

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**METODES IZSTRĀDE 1,1-DIMETILHIDRAZĪNA  
NOTEIKŠANAI, IZMANTOJOT ŠĶIDRUMU  
HROMATOGRĀFIJAS-MASSPEKTROMETRIJAS  
METODI AR DERIVATIZĒŠANU**

BAKALaura DARBS

Autors: Igors Sušinskis

Studenta apliecības Nr.: IS14075

Darba vadītājs: asoc. profesors Dr. chem. Pēteris Mekšs

Darba vadītājs: Dr. chem. Juris Hmeļņickis

RĪGA  
2017

## ANOTĀCIJA

Augsti jutīgas metodes izstrāde 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai, izmantojot augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas metodi ar maselektīvo detektoru un parauga derivatizēšanu. Zinātniskais vadītājs: Dr. ķīm., asoc. prof. Pēteris Mekšs, Dr. ķīm., Juris Hmeļnickis, bakalaura darbs, 52 lappuses, 20 tabulas, 15 attēli, 38 literatūras avoti, 7 pielikumi. Latviešu valodā.

Darba gaitā ir izstrādāta 1,1-dimetilhidrazīna kvantitatīvās noteikšanas metode, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju ar maselektīvo detektoru. Metodes pamatā ir parauga derivatizēšana un sekojoša analīze ar apgrieztās fāzes jonu pāru šķidrums hromatogrāfiju. Pārbaudīta dažādu derivatizēšanas reaģentu piemēroftiba un reakciju vides ietekme uz reakcijas gaitu. Veikta analītiskā signāla apstrādes parametru optimizēšana.

Veikta analīzes metodes validācija saskaņā ar ICH un EF prasībām, kā arī pārbaudīta analizējamās vielas degradācija.

1,1-DIMETILHIDRAZĪNS, AEŠH/MS/MS, HEPTILS, METODES VALIDĀCIJA, DEGRADĀCIJAS PĒTIJUMI, C18, DERIVATIZĀCIJA, ESI, MRM, HFSS, ICH, EF.

## ABSTRACT

Development of highly sensible method for determination of 1,1-dimethylhydrazine, by derivatization and analysis by the high performance liquid chromatograph, coupled with mass selective detector. Supervisors: *Dr.chem.*, asoc. prof. Pēteris Mekšs, *Dr.chem.*, Juris Hmelnickis. Bachelor's Thesis, 52 pages, 20 tables, 15 pictures, 38 literature references, 7 appendices. In Latvian.

The method was developed for determination of 1,1-dimethylhydrazine performed by derivatization reaction and analysis by ion pair liquid chromatography. Detection was performed by mass analyzer. Different derivatization agents are investigated and reaction media influence on reaction have been checked. Optimization of system parameters were performed.

Full method validation have been performed according to ICH and EF requirements. A degradation studies for active pharmaceutical ingredient were investigated.

1,1-DIMETILHYDRAZINE, HPLC/MS/MS, UDMH, HEPTILE, METHOD VALIDATION, DEGRADATION STUDIES, C18, DERIVATIZATION, ESI, MRM, HFBA, ICH, EF.

## SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	5
IEVADS .....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Hidrazīna savienojumi .....	8
1.2. 1,1-Dimetilhidrazīna noteikšanas metodes .....	9
1.2.1. GH/MS metodes .....	9
1.2.2. Klasiskas metodes .....	10
1.2.3. AEŠH metodes .....	10
1.2.4. Citas metodes .....	11
1.3. Derivatizēšanas paņēmieni .....	14
1.4. Metodes pārbaude pēc EF un ICH prasībām .....	17
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA .....	20
2.1. Izmantotās iekārtas un trauki .....	20
2.2. Izmantotās standartvielas un reaģenti .....	20
2.3. Izstrādātās analīzes metodes apstākļi .....	21
2.5. Minimālais 1,1-dimetilhidrazīna saturs un sistēmas piemērotības pārbaude .....	23
2.6. Izmantotās aprēķinu formulas un paraugu ievadīšanas secība .....	23
2.7. Derivatizēšanas produkta iegūšana .....	24
2.8. AEŠH/MS sistēmas analīzes apstākļu izvēle un optimizēšana .....	26
2.9. Derivatizēšanas reakcijas produktu salīdzinājums .....	27
2.10. Reakcijas vides ietekme uz benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu .....	27
2.11. Validācijas eksperimenti .....	28
2.11.1. Specifiskums .....	28
2.11.2. Sistēmas piemērotības pārbaude .....	29
2.11.3. Linearitāte .....	29
2.11.4. Precizitāte .....	30
2.11.5. LOD, LOQ .....	31
2.11.6. Atgūstamība/pareizība .....	32
2.11.7. Metodes noturība .....	33
2.11.8. Degradācijas pētījumi .....	34
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS .....	36
3.1. Derivatizēšanas produkta iegūšana .....	36
3.2. Derivatizēšanas reakcijas produktu salīdzinājums .....	36
3.3. AEŠH/MS sistēmas analīzes apstākļu izvēle un optimizēšana .....	38
3.4. Reakcijas vides ietekme uz benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu .....	40

3.5. Validācijas eksperimentu rezultāti.....	40
3.5.1. Specifiskums .....	40
3.5.2. Sistēmas piemērotības pārbaude .....	41
3.5.3. Linearitāte.....	41
3.5.4. Precizitāte .....	42
3.5.5. LOD, LOQ .....	43
3.5.6. Atgūstamība/pareizība.....	45
3.5.7. Metodes noturība.....	45
3.5.8. Degradācijas pētījumi.....	46
SECINĀJUMI .....	48
PATEICĪBAS .....	53
PIELIKUMI.....	54
1. pielikums.....	55
2. pielikums.....	56
3. pielikums.....	57
4. pielikums.....	58
5. pielikums.....	59
6. pielikums.....	60
7. pielikums.....	61

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AEŠH	- Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija;
AEŠH/MS	- augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija ar masas selektīvo detektoru;
apgr/min	- apgriezīgu skaits minūtē
As	- joslas asimetrijas faktors;
CPS	- impulsi sekundē;
Da	- daltons;
DI	- drošības intervāls
DIPEA	- N-etil-N-izopropil-propān-2-amīns;
EDQM	- Eiropas zāļu direktorāts;
EDS	- elektrodzinējspēks;
EDTA	- etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrijs sāls;
EF	- Eiropas farmakopeja;
ES-	- elektroizsmidzināšanas jonizācija negatīvo jonu skenējumā;
ES+	- elektroizsmidzināšanas jonizācija pozitīvo jonu skenējumā;
ESI	- elektroizsmidzināšanas jonizācija;
eV	- elektronvolts
g	- brīvās krišanas paātrinājums;
GH	- gāzu hromatogrāfija;
HFSS	- heptafluorsviestskābe;
HILIC	- hidrofilo mijiedarbību hromatogrāfija
ICH	- Starptautiskās harmonizācijas konferences;
LC <sub>50</sub>	- Vidējā letālā koncentrācija;
LD <sub>50</sub>	- Vidējā letālā deva;
LOD	- zemākā noteikšanas robeža;
LOQ	- zemākā kvantitēšanas robeža;
m/z	- daļiņas masas attiecība pret lādiņu;
Maks.	- maksimāli;
min	- minūte;
Min.	- minimāli;
MRM	- vairāku reakciju monitorings;
nr.	- numurs;
piem.	- piemēram;
ppm	- parts per million, miljonās daļas;

PSA	- polāras virsmas laukums;
p-ta	- punkta;
Red-oks.	- reducēšanas/oksidēšanas
RRT	- relatīvais aiztures laiks;
RSN	- relatīvā standartnovirze;
RT	- aiztures laiks;
S/N	- signāla/trokšņa attiecība;
Ser. No.	- sērijas numurs;
SIR	- viena jona reakcija;
sk.	- skatīt;
SN	- standartnovirze;
st.	- stunda;
TEA	- trietilamīns;
TFA	- trifluoretiķskābe;
tilp.	- tilpums;
u.c.	- un citi;
UV	- ultraviolets;
Vid.	- vidējais;

## IEVADS

1,1-Dimetilhidrazīns maisījumā ar dislāpekļa tetroksīdu pazīstams kā raķešu degvielas komponents [1]. Raķetes ar šķidrās degvielas dzinējiem izmanto Amerikas Savienotajās Valstīs, Eiropā, Ķīnā, Krievijā. Vidējā 1,1-dimetilhidrazīna masa raķetē ir ~500 tonnas [2]. Šo degvielu bieži izmanto arī starpkontinentālās balistiskās raķetēs. Sakarā ar degvielas novecošanu un lieliem krājumiem – tās utilizācija ir problemātisks un ekonomiski neizdevīgs process [3]. Līdz ar to bieži notiek avārijas (6,4 %) un degvielas noplūdes [3].

Pētāmā viela ir dažādu ārstniecisko preparātu izejviela [4]. Tas ir augsti toksisks savienojums, kas kairina ādu, acis un gļotādas. Savienojums ir toksisks aknām, nierēm, izraisa destruktīvus procesus, piemīt kancerogēnas īpašības [5]. Tā saturs ārstnieciskos preparātos ir stingri kontrolējams un ir atkarīgs no zāļu diennakts devas [6].

Izvēlētā analīzes metode balstās uz 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanu derivatizētā formā. 1,1-Dimetilhidrazīns spēj katalītiski sadalīties un oksidēties, kontaktējot ar metāliem un metālu oksīdiem, kas apgrūtina nederivatizētā savienojuma analīzi [7].

Darba mērķis ir izstrādāt augsti jutīgu metodi 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju ar masspektrometrisko detektoru.

Darba uzdevumi:

Izvērtēt literatūrā sastopamās 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanas un derivatizēšanas metodes;

Izpētīt dažādu derivatizēšanas produktu analīzes metožu trūkumus, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju metodi ar masselektīvo detektoru;

Izpētīt dažādas derivatizēšanas reakcijas vides;

Izstrādāt piemērotu analīzes metodi derivatizēšanas produktam;

Veikt metodes validāciju atbilstoši *EF* un *ICH* prasībām;

Pārbaudīt, ka 1,1-dimetilhidrazīns neveidojas vielas glabāšanās laikā produkta degradācijas dēļ;

Ieviest izstrādāto metodi rutīnas analīžu praksē.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Hidrazīna savienojumi

Hidrazīna savienojumu grupa ir augsti toksiskas vielas. Šī grupa ietver hidrazīnu, metilhidrazīnu, 1,1-dimetilhidrazīnu, 1,2-dimetilhidrazīnu, fenilhidrazīnu, kā arī šo savienojumu sāļus. Hidrazīna savienojumu grupai raksturīgas dažādas toksiskas parādības, piemēram, viegla absorbcija cauri ādai, ietekme uz aknām un asinīm, audzēju augšanas paātrinājums, potenciāli kancerogēna ietekme. Līdz ar to tā droša ekspozīcija cilvēka veselībai ir grūti novērtējama [8]. Rekomendējamās ekspozīcijas ir parādītas 1.1. tabulā.

*1.1. tabula*

### Hidrazīna savienojumu grupai rekomendējamās ekspozīcijas

Hidrazīns	0,03 ppm
Metilhidrazīns	0,04 ppm
1,1-Dimetilhidrazīns	0,06 ppm
Fenilhidrazīns	0,14 ppm

1,1-Dimetilhidrazīna LD<sub>50</sub> 122 mg kg<sup>-1</sup> (orāli, žurkas), LC<sub>50</sub> 252 ppm (žurkas, 4 st.).

1,1-Dimetilhidrazīns ir caurspīdīgs, bezkrāsains šķidrums, ar amonjakam un amīniem līdzīgu smaržu. Tas jauca ar ūdeni, hidrazīnu, etanolu, amīniem un dažādiem naftas produktiem. 1,1-Dimetilhidrazīns ir vidēji stipra bāze un ļoti stiprs reducējošais reaģents. 1,1-Dimetilhidrazīna molekula satur N-N saiti, ar tai blakus esošām divām metilgrupām. Molekula veido stipras ūdeņraža saites. Savienojumam raksturīga augsta ķīmiskā aktivitāte, to plaši izmanto ķīmiskajā sintēzē, arī fotogrāfiju attīstīšanā, kā gāzu absorbentu un dažādu degvielu stabilizatoru.

Darbs ar 1,1-dimetilhidrazīnu bieži vien ir apgrūtināts, jo viela kontaktā ar oksidētājiem var uzliesmot vai uzsprāgt. Mijiedarbība ar metāliem un porainām virsmām var izraisīt vielas aizdegšanos tās sadalīšanās procesā. Hidrazīna un gaisa maisījumam piemīt sprādzienbīstamība plašā koncentrāciju apgabalā. Vielas fizikālās īpašības ir parādītas 1.2. tabulā.

**1,1-Dimetilhidrazīna fizikālās īpašības**

Molekulāra masa, g/mol	60,1
PSA	29,26
AlogP	0,0163
Blīvums, g/mL	0,784
Viskozitāte, cp	0,56
Viršanas temperatūra, °C	63
Kušanas temperatūra, °C	-57
Uzliesmošanas temperatūra, °C	-15
Uzliesmošanas robežas gaisā ( tilp. %)	2-95

**1.2. 1,1-Dimetilhidrazīna noteikšanas metodes**

No literatūrā aprakstītām, 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanas metodēm visbiežāk ir sastopamās ir GH/MS, AEŠH/MS un AEŠH.

**1.2.1. GH/MS metodes**

Viens no 1,1-dimetilhidrazīna avotiem cilvēka organismā ir fitohormons – daminozīds, kura sadalīšanās produkts ir 1,1-dimetilhidrazīns [9]. 1,1-Dimetilhidrazīns ir dažādu ārstniecisko preparātu izejviela, viena no kurām ir meldonijs. Slikti attīrīts produkts var saturēt toksisku un potenciāli kancerogēnu vielu. Pēc Eiropas zāļu kvalitātes direktorāta rekomendācijas, tika pieņemts lēmums par 1,1-dimetilhidrazīna satura kontroli neattīrītā produktā uzņēmumā AS “Grindeks”.

Literatūrā sastopamas vairākas 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanas metodes, taču vairākas no tām ir piemērotas tikai apkārtējās vides kontrolei.

Visbiežāk 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai izmanto gāzu hromatogrāfiju. Viena no metodēm balstās uz 1,1-dimetilhidrazīna analīzi ar GH/MS iekārtu, derivatizējot to ar pentafluorbenzoilu [10]. Metode ir piemērota 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai ābolu sulas koncentrātā. Analizējamo paraugu vispirms attīra ar destilāciju un apmēram 1 mL destilāta derivatizē ar pentafluorbenzoila šķīdumu dihlormetānā, 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> šķīduma klātbūtnē. Reakcijas laiks – 1 stunda. Iegūto maisījumu ekstrahē un izolē ar katjonu apmaiņas hromatogrāfiju. Eluātu koncentrē (žāvē slāpekļa plūsmā). Tālāk paraugu ievada GH/MS iekārtā ar sekojošiem iestatījumiem:

Jonizācijas veids - elektronu sadursmes jonizācija ar 70 eV;

Kolonna - 25m x 0,32 mm SE 54 silica;  
Meklējamo jonu masas - m/z 448, 420, 253, 195 un 167 ;

Metodei piemīt augsta selektivitāte un jutība (2 pg), bet paraugu pagatavošana ir sarežģīta un darbietilpīga. Rutīnas kvalitātes kontrolei tas ir nopietns trūkums. Metodes korelācijas koeficients apgabalā 0 - 66 ppm ir  $R^2 = 0,994$ , un atgūstamība svārstās robežās no 24 % līdz 117 %. Kopumā metode nav derīga farmaceitisko preparātu analīzei, jo neatbilst aprakstītām ICH prasībām ( $R^2$  vērtībai jābūt  $\geq 0,998$  un atgūstamības vērtībai jābūt no 80 % - 120 % un  $RSN \leq 10$  %) [11].

Sastopamas arī GH/MS metodes 1,1-dimetilhidrazīna skudrskābes sāļa noteikšanai augsnes paraugos, neizmantojot derivatizēšanu [12]. 2,0 g sausa augsnes parauga ekstrahē ar 80 mL metanola, izmantojot soksleta ekstraktoru. Tālāka koncentrēšana notiek ar rotācijas ietvaicētāju, 150 Torr spiedienā un 35 °C temperatūrā. Vielas analīze notiek ar *Agilent 6890N* GH sistēmu ar 5973N masas analizatoru. Jonizācijas režīms – elektronu sadursmes jonizācija. Izmantotās kolonnas – *DB-225 MS* (30 m x 0,25 mm ;  $d_f = 0,25 \mu\text{m}$ ) un *INNOWAX* (30 m x 0,25 mm ;  $d_f = 0,25 \mu\text{m}$ ). Viegla parauga pagatavošana, īss analīzes laiks, plašs linearitātes diapazons (0,5 -100 mg/kg) - metodes priekšrocības. Metodes trūkums - aprakstā ir pieejama informācija par 1,1-dimetilhidrazīna oksidēšanos skābekļa klātbūtnē un tā hidrolīzi. Līdz ar to pagatavoto paraugu nepieciešams ievadīt iekārtā uzreiz pēc pagatavošanas.

### 1.2.2. Klasiskās metodes

Literatūrā sastopamas ar titrēšanu saistītas metodes. Lielākoties 1,1-dimetilhidrazīnu lieto kā derivatizēšanas reaģentu. Parasti tā pārākumu attitrē ar skābi. Vienā no metodēm ir aprakstīta dažādu aldehīdu derivatizēšana ar 1,1-dimetilhidrazīnu. Metode nav piemērota uzstādītām prasībām zemās jutības dēļ. Tomēr metodē ir apskatītas dažādas reakcijas starp 1,1-dimetilhidrazīnu un aldehīdiem, nepieciešamie reakcijas apstākļi, produkta iznākumi un reakcijas laiki [13].

### 1.2.3. AEŠH metodes

AEŠH metodes 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai [14, 15]. Analīze veikta bez derivatizēšanas, un parauga šķīšanas vide tiek barbotēta ar slāpekli, lai novērstu tālāko pētāmās vielas oksidēšanu ar skābekli. Tālāk paraugs tiek apstrādāts ar 0,7 % EDTA šķīdumu. Metodē izmanto *Aminex A-5* (sulfogrupas tipa), 30 cm x 4 mm jonu apmaiņas kolonnu. Izmantotā kustīgā fāze – 0,05 M nātrija borāta buferšķīdums, plūsmas ātrums

1 mL/min. Detektēšana veikta ar *Metrohm EA1096* elektroķīmisko detektoru. Tiek izmantots Ag|AgCl salīdzināšanas elektrods, oglekļa indikators un darba elektrodi. Metode piemērota 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai asinīs un urīnā. Izmantojot šo metodi 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai meldonijā, iespējama interference starp pētāmo vielu un meldonija jonu [16, 17].

