

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВАРИНСЬКИЙ БОРИС ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК: 543.544+543.51]:547.792:615.2/.4.074

ДИСЕРТАЦІЯ

ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ТА МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ
АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ – ПОХІДНИХ 3-ТІО-
1,2,4-ТРИАЗОЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук

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

_____ Б. О. Варинський

Науковий консультант Каплаушенко Андрій Григорович, доктор
фармацевтичних наук, професор

Запоріжжя – 2021

АНОТАЦІЯ

Варинський Б. О. Хроматографічне та мас-спектрометричне визначення активних фармацевтичних інгредієнтів – похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в лікарських засобах та біологічних об'єктах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія» (226 – Фармація, промислова фармація). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2021.

Дисертаційна робота присвячена науково-теоретичному обґрунтуванню, створенню та опрацюванню підходів стосовно розроблення біоаналітичних (метаболізму, визначення залишкових кількостей) та аналітичних методик визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу (стандартизації АФІ) в субстанціях та лікарських засобах, валідації цих методик, а відтак застосуванню їх під час здійснення відповідних досліджень за допомогою ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС методів. На підставі цих підходів запропонована методична база та зроблені рекомендації щодо здійснення кількісного визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу та їх синтонів у фармацевтичних та біологічних зразках.

Для досліджень використовувались рідинно-хроматографічна система Agilent 1260 Infinity (дегазатор, бінарний насос, автоматичний дозатор, термостат колонки, діодно-матричний детектор), одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з йонізацією електророспиленням в (ЕСІ), програмне забезпечення Open LAB CDS Software.

У більшості методик використана колонка Zorbax SB-C18; 30 мм × 4,6 мм; 1,8 мкм в обернено фазовому режимі хроматографічного утримування. Для дослідження фармакокінетики та метаболізму застосовано колонку Agilent Zorbax RX-SIL (4,6 × 50 мм, 1,8 мкм) в режимі гідрофільної хроматографії.

Дослідження АФІ тіометризолу (морфолінію 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат) і технологічних домішок проводилось за допомогою ізократичного режиму. Рухома фаза вода/ацетонітрил (84:16) з 0,1% мурашиної кислоти. Дослідження фармакокінетики та метаболізму тіометризолу в режимі гідрофільної хроматографії проводилось за допомогою рухомої фази, яка складалась із 80% ацетонітрилу (із 0,1% HCOOH) та 20% води (із 100 мМ HCOONH₄).

АФІ тріфузолу (піперидінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетат) та технологічні домішки до нього вивчались в ізократичному режимі при рухомій фазі вода/ацетонітрил (70:30) з 0,1% мурашиної кислоти.

АФІ авесстиму (морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат) визначали за допомогою елюенту, що складався із вода/ацетонітрил (95:5) з 0,1% мурашиної кислоти.

Визначено залежності інтенсивності сигналу мас-детектору від факторів роботи іонного джерела (напруги на фрагментаторі, тиску на небулайзері, температури газу осушувача) для гідразидів, гідразінкарботіоамідів, 1,2,4-тріазолтіонів, 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот та їх солей.

Встановлено оптимальні умови мас-спектрометричного детектування вказаних похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх синтезі. Описано взаємозв'язок оптимальних умов із структурою досліджуваних сполук.

Запропоновано схеми ВЕРХ-МС фрагментації низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів під час їхнього синтезу. Показано залежності фрагментації вказаних сполук від енергії хімічних зв'язків.

З'ясовані залежності хроматографічного утримування похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та їх напівпродуктів від вмісту органічного модифікатора. Вивчено залежність характеристик утримування вказаних речовин від розрахованих показників ліпофільності. Показано експоненційний характер взаємозв'язку між lgD та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази. Встановлено взаємозв'язок між lgD та десятичними логарифмами коефіцієнтів ємності досліджуваних сполук при

15% вмісті ацетонітрилу, якій носить приблизно лінійний характер. Запропоновані оптимальні умови розділення вказаних речовин.

Представлені результати встановлення термодинамічних характеристик утримування АФІ та технологічних домішок синтонів тіометризолу в умовах оберненофазової та гідрофільної хроматографії. Визначені термодинамічні параметри утримування АФІ та домішок напівпродуктів авесстиму при обернено фазової хроматографії.

Розроблена та провалідована методика визначення морфолінію 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ Тіометризолу), а також технологічних домішок (піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону) в субстанції. Об'єм ін'єкції для визначення АФІ становив 2 мкл, для визначення домішок 5 мкл. Здійснено визначення вмісту АФІ та домішок напівпродуктів синтезу в реальному зразку субстанції тіометризолу.

Розроблена та провалідована методика визначення піперидінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату (АФІ Тріфузолу) та технологічних домішок (фуран-2-карбогідразиду, 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідразид-1-карботіоаміду, 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону) в субстанції. Об'єм інжекції становив 5 мкл. Ізократичний режим.

Розроблена та провалідована методика визначення піперидінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій. Інжекційний об'єм становив 2 мкл. Представлені результати визначення у зразках 1% розчину тріфузолу для ін'єкцій.

Прецизійність методик визначали на рівні збіжності. Результати свідчать, що методики відповідають вимогам ДФУ стосовно прецизійності та правильності.

Розроблено та провалідовано методику визначення піперидінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в м'ясі птахів.

Отримані результати дослідження зразків м'яса птиці, яку випоювали з додаванням розчину АФІ тріфузолу.

Розроблена та провалідована методика визначення піперидинію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в яйцях птиці. Опрацьована методика апробована на реальних зразках яєць птиці, яка отримувала АФІ тріфузолу.

Розроблена та провалідована методика визначення піперидинію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в м'ясі поросся. Проведено дослідження реальних зразків м'яса та органів поросся, які містили вказаний АФІ.

Розроблена та провалідована методика визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату в яйцях птахів. Методику опрацьовано на реальних зразках яєць птиці, яка отримувала АФІ авесстиму.

Прецизійність та правильність методик визначення в яйцях та м'ясі прийнятна та відповідала вимогам керівництв з валідації біоаналітичних методик.

Розроблена методика визначення АФІ тріфузолу в молоці. Методику апробовано на реальних зразках молока, які містили АФІ Тріфузолу.

Розроблена швидка, селективна та чутлива ВЕРХ-МС методика визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тію)ацетату, придатна для дослідження метаболізму та кількісного визначення даного АФІ в плазмі крові. Здійснене вивчення фармакокінетики, а саме побудована фармакокінетична крива та розраховані фармакокінетичні параметри. Проведено дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тію)ацетату та метаболізму в плазмі крові щурів. Встановлена структура метаболіту АФІ Тіометризолу, котрий відповідає метильному похідному 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тію)ацетату.

Як розчинник для осадження білків яєць використовували диметилсульфоксид. Екстракцію з м'яса птиці проводили за допомогою суміші

ацетонітрилу та 0,1% мурашиної кислоти з подальшим твердофазним очищенням. Осадження білків молока здійснювали за допомогою мурашиної кислоти. Екстракцію з м'яса поросся здійснювали за допомогою метанолу. Для осадження білків плазми крові використовували метанол із хлорною кислотою.

Здійснене дослідження примусової деградації піперидінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в АФІ, 0,1% розчині та 1% розчині тріфузолу для ін'єкцій. Запропонована будова продуктів розкладення.

Вивчена деградація морфолінію 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для додаткового підтвердження селективності методик визначення АФІ та домішок, запропонована можлива будова продуктів деструкції.

Для обох АФІ як продукти окиснення гідроген пероксидом представлені відповідні сульфоксид та сульфон. Зроблено висновок, що найбільша руйнівна дія спостерігається під час впливу H_2O_2 та УФ-випромінювання.

Розроблено фармакопейний стандартний зразок морфолінію 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Наукова новизна результатів обгрунтована патентами. Практична значимість підтверджена методичними рекомендаціями МОЗ, впровадженням методик в роботу наукових та контролюючих лабораторій фармацевтичних науково-виробничих підприємств, впровадженням розроблених підходів в науково-педагогічний процес навчальних закладів вищої освіти України.

Ключові слова: 3-тіо-1,2,4-тріазоли, ВЕРХ-ДМД, ВЕРХ-МС, лікарські речовини, фармакокінетика, метаболізм, залишкові кількості.

ANNOTATION

Varynskyi B. O. Chromatographic and mass spectrometric determination of active pharmaceutical ingredients – derivatives of 3-thio-1,2,4-triazole in medicinal products and biological objects. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a doctor's degree in pharmaceutical sciences by specialty 15.00.02 «Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy» (226 – Pharmacy, industrial pharmacy). – Zaporizhzhya State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhya, 2021.

The dissertation is devoted to scientific and theoretical substantiation, creation and elaboration of approaches concerning development of bioanalytical (metabolism, determination of residual quantities) and analytical methods of determination of 3-thio-1,2,4-triazole derivatives (API standardization) in substances and drugs, validation of methods, and then apply them in the implementation of relevant research using HPLC-DMD and HPLC-MS methods. Based on these approaches, a methodological basis is proposed and recommendations are made for the quantitative determination of 3-thio-1,2,4-triazole derivatives and their synthons in pharmaceutical and biological samples.

Agilent 1260 Infinity liquid chromatographic system (degasser, binary pump, autosampler, column thermostatted compartment, diode array detector), Agilent 6120 single-quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization (ESI), Open LAB CDS Software were used.

Most process use a Zorbax SB-C18 column; 30 mm × 4.6 mm; 1.8 μm in reverse phase chromatographic retention conditions. However, an Agilent Zorbax Rx-SIL column (4.6 × 50 mm, 1.8 μm) in hydrophilic chromatography mode was used to study pharmacokinetics and metabolism.

