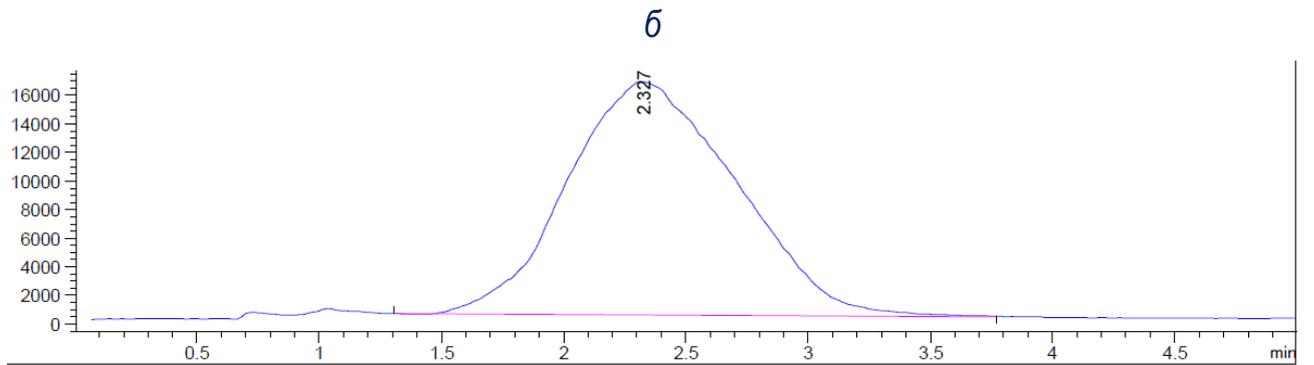
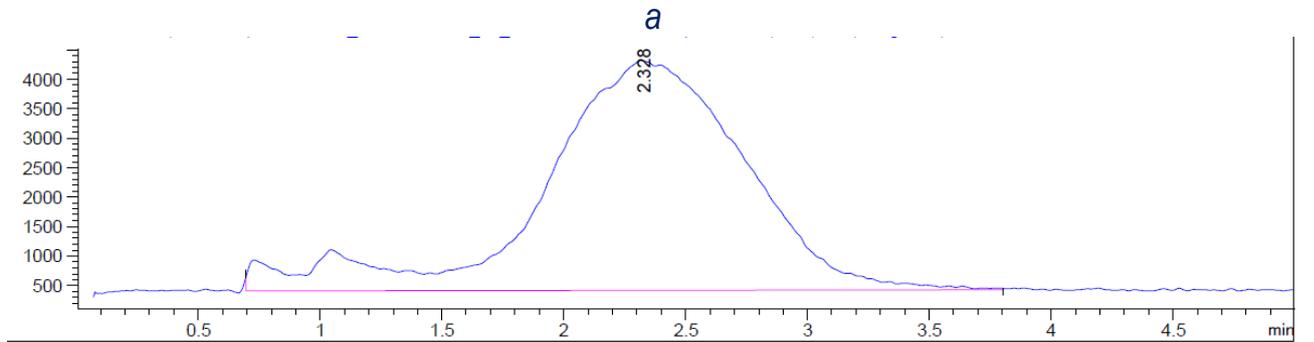
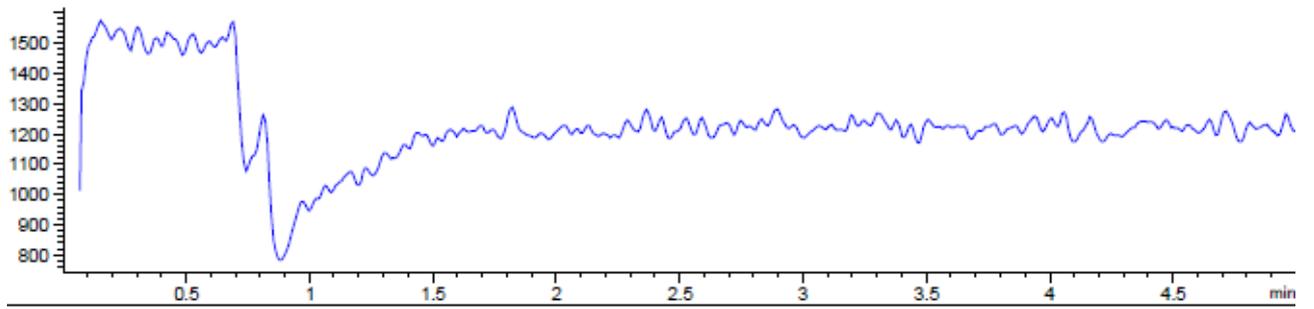
*Разработка процедуры пробоподготовки*

Для осаждения белков и экстракции аналита был выбран ДМСО.