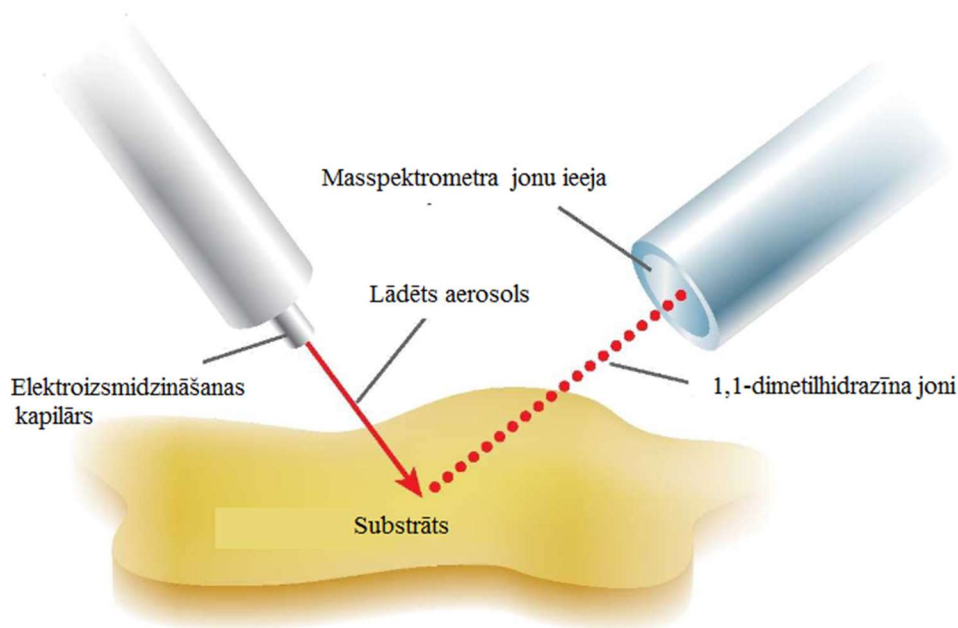
Ir pieejamas AEŠH metodes 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai, izmantojot AEŠH ar fotodiožu matricas detektoru [18]. Paraugs tiek derivatizēts ar salicilaldehīdu, analīze veikta, izmantojot apgrieztās fāzes kolonnu (*C 18, Microsorb -MV*, 4,6 mm x 250 mm ;  $d_p = 5 \mu\text{m}$ ). Metodes autori piedāvā analizēt vielu pie diviem absorbcijas maksimumiem, 295 un 325 nm.

#### 1.2.4. Citas metodes

Ir pazīstamas metodes, kas balstās uz jonu selektīvā elektroda izmantošanu 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai [19]. Darba elektrodā izmanto membrānu no Berlīnes zilā (dzelzs heksacianoferāts) un grafitā pastas. Elektroda linearitātes apgabals ir no 0,00003 līdz 0,00115 mol/L un detektēšanas (noteikšanas) robeža ir 0,00016 mol/L. Galvenais trūkums – tāda tipa elektrodi nav pieejami rūpnieciski, līdz ar to farmaceitiskā rūpniecībā šo metodi nav iespējams reģistrēt un izmantot. Iespējamie trūkumi – meldonija traucējošā iedarbība 1,1-dimetilhidrazīna analītiskajam signālam.

Ir sastopamas dažādas metodes, kurās izmanto KMR, koronārās izlādes detektoru, u.c., bet praktiski tās lieto citiem mērķiem un 1,1-dimetilhidrazīna noteikšana ar tām nav ekonomiski izdevīga.

No masspektrometriskām metodēm ir aprakstītas metodes ar paraugu tiešo analīzi, neizmantojot AEŠH vai GH iekārtu. Viena no metodēm ir desorbcijas elektroizsmidzināšanas jonizācijas metode (*DESI*). Metodes būtība: jonizētie solventa mikropilieni jonizē substrāta vielu un analizējamās vielas joni tiek iesūkta masspektrometrā (sk. 1.1.att.).



### 1.1 .att. Desorbcijas elektroizsmidzināšanas jonizācijas avots

Otrā apskatāmā metode – ķīmiskā jonizācija desorbcijas atmosfēras spiedienā (*DAPCI*). Koronārā izlāde (~6 kV) toluola tvaiku atmosfērā veido jonus. Lādētie joni saskaras ar substrātu un uzlādē analizējamās vielas molekulas. Mehānisms līdzīgs *DESI* metodei, tikai šķīdinātāja vietā tiek lietota gāze vai tvaiks.

No līdzīgām metodēm var minēt arī tiešo analīzi (*DART*). Šajā metodē ierosināto atomu saturošā plazma (parasti tiek izmantots hēlijs vai slāpeklis) tiek virzīta uz analizējamā parauga virsmu. Šajā procesā vielas ar zemu molekulāro masu vispirms desorbējas un tad uzlādējas [20]. Apskatītās metodes ir augsti jutīgas un analīze aizņem dažas sekundes. Paraugu pagatavošana nav nepieciešama. Tomēr iekārtas ar tāda veida jonizācijas avotiem ir reti sastopamas un to pielietošanas loks ir šaurs.

Izvērtējot literatūrā pieejamo informāciju par visām augstāk minētām metodēm, ir izveidota to salīdzināšanas tabula (1.3. tabulā).

## Metožu salīdzinājums 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai

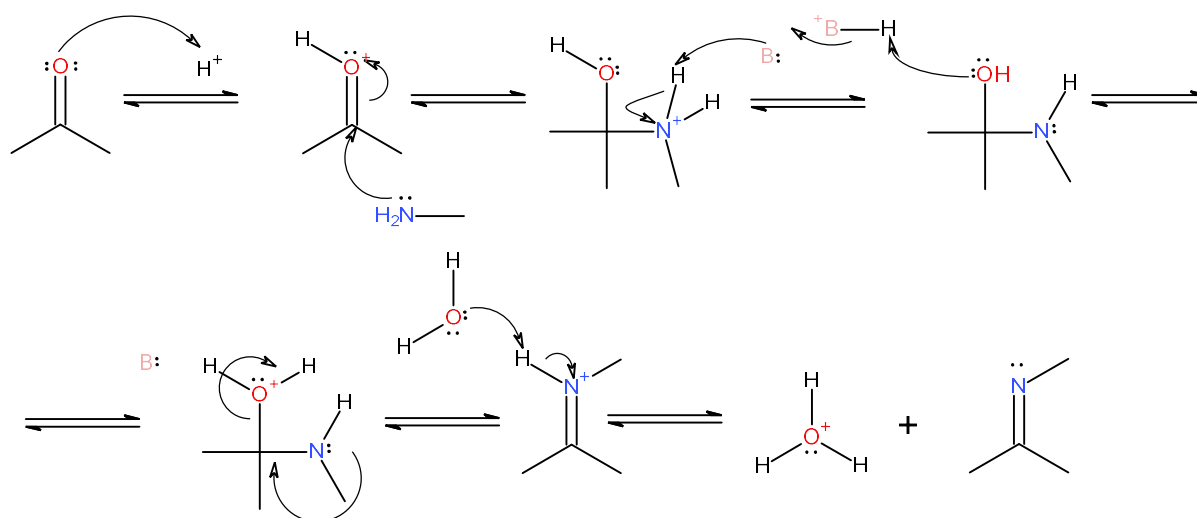
Metode	Metodes priekšrocības	Metodes trūkumi
GH/MS ar derivatizēšanu	Pietiekama jutība. Pietiekama selektivitāte.	Darbietilpīga parauga sagatavošana. Neatbilst <i>ICH</i> kritērijiem Dārgs derivatizēšanas reaģents.
GH/MS	Pietiekama jutība. Pietiekama selektivitāte. Īss analīzes laiks. Samērā vienkāršs parauga sagatavošanas process.	Paraugs ir nestabils. Iespējama ātra kolonnas novecošana. Nepieciešama ilga (līdz 8 st.) parauga koncentrēšana.
Titrēšana	Minimālas izmaksas. Iekārtas pieejamība.	Zema jutība. Zema selektivitāte. Metodes automatizācija saistīta ar lielām izmaksām.
AEŠH ar elektroķīmisko detektoru	Pietiekama jutība. Nav nepieciešama derivatizēšana.	Paraugs ir nestabils. Šķīdinātājam jābūt atbrīvotam no skābekļa. Iespējama traucējošo jonu ietekme.
AEŠH ar fotodiožu matricas detektoru pēc derivatizēšanas.	Pietiekama jutība. Iekārtas pieejamība. Samērā vienkāršs parauga pagatavošanas process.	Iegūtais derivatizēšanas produkts ir gaistoša, šķīdīga viela.
Jonselektīvie elektrodi	Ātrs un vienkāršs mērījums. Nav vajadzīga parauga apstrāde.	Netiek ražoti rūpnieciski. Iespējama traucējošo jonu ietekme.
KMR, koronāras izlādes detektors u.c.	Iespējami liela jutība un izšķirtspēja.	Nav pieejams uzņēmumā. Augstas iekārtu cenas un lielas ekspluatācijas izmaksas. Nav pietiekošas informācijas.

Redzams, ka viena no piemērotākām metodēm ir AEŠH, izmantojot parauga derivatizēšanu. Izvērtējot dažādu derivatizēšanas savienojumu trūkumus un priekšrocības, tika nolemts izmantot AEŠH metodi ar MS detektoru. MS detektora izvēle ļauj pārliecināties par derivatizēšanas produkta identitāti, reakcijas blakusproduktu klātbūtni, un hromatogrāfiskās joslas viendabību.

### 1.3. Derivatizēšanas paņēmieni

1,1-Dimetilhidrazīns ir aktīvs savienojums un viegli piedalās dažādās nukleofilās aizvietošanas reakcijās [21]. Līdz ar to, pastāv plašs savienojumu klāsts, kas reaģēs ar 1,1-dimetilhidrazīnu. Tālāk tiks apskatītas literatūrā aprakstītās reakcijas, kas ir potenciāli perspektīvas un derīgas derivatizēšanai.

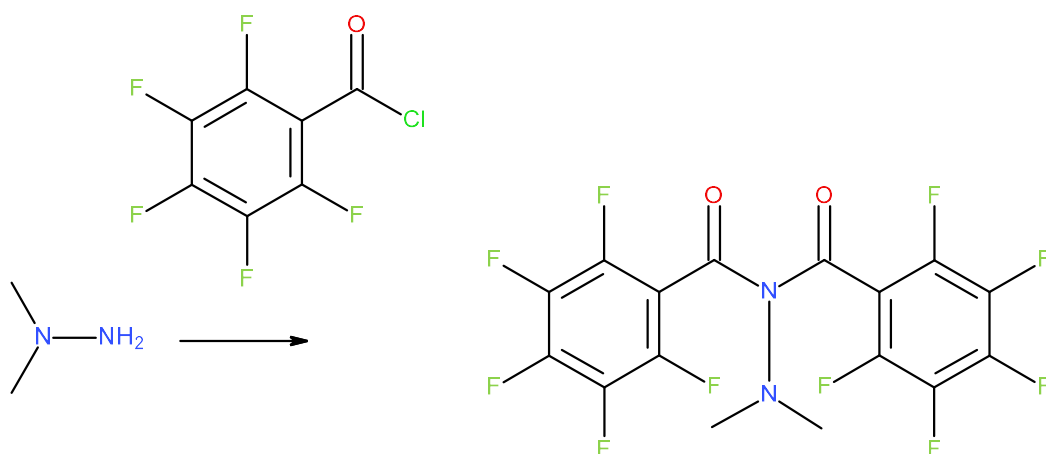
Visbiežāk sastopams derivatizēšanas veids – reakcija starp ketoniem un amīniem. Reakcijas mehānisms ir apskatīts 1.2. att. [22].



1.2. att. Reakcijas mehānisms starp ketoniem un amīniem

Bieži tiek lietota reakcija starp 1,1-dimetilhidrazīnu un aldehīdiem. Mehānisms ir līdzīgs parādītam 1.2. att. Pieejami dati, ka reakcijas iznākums un laiks ir atkarīgs no aldehīda uzbūves un aizvietotāju grupām hidrazīna molekulā. Reakcijai ar formaldehīdu ir viszemākais iznākums (~36,6 %), bet augstākais – ar aldehīdiem, kuros viens no aizvietotājiem ir benzola gredzens (benzaldehīds, dihlorbenzaldehīds, salicilaldehīds, m-nitrobenzalehīds). Piemērotas reakcijas vides ir etilēnglikols – alifātiskiem un aromātiskiem aldehīdiem un metanols – benzaldehīda atvasinājumiem ar diviem aizvietotājiem. Reakcija iespējama arī polāros šķīdinātājos, piemēram, ūdenī, bet šķīdinātāja izvēli ierobežo aldehīda šķīdība. Tetrahydrofurāns, hlorbenzols un *tert*-butanols ir atzīti par nepiemērotiem šķīdinātājiem [13].

Nākamā metode balstās uz 1,1-dimetilhidrazīna derivatizēšanu ar pentafluorbenzoilhlorīdu sārmainā vidē [9]. Pārvērtības ir parādītas 1.3. att.

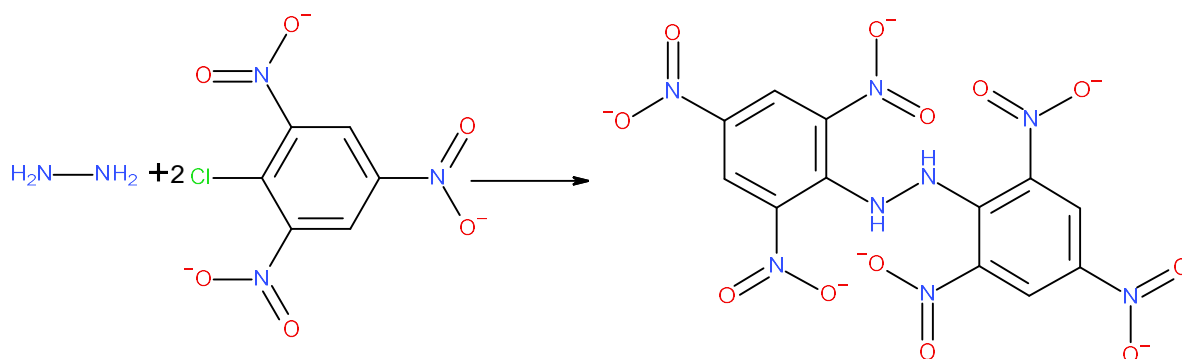


**1.3. att. Reakcija starp pentafluorobenzoilhlorīdu un 1,1-dimetilhidrazīnu**

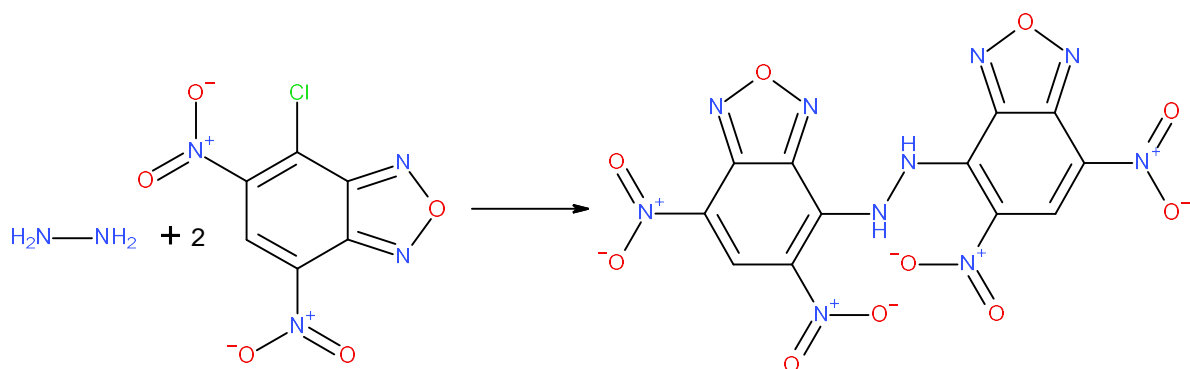
No reakcijas vienādojuma redzams, ka ir iespējama divu pentafluorobenzoilhlorīda molekulu pievienošanās. Aprakstītā reakcijas vide ir apšaubāma, jo tiek lietots  $K_2CO_3$  šķīdums ūdenī, maisījumā ar dihlorometānu. Abi šķīdinātāji ir savstarpēji mazšķīstoši [23], līdz ar to reakcijas maisījumu nepieciešams nepārtraukti maisīt vismaz 1 stundu.

Sastopamas arī pirmskolonnas derivatizēšanas metodes ar glioksāliem [24].

Aktuāla ir derivatizēšana ar pikrilhlorīdu un 4-hlor-5,7-dinitrobenzofurazānu. Abu reakciju produkti ir krāsaini savienojumi (maksimālā gaismas absorbcija, attiecīgi, pie viļņa garuma 530 nm un 500 nm). Abus savienojumus iespējams noteikt fotometriski. Notiekošās pārvērtības ir parādītas 1.4.att. un 1.5.att.



**1.4. att. Reakcija starp pikrilhlorīdu un hidrazīnu**



1.5. att. Reakcija starp 4-hloro-5,7-dinitrobenzofurazanu un hidrazīnu

1,1-Dimetilhidrazīns ir stiprs reducētājs. Sastopama informācija par iespēju reducēt dažādus oksidētājus ar 1,1-dimetilhidrazīnu. Iegūtiem savienojumiem piemīt augsta gaismas absorbcija. Viens no piemēriem - fosformolibdēnskābes reducēšana ar zilās krāsas savienojuma veidošanos. Ir zināma reakcija ar sudraba joniem želatīna vidē. No red-oks reakcijām ir sastopamas reakcijas starp hidrazīnu un nitrāta jonu, trifeniltetrazoliumu u.c. [25].

Iespējama arī netiešā noteikšana: metāla jona reducēšana un tālākā krāsu reakcija. Piemēram, krāsaina kompleksa veidošanās starp Fe (II) joniem un o-fenantrolīnu, Fe(II) joniem un ferrozīnu, vai Cu (I) joniem un neokuproīnu.

Augstāk minētām reakcijām ir izstrādātas dažādas ekspresmetodes, kas ļauj noteikt 1,1-dimetilhidrazīnu bez specializētas iekārtas izmantošanas. Tomēr visām red-oks reakcijām ir trūkumi. Lai reakcija notiktu līdz beigām, nepieciešama karsēšana vienas stundas laikā verdoša ūdens vannā. Ņemot vērā, ka 1,1-dimetilhidrazīns ir viegli gaistošs savienojums, nepieciešams izmantot arī atceces dzesinātāju. Reakcijas ir nespecifiskas un notiek arī ar citiem reducētājiem. Dažas no minētām reakcijām norisinās tikai bāziskā vidē, kas var izraisīt AEŠH kolonnas bojājumus [26].