Study of thiometrizol API (morpholine 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate), as well as technological impurities was carried out using an isocratic mode. Mobile phase was water/acetonitrile (84:16) with 0.1% methane acid. The study of the pharmacokinetics and metabolism of thiometryzole API in hydrophilic chromatography was performed using a mobile phase consisting of 80% acetonitrile (with 0.1% HCOOH) and 20% water (with 100 mM HCOONH₄).

API of trifuzol (piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) acetate) and technological impurities to it were studied in isocratic mode at mobile phase water/acetonitrile (70:30) with 0.1% methane acid.

Avesstim API (morpholine 2-(5-(pyridinyl)-1,2,4-triazol-3-ylthio) acetate) was determined using an eluent consisting of water/acetonitrile (95:5) with 0.1% methane acid.

The dependences of the mass detector signal intensity on the ion source operating factors (fragmentor voltage, nebulizer pressure, drying gas temperature) for hydrazides, hydrazine carbothioamides, 1,2,4-triazolthiones, 1,2,4-triazolethioacetic acids and their salts were determined.

The optimal conditions for mass spectrometric detection of these derivatives of 3-thio-1,2,4-triazoles and intermediates in their synthesis have been established. The relationship of optimal conditions with the structure of the studied compounds is described.

Schemes of mass spectrometric decomposition of a number of derivatives of 3-thio-1,2,4-triazoles and intermediates in their synthesis are proposed. The dependences of fragmentation of these compounds on the energy of chemical bonds are shown.

The dependences of the chromatographic content of 3-thio-1,2,4-triazole derivatives and their intermediates on the content of the organic modifier are given. The relationship between the characteristics of the content of these substances from the calculated indicators of lipophilicity has been studied. The exponential nature of the relationship between lgD and the capacity coefficients of the test compounds at 15% acetonitrile content in the mobile phase is shown.

The relationship between lgD and decimal logarithms of the capacitance coefficients of the test compounds at 15% acetonitrile content, which is approximately linear. The optimal conditions for the separation of these substances are proposed.

The results of establishing the thermodynamic characteristics of API content and technological impurities of thiometrizol synthons in the conditions of reverse

phase and hydrophilic chromatography are presented. The thermodynamic parameters of API and impurities of avestim intermediates in reverse phase chromatography were determined.

A way for the determination of morpholine 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate (API thiometrizol) and technological impurities of pyridine-4-carbohydrazide, 2-isonicotinoyl-*N*-(2-methoxyphenyl)hydrazine-1-carbothioamide and 4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazole-3-thione) in the substance was elaborated and validated.

A method for the determination of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl) acetate (API of trifuzol) and technological impurities 2-carbohydrazide, 2-(furan-2-carboxy)-*N*-phenylhydrazide-1-carbothioamide, 5-(furan-2-yl)-4-phenyl-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazole-3-thione) in the substance. The injection volume was 5 μ l. Isocratic mode.

A method for the determination of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl) acetate in 1% solution for injection has been developed and validated. The volume injected was 2 μ l. The results of the determination in samples of 1% solution of trifuzol for injection are given.

The precision of the methods was determined at the level of convergence. The results show that the methods meet the requirements of the SPU for precision and accuracy.

A way for the determination of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl)acetate in poultry meat has been developed and validated. The results of the study of samples of meat of poultry fed with the addition of a solution of API trifuzol.

A method for the determination of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl) acetate in poultry eggs has been developed and validated. The method was developed on real samples of eggs of poultry that received API trifuzol.

A method for the determination of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl) acetate in pig meat has been developed and validated. A study of real samples of meat and organs of piglets, which contained this API.

A method for the determination of morpholine 2-(5-(pyridinyl)-1,2,4-triazol-3-ylthio)acetate in poultry eggs was developed and validated. The method was tested on real samples of eggs of poultry that received API avestim.

The precision and accuracy of the methods for determination in eggs and meat are acceptable and meet the requirements of the guidelines for the validation of bioanalytical methods.

A method for determining API of trifuzol in milk has been developed. The method was applied to real milk samples containing API trifuzol.

A rapid, selective and sensitive HPLC-MS method for the determination of morpholine 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thio) acetate has been developed for the study of metabolism and quantification of this API in blood plasma. The pharmacokinetic characteristics was studied, namely the pharmacokinetic curve was constructed and the pharmacokinetic parameters were calculated.

A study of the metabolism of morpholine 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate in the blood plasma of rats.

The structure of the API thiometrizol metabolite, which corresponds to the methyl derivative of the ((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio)acetate, was established.

Dimethyl sulfoxide was used as a solvent for the precipitation of egg proteins. Extraction of poultry meat was performed using a mixture of acetonitrile and 0.1% formic acid, followed by solid-phase purification. Precipitation of milk proteins was performed using methane acid.

Extraction from pig meat was performed using methanol. Methanol with perchloric acid was used to precipitate blood plasma proteins.

The study of forced degradation of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) acetate in the active pharmaceutical ingredient, 0.1% solution and 1% solution of trifuzol for injection. Proposed structures of decay products.

The degradation of morpholine 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate was studied to further confirm the selectivity of API and determination of impurities with the proposal of a possible structure of destruction products.

Sulfoxide and sulfone in hydrogen peroxide oxidation products for both APIs are presented. The most destructive effect when exposed by H₂O₂ and UV radiation.

A pharmacopoeial standard sample of 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate was prepared.

The scientific novelty of the results is substantiated by patents. The practical significance is confirmed by the methodological recommendations of the Ministry of Health, the introduction of methods in the work of scientific and control laboratories pharmaceutical plants, the introduction of the developed approaches in the scientific and pedagogical process of higher educational institutions of Ukraine.

Key words: 3-thio-1,2,4-triazoles, HPLC-DAD, HPLC-MS, drugs, pharmacokinetics, metabolism, residual amounts.

Список публікацій здобувача

1. Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. Методи ВЕРХ і ВЕРХ-МС в аналізі лікарських речовин в плазмі та сироватці крові : *монографія*. Запоріжжя, 2019. 300 с. (Здобувач провів пошук та опис літературних джерел, підготовку діаграм із пробопідготовки, узагальнення матеріалу, підготовку таблиць).

2. Варинський Б. О. Застосування математичного планування експерименту для оптимізації умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС. *Фармац. журн.* 2014. № 5. С. 54–62.

3. Варинський Б. О. Розвиток ВЕРХ-МС як методу оцінювання чистоти і підтвердження молекулярної маси нових біоактивних речовин. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2014. № 2 (15). С. 85–88.

4. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду гідразидів карбонових кислот і 2-ацилгідразинкарботіоамідів методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Фармац. журн.* 2015. № 4. С. 59–64.

5. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-іл-тіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Одеський мед. журн.* 2015. № 4. С. 17–21.

6. Варинський Б. О. Дослідження характеристик утримування ряду гідразидів карбонових кислот і гідразинокарботіоамідів, вихідних речовин при синтезі субстанцій для виготовлення лікарських засобів методом ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС. *Проблеми військової охорони здоров'я* : зб. наук. праць Української військово-мед. академії. 2015. Вип. 43. С. 320–330.

7. 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. *J. Org. Pharm. Chem.* 2015. Vol. 13, № 4 (52). Р. 68–72. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

8. Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду гідразидів деяких органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботіоамідів / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко, М. М. Малецький, Ю. В. Тімошик. *Укр. біофармац. журн.* 2015. № 6 (41). С. 60–71. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

9. 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 фармац. і мед. науки та практики.* 2015. № 2 (18). С. 25–31. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

10. Salionov V. A., Varynskyi B. O., Parchenko V. V. Mass-spectrometric fragmentation of sodium 2-(4-methyl-5-(thiophene-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetate. *Запорозж. мед. журн.* 2015. № 5 (92). С. 93–96. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

11. Варинський Б. О. Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів – напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фармаком.* 2016. № 1. С. 32–40.

12. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Optimization of the detection conditions for the Series of 1,2,4-triazole-3-thiones for FIA-ESI-MS and HPLC-ESI-MS. *NEWS OF PHARMACY.* 2016. № 1 (85). С. 7–11. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

13. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug. *Запорозж. мед. журн.* 2017. № 3. С. 373–380. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

14. Varynskiy B. O., Parchenko V. V., Kaplaushenko A. G. Development and validation of HPLC-DAD method of determination piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in 1% solution. *Запорозж. мед. журн.* 2017. Vol. 19, № 6 (105). P. 827–832. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

15. Розробка методики визначення та дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у молоці корів через 12 годин після введення / Б. О. Варинський, Є. О. Карпун, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, Б. П. Киричко, І. В. Гиренко. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2019. № 2 (30). С. 153–159. (Здобувач спланував

дослідження, провів збір даних, провів аналіз та інтерпретацію даних, написання статті).

16. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. ESI-MS fragmentation pathways of some 1,2,4-triazole-3-thiones, the intermediate compounds in the synthesis of active pharmaceutical ingredients. *J. Org. Pharm. Chem.* 2020. Vol. 18, № 1 (69). P. 22–33. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

17. Варинський Б. О. Термодинамічна характеристика обернено-фазового хроматографічного утримання морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок. *Фармац. часопис.* 2020. № 3. С. 24–30.

18. Варинський Б. О. Визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2020. Т. 13, № 3 (34). С. 371–377.

19. Varynskyi B. O. ВЕРХ-МС дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату. *J. Org. Pharm. Chem.* Vol. 18, № 3 (71). С. 49–54.

20. Варинський Б. О. Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок в умовах гідрофільної хроматографії. *J. Org. Pharm. Chem.* 2020. Vol. 18, № 4 (72). С. 50–55.