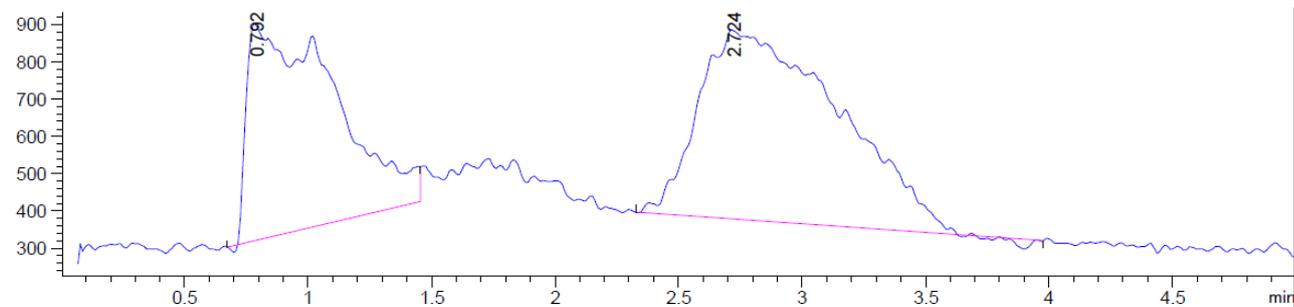
*Результаты валидации методики*

*Специфичность/селективность* методики в соответствии с [9-10] подтверждали путем анализа бланк-образцов. В ходе анализа бланк-образцов показано отсутствие на хроматограммах дополнительных пиков в диапазоне времен удерживания 2,1 – 2,9 мин, что подтверждает специфичность/селективность методики в отношении компонентов биологической матрицы (рис. 2а).

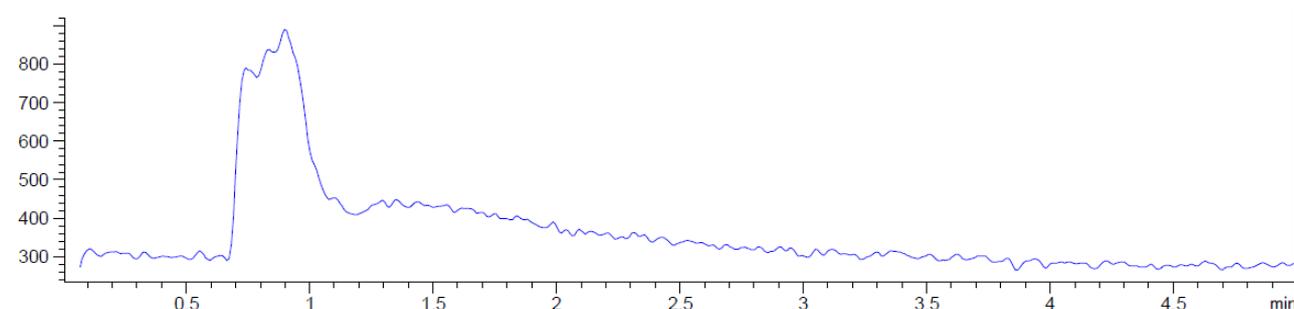
Для определения нижнего предела количественного определения (НПКО) методики был выбран методологический подход, основанный на соотношении «сигнал/шум». НПКО соответствует содержанию аналита в модельной смеси, которое обеспечивает 5-кратное соотношение «сигнал/шум». При этом правильность и прецизионность данного определения не должны превышать 20% [9-10].