1,1-Dimetilhidrazīns spēj veidot kompleksus ar lādiņa pārnēsi. Viens no tādiem piemēriem – amonija aizvietošana ar hidrazīniem Fe (II) koordinācijas sfērā,  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$  (*SPCAF*) savienojumā. Komplekss ir sarkanā krāsā. Metode tiek lietota 1,1-dimetilhidrazīna noteikšanai asinīs, gaisā un ūdenī. [27]. Balstoties uz minēto metodi, noteikšanas procedūra iekļauta monogrāfijā [28]. Reakcijas trūkumi – reaģenta zemā stabilitāte gan sausā stāvoklī, gan šķīdumā. Reakcijas laiks ir stipri atkarīgs no matricas un pārsniedz 2 stundas, bet kompleksa krāsas intensitāte ir atkarīga no pH, kas apgrūtina kvantitatīvu vielas noteikšanu.

Apkopojot informāciju par derivatizēšanu, redzams, ka optimālai 1,1-dimetilhidrazīna derivatizēšanas reakcijai ir jābūt ātrai un praktiski neatgriezeniskai. Viens no izvēles kritērijiem - iespējamība veikt reakciju mazos tilpumos, neizmantojot papildus iekārtas (dzesinātājus, maisītājus u.c.). Iegūtam savienojumam jābūt pietiekoši stabilam gan sausā veidā (ilgstoša iegūtā savienojuma glabāšana), gan šķīdumā (pagatavotā parauga stabilitāte). No aprakstītām metodēm izvirzītam kritērijam atbilst 1,1-dimetilhidrazīna nukleofilās aizvietošanas reakcijas.

#### 1.4. Metodes pārbaude pēc EF un ICH prasībām

Lai ieviestu metodi farmaceitisko produktu rutīnas analīzēs, nepieciešams pārbaudīt metodes atbilstību EF un ICH prasībām, t.s. veikt pilnu metodes validāciju [29]. Validācijas kritēriji ir aprakstīti iepriekš minētajos avotos, tie ir atkarīgi no meklējamās vielas maksimāli atļautās koncentrācijas analizējamajā paraugā [11].

Validācijas gaitā ieplānots pārbaudīt šādus parametrus:

- Specifiskums;
- Linearitāte;
- Detektēšanas un kvantitēšanas robežas;
- Atgūstamība/pareizība;
- Sistēmas precizitāte;
- Metodes precizitāte;
- Starplaboratoriju precizitāte;
- Metodes noturība (robustums)

Izvirzītie kritēriji ir paradīti 1.4. tabulā.

*1.4. tabula*

**Izvirzīto kritēriju vērtībās**

Parametrs	Kritērijs
Specifiskums	Visas joslas ir pilnīgi atdalītas. Nav pārklāšanās ar šķīdināšanas vides vai reaģentu joslām.

Sistēmas piemērotības pārbaude: signāls/troksnis attiecība pie 1,5 ppm 1,1-dimetilhidrazīna koncentrācijas $A_s$ Teorētisko šķīvju skaits (kolonnas efektivitāte)	Signāls/troksnis attiecība $\geq 50$ 0,8 – 2,0 $\geq 2000$
Linearitātes apgabals	LOQ – 120 % no pieļaujamās normas (1,5 ppm)
Korelācijas koeficients	$R^2 \geq 0,998$
Sistēmas precizitāte	RSN $\leq 20,0$ %
Metodes precizitāte	RSN $\leq 30,0$ %
Starplaboratoriju precizitāte	RSN $\leq 40,0$ %
LOD	$\leq 0,45$ ppm
LOQ	$\leq 0,14$ ppm
Atgūstamība/pareizība	RSN $\leq 10,0$ % Atgūstamība 70 - 130 %
Metodes noturība (robustums) Šķīdumu stabilitāte Jonu pāru reaģenta daudzuma izmaiņas Kolonnas maiņa Kolonnas temperatūras izmaiņa	$\leq 10,0$ %
Degradācijas pētījumi	Termiskā degradācija Degradācija oksidatīvā vidē Hidrolītiskā degradācija skābā vidē Hidrolītiskā degradācija sarmainā vidē Fotodegradācija

LOD, LOQ un sistēmas piemērotības pārbaudē kritēriji ir izvēlēti, balstoties uz maksimālo atļauto piemaisījuma saturu analizējamajā paraugā.

Degradācijas pētījumu veidi ir izvēlēti saskaņā ar ICH prasībām [30]. Kopā ir veikti pieci degradācijas pētījumi.

**Termiskā degradācija.** Zināms, ka reakcijas ātrums pieaug līdz ar temperatūras paaugstināšanu. Dažādas farmaceitiskās vielas (vitamīni, peptīdi, u.c.) ir nestabilas paaugstinātā temperatūrā. Termiskās degradācijas procesā var norisināties dažādas reakcijas, piem., hidrolīze, pirolīze, dekarboksilešana, izomerizācija, pārgrupēšanas vai polimerizācija.

Parasti termiskās degradācijas pētījumi notiek temperatūras diapazonā no 40 °C līdz 80 °C [30].

**Degradācija oksidatīvā vidē.** Ūdeņraža pārskābe ir bieži lietots oksidētājs paātrinātajos degradācijas pētījumos, parasti lietojot 0,1 – 3,0 % stipru šķīdumu neitrālā vidē istabas temperatūrā. Tomēr ir atļauts izmantot arī metāla jonus, skābekli un radikālo reakciju iniciatorus (piem. azobisisobutironitrilu). Oksidējošā reaģenta izvēle, koncentrācija un degradācijas apstākļi ir atkarīgi no pētāmās vielas īpašībām. Amīni iesaistās oksidēšanās reakcijās ar elektronu pārnesi, veidojot N-oksīdus, hidroksilamīnu, u.c. [30].

**Hidrolītiskā degradācija.** Bieži sastopama ķīmiska reakcija, notiek plašā pH diapazonā. Hidrolīze ir solvatācijas process, kurā notiek farmaceitiskās vielas reakcija ar ūdeni. Ūdens var saskarties ar zālēm gan gaisā, gan analītisko paraugu pagatavošanā - šķīdinātājā lomā [31].

**Fotodegradācija.** Fotodegradācijas apstākļi minēti ICH vadlīnijās. Iespējami divi veidi: starojums ar viļņa garumu no 320 līdz 400 nm (UV starojums), ar jaudu ne mazāk par  $200 \text{ W} \times \text{st}/\text{m}^2$ , vai nepārtraukta spektra avotu, ar minimālo spilgtumu  $1200000 \text{ luks}$  \*st.

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Izmantotās iekārtas un trauki

Hromatogrāfiskā sistēma – *Waters 2695 model*; Ser. Nr. E05SM4167M;

Detektors – *Micromass Quattro micro API* Ser. Nr. QAA1150;

Nepārtrauktās barošanas bloks – *APC 7500* Ser. Nr. 99941245;

Analītiskie svāri – *Sartorius ME235S OCE*; Ser. Nr. 21410307 ( $\pm 0,01$  mg);

pH metrs – *SevenCompact*, Ser. Nr. B148486414 ( $\pm 0,01$ );

Izšķīdinātā skābekļa koncentrācijas mērītājs – *Oakton*, Ser. Nr. 963763,

Iekārta fotostabilitātes pētījumiem – *Sun Test CPS+*, *AtlasMTT GmbH*, Ser. Nr. 1009006;

Ultraskaņas vanna – *Cole-Parmer 8893-26*;

Kolonnas – *Waters X-Terra MS-C18*, 150 x 3.0 mm, particle size 3.5  $\mu$ m Kat.Nr. 186000422,

Ser. No. 021183821312103 Nr. 271, Ser. No. 021183821312109, Nr. 270;

Maisītājs – *Velp Vortex* Ser. No. 66163;

Centrifūga – *Labnet Spectrafuge 24 D* Ser. No. D609745;

Automātiskā pipete – *Transferpette*, 100 - 1000  $\mu$ L, ( $\pm 0,64$   $\mu$ L), Ser. No. 08C7073;

Automātiskā pipete – *Finnpipette*, 10 – 100  $\mu$ L, ( $\pm 0,29$   $\mu$ L), Ser. No. CJ08726;

Pipetes – 1,0 mL, ( $\pm 0,006$  mL), A klases;

Mērkolbas – 100 mL, ( $\pm 0,10$  mL), A klases;

Mērkolbas – 20 mL, ( $\pm 0,03$  mL), A klases;

Centrifūgas stobriņi – *Brand*, 1,5 mL, PP, Maks. RCF 20,000 g

Datorprogrammas – *Masslynx 4.0*, *Symyx Draw*, *Microsoft Word 365*, *Microsoft Excel 365*.

### 2.2. Izmantotās standartvielas un reaģenti

Ūdens hromatogrāfijai – *Millipore Milli-Q Gradient A10* ( $R \geq 18,2$  M $\Omega$ ·cm; TOC: 1 ppb);

Metanols – *Biochem*, Kat.Nr. 213012500, *HPLC grade*, Ser. Nr. 3312/13, 31.08.2018.

Acetonitrils – *Fisher Chemical*, Kat.Nr. A/0627/17, *HPLC grade*, Ser. Nr. 1362912, 21.02.2017;

Benzoilhlorīds – *Sigma Aldrich*, Kat.Nr. 259950, 99,0 %, Ser. Nr. SHBC8811V, 31.11.2016.

HFSS – *Across Organics* Kat.Nr. 172801000, 99,0 %, Ser. Nr. A0351251, 31.08.2017.

N,N-Diizopropiletilamīns – *Sigma Aldrich*, Kat.Nr.125806, 99,0 %, Ser. Nr. STBF4708V, 31.02.2018.

Trietilamīns – *Sigma Aldrich*, Ser. Nr. STBF9163V, 99,7 %, 31.10.2018;

Propilēnglikols – *Sigma Aldrich*, Ser. Nr. LRAA5984, 99,5 %, 31.12.2019;  
 1,1-Dimetilhidrazīns – *Sigma Aldrich*, Ser. Nr. BCBQ8323V, 98,0 %, 01.11.2017;  
 Propanons-2 – *Sigma Aldrich*, Ser. Nr. STBF6354V, > 99,90 %, 01.07.2018;  
 Propanols-2 – *Chempur*, Ser. Nr. 16/07/01, >99,8 %, 21.10.2021;  
 Ciklopentanons – Ser. No. 120-92-3 99 % (GC);  
 Benzaldehīds (uzņēmuma standartviela) – Ser. Nr. STBF5431V, 99,0 %;  
 Ciklopentanona N,N-dimetilhidrazons (uzņēmuma standartviela) – Ser. Nr. L-11091503  
 98,5 %. 21.11.2017;  
 Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīds (uzņēmuma standartviela) – Ser. Nr. L-11091501 99,5 %.  
 21.11.2017;  
 Benzaldehīda N,N-dimetilhidrazons (uzņēmuma standartviela) – Ser. Nr. L-11091502 98,7 %.  
 21.11.2017;  
 Paraugi, tehniskais mildronāta dihidrāts (*Meldonium dihydrate crude*) – TP.2.2 AP-290-16V

### 2.3. Izstrādātās analīzes metodes apstākļi

Darbā izmantota AEŠH sistēma *Waters 2695* ar MS/MS detektoru *Micromass Quattro micro API*. Iekārtas darbības apstākļi ir aprakstīti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

#### AEŠH/MS/MS sistēmas parametri

<b>Kolonna:</b>	<i>Waters X-Terra MS-C18</i> , 150 x 3,0 mm, daļiņu diametrs 3,5 μm;			
<b>Kolonnas temperatūra:</b>	25 °C;			
<b>Paraugu temperatūra:</b>	10 °C;			
<b>Kustīgā fāze A:</b>	0,1 % HFSS šķīdums ūdenī;			
<b>Kustīgā fāze B:</b>	0,1 % HFSS šķīdums metanolā;			
<b>Izmantots gradients:</b>	Laiks, (min)	Plūsma, (mL/min)	<b>Kustīgā fāze A,</b> %	<b>Kustīgā fāze B,</b> %
	0	0,25	90	10
	7	0,25	65	35
	12	0,25	40	60
	18	0,25	25	75
	19	0,25	90	10
	25	0,25	90	10
<b>Ievadītā parauga tilpums:</b>	20 μL;			
<b>Blīvju mazgāšanas šķīdums:</b>	50 % acetonitrils;			
<b>Adatas mazgāšanas šķīdums:</b>	50 % acetonitrils;			
<b>Detektēšanas režīms:</b>	MRM – gatavai metodei			
	Skenēšana, izstrādes laikā			
<b>Jonu avotu temperatūra:</b>	110 °C;			
<b>Izsmidzinātāja temperatūra:</b>	220 °C;			
<b>Izsmidzinošās gāzes plūsma:</b>	600 L/st. (slāpekļis);			

Konusa gāzes plūsma:	20 L/st. (slāpekļis);				
Spriegums uz kapilāra:	3,00 kV;				
MRM parejas	Jonu masa, m/z	Meitas jona masa, m/z	Pauzes laiks, s	Konusa spriegums, V	Sadursmes enerģija, eV
	165,1	43,7	0,2	27	16
Skenēšanas diapazons	70 – 400 Da				

## 2.4. Šķīdumu pagatavošana

**Kustīgā fāze A:** 1,0 mL koncentrētas HFSS pārnēs 1000 mL mērkolbā. Atšķaida ar ūdeni līdz mērzīmei, samaisa.

**Kustīgā fāze B:** 1,0 mL koncentrētas HFSS pārnēs 1000 mL mērkolbā. Atšķaida ar metanolu līdz mērzīmei, samaisa.

*Visas tālākas darbības jāveic velkmes skapī, pilnā gāzmaskā ar filtriem ne zemākiem par ABEK līmeni.*

**Kontroles šķīduma pagatavošana.** Ar Mora pipeti pārnēs 1,0 mL ūdens hromatogrāfijai, 1,0 mL izopropanola 20 mL mērkolbā, ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Ar automātisko pipeti pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju, 30 sek., pie 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnēs centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Standartšķīduma pagatavošana.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā, precīzi nosver ar analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnēs 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. Ar automātisko pipeti 200 µL pagatavotā šķīduma pārnēs 20 mL mērkolbā, pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL ūdens hromatogrāfijai, 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Ar automātisko pipeti pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju, 30 sek., pie 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnēs centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 min, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Analizējama šķīduma pagatavošana.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā meldonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL ūdens hromatogrāfijai, izšķīdina. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju, 30 sek., pie 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Sistēmas piemērotības pārbaudes šķīduma pagatavošana.** Izmanto standartšķīdumu.

## 2.5. Minimālais 1,1-dimetilhidrazīna saturs un sistēmas piemērotības pārbaude

Maksimāli pieļaujamais 1,1-dimetilhidrazīna saturs farmaceutiskajā preparātā ir 1,5 ppm.

**Sistēmas piemērotības pārbaude.** Kā sistēmas piemērotības kritērijs tiek izvēlēta signāla/trokšņa attiecība. Minimāla signāla/trokšņa attiecība benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda joslai standartšķīdumā ir 50. Ja atrastā vērtība ir zemāka par 50, sistēmas jutība nav pietiekama.

## 2.6. Izmantotās aprēķinu formulas un paraugu ievadišanas secība

AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kārtībā:

*Kontroles šķīdums,*

*analizējamais šķīdums,*

*standartšķīdums.*

Pēc katras analizējamā šķīduma injekcijas vēlams veikt kustīgās fāzes B injekciju.

1,1-Dimetilhidrazīna saturs (ppm) aprēķināms pēc formulas:

$$C_{ppm} = \frac{S_{an} \times C_{st} \times \gamma \times V_{an} \times 10000 \times R_f}{S_{st} \times m_{an}}, \quad (2.1.)$$

kur,

$S_{an}$  – benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums analizējamā šķīduma hromatogrammā;

$V_{an}$  – analizējamā šķīduma tilpums, mL (20);

$\gamma$  – 1,1-dimetilhidrazīna standartvielas kvantitatīvais saturs, (95);

$C_{st}$  – 1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija standartšķīdumā, mg/mL (0,00001);

$S_{st}$  – benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums standartšķīduma hromatogrammā;

$m_{an}$  – parauga masa, mg (133);

10000 – pārrēķināšanas faktors no % uz ppm;

$R_f$  – pārrēķināšanas faktors standartšķīdumam:

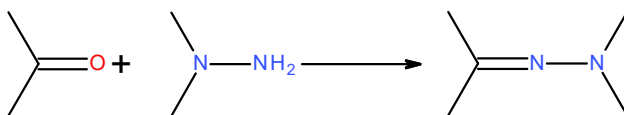
0,61 1,1-dimetilhidrazīna hidrochlorīdam;

1,00 1,1-dimetilhidrazīnam.

## 2.7. Derivatizēšanas produkta iegūšana

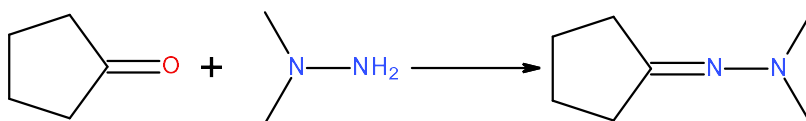
Tālākai sintēzei un izpētei tiek izvēlēti četri derivatizēšanas reaģenti: propanons-2, ciklopentanons, benzaldehīds un benzoilchlorīds.

**1,1-dimetilhidrazīna reakcija ar propanonu-2.** Ar Mora pipeti pārnes 2,0 mL metanola 15 mL centrifūgas stobriņā. Ar automātisko pipeti pievieno 100  $\mu$ L propanona-2, 10  $\mu$ L 1,1-dimetilhidrazīna. Reakcijas maisījumu sakrata, atstāj uz 3 stundām. Iegūto šķīdumu kvantitatīvi pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa un izmanto tālākiem eksperimentiem. Notiekošās reakcijas shēma parādīta 2.1. att.



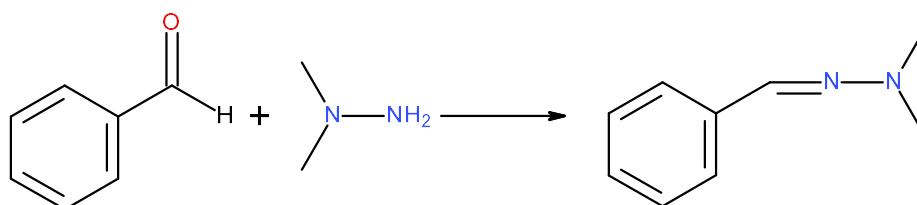
2.1. att. 1,1-Dimetilhidrazīna reakcija ar propanonu-2

**1,1-Dimetilhidrazīna reakcija ar ciklopentanonu.** Ar Mora pipeti pārnes 2,0 mL metanola 15 mL centrifūgas stobriņā. Ar automātisko pipeti pievieno 100  $\mu$ L ciklopentanona, 10  $\mu$ L 1,1-dimetilhidrazīna. Reakcijas maisījumu sakrata, atstāj uz 3 stundām. Iegūto šķīdumu kvantitatīvi pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa un ievieto ultraskaņas vannā uz 20 min. Iegūto maisījumu centrifugē 10 min pie 16000 g, ūdens slāni izmanto tālākiem eksperimentiem. Notiekošās reakcijas shēma parādīta 2.2. att.