21. Development and validation of a LC-ESI-MS method for detection of piperidin-1-ium {[5-(2-furyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio} acetate residues in poultry eggs / B. Varynskyi, V. Parchenko, A. Kaplaushenko, O. Panasenko, Ye. Knysh. *J. Fac. Farm. Ankara.* 2016. Vol. 40 (3). P. 29–40. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

22. Разработка и валидация методики определения активного ингредиента препарата «авесстим» в яйцах птицы / Б. А. Варинский, В. В. Парченко,

Е. Г. Кныш, А. И. Панасенко, А. Г. Каплаушенко. *Azerbaijan Pharm. Pharmacother. J.* 2017. Т. 17 (2). С. 10–17. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

23. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Parchenko V. Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolylthioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018. № 10. P. 303–312. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

24. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Zidan F. Al. Development And Validation of HPLC-DAD Method Of Determination Morpholin-4-ium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate In A Bulk Drug. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2018. № 9. P. 2200–2209. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

25. Varynskyi B., Kaplaushenko A. The Force Degradation Study of the Morpholinium 2-((4-(2-Methoxyphenyl)-5-(Pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-Triazol-3-yl)Thio)Acetate. *Indonesian J. Pharmacy.* 2019. Vol 30, N 1. P. 25–34. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

26. Varynskyi B. Piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) acetate forced degradation study. *J. Fac. Pharm. Ankara (Ankara Ecz. Fak. Derg.)*. 2019. Vol. 43 (2). P. 117–134.

27. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Metabolism study of morpholinium 2- ((4- (2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio) acetate. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2020. Vol. 33, № 2. P. 72–75. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

28. Пат. на винахід 118707 Україна, МПК (2019.01) G01N 30/00, G01N 33/15 (2006.01), G01N 32/2258 (2018.01), B01D 15/00. Спосіб кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в субстанції морфолін-4-ій 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № у 2017 01062 ; заявл. 06.02.17 ; опубл. 25.02.19, Бюл. № 4. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

29. Пат. на корисну модель 130584 Україна, МПК G01N 30/02 (2006.01). Спосіб кількісного хроматографічного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № у201807689 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.12.18, Бюл. 23. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

30. Пат. на корисну модель 130873 Україна, МПК (2006) C07D 413/12 (2006.01), G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, А. Г. Каплаушенко, В. В. Парченко. № у201807659 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 26.12.18, Бюл. № 24. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

31. Пат. на корисну модель 131316 Україна, МПК (2006) G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. № у201807671 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.01.19, Бюл. № 1. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

32. Кучерявий Ю. М., Юрченко І. О., Варинський Б. О. Синтез та мас-спектрометричне дослідження похідних 5R-4R-1-1,2,4-тріазол-3-тіонів. *Інновації в медицині* : тези доповідей 83-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 27-28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 195. (Здобувачем проведено мас-спектрометричне дослідження).

33. Оптимізація умов рідинної хромато-мас-спектрометрії для перевірки молекулярної маси та чистоти синтезованих біологічно активних сполук / Ю. М. Кучерявий, Б. О. Варинський, І. О. Юрченко, Т. М. Литвиненко, А. М. Рудь. *Хімічні Каразінські читання - 2014* : VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 22-24 квіт. 2014 р. Х., 2014. С. 126. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження).

34. Варинський Б. О., Базилєва Х. А., Легкодух В. Г. Оптимізація умов МС детекції при ВЕРХ-МС визначенні похідних 1,2,4-тріазола. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення* : збірник тез міжнар. наук.-практ. конф., 7-8 листоп. 2014 р. К., 2014. С. 122–123. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

35. Варинський Б. А., Баланська Т. Ю. Розробка способу кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в піперидиній{[5-(2-фуран)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл]тіо}ацетату. *Сучасні Тенденції 2015* : тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії, 7-9 жовт. 2015 р. К., 2015. С. 152. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

36. Варинський Б. О., Матвієнко Л. Б., Гулий А. А. Методика визначення залишкової кількості піперидинію 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо] ацетату в яйцях птиці за допомогою ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Сучасні Тенденції 2017* : тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії, 18-21 жовт. 2017 р. К., 2017. С. 180. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

37. Варинський Б. О., Матвієнко Л. Б. Порівняльна характеристика методик визначення похідних 1,2,4-тріазола в яйцях птахів. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : Всеукр. наук.-практ. конф., 18-25 квіт., 30 трав. 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 146. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

38. Усенко Д., Варинський Б. О. Вивчення деградації пиперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетата в стресових умовах. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації 2019* : збірник тез доповідей наук.-практ. конф. з міжнар. участю молодих вчених та студентів, 13-17 трав. 2019 р. Запоріжжя, 2019. С. 156. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

39. Варинський Б. О. Дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетата. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, 19-20 верес. 2019 р. Х., 2019. Т. 1. С. 319.

40. Варинський Б. О., Леонтьєв Д. А., Каплаушенко А. Г. Створення фармакопейного стандартного зразка морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю, 23-24 вер. 2020 р. Т., 2020. С. 4. (Здобувачем проведено хроматографічні дослідження, участь в підготовці тез).

41. Варинський Б. О. Вибір оптимальних умов розділення деяких похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів, активних фармацевтичних інгредієнтів та домішок, для створення методик кількісного визначення. *Наука та сучасне фармацевтичне виробництво* : збірник матеріалів VIII наук.-практ. конф. школи молодих науковців, 19 листоп. 2020 р. К. : АТ «Фармак», 2020. С. 2.

42. Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, пиперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл] тіо) ацетату, та його домішок :

метод. рекомендації МОЗ України / І. Я. Коцюмбас, Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, В. В. Парченко. К., 2017. 19 с. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано методичні рекомендації до друку).

43. Усенко Д. Л., Варинський Б. О. Визначення енергій зв'язків для інтерпретації мас-спектричного розпаду ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів, вихідних речовин при синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю, 23-24 верес. 2020 р. Т., 2020. С. 16. (Здобувачем проведено розрахунки енергій зв'язків, написання тез).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	30
ВСТУП.....	32
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС МЕТОДИК (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	41
1.1 Синтез похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу.....	41
1.2 Існуючі хроматографічні методики аналізу похідних 1,2,4-тріазолу.....	43
1.3 Існуючі методики аналізу досліджуваних речовин.....	54
1.3.1 Відомі методики аналізу морфоліній 2-((4-(2-метокси- феніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	54
1.3.2 Відомі методики аналізу морфоліній 2-(5-(піридиніл)- 1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату.....	55
1.3.3 Відомі методики аналізу піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)- 4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	56
1.4 Підходи до оптимізації умов ВЕРХ-МС експерименту.....	57
1.5 Данні із мас-спектрометричної фрагментації похідних 1,2,4-тріазолів, що описані в літературі.....	73
1.6 Хроматографічні методики визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у м'ясі, яйцях та молоці, які описані в літературі.....	74
1.7 Хроматографічні методики визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в плазмі та сироватці крові, які описані в літературі.....	77
1.8 Існуючі методи дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів.....	78

	21
РОЗДІЛ 2 ПРИЛАДИ, МЕТОДИ, МЕТОДИКИ ТА РЕАКТИВИ, ВИКОРИСТАНІ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ДОСЛІДЖЕНЬ. ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕНЬ.....	79
2.1 Прилади.....	79
2.2 Основні нормативно-правові документи.....	81
2.3 Об'єкти дослідження.....	81
2.3.1 Сполуки.....	81
2.3.2 Біологічний матеріал.....	85
2.4 Реактиви та розчинники. Виготовлення розчинів.....	86
2.5 Формули розрахунку відсоткового вмісту.....	86
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ.....	88
3.1 Виготовлення розчинів для оптимізації умов мас-спектрометричного детектування та опис мас-спектрометричного дослідження.....	88
3.2 Процедура оптимізації умов мас-спектрометричного детектування.....	89
3.3 Оптимізація умов детектування гідразидів та карботіоамідів..	92
3.4 Оптимізація умов детектування тіонів.....	95
3.5 Оптимізація умов детектування кислот та солей.....	99
ВИСНОВКИ.....	103
РОЗДІЛ 4 ОБГРУНТУВАННЯ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБЛЕННЯ І ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АФІ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ.....	104
4.1 Дослідження хроматографічних параметрів утримування речовин.....	104
4.1.1 Умови проведення хроматографічного дослідження.....	104
4.1.2 Процедура оптимізації хроматографічних умов визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та проміжних речовин в їх синтезі.....	104

	22
4.1.3 Дослідження характеристик утримування гідразидів карбонових кислот та карботіоамідів.....	106
4.1.4 Дослідження характеристик утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів.....	112
4.1.5 Дослідження характеристик утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей.....	117
4.2 Хроматографічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок до нього.....	124
4.2.1 Вибір оптимальних умов розділення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок до нього, використання цих умов для створення методики кількісного визначення.....	125
4.2.2 Методика визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції.....	129
4.2.3 Валідація методики визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції.....	131
4.2.4 Застосування розробленої методики для кількісного визначення АФІ тіометрізолу в субстанції.....	134
4.2.5 Методика визначення домішок морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в його субстанції.....	136
4.2.6 Валідація методики визначення домішок морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в його субстанції.....	139
4.2.7 Застосування розробленої методики для кількісного визначення домішок тіометрізолу в субстанції.....	147

4.3 Хроматографічне дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату та його домішок.....	150
4.3.1 Вибір оптимальних умов розділення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату та його домішок.....	151
4.3.2 Методика визначення АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД.....	154
4.3.3 Валідація методики визначення АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД.....	156
4.3.4 Методика визначення домішок до піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД.....	161
4.3.5 Валідація методики визначення домішок АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою методу ВЕРХ-ДМД.....	163
4.3.6 Методика визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій	171
4.3.7 Валідація методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій	173
4.3.8 Застосування розробленої методики для кількісного визначення АФІ тріфузолу в 1% розчині для ін'єкцій.....	177
4.4 Термодинамічна характеристика оберненофазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату та його технологічних домішок.....	179
4.4.1 Методика визначення термодинамічних параметрів оберненофазового хроматографічного утримування морфолі-	