**d**



е



ж

**Рисунок 2.** Хроматограммы экстрактов:

- а – бланк-образец;
- б и в – модельные образцы с содержанием АФИ на уровнях НПКО и ВПКО;
- г – ж – исследуемые образцы (10, 24, 48 и 60 часов)

В ходе наших исследований показано, что НПКО составляет < 0,1 мкг анализа в образце, что соответствует содержанию АФИ в гомогенате < 0,4 мкг/г. Типовая хроматограмма исследуемого образца с указанным содержанием анализа приведена на рис. 2б. В данных условиях соотношение «сигнал/шум» составляет 5,3, что соответствует заявленным требованиям [9-10].

*Линейность.* В качестве диапазона применения методики выбран один порядок концентраций; при этом содержание анализа в нижнем калибровочном образце соответствует НПКО.

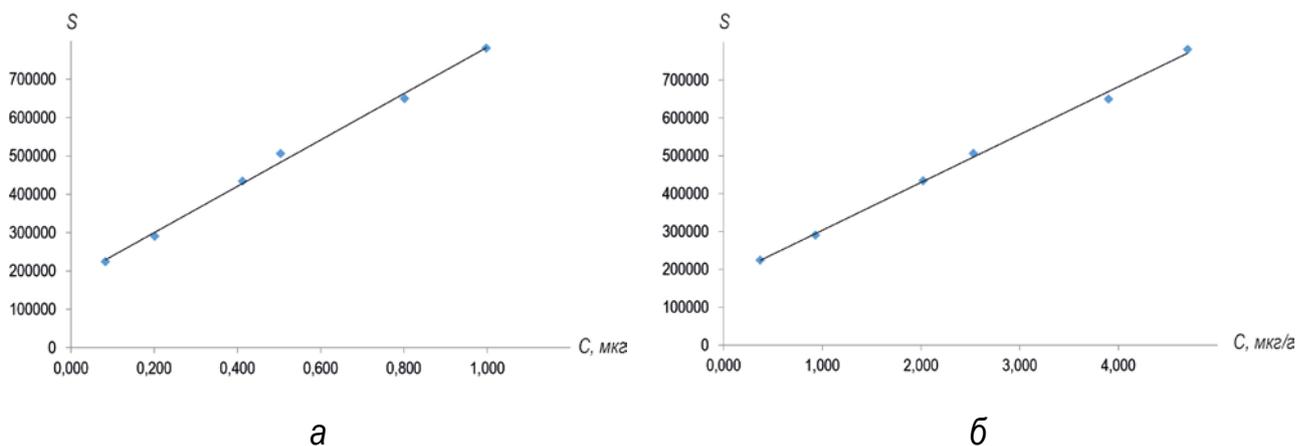
В заданном диапазоне были проведены измерения для 6 калибровочных образцов с содержанием анализа, отличным от нуля, что соответствует требованиям [9-10]. На основании экспериментальных данных, полученных в предложенных условиях, строили калибровочную кривую зависимости отклика МС-детектора от содержания анализа в образце или гомогенате соответственно.

На рис. 3 приведены полученные калибровочные кривые, в табл. 1 указаны их метрологические параметры, полученные в ходе обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов [10].

**Таблица 1**

*Результаты определения линейности для предложенной методики определения АФИ препарата «Авесстим» в яйцах птицы*

кривая	$R_c$	$b$	$S_b$	$a$	$S_a$	$RSD_0$
$S - C$ , мкг	0,9980	604263	18964	179176	11244	14814
$S - C$ , мкг/г	0,9986	126345	3352	176841	9560	12531



**Рисунок 3.** Графики зависимости площади пика от содержания аналита:  
а – в образце; б – в навеске гомогената

Таким образом, методика является линейной в диапазоне концентраций 0,07 – 1,00 мкг в пробе (0,35 – 5,00 мкг/г в образце).

Типовая хроматограмма исследуемого образца с содержанием аналита на уровне верхнего предела количественного определения (ВПКО) приведена на рис. 2в.

Прецизионность и правильность методики определяли путем анализа модельных образцов на 4-х концентрационных уровнях – НПКО, в пределах трехкратного НПКО (нижний образец), приблизительно 50% диапазона калибровочной кривой (средний образец), не менее 75% верхнего предела калибровочной кривой (верхний образец).