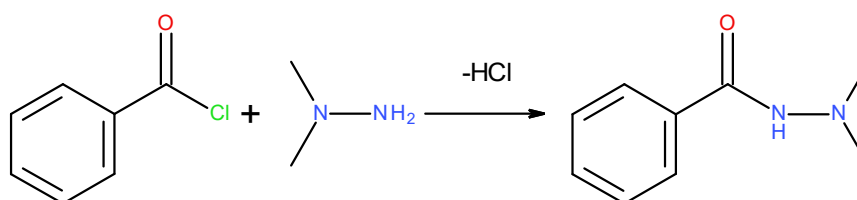
2.2. att. 1,1-Dimetilhidrazīna reakcija ar ciklopentanonu

**1,1-Dimetilhidrazīna reakcija ar benzaldehīdu.** Ar Mora pipeti pārnes 2,0 mL propilēnglikola 15 mL centrifūgas stobriņā. Ar automātisko pipeti pievieno 100 µL benzaldehīda, 10 µL 1,1-dimetilhidrazīna. Reakcijas maisījumu sakrata, atstāj uz 3 st. Iegūto šķīdumu kvantitatīvi pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa un ievieto ultraskaņas vannā uz 20 min. Iegūto maisījumu centrifugē 10 minūtes pie 16000 g, ūdens slāni izmanto tālākiem eksperimentiem. Notiekošās reakcijas shēma parādīta 2.3. att.



2.3. att. 1,1-Dimetilhidrazīna reakcija ar benzaldehīdu

**1,1-dimetilhidrazīna reakcija ar benzoilchlorīdu.** Ar Mora pipeti pārnes 2,0 mL metanola 15 mL centrifūgas stobriņā. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL benzoilchlorīda, 100 µL TEA, 10 µL 1,1-dimetilhidrazīna. Reakcijas maisījumu sakrata, atstāj uz 3 stundām. Iegūto šķīdumu kvantitatīvi pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, ievieto ultraskaņas vannā uz 60 min. Iegūto maisījumu centrifugē 10 min pie 16000 g, ūdens slāni izmanto tālākiem eksperimentiem. Notiekošās reakcijas shēma parādīta 2.4. att.

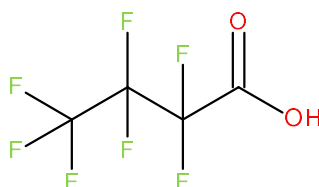


2.4. att. 1,1-dimetilhidrazīna reakcija ar benzoilchlorīdu

Izvērtējot derivatizēšanas reakcijas produktu aiztures laikus, signālus u.c. parametrus, tiek pasūtītas doto savienojumu standartvielas. Galvenais iemesls – nav iespējams spriest par savienojuma signāla intensitāti, ja nav zināma vielas koncentrācija analizējamā šķīdumā. Tālākos pētījumos reaģentu daudzumi tiek koriģēti, lai atvieglotu to pagatavošanu vairāku paraugu gadījumā. Iegūto savienojumu identitātes noteikšanai tiek veikta salīdzināšana ar standartvielām.

## 2.8. AEŠH/MS sistēmas analīzes apstākļu izvēle un optimizēšana

Hidrazīna grupu saturošie savienojumi pārsvarā ir polāri savienojumi. Tādu savienojumu analīze ar apgrieztās fāzes kolonnu ir apgrūtināta nepietiekamas aiztures dēļ. Pastāv divas iespējas dotās problēmas risināšanai: jonu pāru reaģenta izmantošana, vai analīze ar HILIC kolonnu [32,33]. Darbam tika izvēlēts jonu pāru reaģents, jo, strādājot HILIC režīmā, paraugs tiek atšķaidīts fāzē ar lielu acetonitrila koncentrāciju (ap 80 %) [33]. Derivatizēšanas aģenta atdalīšana no tādiem maisījumiem ir apgrūtināta un darbietilpīga. HILIC režīmā joslas aiztures laiki stipri atkarīgi no pH un šķīduma jonu spēka [33]. 1,1-Dimetilhidrazīna ar benzoilhlorīdu reakcijas gadījumā, joslas aiztures laiku izkliede varētu būt nepieņemama. Kā jonu pāru reaģents ir izvēlēta HFSS (sk. 2.5. att.). Dotā viela ir savietojama ar AEŠH/MS sistēmu, tā ir gaistoša, un ļauj sasniegt labāku jutību nekā TFA [32]. Tika pārbaudīta iespēja izmantot metanolu un acetonitrilu kā kustīgās fāzes komponentu, kā arī tika veikta gradienta pielāgošana.



### 2.5. att. HFSS struktūrformula

Detektēšana notiek ES+ režīmā. Izmantojot tiešo parauga ievadīšanu (apstākļi aprakstīti 2.2. tabulā), katram iegūtam savienojumam tika pārbaudīta identitāte. Tika pārbaudīta jonu avota temperatūras ietekme, izsmidzināšanas gāzes plūsmas un temperatūras izmaiņu un konusa gāzes plūsmas ātruma ietekme. Tika atrasti fragmentu joni, sadursmes enerģijas, kā arī citi optimālie analīzes parametri, kas ļauj sasniegt maksimālo jutību. Iegūtie dati ļauj izmantot MRM režīmu analīzes gaitā. Tika izvērtēta iespēja veikt eksperimentus SIR vai MRM režīmā.

2.2. tabula

### Tiešās injekcijas parametri

Parauga ievadīšanas veids:	Tiešā injekcija;
Parauga ievadīšanas ātrums:	20 µL/min;
Detektēšanas režīms:	Skenēšana 70 – 400 m/z
Jonu avota temperatūra:	110 °C;
Izsmidzinātāja temperatūra:	220 °C;
Izsmidzinošās gāzes plūsma:	600 L/st. (slāpekļis);
Konusa gāzes plūsma:	20 L/st. (slāpekļis);
Spriegums uz kapilāra:	3,00 kV.

## 2.9. Derivatizēšanas reakcijas produktu salīdzinājums

Izmantojot optimizētos AEŠH/MS apstākļus, iegūtiem savienojumiem tika pārbaudīti sistēmas piemērotības parametri. Optimizētās sistēmas lietderība doto savienojumu analīzei tika izvērtēta pēc tādiem parametriem kā: sorbcijas koeficients, teorētisko šķīvju skaits, signāla/trokšņa attiecība, joslas asimetrija.

Sorbcijas koeficienta noteikšanas formula:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.2.)$$

kur,

$k'$  – sorbcijas koeficients;

$t_R$  – pētāmās vielas joslas aiztures laiks, min;

$t_0$  – kustīgās fāzes frontes aiztures laiks, min.

Teorētisko šķīvju skaita noteikšanas formula:

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_r}{w_h} \right)^2 \quad (2.3.)$$

kur,

$N$  – teorētisko šķīvju skaits;

$t_R$  – pētāmās vielas joslas aiztures laiks, min;

$w_h$  – joslas platums pusaugstumā, min.

Joslas asimetrijas noteikšanas formula:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (2.4.)$$

kur,

$A_s$  – joslas asimetrijas faktors;

$w_{0,05}$  – joslas platums 5 % augstumā, min;

$d$  – attālums, starp perpendikulu no joslas maksimuma un joslas fronti, 5 % augstumā, min.

## 2.10. Reakcijas vides ietekme uz benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu

**Pētāmā šķīduma pagatavošana, pētot reakcijas vides ietekmi uz benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem, apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mēratzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar

Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. Ar automātisko pipeti 200 µL pagatavotā šķīduma pārnes piecās 20 mL mērkolbās. Katrā mērkolbā pievieno šķīdinātājus un reaģentus, pēc 2.3. tabulas apraksta.

**Standartvielas šķīduma pagatavošana, pētot reakcijas vides ietekmi uz benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā, precīzi nosver, uz analītiskiem svāriem, apmēram 27 mg benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. Ar automātisko pipeti 200 µL pagatavota šķīduma pārnes 20 mL mērkolbā, atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa.

2.3. tabula

**Pievienotās vielas daudzumi, pētot N,N-dimetilhidrazīda iznākumu**

Kolbas Nr.	1.	2.	3.	4.	5.
Acetonitrils	2,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	-	-
Izopropanols	-	-	-	2,0 mL	1,0 mL
Ūdens	-	-	1,0 mL	-	1,0 mL
DIPEA	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL	75 µL
Benzoilhlorīds	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Iegūto maisījumu intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju, 30 sek., pie 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Analīzei izmanto augšējo slāni. Katrs no eksperimentiem tika atkārtots trīs reizes. Pēc iegūtiem datiem aprēķina iznākumu, RSN.

## 2.11. Validācijas eksperimenti

### 2.11.1. Specifiskums

**Kontroles šķīduma pagatavošana.** Sk. “2.4. šķīduma pagatavošana”.

**Analizējamā šķīduma pagatavošana.** Sk. “2.4. šķīduma pagatavošana”.

**Standartšķīduma pagatavošana.** Sk. “2.4. šķīduma pagatavošana”.

AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kārtībā:

*kontroles šķīdums,*

*analizējamais šķīdums,*

*standartšķīdums.*

Visam joslām jābūt atdalītam: kustīgas fāzes signāls, kontroles šķīduma signāls, bāzes līnijas fluktuācijas un derivatizēšanas reaģenta signāls neietekmē benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda joslu.

### 2.11.2. Sistēmas piemērotības pārbaude

Izmanto *standartšķīduma hromatogrammu*. Aprēķina signāls/troksnis attiecību, As, teorētisko šķīvju skaitu.

### 2.11.3. Linearitāte

Linearitātes diapazonā jāizvēlas vismaz piecus punktus, minimālā diapazonā no 10 %, līdz 180 %, no maksimāli atļautas benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda satura.

**Pamatšķīduma pagatavošana linearitātes diapazona pārbaudei.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 10 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. Ar automātisko pipeti 200 µL pagatavotā šķīduma pārnes 20 mL mērkolbā, pievienoja ar Mora pipeti 1,0 mL ūdens hromatogrāfijai, 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Ar automātisko pipeti pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek., pie 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 min, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni. Iegūtā šķīduma koncentrācija ir 15 ppm no pamatvielas koncentrācijas šķīduma, jeb 100 ng/mL.

**Šķīdumu pagatavošana linearitātes apgabala pārbaudei.** Pamatšķīdumu linearitātes apgabala pārbaudei pārnes 10 mL mērkolbā, saskaņā ar 2.4. tabulu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei.

2.4. tabula

#### Šķīdumu pagatavošana linearitātes apgabala pārbaudei

Šķīduma Nr.	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10
<b>Pamatšķīduma tilpums</b>	0,1 mL	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	1,0 mL	1,2 mL	1,4 mL	1,6 mL	1,8 mL
<b>Iegūta koncentrācija, ng/mL</b>	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0

Iegūta koncentrācija, no maksimāli atļautā benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda satura, %	10	20	40	60	80	100	120	140	160	180
Iegūta benzoscābes N,N-dimetilhidrazīda koncentrācija, no meldonija dihidrāta, ppm	0,15	0,30	0,60	0,90	1,20	1,50	1,80	2,10	2,40	2,70

AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kartībā:

Ievada katru šķīdumu (koncentrācijas pieaugšanas kartībā) *linearitātes apgabala pārbaudei* trīs reizes.

#### 2.11.4. Precizitāte

##### Sistēmas precizitāte

**Sistēmas precizitātes pamatšķīdums Nr. 1.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa.

**Sistēmas precizitātes pamatšķīdums Nr. 2.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā meldonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar pipeti 0,8 mL ūdens hromatogrāfijai, izšķīdina.

**Sistēmas precizitātes analizējamais šķīdums.** Pārnes ar automātisko pipeti 200 µL *Sistēmas precizitātes pamatšķīduma Nr. 1.* 20 mL mērkolbā ar *Sistēmas precizitātes pamatšķīdumu Nr. 2.*, pievieno 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Ar automātisko pipeti pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 min ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni. Iegūta šķīduma koncentrācija ir 1,5 ppm no pamatvielas koncentrācijas šķīdumā, vai 10,0 ng/mL. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada iegūto šķīdumu 6 reizes.

## Metodes precizitāte

**Metodes precizitātes analizējamais šķīdums.** Pagatavo sistēmas precizitātes analizējamo šķīdumu 6 reizes. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada katru iegūto šķīdumu vienu reizi.

## Starplaboratoriju precizitāte

Otras AEŠH/MS sistēmas iztrūkuma dēļ cits analītiķis veic analīzi ar to pašu iekārtu, bet citas sērijas kolonnu, svaigi pagatavotu kustīgo fāzi, u.c. Zemā piemaisījuma satura dēļ otrais analītiķis atkārtoti metodes precizitātes testu (izmanto piemaisījuma piedevu paraugam).

**Starpprecizitātes analizējamais šķīdums.** Izmanto *metodes precizitātes analizējamo šķīdumu*. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada katru iegūto šķīdumu vienu reizi.

### 2.11.5. LOD, LOQ

**LOD analizējamais šķīdums.** Izmanto *linearitātes šķīdumu Nr. 1*. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada iegūto šķīdumu trīs reizes.

Signāla/trokšņa attiecība tika aprēķināta ar *Masslynx 4.0* programmatūru  
LOD, „%” vērtība aprēķināta pēc formulas,

$$LOD = \frac{C \times 3}{S / N} \quad (2.5.)$$

kur,

$C$  – ievadītā šķīduma koncentrācija, %;

$S/N$  – iegūta signāla/trokšņa attiecība.

**LOQ analizējamais šķīdums.** Izmanto *linearitātes šķīdumu Nr. 1*. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada iegūto šķīdumu trīs reizes.

Signāla/trokšņa attiecība tika aprēķināta ar *Masslynx 4.0* programmatūru

LOQ, „%” vērtība aprēķināta pēc formulas,

$$LOQ = \frac{C \times 10}{S / N} \quad (2.6.)$$

kur,

$C$  – ievadītā šķīduma koncentrācija, %;

$S/N$  – iegūta signāls/troksnis attiecība.

## 2.11.6. Atgūstamība/pareizība

Atgūstamības/pareizības (tālāk tekstā atgūstamība) pārbaude ir veikta diapazonā no 80 % līdz 120 % no 10,0 ng/mL 1,1-dimetilhidrazīna koncentrācijas (1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija tehniskā meldonijā 1,20 – 1,80 ppm). Pārbaude ir veikta arī pie 1,0 ng/mL 1,1-dimetilhidrazīna koncentrācijas (1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija tehniskā meldonijā 0,15 ppm, LOQ robežā).

**Atgūstamības standartšķīduma pagatavošana.** Izmanto *linearitātes šķīdumu*  
Nr. 6.

**Atgūstamības pamatšķīdums Nr. 1.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 100 µL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa.

**Atgūstamības pamatšķīdums Nr. 2.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 800 µL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa.

**Atgūstamības pamatšķīdums Nr. 3.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,0 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa.

**Atgūstamības pamatšķīdums Nr. 4.** 100 mL mērkolbā ielej apmēram 20 mL ūdens. Tajā pašā mērkolbā precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 10 mg 1,1-dimetilhidrazīna. Atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa. 1,2 mL pagatavotā šķīduma ar Mora pipeti pārnes 100 mL mērkolbā, atšķaida ar ūdeni hromatogrāfijai līdz mērzīmei, samaisa.

**Atgūstamības pamatšķīdums Nr. 5.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā meldonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar pipeti 0,8 mL ūdens hromatogrāfijai, izšķīdina.

**Atgūstamības analizējamie šķīdumi.** Pārnes ar automātisko pipeti 200 µL *Atgūstamības pamatšķīduma Nr. 1-4*, saskaņā ar 2.5. tabulu, 20 mL mērkolbā ar *Atgūstamības pamatšķīdumu Nr. 5*, pievieno 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL

DIPEA, samaisa. Ar automātisko pipeti pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 min ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni. Iegūta šķīduma koncentrācija 1,5 ppm no pamatvielas koncentrācijas šķīduma, vai 10 ng/mL. AEŠH/MS/MS sistēmā ievada iegūto šķīdumu 6 reizes.

2.5. tabula

#### Sistēmas precizitātes analizējamo šķīdumu pagatavošana

Šķīduma Nr.	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Pamatšķīduma Nr.	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Pamatšķīduma Nr.	Nr. 5	Nr. 5	Nr. 5	Nr. 5
1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija, no atļautas normas, %	10	80	100	120
Iegūta koncentrācija, ng/mL	1,0	8,0	10,0	12,0

Pagatavo katru *Atgūstamības analizējamo šķīdumu trīs reizes.*

AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kārtībā:

*Atgūstamības standartšķīdums* - trīs reizes,

*Atgūstamības analizējamais šķīdums* – katrs vienu reizi.

#### 2.11.7. Metodes noturība

Metodes noturība tika pārbaudīta, veicot dažādas sistēmas variācijas.

**Metodes noturības Analizējamais šķīdums.** Izmanto *sistēmas precizitātes šķīdumu*.

**Analizējamā šķīduma stabilitāte.** Ievada AEŠH/MS/MS sistēmā svaigi pagatavotu šķīdumu un to pašu šķīdumu, glabātu 48 stundas pie 25 °C. Svaigi pagatavoto šķīdumu izmanto arī tālākiem metodes noturības eksperimentiem.

**HFSS daudzuma izmaiņas kustīgajā fāzē.** AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kārtībā:

*Metodes noturības analizējamais šķīdums*, lietojot kustīgo fāzi ar 0,9 % HFSS saturu.

*Metodes noturības analizējamais šķīdums*, lietojot kustīgo fāzi ar 1,1 % HFSS saturu.

#### **Kolonnas maiņa.**

AEŠH/MS/MS sistēmā ievada *Metodes noturības Analizējamais šķīdums*, izmantojot līdzīga tipa kolonnu, bet ar citu sērijas numuru.

**Kolonnas temperatūras maiņa.** AEŠH/MS/MS sistēmā ievada paraugus sekojošā kartībā:

*Metodes noturības analizējamais šķīdumu*, izturot kolonnas temperatūru 20 °C.

*Metodes noturības analizējamais šķīdumu*, izturot kolonnas temperatūru 30 °C.