ній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок.....	179
4.4.2 Термодинамічні параметри оберненофазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок.....	180
4.5 Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідрофільної хроматографії.....	184
4.5.1 Методика визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідрофільної хроматографії.....	184
4.5.2 Термодинамічні параметри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідрофільної хроматографії.....	185
4.6 Визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії.....	190
4.6.1 Методика встановлення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії.....	190
4.6.2 Дослідження умов розділення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетату та його домішок	191
4.6.3 Термодинамічні параметри морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії.....	192
ВИСНОВКИ.....	195
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ СПОЛУК ДЛЯ ВЕРХ-МС ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО	

	25
ВИЗНАЧЕННЯ.....	197
5.1 Умови дослідження мас-спектрометричної фрагментації при іонізації в електроспреї.....	197
5.2 Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду при іонізації в електроспреї гідразидів ряду органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботіоамідів, напівпродуктів в синтезі АФІ.....	198
5.3 Вивчення закономірностей фрагментації при іонізації в електроспреї ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів, проміжних сполук в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів.....	206
5.4 Вивчення закономірностей фрагментації при іонізації в електроспреї низки солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот, потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів.....	225
ВИСНОВКИ.....	246
РОЗДІЛ 6 ОБГРУНТУВАННЯ РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ АФІ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ.....	248
6.1 Визначення АФІ авестиму в яйцях птиці.....	248
6.1.1 Методика визначення АФІ авестиму в яйцях птахів.....	248
6.1.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату (АФІ авестиму).....	250
6.1.3 Вивчення селективності, чутливості, лінійності методики визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату (АФІ авестиму) в яйцях птиці.....	251
6.1.4 Визначення прецизійності та правильності методики визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату (АФІ авестиму) в яйцях птиці.....	254
6.1.5 Результати кількісного визначення вмісту морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату в яйцях птиці....	256

6.2	Визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в яйцях птиці.....	256
6.2.1	Методика визначення АФІ тріфузолу в яйцях птиці.....	257
6.2.2	Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) при визначенні в яйцях птиці.....	259
6.2.3	Вивчення селективності, лінійності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в яйцях птиці.....	260
6.2.4	Вивчення чутливості, прецизійності та правильності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в яйцях птиці.....	261
6.3	Визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці.....	264
6.3.1	Методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці.....	264
6.3.2	Вибір умов ВЕРХ-аналізу і МС-детектування АФІ тріфузолу піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці.....	268
6.3.3	Вивчення чутливості, лінійності методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі птиці.....	271
6.3.4	Вивчення лінійності, прецизійності та правильності методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі птиці.....	272
6.3.5	Результати кількісного визначення вмісту АФІ тріфузолу в м'ясі птиці.....	273

	27
6.4 Дослідження піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в молоці корів.....	274
6.4.1 Методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у молоці корів.....	274
6.4.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу і МС-детектування піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в молоці корів.....	275
6.4.3 Вибір умов пробоопідготовки, селективність, чутливість та побудова калібрувальної кривої при визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в молоці корів.....	275
6.4.4 Визначення вмісту АФІ тріфузолу в зразку молока корови через 12 год після отримання ін'єкційного розчину.....	279
6.5 Розробка і валідація методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі поросся.....	280
6.5.1 Методика визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі поросся.....	280
6.5.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) при визначенні в м'ясі поросся.....	284
6.5.3 Вивчення чутливості та селективності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі поросся.....	284
6.5.4 Вивчення лінійності, прецизійності та правильності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі поросся.....	285

6.5.5 Застосування аналітичної методики для визначення залишкової кількості піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у гомогенаті.....	287
ВИСНОВКИ.....	292
РОЗДІЛ 7 ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИСКОРЕНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ АФІ ПОХІДНИХ 3-ТІО-1,2,4-ТРИАЗОЛУ.....	294
7.1 Дослідження стресової деградації морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	294
7.1.1 Методика дослідження стресової деградації морфолінію 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	294
7.1.2 Результати дослідження стресової деградації морфолінію 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	296
7.2 Дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату.....	305
7.2.1 Методика дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату.....	305
7.2.2 Результати дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату.....	306
7.2.3 Визначення структури продуктів деструкції.....	310
ВИСНОВКИ.....	320
РОЗДІЛ 8 ОБҐРУНТУВАННЯ РОЗРОБКИ МЕТОДИКИ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИКИ І МЕТАБОЛІЗМУ МОРФОЛІНІЙ 2-((4-(2-МЕТОКСИФЕНІЛ)-5-ПІРИДИНІЛ)-4 <i>H</i> -1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ (ТІОМЕТРИЗОЛУ) В ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ.....	322
8.1 Дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів.....	322

8.1.1	Методика дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	323
8.1.2	Результати дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	323
8.2	Дослідження метаболізму морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	330
8.2.1	Методика дослідження метаболізму морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.....	330
8.2.2	Визначення складу основного метаболіту за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією....	331
8.2.3	Механізм утворення основного метаболіту.....	333
	ВИСНОВКИ.....	336
	ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	337
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	340
	ДОДАТКИ.....	382

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ-ЕСІ-МС	– високоефективна рідинна хроматографія із мас-спектрометричною детекцією в електроспреї;
ВЕРХ-МС/МС	– високоефективна рідинна хроматографія із тандемною мас-спектрометричною детекцією;
ВЕРХ-ДМД	– високоефективна рідинна хроматографія із діодно-матричною детекцією;
ВМКВ (ULOQ)	– верхня межа кількісного визначення (upper limit of quantification);
ВС	– внутрішній стандарт;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
ЗКЯ (QC зразкі)	– зразкі з контролю якості;
МВ (LOD)	– межа виявлення;
МКВ (LOQ)	– межа кількісного визначення;
МСД	– мас-спектрометричний детектор;
НМКВ (LLOQ)	– нижня межа кількісного визначення (lower limit of quantification);
ОФ ВЕРХ	– обернено фазова високоефективна рідинна хроматографія;
ПІА-МС	– проточно-інжекційний аналіз;
СЗ	– стандартний зразок;
ТФА	– трифлуорацетатна кислота;
ТФЕ	– твердофазна екстракція;
ТШХ	– тонкошарова хроматографія;
т.т.	– теоретичні тарелки;
ФСЗ	– фармакопейний стандартний зразок;
ADME	– absorption, distribution, metabolism and excretion (адсорбція, дістриб'юція, метаболізм та екскреція);

CID	– collision induced dissociation (дисоція, що викликана зіткненнями);
EIC-хроматограма	– хроматограма за виділеним іоном;
ELSD	– evaporative light scattering detector (випаровувальний детектор світлорозсіювання);
ESI-TOF-MS	– electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (іонізація в електроспреї – часо-прольотна мас-спектрометрія);
HILIC	– гідрофільна хроматографія;
LOD	– limit of detection (межа детектування);
logP _{ow}	– $\log \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{water}}}$, де C_{octanol} – концентрація речовини в октанолі, C_{water} – концентрація речовини у воді;
PBS	– phosphate-buffered saline (фосфатно-буферний солевий розчин);
Q-TOF-MS	– quadrupole time-of-flight mass spectrometry (квадрупольна часо-прольотна мас-спектрометрія);
QuEChERS	– «quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe» є твердофазним способом екстракції для виявлення залишків пестицидів у продуктах харчування;
RSD%	– relative standard deviation (відносне стандартне відхилення, у відсотках);
R, %	– ступінь вилучення (ступінь ізолювання);
R _m	– $\log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$;
S/N	– співвідношення сигнал/шум;
TIC-хроматограма	– хроматограма за повним іонним током;
\bar{X}	– середнє значення;
ε	– відносна невизначенність результату окремого визначення.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Сучасна медицина має в своєму арсеналі і використовує похідні 1,2,4-тріазолу як протигрибкові, протипухлинні, антиоксидантні, гепатопротекторні, противірусні лікарські препарати. Останнім часом в Україні знайшов широке використання оригінальний лікарський засіб тіотріазолін, зареєстровані ветеринарні препарати тріфузол та авесстим. Препарат тріфузол ефективний проти багатьох вірусів. В той же час авесстим підвищує резистентність організму до хвороб вірусної етіології. Тому дослідження цих речовин має особливу важливість. На етапі реєстрації для застосування в медицині людини знаходиться засіб тіометрізол, що має нейропротекторні властивості.

Всі перелічені ліки є похідними 3-тіо-1,2,4-тріазолу і, якщо для тіотріазоліну розроблені методи ідентифікації і кількісного визначення, три останні препарати потребують детального вивчення в даному аспекті. Основними тенденціями із створення нових методик аналізу АФІ є збільшення використання ВЕРХ, ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС методів. Однак, для похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів спостерігається відставання у розробці методик їх визначення від світових тенденцій, а саме для цих речовин звичайно пропонуються здебільшого спектрофотометричні методи.

Вивчення масиву патентної документації показало практично повну відсутність охоронних документів з ВЕРХ-ДМД-МС визначення 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їхньому синтезі, що свідчить про нестачу інноваційних методик аналізу щодо нових високоякісних лікарських засобів. Тому розробка методик визначення перспективних лікарських засобів з групи похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів є актуальним завданням сучасної фармації.