Исследования проводили в рамках 5 аналитических последовательностей

Расчет концентрации АФИ в модельных образцах проводили по уравнению калибровочного графика, построенного по результатам анализа калибровочных образцов.

По полученным результатам рассчитывали величину доверительного интервала и систематической ошибки.

Результаты определения правильности и прецизионности методики приведены в табл. 2.

**Таблица 2**

*Результаты определения правильности, прецизионности и степени извлечения для предложенной методики определения АФИ препарата «Авесстим» в яйцах птицы*

Уровни	Введено $\bar{X}_{теор}$	Найдено $\bar{X}_{практ}$	Прецизионность $RSD, \%$	Правильность	Степень извлечения $R, \%$
				$\frac{ \bar{X}_{теор} - \bar{X}_{практ} }{\bar{X}_{теор}} \cdot 100, \%$	
НПКО	0,109 мкг	0,105 мкг	$18,97 \leq 20\%$	$3,63 \leq 20\%$	97
	0,530 мкг/г	0,521 мкг/г	$18,29 \leq 20\%$	$1,65 \leq 20\%$	
нижний образец	0,203 мкг	0,196 мкг	$8,59 \leq 15\%$	$3,43 \leq 15\%$	99
	0,991 мкг/г	0,954 мкг/г	$8,43 \leq 15\%$	$3,74 \leq 15\%$	
средний образец	0,490 мкг	0,441 мкг	$5,12 \leq 15\%$	$10,08 \leq 15\%$	96
	2,442 мкг/г	2,126 мкг/г	$5,07 \leq 15\%$	$12,94 \leq 15\%$	
верхний образец	0,797 мкг	0,714 мкг	$10,93 \leq 15\%$	$10,44 \leq 15\%$	95
	3,808 мкг/г	3,434 мкг/г	$10,87 \leq 15\%$	$9,81 \leq 15\%$	

Степень извлечения определяли путем сравнения средних результатов анализа модельных образцов с соответствующими результатами, полученными для модельных растворов в рамках 1 аналитической последовательности. Данные о величинах степени извлечения приведены в табл. 2.

Таким образом, предложенная нами методика является прецизионной, правильной, специфичной и чувствительной, и может быть применена для определения остаточных количеств АФИ препарата «Авесстим» в яйцах птицы.

Для проведения исследований использовали не менее 7 яиц для каждого срока, прошедшего после выпаивания птицы. Расчет концентрации АФИ в исследуемых образцах проводили по уравнению калибровочного графика, построенного по результатам анализа калибровочных образцов. Результаты определения содержания аналита приведены в табл. 3.

**Таблица 3**

*Результаты определения АФИ препарата «Авесстим» в контрольных группах яиц*

Время, прошедшее после выпаивания птицы	Содержание аналита в образце, мкг	Содержание аналита в гомогенате, мкг/г
10 ч	0,071	0,355
24 ч	обнаружено*	обнаружено*
48 ч	обнаружено*	обнаружено*
60 ч	не обнаружено	не обнаружено

\* содержание ниже НПКО

Таким образом, АФИ препарата «Авесстим» количественно определяется в гомогенате яиц птицы только через 10 часов после выпаивания кур (рис. 3г). Через 2 и 4 суток АФИ удалось обнаружить в исследуемых образцах, но его содержание находилось ниже НПКО (рис. 3д и 3е). Через 5 суток аналит в гомогенате яиц птицы не выявлен (рис. 3ж).

Разработанная методика предлагается к использованию в токсикологических лабораториях и лабораториях ветеринарных инспекций.

## **Выводы**

1. Разработана ВЭЖХ-МС-методика определения АФИ препарата «Авесстим» – морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата в яйцах птицы – обоснованы условия хроматографирования и ЭСИ-МС-детектирования, подобрана процедура пробоподготовки.
2. Проведена валидация разработанной методики в соответствии с современными международными требованиями и подтверждена ее приемлемость по таким параметрам как специфичность/селективность, линейность, правильность, прецизионность и степень извлечения.
3. Определены остаточные количества морфолиний 2-(5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата в яйцах птицы, получавших «Авесстим» в течение 3 дней, через различные периоды времени, прошедшие после выпаивания птицы.