### 2.11.8. Degradācijas pētījumi

Degradācija tika veikta ar 1,0 M HCl šķīdumu, 1,0 M NaOH šķīdumu, 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> divu stundu laikā, 25 °C temperatūrā. Termiskā degradācija tika veikta 80 °C divu stundu garumā. Foto degradācija veikta redzamās gaismas diapazonā, izmantojot iekārtu ar nepārtraukta spektra gāzizlādes ksenona lampu. Foto degradācijas apstākļi (starojuma intensitāte un ietekmes laiks) izvēlēti, atbilstoši ICH prasībām (120000 luksu×stundā = 170 luksu = 7.1 stundas [34]).

**Standartšķīdums degradācijas pētījumiem.** Izmanto *standartšķīdumu* saskaņā ar 2.3. Izstrādātās metodes analīzes apstākļi.

**Pamatšķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 1.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā melnlonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL 1,0 M HCl, izšķīdina. Atstāj uz divām stundām.

**Pamatšķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 2.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā melnlonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL 1,0 M NaOH, izšķīdina. Atstāj uz divām stundām.

**Pamatšķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 3.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā melnlonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, izšķīdina. Atstāj uz divām stundām.

**Pamatšķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 4.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā melnlonija, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL ūdens, izšķīdina. Atstāj uz divām stundām, termostātā 80 °C temperatūrā.

**Pamatšķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 5.** Precīzi nosver uz analītiskiem svāriem apmēram 133 mg tehniskā melnlonija, pēc foto degradācijas, 20 mL mērkolbā. Pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL ūdens, izšķīdina.

**Analizējamais šķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 1.** 20 mL mērkolbā ar *pamatšķīdumu degradācijas pētījumiem Nr. 1.* pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma

opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Analizējamais šķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 2.** 20 mL mērkolbā ar *pamatšķīdumu degradācijas pētījumiem Nr. 2.* pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Analizējamais šķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 3.** 20 mL mērkolbā ar *pamatšķīdumu degradācijas pētījumiem Nr. 3.* pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Analizējamais šķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 4.** 20 mL mērkolbā ar *pamatšķīdumu degradācijas pētījumiem Nr. 4.* pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

**Analizējamais šķīdums degradācijas pētījumiem Nr. 5.** 20 mL mērkolbā ar *pamatšķīdumu degradācijas pētījumiem Nr. 5.* pievieno ar Mora pipeti 1,0 mL izopropanola. Ar automātisko pipeti pievieno 75 µL DIPEA, samaisa. Pievieno 50 µL benzoilhlorīda, intensīvi maisa ar “Vorteks” maisītāju 30 sek. ar ātrumu 6000 apgr/min (iespējama šķīduma opalescence), atstāj uz vienu stundu. Atšķaida ar kustīgo fāzi A līdz mērzīmei, samaisa, atstāj uz vienu stundu. Iegūto šķīdumu pārnes centrifūgas stobriņā, centrifugē 6 minūtes, ar paātrinājumu 16000 g. Izmanto augšējo slāni.

Katrā analizējamā šķīdumā nosaka 1,1-dimetilhidrazīna saturu.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

#### 3.1. Derivatizēšanas produkta iegūšana

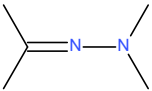
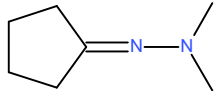
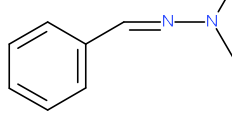
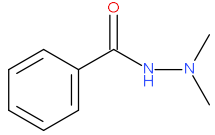
Visos eksperimentos reakcijas gaitā tika iegūts derivatizēšanas produkts. To apliecina iegūtās vielas molekulārā jona masa, kā arī aiztures laika sakritība ar standartvielas laiku AEŠH sistēmā. Propanona-2 N,N-dimetilhidrazonam standartviela nav pieejama. Reakcija starp benzoilhlorīdu un 1,1-dimetilhidrazīnu notiek visintensīvāk, ar siltuma izdalīšanos un iespējamu maisījuma izšļakstīšanos. Maisījumā pirms centrifugēšanas ir novērota kristāliska, balta viela – benzoscābe, kas ir neizreagējušā benzoilhlorīda hidrolīzes produkts[35].

#### 3.2. Derivatizēšanas reakcijas produktu salīdzinājums

Visi derivatizēšanas produkti, izņemot propanona-2 N,N-dimetilhidrazonu, atbilst Eiropas Farmakopejas sistēmas piemērotības pārbaudes prasībām. Iegūtie rezultāti, analizējot šķīdumu ar koncentrāciju 0,01 mg/mL, parādīti 3.1. tabulā.

3.1. tabula

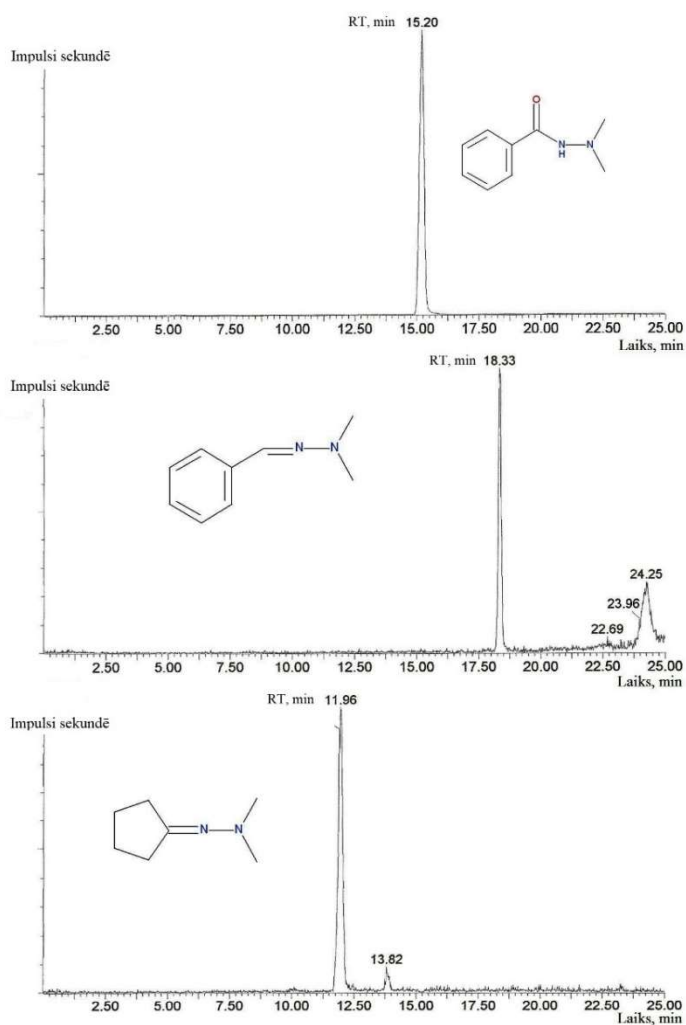
Derivatizēšanas reakcijas produktu salīdzinājums

Viela	Propanona-2 N,N-dimetilhidrazons	Ciklopentanona N,N-dimetilhidrazons	Benzaldehīda N,N-dimetilhidrazons	Benzoscābes N,N-dimetilhidrazons
Vielas struktūra				
Analizējamās vielas jona masa, m/z	101,2	127,2	149,2	165,1
RT, min	8,97	11,96	18,33	15,20
Teorētisko šķīvju skaits	150*	18400*	110900*	30000*
k'	1,98	2,98	5,11	4,07
As	1,31	1,12	1,11	1,10
Attiecība signāls/troksnis	780	840	1600	8860

\*-Analīze veikta kustīgās fāzes gradientā, Teorētisko šķīvju skaits ir šķietams (ir tikai informatīva nozīme).

Izvērtējot iegūtās vērtības, var secināt, ka sistēmas piemērotības prasības propanona-2 N,N-dimetilhidrazona joslai neatbilst izvirzītam kritērijam: teorētisko šķīvju skaits ir < 2000, sorbcijas koeficienta vērtība ir < 2 un signāla/troksņa attiecības vērtība ir zemāka par pārējiem derivatizēšanas produktiem. Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka visperspektīvākie

savienojumi ir benzaldehīda N,N-dimetilhidrazons un benzoskābes N,N-dimetilhidrazons. Benzaldehīda N,N-dimetilhidrazona joslai iegūts anomāli liels teorētisko šķīvju skaits – 110820. Vērtība ir apšaubāma, bet eksperiments tika atkārtots trīs reizes un katru reizi šķīvju skaits bijis līdzīgs. To var pamatot ar maza diametra un pietiekami garu (3,0 x 150 mm) kolonnu, ar samērām mazām sorbenta daļiņām (3,5 μm). Jāņem vērā, ka sorbenta daļiņas dotai kolonnai ir veidotas pēc hibrīdas tehnoloģijas (pamatā ir silīcija dioksīda un polimēra savienojums), un brīvas silanola grupas ir deaktivētas. Līdz ar to, kolonnai ir minimāla silanola aktivitāte, kas samazina bāziskās vielas joslas asimetriju un izplūšanu. Benzaldehīda N,N-dimetilhidrazona joslas platums pusaugstumā ir tikai 7,6 sekundes. Hromatogramma ar ciklopentanona N,N-dimetilhidrazona, benzaldehīda N,N-dimetilhidrazona un benzoskābes N,N-dimetilhidrazona joslām parādīta 3.1.att.



**3.1. att. Hromatogrammas ar ciklopentanona N,N-dimetilhidrazona, benzaldehīda N,N-dimetilhidrazona un benzoskābes N,N-dimetilhidrazona joslām.**

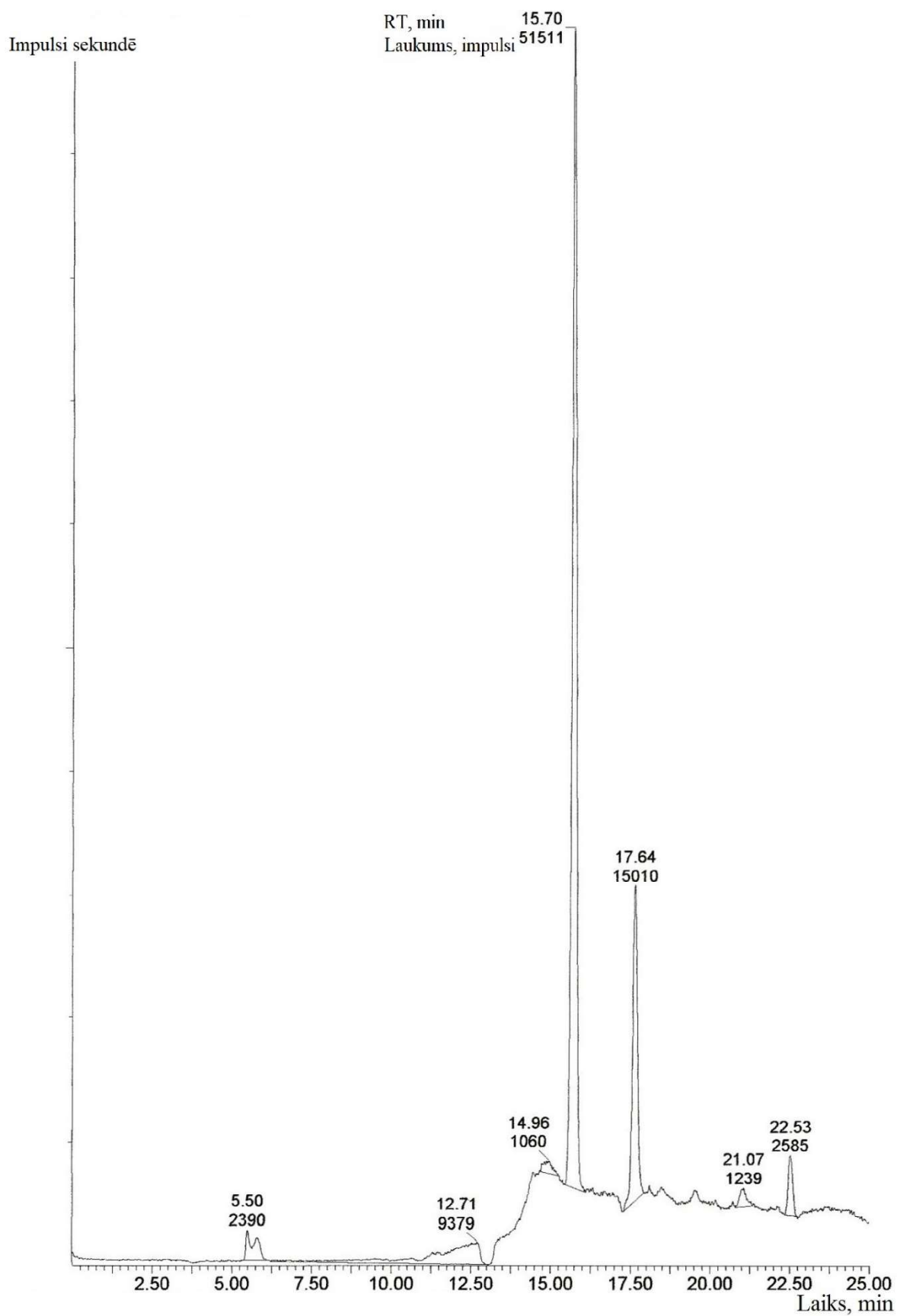
No visiem savienojumiem tālākiem pētījumiem tika izvēlēts benzoskābes N,N-dimetilhidrazons. Savienojumam ir visaugstākā signāla intensitāte, pietiekošs teorētisko

šķīvjū skaits (>2000), pieņemama aiztures faktora vērtība ( $2 < k' < 10$ ) un joslas asimetrijas faktors. Savienojuma iegūšanai tika izmantots derivatizēšanas reaģents, kas nešķīst ūdenī. Līdz ar to, centrifugešanas procesā neizreagējošo vielu ir viegli atdalīt. Eksperimenta gaitā tika novērots, ka benzoscābes N,N-dimetilhidrazons ir vienīgais no iegūtiem savienojumiem, kas atrodas cietā agregātstāvoklī, pārējās vielas ir šķīdņas. Sakarā ar to, iegūto vielu vieglāk saglabāt un svērt. Savienojuma struktūrā ir benzola gredzens, kas teorētiski pieļauj analīzei izmantot AEŠH/UV sistēmu (dubultās saites). Izvērtēta iespēja izmantot DIPEA savienojumu TEA vietā, kā aizsargāto bāzi, kas praktiski nepiedalās nukleofīlās aizvietošanas reakcijās.

### 3.3. AEŠH/MS sistēmas analīzes apstākļu izvēle un optimizēšana

Veicot AEŠH sistēmas parametru optimizēšanu, tika secināts, ka optimālais kustīgās fāzes komponents ir metanols. Izmantojot doto savienojumu grupai acetonitrilu, nav iespējams sasniegt pietiekamu vielas atdalīšanu. Ar izmantoto gradientu tika panākta pilnīga derivatizēšanas produkta, reaģenta un DIPEA atdalīšana.

Visi eksperimenti tika veikti ES+ iekārtas darbības režīmā. Iegūtie derivatizēšanas reakcijas produkti viegli veido jonus  $[M + H]^+$  veidā. Adukti ar nātriju  $[M + Na]^+$  nav konstatēti. Veicot masspektrometra analizatora optimizāciju, atrasti parametri, lai sasniegtu maksimālo jutību (sk. 2.1. tabulā). Tomēr izsmidzinošās gāzes plūsma nav pilnīgi optimāla: palielinot to līdz 700 L/st., jutība pieaug, bet kļūst pamanāmas gāzes plūsmas svārstības. Ņemot vērā, ka parametrs ietekmē kustīgās fāzes un parauga izsmidzināšanu, secināts, ka gāzes plūsma jāsamazina līdz stabilam līmenim. Tika salīdzinātas hromatogrammas, kas iegūtas SIR un MRM režīmos. Strādājot SIR režīmā, novērotas bāzes līnijas svārstības. Svārstību līmenis bija tik ievērojams, ka apgrūtināja benzoscābes N,N-dimetilhidrazona joslas laukuma aprēķināšanu (sk. 3.2. att.). Tāpēc tika pieņemts lēmums par MRM režīma izmantošanu (sk. 1. - 4. pielikumu).



3.2. att. Standartšķiduma hromatogramma SIR režīmā

### 3.4. Reakcijas vides ietekme uz benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda iznākumu

Reakcijas vides ietekme uz 1,1-dimetilhidrazīna pārvērtības pakāpi apkopota 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Reakcijas vides ietekme uz 1,1-dimetilhidrazīna iznākumu

Reakcijas vide	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazona iznākums, %	Iznākums, vid., %	RSN, %
Acetonitrils, 2,0 mL	67,1	71,1	6,4
	70,3		
	76,1		
Acetonitrils, 1,0 mL	60,5	62,6	2,8
	63,6		
	63,5		
50 % Acetonitrils, 2,0 mL	5,3	6,1	21,5
	7,6		
	5,4		
Izopropanols, 2,0 mL	41,1	44,3	6,3
	46,4		
	45,5		
50 % Izopropanols, 2,0 mL	88,7	91,7	2,9
	93,7		
	92,8		

No iegūtiem datiem var secināt, ka 1,1-dimetilhidrazīna derivatizēšana vislabāk norisinās izopropanola šķīdumā (50% iPr-OH), (produkta iznākums ir 91,7 %). Izvērtējot RSN = 2,9 %, var secināt, ka derivatizēšanas metode atbilst izvirzītajam prasībām (RSN < 10) [11].

### 3.5. Validācijas eksperimentu rezultāti

#### 3.5.1. Specifiskums

Visas joslas ir pilnībā atdalītas. Nav pārklāšanās ar šķīdināšanas vides vai reaģentu joslām. Izmantojot MRM detektora darbības režīmu, pētāmās vielas hromatogrammā nav novērotas šķīdināšanas vides un reaģentu maisījuma joslas. Tas nozīmē, ka metode ir specifiska.

### 3.5.2. Sistēmas piemērotības pārbaude

Izmantojot datus no hromatogrammas (1,1-dimetilhirazīna koncentrācijā 10,0 ng/mL), tika aprēķināta signāla/trokšņa attiecība (3.3. tabula). Raksturīgā hromatogramma ir parādītā 5. pielikumā.