Результатом виконання науково-дослідницької роботи є розробка нових наукових підходів до ВЕРХ-ДМД-МС ідентифікації та кількісного визначення низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, опрацювання та здійснення валідації

методик, які дозволять контролювати вміст вказаних речовин у напівпродуктах, субстанціях, лікарських препаратах, біологічних рідинах та тканинах.

Отже, все вищезазначене свідчить про актуальність теми та підтверджує доцільність виконання науково-дослідницької роботи.

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

Дисертаційну роботу виконано згідно до планів науково-дослідної роботи Запорізького державного медичного університету за темами «Розробка, валідація методик аналізу та дослідження АФІ – похідних 1,2,4-тріазолу з використанням хроматографії та мас-спектрометрії» (номер державної реєстрації 0116U005829) та «Створення методик аналізу та дослідження похідних 1,2,4-тріазолу як перспективних активних фармацевтичних інгредієнтів з використанням високоефективної рідинної хроматографії» (номер державної 0120U101650).

Мета і завдання дослідження

Науково-теоретичне та практичне обґрунтування підходів до аналітичного супроводу АФІ на етапах створення і впровадження в практику оригінальних лікарських засобів, шляхом розробки та випробування аналітичних і біоаналітичних ВЕРХ-ДМД-МС методик визначення низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу.

Для досягнення означеної мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- здійснити аналітичний огляд патентних та літературних наукових джерел щодо застосування ВЕРХ-ДМД-МС для визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в різних об'єктах. З'ясувати оптимальні умови визначення досліджуваних речовин залежно від факторів, що впливають на роботу йонного джерела (напруга на фрагментаторі, тиск на небулайзері, температура газу-осушувача) та значення сигналу мас-спектрометричного детектора;
- спрогнозувати та пояснити за допомогою розрахунку параметрів гідрофільно-ліпофільних властивостей похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу закономірності їх утримування на обернено-фазовому носії. Визначити

залежність часу утримування об'єктів дослідження від вмісту органічного модифікатора;

- розрахувати математичні моделі, що дозволять оптимізувати умови ідентифікації та кількісного визначення АФІ, їх напівпродуктів та домішок під час здійснення мас-спектрометричного та хроматографічного аналізу. Вивчити термодинамічні характеристики утримування досліджуваних аналітів;

- вивчити мас-спектрометричну фрагментацію низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, напівпродуктів при їх синтезі. Запропонувати схеми мас-спектрометричного розкладання вказаних сполук;

- на підставі розрахунку та експериментального визначення ступеня вилучення, запропонувати оптимальні умови пробопідготовки при дослідженні похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в фармацевтичних та біологічних зразках;

- розробити, валідувати та випробувати на реальних зразках методики визначення АФІ (тріфузолу, авесстиму, тіометризолу) та відповідних домішок у субстанціях, лікарських та ветеринарних засобах, у біологічних рідинах, тканинах та органах;

- дослідити поведінку АФІ в умовах прискореної деградації, при цьому встановити зміну концентрацію АФІ в часі при дії хімічних факторів, а саме лугів, кислот, окиснювачів; фізичних факторів – температури, УФ-випромінювання;

- застосувати розроблені методики визначення АФІ (тріфузолу, авесстиму, тіометризолу) для вивчення фармакокінетики та метаболізму вказаних речовин;

- створити на основі комплексного наукового підходу застосування ВЕРХ-ДМД-МС методичну базу визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в фармацевтичних та біологічних зразках;

- здійснити розробку та впровадити у фармацевтичну практику фармакопейний стандартний зразок АФІ.

Об'єкт дослідження. Вивчення фізико-хімічних властивостей низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів, розробка та валідація методик їх кількісного визначення.

Предмет дослідження. Низка похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, їх фізико-хімічні властивості, стійкість, хроматографічна та мас-спектрометрична поведінка.

Методи дослідження

Для розробки та використання методик кількісного визначення та ідентифікації АФІ (в субстанції, лікарських формах, в біологічному матеріалі) та домішок до них (в субстанції, лікарських формах) використані фізико-хімічні методи, такі як високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричною та мас-спектрометричною детекцією. Для визначення рН елюентів та екстрагентів застосована рН-метрія. Біологічними та фармако-токсикологічними методами проведено дослідження фармакокінетики, визначення метаболітів, залишкових кількостей АФІ у біологічних об'єктах. Розрахунки рівнянь поліноміальної регресії, визначення максимумів отриманих функцій, розрахунки валідаційних характеристик розроблених методик здійснено методами математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів

У роботі вперше запропоновано науково-обгрунтований комплексний підхід до вирішення важливої задачі сучасної фармацевтичної галузі, що полягає в аналітичному супроводі оригінальних лікарських засобів, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів їх синтезу, на шляху впровадження в практику. Новизна роботи полягає в оптимізації умов роботи іонного джерела на підставі максимальних значень отриманих поліноміальних регресійних моделей, що відповідають залежностям інтенсивності сигналу мас-детектору від факторів роботи йонного джерела (напруги на фрагментаторі, тиску на небулайзері, температури газу-осушувача). При цьому отримані оптимальні умови мас-спектрометричного детектування вказаних похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів їх синтезу.

Вперше оптимізовано хроматографічне розділення низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх виробництві, отримані залежності хроматографічного утримування сполук від вмісту органічного модифікатору, залежності характеристик утримування всіх досліджуваних речовин від розрахованих показників ліпофільності. Вперше запропоновані схеми ВЕРХ-МС фрагментації для низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх синтезі.

Розроблені нові методики визначення низки АФІ, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, можливих домішок у субстанціях, лікарських засобах, методики виявлення АФІ та залишкових їх кількостей у біологічних рідинах, тканинах та органах, для дослідження фармакокінетики і метаболізму. Якість розроблених методик визначення АФІ тріфузолу, авесстиму, тіометризолу, домішок у субстанціях, лікарських засобах, залишкових кількостей АФІ тріфузолу та авесстиму в біологічних об'єктах підтверджено результатами валідації.

Методики визначення АФІ тріфузолу, авесстиму, тіометризолу, можливих домішок в субстанціях, лікарських засобах, підходи до визначення АФІ в біологічних рідинах, методики визначення залишкових кількостей АФІ тріфузолу та авесстиму в біологічних об'єктах апробовані на реальних зразках.

Вперше отримані дані щодо термодинамічних параметрів утримування низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу та напівпродуктів в їх синтезі на хроматографічних сорбентах. Вперше визначені криві прискореної деградації АФІ тіометризолу та тріфузолу, запропоновані схеми процесу їх деградації.

Новими є результати дослідження фармакокінетики та метаболізму активного фармацевтичного інгредієнта препарату тіометризол у плазмі крові щурів, при цьому встановлено будову основного метаболіту.

Наукову новизну роботи підтверджено патентом України на винахід № 118707 та патентами на корисну модель № 130584, 130873, 131316, а також авторським правом на монографію «Методи ВЕРХ і ВЕРХ-МС в аналізі лікарських речовин в плазмі та сироватці крові : монографія» (дод. А).

Практичне значення одержаних результатів

Напрацьовано значний масив теоретичних та практичних результатів, що полягає в створенні концепції аналітичного супроводу на всіх етапах створення, вивчення, впровадження у виробництво, ветеринарну та медичну практику оригінальних лікарських засобів тріфузолу, авесстиму та тіометризолу.

В ході виконання роботи створені оригінальні, метрологічно атестовані ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС методики ідентифікації та кількісного визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в продуктах та напівпродуктах синтезу, в субстанціях і лікарських формах, в біологічному матеріалі, тощо. Розроблені методики впроваджені та широко використовуються при аналізі АФІ в лабораторіях з контролю якості фармацевтичного заводу ТОВ «Науково-виробнича фірма «БроваФарма», Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, а також ТОВ «Українська фармацевтична компанія». (дод. Б.1-Б.3).

На підставі результатів розробки методик визначення АФІ тріфузолу та технологічних домішок до нього видані Методичні рекомендації МОЗ України «Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, піперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл]тіо)ацетату, та його домішок» (дод. В).

Створений сертифікований Фармакопейний стандартний зразок потенційного лікарського засобу тіометризолу. ФСЗ упроваджено в діяльність Державного підприємства «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (дод. Д).

Розроблені методики визначення АФІ, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу можуть бути використані для забезпечення якості та екологічності на етапах їх виробництва (контроль залишкових кількостей в промислових відходах, промивних водах), для гарантії безпеки вживання продуктів харчування, що можуть містити залишкові кількості похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, які були додатково застосовані як профілактичні, та (або) лікувальні засоби.

Запропоновані шляхи фрагментації ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів 1,2,4-тріазол-3-ілтїооцтових кислот в джерелі іонів при іонізації електророзпиленням може використовуватись для детектування цих або аналогічних речовин, а також для підтвердження структури нових сполук за мас-спектрами на підставі вивчених закономірностей.

Розроблені підходи до створення методик визначення 3-тіо-1,2,4-тріазолів та методики визначення впроваджено в науково-педагогічний процес ряду закладів вищої освіти України: кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова; кафедри аналітичної хімії, кафедри природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії, кафедри фармацевтичної хімії, кафедри фізколоїдної хімії Запорізького державного медичного університету; кафедри токсикологічної та аналітичної хімії, кафедри загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького; кафедри промислової фармації ДЗ «Луганський державний медичний університет»; кафедри неорганічної та фізичної хімії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармацевтичних дисциплін Ужгородського національного університету; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету Е.1-Е.11.