## **Литература**

1. Застосування морфоліній 2-[5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо]ацетату для лікування і профілактики деяких захворювань / І. В. Бушуєва, Л. І. Пархоменко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко // Запорозький медичинський журнал. – 2014. – №2 (83). – С. 97 – 99.
2. Rokka, M. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method / M. Rokka, K. Peltonen // Food Additives & Contaminants. – 2006. – V. 23 (5). – С. 470 – 478.
3. Development of a Rapid LC-MS-MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken / B. Shao, X. Wu, J. Zhang, H. Duan, X. Chu, Y. Wu // Chromatographia. – 2009. – V. 69 (9). – С. 1083 – 1088.
4. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS / G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, A. Lundström // Analytica Chimica Acta. – 2005. – V. 529. – С. 47 – 51.
5. Quantitative analysis of piperidin-1-ium {[5-(2-furyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio}acetate, substance of the veterinary drug «Tryfuzol», in poultry meat by LC-DAD-MS / B. O. Varynskyi, Ye. G. Knysh, V. V. Parchenko, O. I. Panasenko, A. G. Kaplaushenko // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – №2 (18). – С. 25 – 31.
6. Визначення залишкових кількостей активно діючої речовини препарату «Авесстим» у сироватці крові, м'ясі та органах птиці / І. В. Бушуєва, Г. А. Фотіна, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, А. В. Березовський // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2014. – №1 (34). – С. 192 – 199.
7. Варинський, Б. О. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот і їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС / Б. О. Варинський // Одеський медичний журнал. – 2015. – №4 (150). – С. 17 – 21.
8. Вивчення закономірностей утримування потенційних лікарських субстанцій ряду 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ/ДМД-МС / Б. О. Варинський, Є. Г. Книш, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, А. Г. Каплаушенко // Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. – 2015. – V. 13, I. 4 (52) – С. 68 – 75.
9. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.
10. Клименко, Л. Ю. Комплексный подход к разработке и валидации методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях в химико-токсикологическом анализе: автореф. дис. ... докт. фарм. наук / Л. Ю. Клименко. – Харьков, 2016. – 47 с.

## DEVELOPMENT OF THE HPLC-ESI-MS METHOD FOR DETERMINATION OF THE MORPHOLINE 2-(5-(PYRIDIN-4-YL)-1,2,4-TRIAZOL-3-YLTHIO)ACETATE IN THE POULTRY EGGS

Borys O. Varynskyi, Volodymyr V. Parchenko, Evhen H. Knysh,  
Oleksandr Y. Panasenko, Andrii H. Kaplaushenko

*Zaporizhzhya State Medical University, Ukraine*

**Key words:** HPLC-ESI-MS, morpholine 2-(5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetate, «Avesstym», poultry eggs, validation

HPLC-MS-procedure for determination of the active pharmaceutical ingredient of the drug «Avesstym» – morpholine 2-(5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetate in the poultry eggs has been developed; conditions of chromatographing and ESI-MS-detection have been ground, the procedure of sample preparation has been matched. Validation of the developed procedure has been carried out according to the modern international requirements and its acceptability has been confirmed by such parameters as specificity/selectivity, linearity, accuracy, precision and recovery. Residual amounts of morpholine 2-(5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetate in the eggs of poultry taking «Avesstym» for 3 days have been determined in the different time periods after poultry feeding.

## Сведения об авторах

**Варинский Борис Александрович** – кандидат фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры физколлоидной химии Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина

тел.: +38 (063) 334-36-63, e-mail: [borisav70@yahoo.com](mailto:borisav70@yahoo.com), [varinsky@zsmu.zp.ua](mailto:varinsky@zsmu.zp.ua).

**Парченко Владимир Владимирович** – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры токсикологической и неорганической химии Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина

**Кныш Евгений Григорьевич** – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой организации и управления фармации Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина

**Панасенко Александр Иванович** – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологической и неорганической химии Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина

**Каплаушенко Андрей Григорьевич** – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой физколлоидной химии Запорожского государственного медицинского университета, Запорожье, Украина