3.3. tabula

#### Sistēmas piemērotības pārbaude, signāla/trokšņa attiecība

Vielā	Minimālā signāls/trokšnis attiecība	Iegūta signāls/trokšnis attiecība
Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīds	S/N NLT 50	S/N = 257

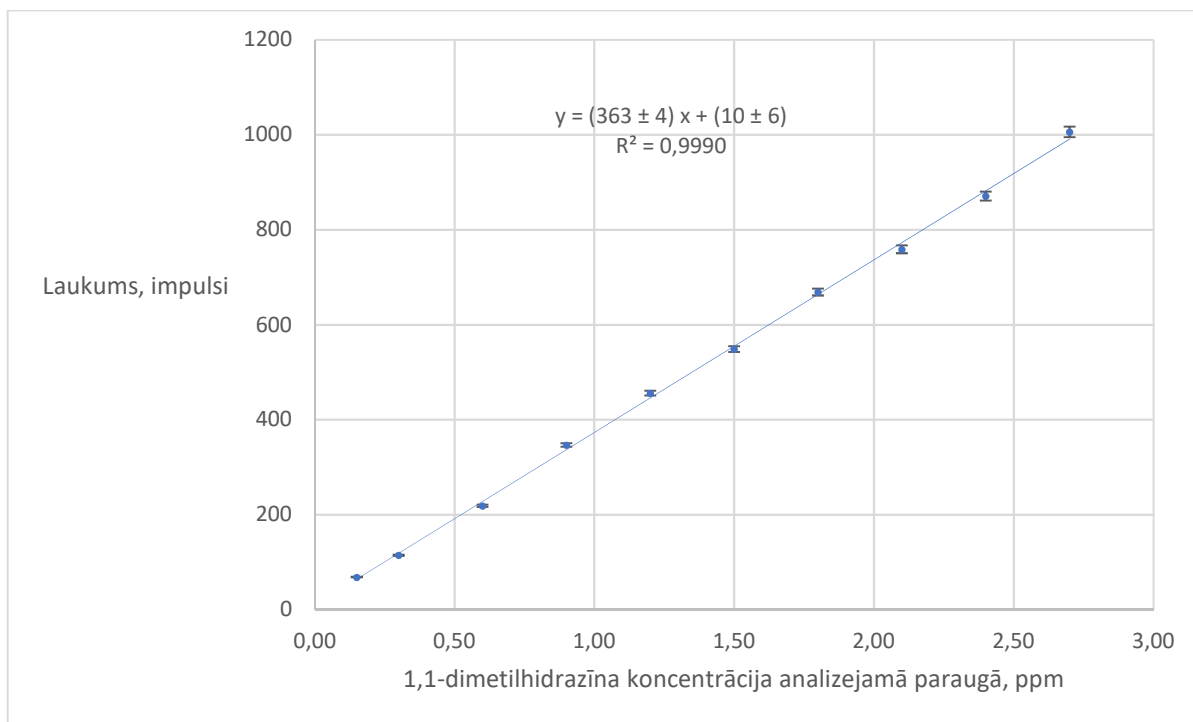
### 3.5.3. Linearitāte

Linearitātes kritērija pārbaudei tika izmantoti desmit šķīdumi ar koncentrāciju, no 1,0 ng/mL līdz 18 ng/mL (atbilst piemaisījuma saturam no 0,15 ppm līdz 2,70 ppm, tehniskajā mēģinājumā). Katrs paraugs tika ievadīts sistēmā trīs reizes. Rezultāti ir apkopoti 3.4. tabulā, 3.3. att.

3.4. tabula

#### Linearitātes novērtējuma dati

Parauga Nr.	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda koncentrācija, % no maksimāli atļautas vērtības	Koncentrācija, ng/mL	1,1-Dimetilhirazīna koncentrācija tehniskajā mēģinājumā, ppm	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi	R <sup>2</sup> , iegūta vērtība
1.	10	1,0	0,15	69	0,9990
2.	20	2,0	0,30	115	
3.	40	4,0	0,60	219	
4.	60	6,0	0,90	347	
5.	80	8,0	1,20	456	
6.	100	10,0	1,50	549	
7.	120	12,0	1,80	669	
8.	140	14,0	2,10	759	
9.	160	16,0	2,40	871	
10.	180	18,0	2,70	1006	



3.3. att. Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda signāla atkarība no koncentrācijas  
Iegūta  $R^2$  vērtība (0,9990) atbilst izvirzītajam kritērijam ( $R^2 \geq 0,998$ )

### 3.5.4. Precizitāte

#### Sistēmas precizitāte

Sistēmas precizitāte noteikta, aprēķinot RSN joslu laukumiem, iegūtiem no sešām injekcijām. Rezultāti ir apkopoti 3.5. tabulā.

3.5. tabula

Sistēmas precizitātes dati

Parauga Nr.	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi
1.	270
2.	256
3.	261
4.	268
5.	271
6.	259
<b>Vid.</b>	264
<b>SN</b>	6,3
<b>RSN, %</b>	2,4

Iegūtā vērtība (RSN = 2,4 %) atbilst izvirzītam kritērijam ( $RSN \leq 20\%$ ).  
Reprezentatīva hromatogramma parādīta 6. pielikumā.

## Metodes precizitāte

Metodes precizitātes rezultāti apkopoti 3.6. tabulā.

3.6. tabula

### Metodes precizitātes dati

Parauga Nr.	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi	Atrasts 1,1-dimetilhirazīna daudzums, ppm
1.	253	1,46
2.	261	1,51
3.	250	1,44
4.	234	1,35
5.	253	1,46
6.	255	1,47
Vid.	251	1,4
SN	9,1	0,1
RSN, %	3,6	3,6
DI (P = 0,95)		1,4 ± 0,1

Iegūtā vērtība (RSN = 3,6 %) atbilst izvirzītajam kritērijam (RSN ≤ 30 %).

## Starplaboratoriju precizitāte

Otra analītiķa rezultāti apkopoti 3.7. tabulā.

3.7. tabula

### Starplaboratoriju precizitātes dati

Parauga Nr.	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi	Atrasts 1,1-dimetilhirazīna daudzums, ppm
1.	253	1,46
2.	247	1,43
3.	254	1,47
4.	256	1,48
5.	244	1,41
6.	251	1,45
Vid.	251	1,4
SN	4,5	0,1
RSN, %	1,8	1,8
RSD starp diviem analītiķiem, %		2,7
DI (P = 0,95)		1,4 ± 0,1

Iegūtā vērtība (RSN = 1,8 %) atbilst izvirzītajam kritērijam (RSN ≤ 40 %). Abu analītiķu rezultāti atrodas iegūtajā drošības intervālā.

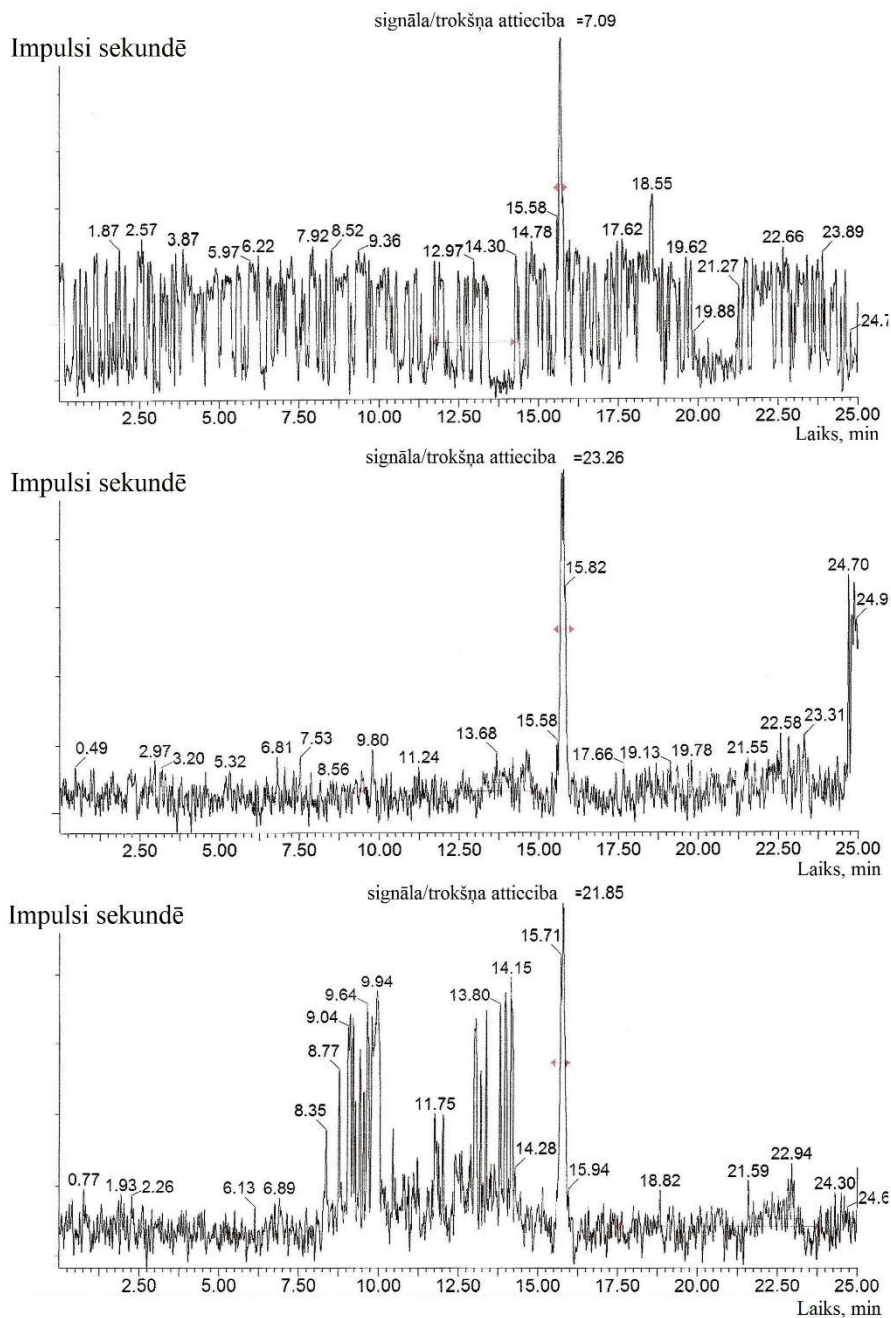
## 3.5.5. LOD, LOQ

Iegūtās signāla/trokšņa attiecības LOQ, LOD noteikšanai ir apkopotas 3.8. tabulā.

## Iegūtas signāla/trokšņa attiecības

Eksperimenta Nr.	Iegūtā signāla/trokšņa attiecība	Iegūtā signāla/trokšņa attiecība, vid	Aprēķināts LOD, ppm	Aprēķināts LOD, ppm
1.	21,85	17,40	0,09	0,03
2.	23,26			
3.	7,09			

Metodes LOD ir 0,09 ppm, bet maksimāli pieļaujamā robeža ir 1,5 ppm (sk. att. 3.4).



3.4. att. Signāla/trokšņa attiecības, iegūtas ar 0,15 ppm 1,1-dimetilhidrazīna koncentrāciju

### 3.5.6. Atgūstamība/pareizība

Atgūstamības iegūtas vērtības ir apkopotas 3.9. tabulā.

3.9. tabula

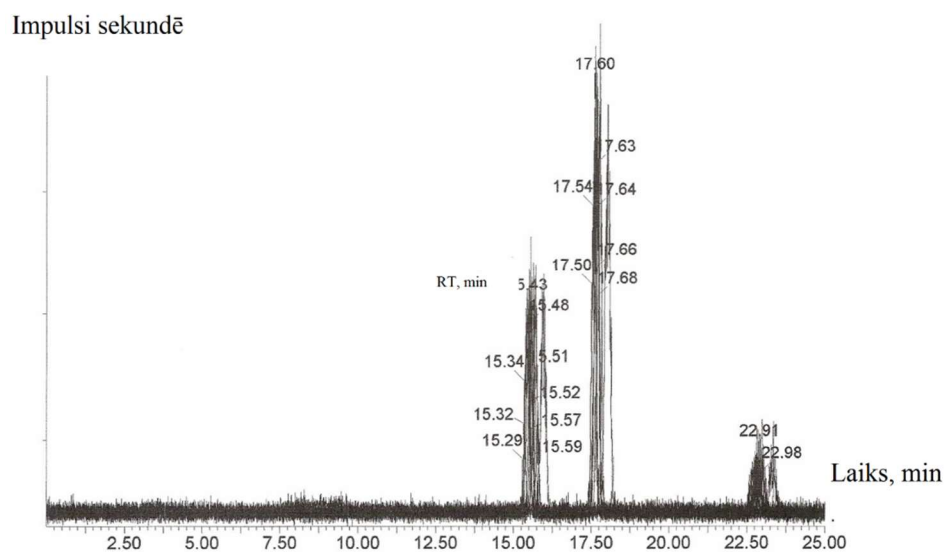
Atgūstamības noteiktās vērtības

1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija, ng/mL	Koncentrācija, % no maksimāli atļautās vērtības	1,1-dimetilhidrazīna koncentrācija tehniskajā mēģonijā, ppm	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi	Atgūstamība, %
10,0	Standarts 100,0	1,5	250	
10,0	Standarts 100,0	1,5	279	
10,0	Standarts 100,0	1,5	250	
1,0	10,0	0,15	27	104,0
1,0	10,0	0,15	29	111,7
1,0	10,0	0,15	23	88,6
8,0	80,0	1,20	208	100,1
8,0	80,0	1,20	208	100,1
8,0	80,0	1,20	196	94,4
10,0	100,0	1,50	255	98,2
10,0	100,0	1,50	267	102,8
10,0	100,0	1,50	254	97,8
12,0	120,0	1,80	274	87,9
12,0	120,0	1,80	287	92,1
12,0	120,0	1,80	271	87,0
SN				7,4
Vid.				97,1
RSN				7,6
DI (P = 0,95)				97 ± 5

Noteiktās atgūstamības vērtības atbilst izvirzītiem kritērijiem. Atrastā atgūstamība ir  $97 \pm 5$  %, RSN 7,6 %. Hromatogramma ir parādīta 7. pielikumā.

### 3.5.7. Metodes noturība

Metodes noturības kritērijs – joslas laukuma izmaiņas. Joslas aiztures laiks ir nenozīmīgs parametrs AĒŠH/MS/MS sistēmā. Tomēr attēls ar hromatogrammu pārklājumu ir parādīts att. 3.5. Joslas laukuma izmaiņas ir apkopotas 3.10. tabulā.



3.5. att. Kopējais attēls ar hromatogrammu pārklāšanu

3.10. tabula

Joslās laukuma izmaiņas, veicot metodes noturības eksperimentus

Metodes noturības veids	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, impulsi	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukuma izmaiņas, %
Sākuma šķīdums	295	-
HFSS daudzuma izmaiņa (0,9 %)	282	-4,4
HFSS daudzuma izmaiņa (1,1 %)	293	-0,7
Cita kolonna	293	-0,7
Kolonnas temperatūra 20 °C	296	0,3
Kolonnas temperatūra 30 °C	276	-6,4
Šķīdums glabāts 48 st., pie 25 °C	281	-4,7

Veikti eksperimenti parāda, ka joslas laukuma izmaiņas nepārsniedz 6,9 %, pieļaujamā izmaiņa ir < 20 %. Analizējamais šķīdums ir stabils vismaz 48 stundas 25 °C temperatūrā.

### 3.5.8. Degradācijas pētījumi

Veicot degradācijas eksperimentus, 1,1-dimetilhidrazīna veidošanās mēģinājumā paraugos nav konstatēta. Degradācijas pētījumu rezultāti apkopoti 3.11. tabulā.

**Degradācijas pētījumu rezultāti**

Degradācijas veids	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums analizējama šķīduma, impulsi	Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda joslas laukums, standartšķīduma impulsi	Atrastais 1,1-dimetilhirazīna daudzums, ppm
Nedegradēts paraugs	< LOD	547	< LOD
Foto degradācija	< LOD	547	< LOD
Degradācija oksidatīvā vidē	< LOD	547	< LOD
Termiskā degradācija	< LOD	547	< LOD
Hidrolītiskā degradācija skābā vidē	< LOD	547	< LOD
Hidrolītiskā degradācija sārmainajā vidē	< LOD	547	< LOD

Izvērtējot iegūtos datus, redzams, ka 1,1-dimetilhirazīns neveidojas degradācijas pētījumos izvēlētajos apstākļos. No tā var secināt, ka vienīgais parauga piesārņojuma avots – nepietiekama attīrīšana. Preparāta ilgtermiņa glabāšanas laikā neveidojas 1,1-dimetilhirazīns [36]. Ilgtermiņa stabilitātes pētījumos nav nepieciešama šīs vielas kontrole, kas ļauj samazināt kvalitātes kontroles izmaksas [37] un pierāda, ka genotoksiskā piemaisījuma koncentrācija nepieaug. Tomēr eksperimentā nav apskatīta tālākās iespējamās reakcijas ar citām palīgvielām, kuras varētu notikt, ražojot un glabājot gatavo formu [38].

## SECINĀJUMI

1. Salīdzinot literatūrā aprakstītās 1,1-dimetilhidrazīna analīzes metodes, izriet, ka piemērotākās tā noteikšanai farmaceitiskajā preparātā ir GH/MS un AEŠH/MS ar parauga derivatizēšanu.
2. Pamatojoties uz Eiropas Farmakopejā aprakstītām sistēmas piemērotības prasībām, noteikti derivatizēšanai piemērotākie reaģenti: visi iegūtie savienojumi, izņemot propanona-2 N,N-dimetilhidrazonu, atbilst izvirzītām prasībām.
3. Metodei piemērotākais derivatizēšanas reaģents ir benzoilhlorīds, bet optimāla reakcijas vide – 50 % izopropanola šķīdums ūdenī, ar DIPEA piedevu.
4. Metodes LOQ un LOD, ir attiecīgi 0,09 ppm un 0,03 ppm. Metodes darbības apgabals ir no 10 % līdz 180 % no pieļaujamās normas (1,5 ppm).
5. Veicot metodes validāciju, atbilstoši *ICH* un *EF* prasībām, noskaidrots, ka visi pārbaudāmie parametri atrodas pieļaujamajās robežās un pierāda analīzes metodes pareizību.
6. Degradācijas pētījumi parāda, ka 1,1-dimetilhidrazīnas neveidojas meldonijā glabāšanās laikā. Vienīgais iespējamais piesārņojuma avots – nepietiekama produkta attīrīšana no izejvielām.
7. Metode ir veiksmīgi reģistrēta *EDQM* un derīga vielas kvalitātes kontrolei.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. G. Lunn, E. B. Sansone. Oxidation of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) in aqueous solution with air and hydrogen peroxide. *Chemosphere*. 1994, 29(7):1577-90.
2. <http://www.astronautix.com/n/n2o4udmh.html> (skatīts 01.12.2016.).
3. <https://v1.std3.ru/be/46/1430243150-be465494d1bd3f58eb12371dc06e48bd.jpeg> (skatīts 01.12.2016.).
4. V.G. Voloshchuk, Y. L. Yagupolskyi, Y.V. Tanchuk, V.M. Boyko, R.V. Bubnov. The problem of utilization (detoxification) unsymmetrical dimethylhydrazine. Challenge for synthesis of mildronate and its structure analogues. *EPMA Journal* 2014, 5, A92.
5. Cf. Reinhardt, Bd. Dinman. Toxicity of hydrazine and 1,1-dimethylhydrazine (UDMH): Hepatostructural and enzymatic change. *Arch Environ Health*. 1965, 10, 859-69.
6. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonised tripartite guideline assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceutical to limit potential carcinogenic risk. M7 Current Step 4 version dated 23.June 2014.
7. O. Pestunova, G. Elizarova, Z. Ismagilov, M. Kerzhentsev, V. Parmon. Detoxication of water containing 1,1-dimethylhydrazine by catalytic oxidation with dioxygen and hydrogen peroxide over Cu- and Fe-containing catalysts. *Catalysis Today*., **2002**, 75, (1-4), 219-225
8. Criteria for a recommended standard. Occupational exposure to hydrazines. U.S. Department of health, education, and welfare. Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, June **1978**.
9. R. M. Ianniello. Square-wave voltammetric determination of daminozide. *Analytica Chimica Acta*, **1987**, 193, 81-86.
10. Marcel. Rutschmann, H. Buser. Determination of daminozide and dimethylhydrazine residues in Swiss apple juice concentrates using gas chromatography-mass spectrometry. *J.Agric. Food Chem.*, **1991**, 39 (1), 176-181.
11. Yuri V. Kazakevich, Rosario LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists ISBN: 978-0-471-68162-5 January **2007**.
12. R. S. Smirnov, I. A. Rodin, A. D. Smolenkov, and O. A. Shpigun. Determination of the Products of the Transformation of Unsymmetrical Dimethylhydrazine in Soils Using Chromatography/Mass Spectrometry. Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia. **2010**.
13. S. Siggia, C. R. Stahl. Determination of Aldehydes Using Unsymmetrical Dimethylhydrazine. *Anal. Chem.*, **1955**, 27 (12), 1975-1977.