Особистий внесок здобувача

Автором особисто:

- проведено аналіз патентної документації та наукових публікацій щодо методик аналізу похідних 1,2,4-тріазолу, насамперед на основі високоефективної рідинної хроматографії; здійснено постановку цілей і завдань дослідження проведено розробку дизайну експерименту;
- теоретично обґрунтовано та опрацьовано підхід до розробки та валідації методик якісного та кількісного визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в субстанціях, лікарських формах та біологічних зразках методами ВЕРХ-МС та ВЕРХ-ДМД;
- вивчено процес та встановлені продукти прискореної деградації

субстанцій та розчинів АФІ; сплановано та проведено дослідження термодинаміки утримування АФІ авесстиму та тіометризолу та відповідних домішок;

- здійснено написання тексту дисертаційної роботи та автореферату.

Персональний внесок у всіх опублікованих зі співавторами працях зазначено за текстом дисертаційної роботи, а також в авторефераті у списку публікацій.

Співавторами наукових праць є науковий консультант та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, наведені у дисертації, розроблені автором особисто.

Апробація результатів дисертації

Основні результати та положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на конференціях: 83 Наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, (Івано-Франківськ, 27-28 берез. 2014 р.); Хімічні Каразінські читання – 2014 : VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів (Харків, 22-24 квіт. 2014 р.); Охорона та захіст здоров'я людини в умовах сьогодення : міжнар. наук.-практ. конф. (Київ, 7-8 листоп. 2014 р.); Сучасні Тенденції 2015 : Київська конференція з аналітичної хімії (Київ, 7-9 жовт. 2015 р.); Київська конференція з аналітичної хімії (Київ, 18-21 жовт. 2017 р.); Актуальні питання сучасної медицини і фармації : Всеукр. наук.-практ. конф. (Запоріжжя, 18-25 квіт. 2018 р.); Актуальні питання сучасної медицини і фармації 2019 : наук.-практ. конф. з міжнар. участю молодих вчених та студентів (Запоріжжя, 13-17 трав. 2019 р.); Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України (Харків, 19-20 верес. 2019 р.); Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю (Тернопіль, 23-24 вер. 2020

р.); Наука та сучасне фармацевтичне виробництво : VIII наук.-практ. конф. школи молодих науковців (Київ, АТ «Фармак», 19 листоп. 2020 р.); Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю (Тернопіль, 23-24 верес. 2020 р.).

Апробацію дисертаційної роботи проведено на спільному засіданні професорсько-викладацького складу кафедр Запорізького державного медичного університету 8 лютого 2021 року.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 43 наукові роботи, у тому числі 1 монографія, 26 статей (з яких 19 у фахових виданнях України, 6 у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Cor Collection і Scopus), 1 патент України на винахід, 3 патенти України на корисну модель, 12 тез доповідей, 1 методичні рекомендації МОЗ України.

Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 410 сторінках машинописного тексту (обсяг основного тексту – 288 сторінки), складається з анотації, вступу, восьми розділів, висновків, списку використаних джерел, 6 додатків (11 актів впроваджень). Робота ілюстрована 85 таблицями та 242 рисунками. Список використаних джерел містить 374 найменування, з яких 307 – латиною.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ВЕРХ ТА ВЕРХ-МС
МЕТОДИК (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Синтез похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу

Наукові досягнення фармацевтичної науки останніх років свідчать про широкі перспективні можливості синтетичної складової в даній галузі. Синтез біологічно активних сполук – основа створення потенційних лікарських засобів. Існує багато синтетичних напрямів пошуку фармакологічно активних речовин. Ключовим аспектом пошуку є створення малотоксичних субстанцій з широким спектром біологічної дії. Аналізуючи наукові джерела, слід відзначити, що великі синтетичні можливості виявляють гетероциклічні системи, серед яких пріоритетними є похідні 1,2,4-тріазолу. Відомо також, що сполуки цього класу є малотоксичними або майже нетоксичними речовинами, які виявляють різні види фармакологічної активності. Поєднання в одній молекулі структурних фрагментів 1,2,4-тріазолу, аліфатичних, ароматичних або гетероциклічних систем приводить до появи нових молекул з високою біологічною активністю [1-3].

1,2,4-Тріазоли є великою групою гетероциклічних сполук з високими показниками фармакологічної активності. Ядро 1,2,4-тріазолу є структурним фрагментом багатьох синтетичних лікарських засобів з протигрибковою (флуконазол, інтраконазол), гепатопротекторною, ранозагоювальною та противірусною (тіотріазолін, тріфузол, авесстим) активністю.

Існуючі методи добування 1,2,4-тріазолін-3-тіонів полягають у циклізації 2-ацилгідразинокрботіоамідів, тіонуванні 1,2,4-тріазолів, а також у перегрупуванні деяких гетероциклів. Найбільш доступним методом синтезу 3-тіопохідних 1,2,4-тріазолу є циклізація 2-ацилгідразинокрботіоамідів [1-3]. Отримання 1,2,4-тріазол-3-ілтїооцтових кислот та їх солей наведено на рис. 1.1.

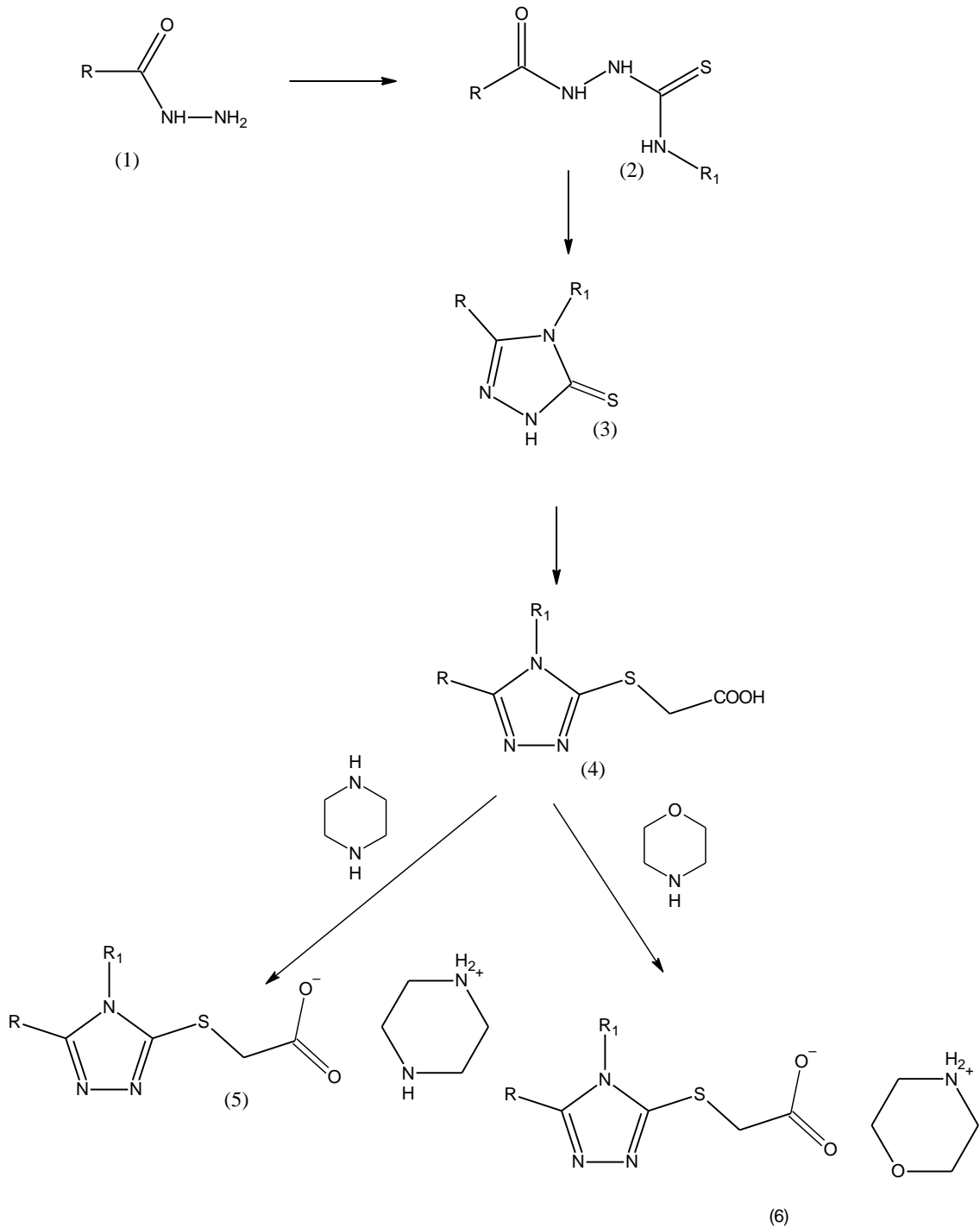


Рис. 1.1. Схема синтезу солей 1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатних кислот

Найчастіше домішками в лікарських субстанціях та препаратах є напівпродукти синтезу, побічні продукти, продукти деградації, розчинники [4].

Напівпродукти синтезу гідразид (1), карботіоамід (2) та тіон (3) можуть потрапляти як специфічні домішки в кінцевий продукт.

1.2 Існуючі хроматографічні методики аналізу похідних 1,2,4-тріазолу

Георгієвським Г. В. створено комплекс методик визначення похідних 1,2,4-тріазолу [5, 6]. Автор пропонував ВЕРХ методику із спектрофотометричним детектуванням для кількісного визначення тіотріазоліну, кардіотрилу та їх технологічних домішок. Як стаціонарну фазу застосовано Silasorb 600, тобто сілікагелевий сорбент. В роботі використано ацетонітрил як органічний модифікатор, кислотне середовище створювалось за допомогою фосфатного буфера, при цьому, як вказує автор, тіотріазолін елююється у вигляді кислоти. Для підтвердження молекулярної маси АФІ (за m/z), перевірки їх чистоти авторами використано ВЕРХ-МС (хімічної іонізації при атмосферному тиску) із додатковими діодноматричним детектором та випаровувальним детектором світлорозсіювання. Як подкислювач застосовано форміатну кислоту, але методику використано тільки для ідентифікації.

В роботі [7] автори проводили дослідження домішок до тіотріазоліну та кардіотрилу. Було використано хроматографічні колонки: Kromasil C18 (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм) та Resolve C18 (300 мм × 4,6 мм, 5 мкм), виробництва «Waters», США. Як рухоми фазу використано фосфатний буфер із ацетонітрилом. Швидкість рухоми фази – 1,0 мл/хв, об'єм проби – 10 мкл.

Под керівництвом Кучеренко Л. І. проводяться дослідження зі створення хроматографічних методик визначення похідних 1,2,4-тріазолу [8-13]. Раніше на прикладі тіотріазоліну було показано, що технологічними домішками можуть бути відповідні синтони, такі як тіосемікарбазід, ацетилтіосемікарбазід (ацетилкарботіоамід) та 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон [6, 7]. В цих роботах показані ВЕРХ методики визначення відповідних домішок. Таким чином, при синтезі солей 3-тіо-1,2,4-тріазолілацетатів в кінцевий продукт можуть потрапляти відповідні карботіоаміди та 1,2,4-тріазоліл-5-тіони.

В роботі [9] надані результати дослідження фармакокінетики препарату ангіолін на підставі ВЕРХ-МС.

Проведено тест «Розчинення» таблеток гіпертрил із використанням ВЕРХ [11].

Tatarczak-Michalewska M. із співавторами розробили рідинно-хроматографічний метод визначення 4-метил-1-морфолінометил-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону, потенційного протитуберкульозного засобу в зразках сечі та сироватки. Використано колонки C18 з рухомою фазою, що складалеться із метанолу та води (5:95), зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Визначення проводили при 245 нм. Депротейнізацію зразка провели за допомогою 6% HClO₄ [14].

J. Flieger та інші провели хроматографічну оцінку ліпофільності на колонках C18. Метою цього дослідження було оцінити використання стаціонарної фази C18 у хроматографічних експериментах для оцінки антимікобактеріальної активності ряду нових тіосемікарбазидів та продуктів їх циклізації – похідних 1,2,4-тріазолу. Підхід допоміг оцінити досліджувані аналіти як активні та неактивні щодо штамів *Mycobacterium* [15].

Існує ряд робіт, в яких наводяться дані про розробку методик кількісного визначення похідних 1,2,4-тріазолу протигрибкового призначення.

Так M. Zhang зі співавторами пропонували спосіб визначення трьох протигрибкових препаратів похідних 1,2,4-тріазолу (вориконазолу, позаконазолу, ітраконазолу і метаболіту гідроксоітраконазол) в плазмі крові людини. Підготовка зразка починається з простого осадження білка за один крок за допомогою 1,0 М хлорної кислоти і метанолу. Після центрифугування супернатант уводять безпосередньо в систему ВЕРХ. Визначення вориконазолу, позаконазолу, ітраконазолу та його метаболіту гідроксоітраконазолу проводили, використовуючи внутрішній стандарт напроксен на колонці C6-феніл з градієнтним елююванням: буфер 0,01 М фосфат, рН 3,5, ацетонітрилу та УФ-детектором при 262 нм [16].

P. Sadasivudu зі співавторами розробили і провалідували ОФ-ВЕРХ і УФ-спектрофотометричний спосіб аналізу флуконазолу у фармацевтичних твердих лікарських форм, таких як капсули, таблетки без покриття та дисперсні

таблетки. Хроматографію проводили на C-18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) колонка з водою і ацетонітрилом (65:35 об/об) як рухомою фазою при 260 нм довжини хвилі детектора. Метод УФ проводили при довжині хвилі 260 нм з використанням 0,1 М HCl як розчинника [17].

L. Baietto із співавторами розробили і провалідували метод високоефективної рідинної хроматографії в поєднанні з мас-спектрометричним детектором для кількісного визначення ітраконазолу, вориконазолу і позаконазолу з використанням хіноксаліну як внутрішнього стандарту. Спосіб включає осадження білків ацетонітрилом [18].

J. W. C. Alffenaar та інші запропонували LC/MS/MS метод визначення вориконазолу, флуконазолу, ітраконазолу і позаконазолу в сироватці крові людини для терапевтичного лікарського моніторингу. Цей новий метод підходить для клінічних фармакокінетичних досліджень і регулярного щоденного моніторингу [19].

P. Tang розробив простий, чутливий і швидкий спосіб високоефективної ВЕРХ для визначення вориконазолу в сироватці або плазмі людини. Вориконазол і внутрішній стандарт клоназепам екстрагували із плазми або сироватки крові метанолом і аналізували на колонці Microsorb-MB C18 з УФ-детектором при 256 і 310 нм, відповідно. Цій спосіб може бути застосований для терапевтичного лікарського моніторингу [20].

В праці L. A. Decosterd та інших [25] запропоновано швидкий УВЕРХ-МС/МС спосіб терапевтичного лікарського моніторингу засобу ряду протигрибкових засобів, із групи 1,2,4-тріазолів (флуконазол, ітраконазол, гідроксіантраконазол, позаконазол, воріконазол, воріконазол-*N*-оксид), а також каспофунгіну і анідулафунгіну. Виконували процедуру осадження білка ацетонітрилом. Після обернено-фазового хроматографічного розділення протигрибкові засоби визначені кількісно за допомогою іонізації електророзпиленням з потрійним квадрупольним мас-спектрометром шляхом моніторингу реакцій з використанням позитивного режиму. Дейтерировані сполуки азолів використані як внутрішні стандарти. Цей метод є ефективним

інструментом для щоденного рутинного терапевтичного лікарського моніторингу [21].

Рівень воріконазолу в сироватці крові визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії в роботі [22]. Проведено хроматографічне розділення за допомогою колонки LiChrosorb (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм розмір зерна сорбента) із захисною колонкою LiChrosorb (RP)-C18. Температуру підтримували на рівні 30°C протягом усього періоду вимірювання. Рухома фаза складалася з відфільтрованої та дегазованої суміші ацетонітрил-натрію дигідрофосфату (0,05 М, рН 3,1) (55:45 [об./об.]), подавали зі швидкістю потоку 1,2 мл/хв в ізократичному режимі. Виявлення було досягнуто моніторинг поглинання при 255 нм.

Розроблено високочутливий і специфічний метод РХ-МС/МС для одночасної оцінки ітраконазолу та гідроксіітраконазолу в людській плазмі з використанням флуконазолу як внутрішнього стандарту [23].

Високоефективний рідиннохроматографічний метод розроблено для визначення флуконазолу в ін'єкційних розчинах. Використовували колонку Phenomenex Synergi Fusion RP-80 C18 (150 x 4,60 мм, 4 мкм) при ізократичному елююванні вода:метанол (55:45, об./об.) та УФ-детектуванні при 260 нм [24].

Для визначення флуконазолу в плазмі людини було розроблено високоефективний рідинно-хроматографічну методику з УФ-детектуванням. Використовували твердофазну екстракцію для очищення зразків. Розділення проводили на колонці C18 методом ізократичного елюювання з рухомою фазою, що складалася із 10 мМ ацетатного буфера з рН 5,0 та метанолу. Детектування проводили при 210 нм. Валідацію проводили відповідно до діючих рекомендацій Керівництва з валідації біоаналітичного методу США.

Розроблено швидку та чутливу обернено-фазову високоефективну рідинно-хроматографічну методику для одночасної оцінки флуконазолу, перорально активного протигрибкового засобу тріазолу та тинідазолу, який належить до групи 5-нітроімідазолів у таблетках. Хроматографічне розділення проводили на колонці ODS Hypersil C(18), використовуючи 0,05 М

дигідрофосфатний буфер калію (рН 3,25, скоригований ортофосфорною кислотою) та ацетонітрил (82:18, об./об.) як рухому фазу зі швидкістю потоку 1,5 мл/хв з детектуванням при 210 нм [26].

Розроблено швидкий метод ВЕРХ-МС/МС для одночасного визначення чотирьох тріазольних протигрибкових препаратів в плазмі людини. Після осадження білка додаванням метанолу/ $ZnSO_4$, що містить кетоконазол як внутрішній стандарт, аналіти виділяли з матриці та збагачували твердофазною екстракцією та розділяли на ВЕРХ колонці Allure PFP, витримуваний при 60°C [27].

Колектив вчених [28] визначав вміст трьох споріднених речовин (1,2,4-тріазолів) у флуконазолі за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Колонка Explise XDB-C18, 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм використовувалась як стаціонарна фаза. Розділення проводили в градієнтному режимі. Рухома фаза А складалась із 0,02 М фосфатного буфера, рухома фаза В складалась із чистого ацетонітрилу. Межі виявлення домішки А (2-(2,4-дифторфеніл)-1,3-біс(1*H*-1,2,4-тріазол-1-іл)-2-пропан-2-ол), домішки В (2-(2,4-дифторфеніл)-1-(1*H*-1,2,4-тріазол-1-іл)-3-(4*H*-1,2,4-тріазол-4-іл)пропан-2-іл дигідрофосфат) та домішки С (2-(2-фторфеніл)-1,3-біс(1*H*-1,2,4-тріазол-1-іл)-2-пропіл дигідрофосфат) 3,0, 3,0 та 5,0 г/мл відповідно. Межа кількісного визначення становила 10,0, 22,0 та 21,3 г/мл для А, В та С. Методика може бути використана для контролю якості домішок в розчинах для ін'єкції, таблетках та капсулах.