14. E.S. Fiala, C. Kulakis. Separation of Hydrazine, Monomethylhydrazine, 1,1-Dimethylhydrazine and 1,2-Dimethylhydrazine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection; *J. Chromatogr.*, **1981**, vol. 214, 229-233.
15. P.E. Kester, N.D. Danielson. Determination of Hydrazine and 1,1-Dimethylhydrazine as Salicylaldehyde Derivatives by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Chromatographia*, **1984**, vol. 18, 125-128.
16. B. Sobhanmanesh, M. Najafi. Selective Determination of Unsymmetrical Dimethylhydrazine on a Prussian Blue Modified Carbon Paste Electrode. *Sensors (Basel)*. **2014**, 14(8): 15227–15243.
17. T.Peik-See, A.Pandikumar, H.Nay-Ming, L.Hong-Ngee, Y.Sulaiman. Simultaneous Electrochemical Detection of Dopamine and Ascorbic Acid Using an Iron Oxide/Reduced Graphene Oxide Modified Glassy Carbon Electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. **2010**, 25 (10), 2366–2369.
18. C. Bicchi , C. Cordero , P. Rubiolo , and A. Ocelli. Determination of Daminozide Residues in Apple Pulp Using HPLC–DAD–UV. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (8), 3548–3552.
19. B. Sobhanmanesh, M. Najafi. Selective Determination of Unsymmetrical Dimethylhydrazine on a Prussian Blue Modified Carbon Paste Electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, 26(3), 451-457.
20. T. Griffin, C. Berger. Three Methods of Detection of Hydrazines. NASA Technical Reports Server (NTRS), 2010-01-01.
21. A. R. Mitchell, P. F. Pagoria, R D. Schmidt. Conversion of the Rocket Propellant UDMH to a Reagent Useful in Vicarious Nucleophilic Substitution Reactions. JANNAF safety & Environmental protection Subcommittee Meeting Tampa, Florida 1995.
22. F.A. Carey. Organic Chemistry. McGraw-Hill Science/Engineering/Math 2007 Chapter 22.
23. I. M. Smallwood Handbook of organic solvent properties. Great Britain 1996 ISBN 0 340 64578 4 p137.
24. R. S. Smirnov, A. D. Smolenkov, T. A. Bolotnik, O. A. Shpigun. Precolumn derivatization with glyoxal as a new approach to the highly sensitive HPLC-UV determination of unsymmetrical dimethylhydrazine. *Anal. Chem.*, 2013, 68(9), 837–844.
25. A. D. Smolenkov, I. A. Rodin, O. A. Shpigun. Spectrophotometric and fluorometric methods for the determination of hydrazine and its methylated analogues. *Anal. Chem.*, 2012, 67(2), 98–113.

26. H.A. Claessens, H. A. Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability. Eindhoven DOI: 10.6100/IR518234, 1999.
27. M.K. Pinkerton, J.M. Lauer, P. Diamond, A.A. Tamas, ASD Technical Report 61\_708: Aeronautical Systems Division, Dayton, OH: Wright\_Patterson, 1961, AD273986. <http://handle.dtic.mil/100.2/AD273986>.
28. I.D. Gadaskina, V.A. Filov, Prevrashchenie i opredelenie promyshlennykh organicheskikh yadov v organizme (Transformation and Determination of Industrial Organic Poisons in the Body) *Meditcina*, Moscow, **1971**.
29. J. M. Miller, J.B. Crowther, *Analytical Chemistry in a GMP Enviroment. A Practical Guide*. Wiley: New York, 2000, 5.
30. Trivikram Rawat , I.P. Pandey Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products- Scientific and Regulatory Considerations */J. Pharm. Sci. & Res.* **2015**, 7(5), 238-241
31. K.M Alsante, A. Ando, R. Brown, etal., Theroleofdegradant profiling inactive pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug..* **2007**, 59(1), 29–37.
32. J. Hmeļņickis, O. Pugovičs, H. Kažoka, A. Vīksna, I. Sušinskis, K. Kokums. Application of ion-pair chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *Latv. Ķīm. Žurn.*, **2008**, 4, 333-340.
33. J. Hmeļņickis, K. Kokums, I. Sušinskis. Retention behavior of Hydrazine Derivatives in HILIC mode. CRC, ISBN:9781439807538, USA 26.11.2010. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*.
34. ICH Q1B C 32 Guideline Photostability Testing of New Drug Substances and Products
35. D. Brown, R.F. Hudson. Mechanism of hydrolysis of benzoyl chloride. *Nature*, **1951**, 167(4255), 819.
36. M. S. Charde, J. Kumar, A. S. Welankiwar, R. D. Chakole. Review: Development of forced degradation studies of drugs. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*, **2013**, 3, 34 – 39.
37. M. Blessy, P. D. Ruchi, P. N. Prajesh, Y. K. Agrawal. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, **2014**, 3, 159 – 165.

38. I. Šimkovic, I. Šurina, M. Vričan. Primary reactions of sucrose thermal degradation. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, **2003**, 70, 493 – 504.

## **PATEICĪBAS**

AS “Grindeks” kvalitātes direktoram J. Hmeļnickim,

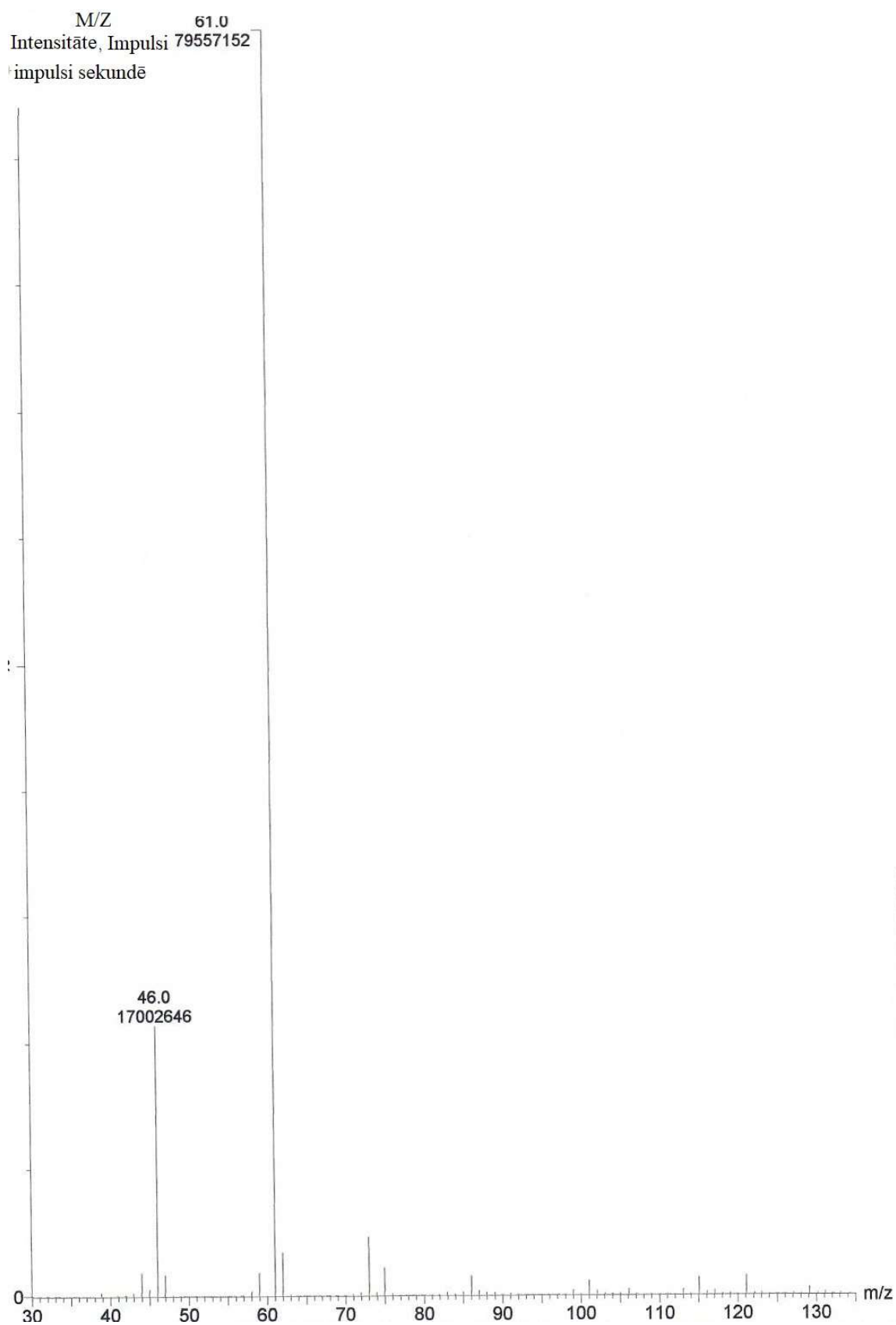
AS “Grindeks” ķīmiķim – analītiķim V. Bogoradam,

AS “Grindeks” vecākajam ķīmiķim – analītiķim K. Kokumam,

AS “Olainfarm” vadošajai ķīmiķei J. Sušinskai.

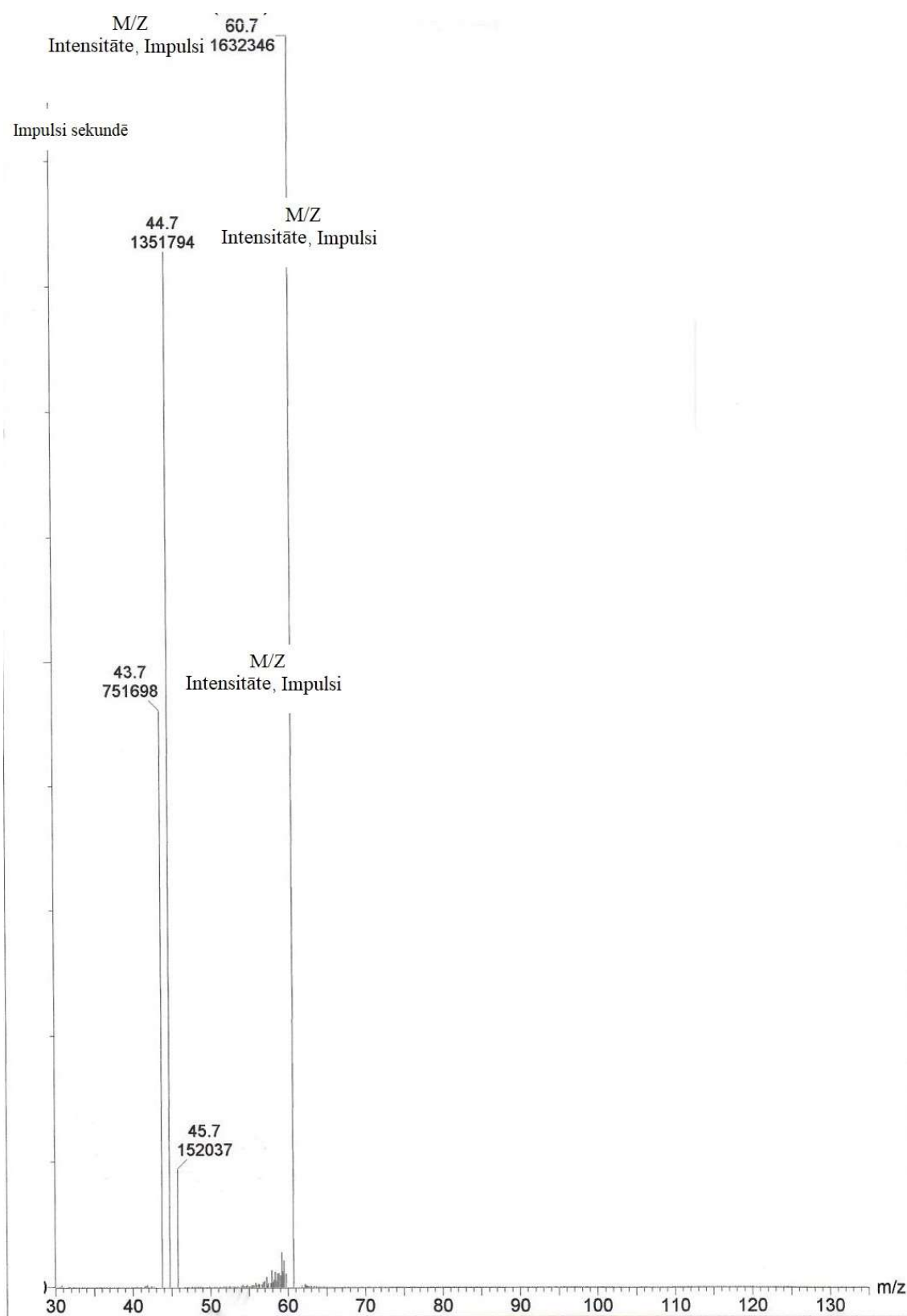
## **PIELIKUMI**

# 1. pielikums



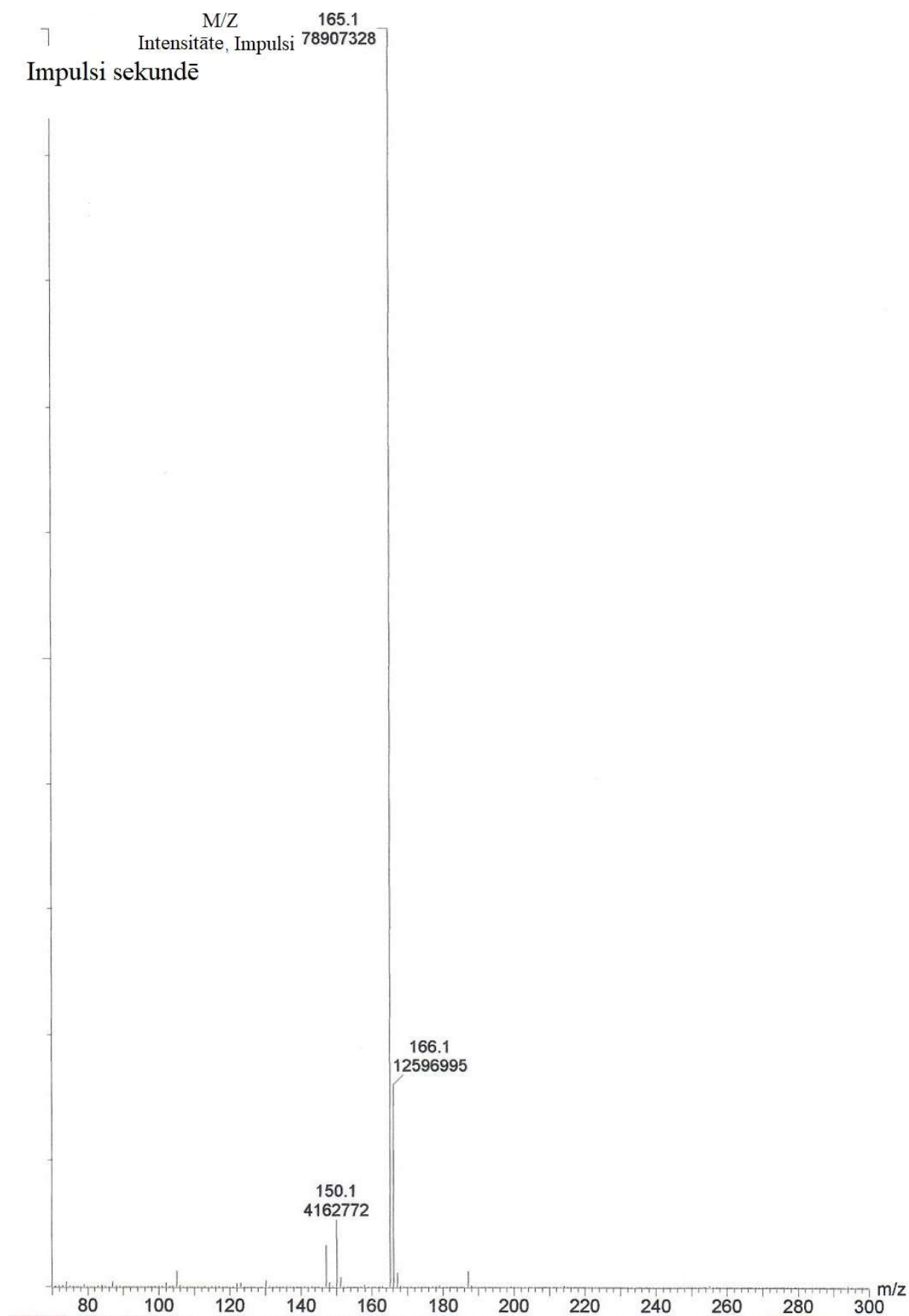
1. att. 1,1-Dimetilhidrazīna MS spektrs (ES+ diapazons, ESI jonizācijas avots)

## 2. pielikums



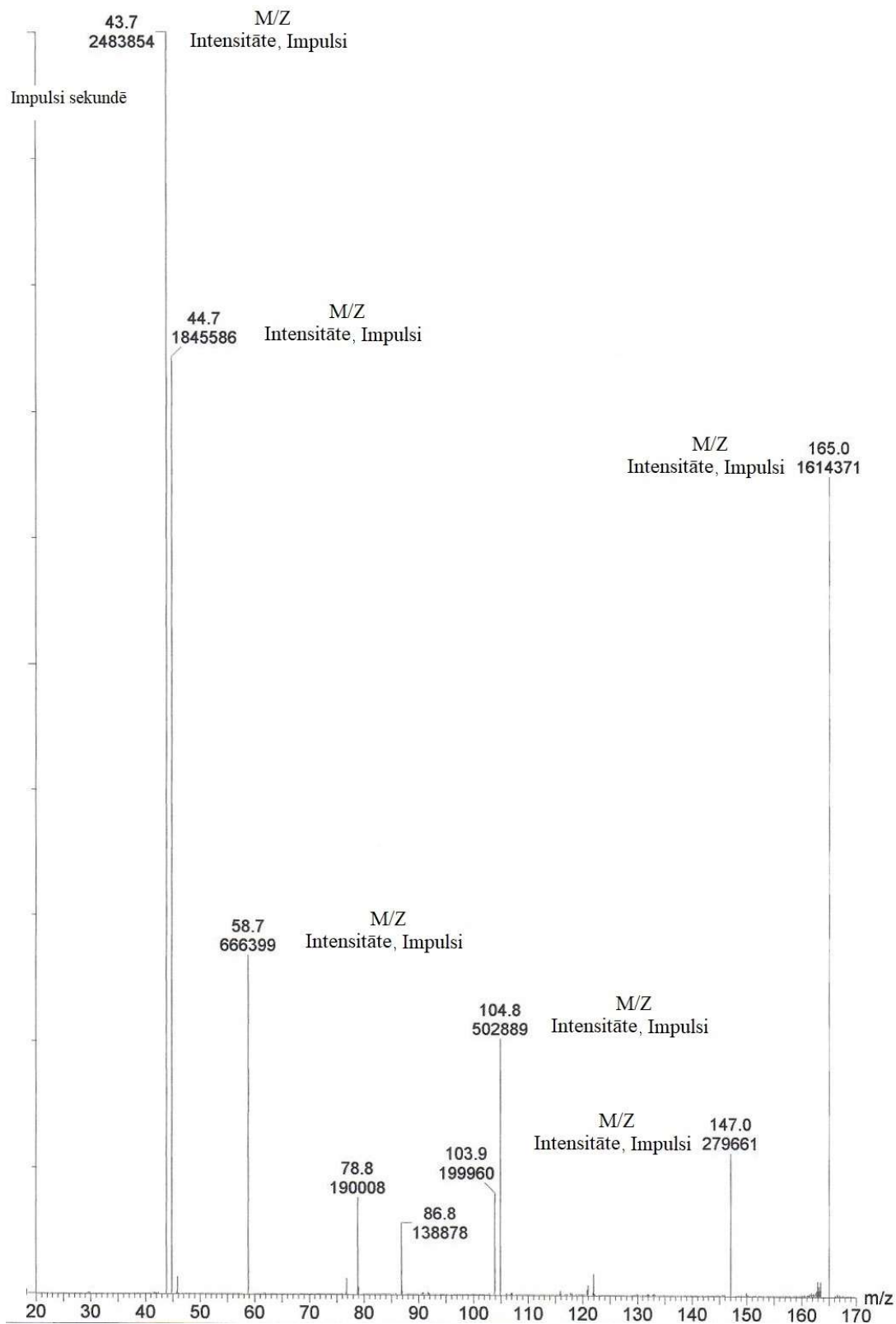
2. att. 1,1-Dimetilhidrazīna fragmentācijas MS spektrs (sāpursmes enerģija 11 eV, ES+ diapazons, ESI jonizācijas avots)

### 3. pielikums



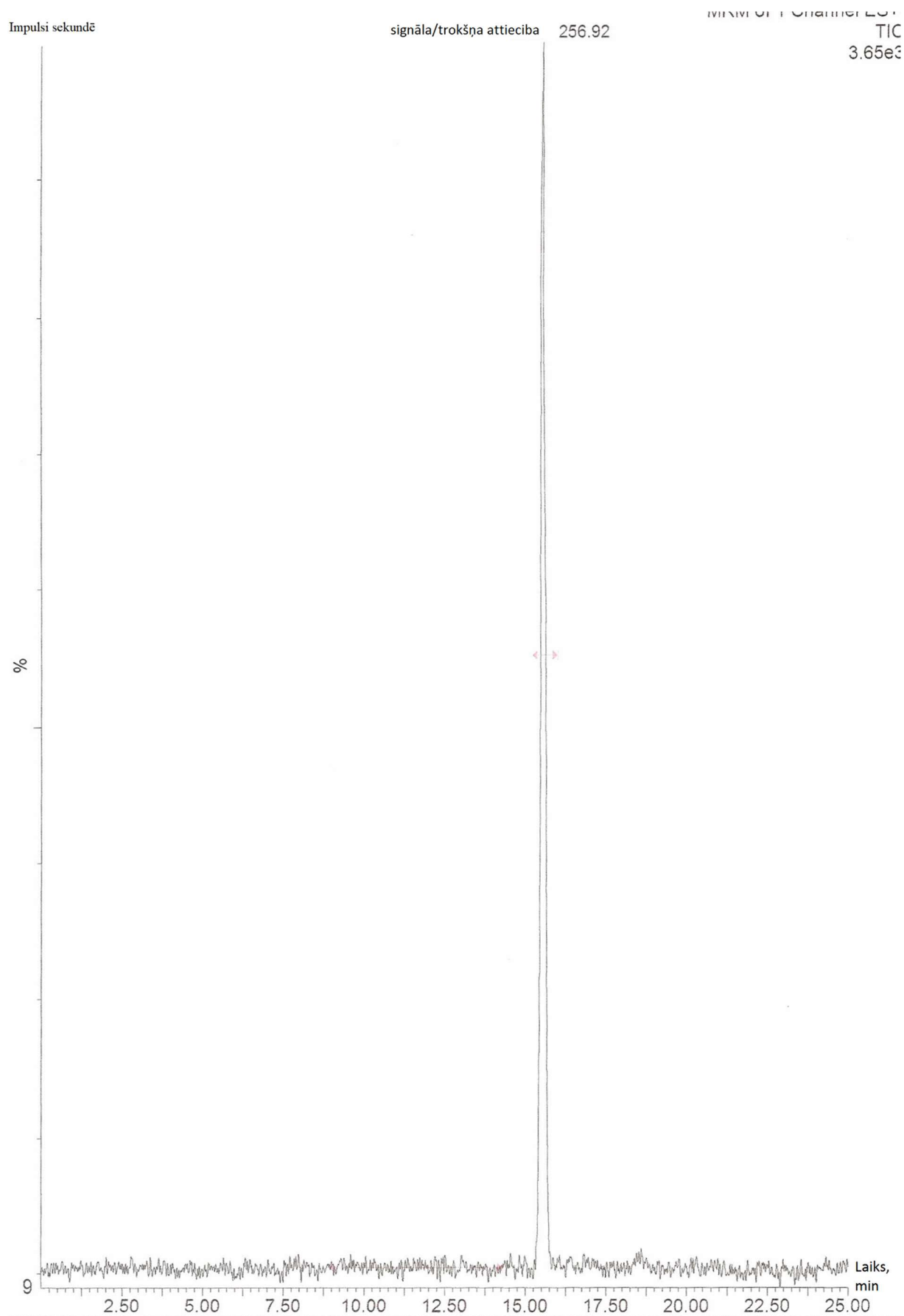
3. att. Benzoskābes N,N-dimetilhidrazīda MS spektrs (ES+ diapazons, ESI jonizācijas avots)

#### 4. pielikums



4. att. Benzskābes N,N-dimetilhidrazīda fragmentācijas MS spektrs (sadarmsmes enerģija 16 eV ES+ diapazons, ESI jonizācijas avots)

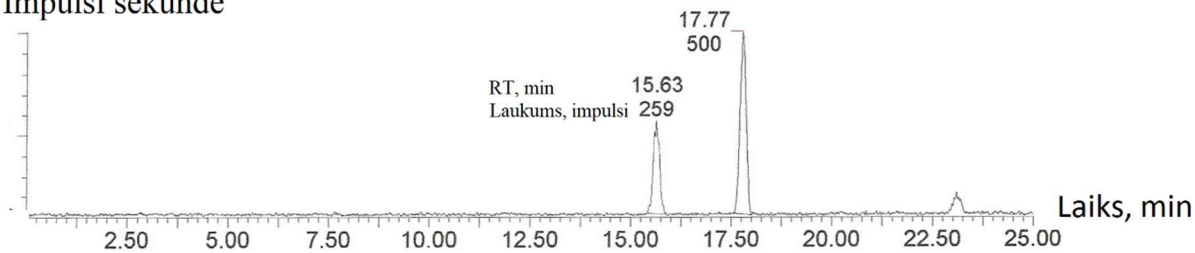
## 5. pielikums



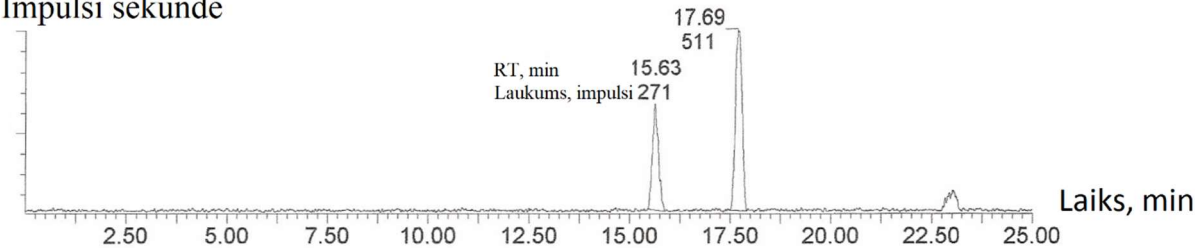
5. att. Signāla/trokšņa attiecība, sistēmas piemērotības pārbaudei

## 6. pielikums

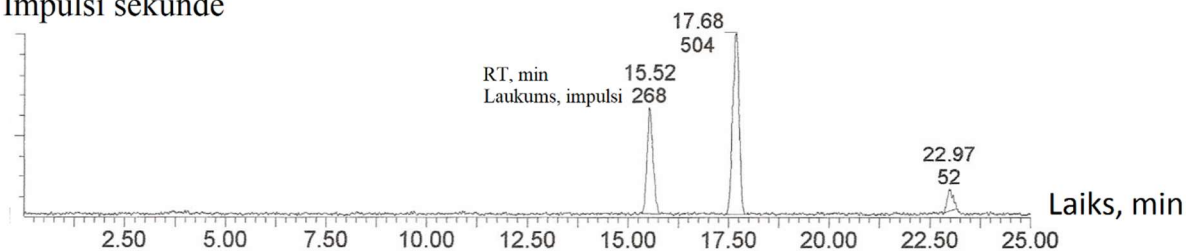
Impulsi sekundē



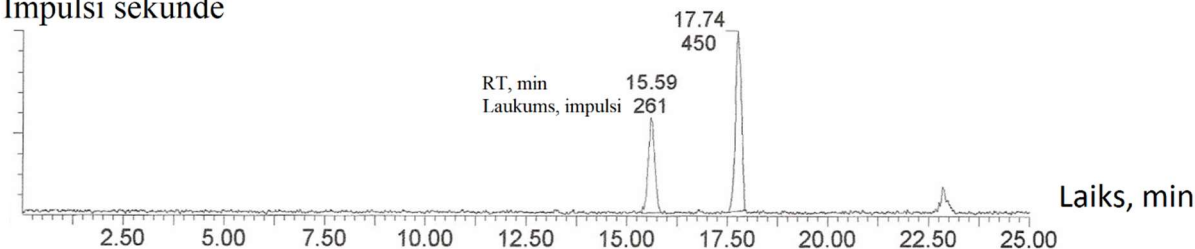
Impulsi sekundē



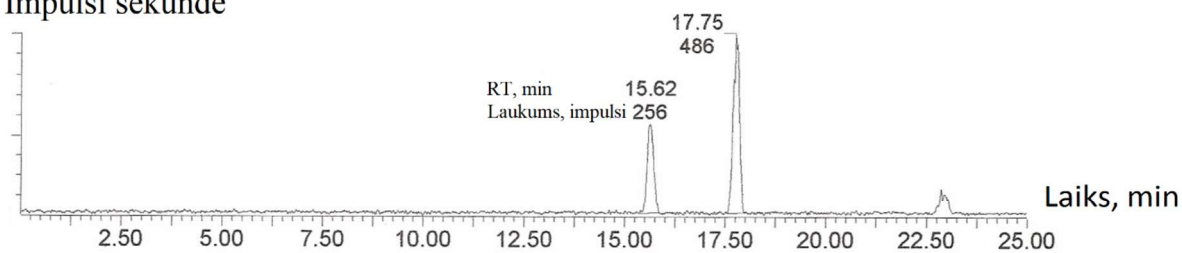
Impulsi sekundē



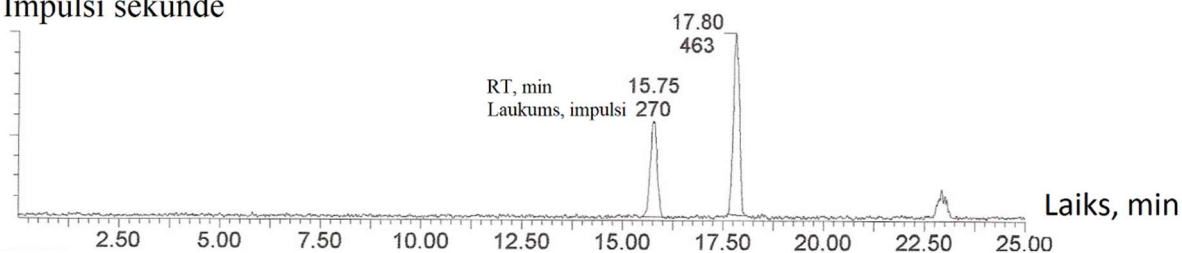
Impulsi sekundē



Impulsi sekundē



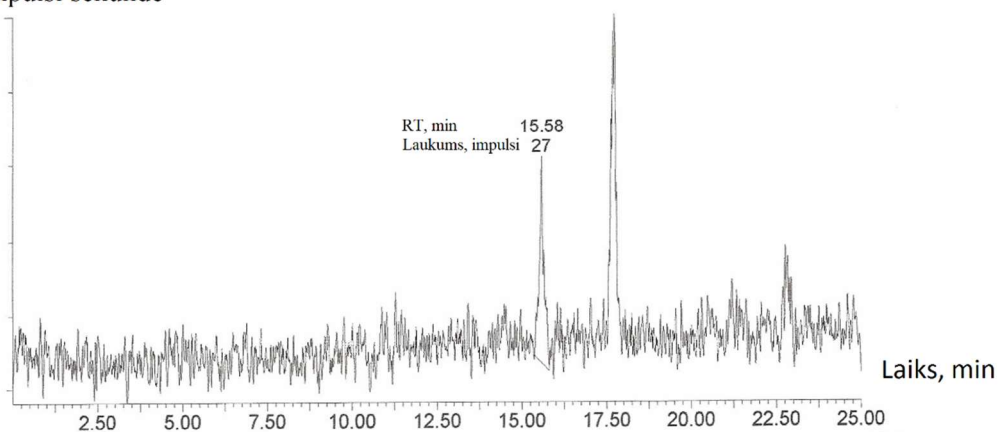
Impulsi sekundē



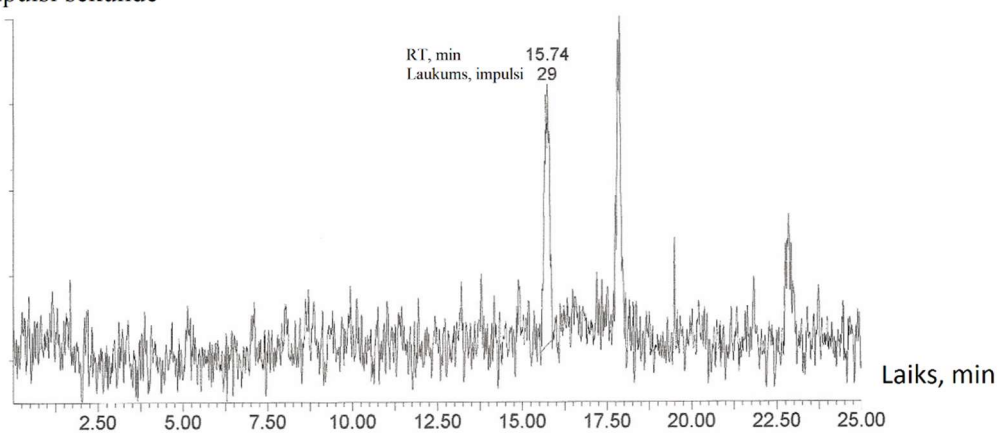
6. att. Sistēmas precizitātes hromatogrammas

## 7. pielikums

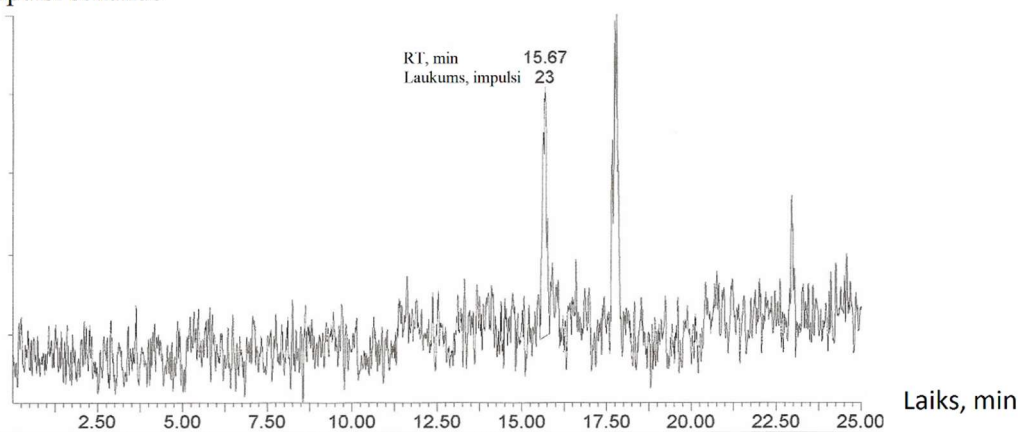
Impulsi sekundē



Impulsi sekundē



Impulsi sekundē



7. att. Atgūstamības hromatogrammas pie 0,15 ppm koncentrācijas (LOQ)