Розроблено методику визначення флуконазолу в мікроемульсіях та рідких кристалах на колонці C18-RP (250 × 4,6 мм) за кімнатної температури. Рухома фаза складалась з ацетонітрилу та води (50:50, об./об.), при швидкості потоку 1,0 мл/хв та з використанням ультрафіолетового детектора при 210 нм. Час утримування 6,3 хв, методика лінійна в діапазоні 20-400 мкг/мл [29].

Вченими із Індії запропоновані чутливі методи для визначення трьох потенційно генотоксичних домішок, а саме 1-бромо-3-хлорпропану, 1-(4-нітробензил)-1*H*-1,2,4-тріазолу та 1-(бромометил)-4-нітробензол у ризатриптан

бензоаті. Визначення 1-бромо-3-хлорпропану проводили за допомогою GC-MS, 1-(4-нітробензил)-1*H*-1,2,4-тріазол та 1-(бромометил)-4-нітробензол визначали за допомогою ВЕРХ-МС [30].

Запропоновано методики для моніторингу пропіконазолу ((+/-)-1-[2-(2,4-дихлорфеніл)-4-пропіл-1,3-диоксолан-2-ілметил]-1*H*-1,2,4-тріазолу) та 1,2,4-тріазолу (продукт деградації фунгіцидів) в ґрунті за допомогою ВЕРХ-МС/МС [31].

Циклогекс-3-еніл(5-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)метанол (MSDRT 12) – це нова протитуберкульозна сполука з двома хіральними центрами. Встановлено, що серед чотирьох стереоізомера тільки один ізомер мав найбільшу активність. Інші ізомери були неактивні, або мали незначну активність. Методика дозволяла визначати як основний ізомер, так і домішкові ізомери. Використано колонку на основі полісахариду, Chiralpak ID з амілозним трис(3-хлорфенілкарбаматом) як хіральний селектор. Поділ проводили із застосуванням суміші н-гексану, ізопропілового спирту, етанолу та діетиламіну (60:35:5:0,1 об./об./об.) зі швидкістю потоку 1 мл/хв [32].

Нові похідні N-заміщених амідів 3-(3-етилтіо-1,2,4-тріазол-5-іл)пропенової кислоти, які володіють протипухлинною активністю, досліджували за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою та тонкошарової хроматографії з використанням RP-18 як стаціонарної фази та суміші метанолу, води та амонійного буфера як рухомої фази. На основі зв'язку між коефіцієнтами утримування ($\log k$ та R_M) та концентрацією органічного модифікатора у воді методом екстраполяції були отримані хроматографічні параметри ліпофільності. Параметри ліпофільності експериментально визначали із застосуванням семи стандартних розчинених речовин із відомими значеннями $\log P_{ow}$, які аналізували за таких же хроматографічних умов, що і тестовані сполуки [33].

Запропоновано ВЕРХ методику визначення в крові та еритроцитах хворих на гепатит С. Білки осаджували за допомогою ацетонітрилу [34].

Проведено розділення до базової лінії енантіомерів пропіконазолу на колонці OD-H з н-гексан – етанолом (95:5, об./об.) як елюенту при швидкості потоку 0,6 мл хв⁻¹ з УФ-детектуванням при 220 нм і температурі 25° С [35].

Розроблено методику визначення малатіону, діазінону, імідаклоприду та 1,2,4-тріазольного фунгіциду триадимефону (1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1*H*-1,2,4-тріазол-1-іл) бутан-2-ону), що основана на он-лайн рідино-рідиній екстракції в шприці для видалення цукрів в поєднанні із системою ВЕРХ-МС/МС [36].

Визначення пенконазолу (1-[2-(2,4-дихлорфеніл) пентил] 1,2,4-тріазолу) проводили в плодах персика, сливи, абрикоса та манго, при підготовці зразків за допомогою QuEChERS та високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним детектором [37].

Розроблена процедура визначення наступних тіоамідів на основі тіазолу, 1,3,4-тіадіазолу, 1,2,4-тріазолу та тетразолу: 2-меркаптотіазолу, 2-меркапто-1,3,4-тіадіазолу, 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тіадіазолу, 3-меркапто-1,2,4-тріазолу, 3-меркапто-4-метил-1,2,4-тріазолу та 5-меркапто-1-метилтетразолу. Визначення проводили за допомогою ВЕРХ на колонці (150 × 4 мм), упакованій Diaspher-110-C18 (5 мкм), використовуючи елюцію сумішшю ацетонітрил-ацетатного буферного розчину (рН 4,70) (5:95) [38].

Проведено дослідження стресової деградації рибавіріну (1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-дигідрокси-5-(гідроксиметил)оксолан-2-іл]-1*H*-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід) на основі рідинної хроматографії високого тиску з діодно-матричним детектором. Хроматографічне розділення було досягнуто за допомогою CPS Hypersil ціанової колонки (4,6 x 250 мм, розмір частинок 5 мм) з ізократичною елюцією рухомою фазою, яка складалася з 50 мМ фосфатного буфера, регульованого при рН 4 фосфатною кислотою. Швидкість потоку 0,8 мл/хв [39].

Розроблена спектрофлуориметрична та ВЕРХ методики визначення рибавіріну. Методики базувались на реакції 5'-гідроксильної групи цукрової частини в рибавіріні з дансилхлоридом у розчині бікарбонату (рН 10,5) з утворенням флуоресцентного похідного. Перший метод базувався на

вимірюванні флуоресценції похідного в дихлорметані при 529 нм (збудження при 382 нм). Другою методикою було ВЕРХ визначення похідного на колонці С18 з детектуванням за допомогою флуоресцентного детектора [40].

Використано силікагель, модифікований наночастинками золота, стабілізований хітозаном в нормальнофазової ВЕРХ для розділення похідних аніліну та піридину, а також фунгіцидів 1,2,4-тіазолу шляхом елюції сумішами гексану з ізопропіловим спиртом, ізобутанолом, або хлороформом [41].

Розроблено методику одночасного визначення флуконазолу та тинідазолу в комбінованих фармацевтичних лікарських формах на основі міцелярної високоефективної рідинної хроматографії [42].

Електрохімічне перетворення дифеноконазолу (3-хлор-4-((2RS,4RS,2RS,4SR)-4-метил-2-(1*H*-1,2,4-триазол-1-ілметил)-1,3-діоксолан-2-іл)феніл-4-хлор-феніловий ефір) вивчали за допомогою ВЕРХ-ЕСІ-МС/МС [43].

Описано ВЕРХ методику для кількісного визначення флуконазолу в плазмі людини. Вона включала одноступеневу рідинно-рідинну екстракцію з використанням дихлорметану. Тинідазол використовували як внутрішній стандарт. Розділення було проведено з використанням С-18 колонки з УФ-детектором при 260 нм. Рухома фаза включала буфер-ацетонітрил (80:20, об./об.), доведений до рН 5,0 за допомогою ацетатної кислоти [44].

Три препарати, що уводяться одночасно проти вірусу гепатиту С: рибавірин (похідне 1,2,4-тріазолу), софосбувір, даклатасвір, одночасно визначали в плазмі людини за допомогою ВЕРХ, використовуючи пропілпарабен як внутрішній стандарт. Для екстракції зразків використовували рідинно-рідинну екстракцію етилацетатом. Хроматографічне розділення було досягнуто на колонці Scharlau® С18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Застосовували градієнтну елюцію сумішшю рухомої фази води та ацетонітрилу зі швидкістю потоку 1 мл / хв [45].

Розроблено НІЛІС методику для кількісного визначення слідових кількостей 1,2,4-тріазолу та 4-аміно-1,2,4-тріазолу в лікарській речовині флуконазолу. Розділення проводили на колонці НІЛІС, використовуючи

ізократичне елюювання сумішшю води, ацетонітрилу та фосфатної кислоти та УФ-детектуванням при 205 нм [46].

Нові похідні 1,2,4-тріазолу та тіосемікарбазиду аналізували за допомогою ОФ-ТШХ та ОФ-ВЕРХ із застосуванням адсорбентів октадецилкремнезему та водно-органічних рухомих фаз з метою оцінки придатності тонкошарової хроматографії як пілотного методу для розробки ВЕРХ методики. Органічні модифікатори – метанол та ацетонітрил, використовували у відповідних концентраціях, забезпечуючи оптимальні коефіцієнти утримування [47].

Розроблено методику кількісного визначення тріазопразолу (4-метоксианілід 5-(4-метилфеніламінометил-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-4*H*-3-ілтіогліколева кислота) в субстанції за допомогою ВЕРХ. Використано рідинно-хроматографічну систему Agilent 1290 Infinity із діодно-матричним детектором (LC 1290) і тандемним мас-спектрометричним детектором квадруполь-часо-пролітним (QTOF 6530) [48].

У роботі [49] проведено оцінку ліпофільності нещодавно синтезованих тіосемікарбазидів та їх циклічних аналогів – 1,2,4-тріазол-3-тіонів. Попередні дослідження показали, що ці сполуки мають антибактеріальну активність. Хроматографічну поведінку аналізованих сполук вивчали за допомогою ОФ-ВЕРХ та ОФ-ТШХ. Водні рухомі фази, що містять метанол, використовували для визначення R_M та $\log k$ аналізованих сполук. Параметри ліпофільності були отримані шляхом лінійної екстраполяції, їх порівнювали з розрахунковим $\log P$, отриманим за допомогою кілька програмних пакетів.

Метод ВЕРХ використано для аналізу основного інгредієнта – 1-метил-3,5-динітро-1*H*-1,2,4-тріазолу та основної домішки – 1-метил-3-нітро-1*H*-1,2,4-тріазол-5-аміну. Метод проводили на колонці SinoChrom ODS-BP (4,6 × 200 мм, 5 мкм), використовуючи рухому фазу метанол – вода (90/10, об./об.) зі швидкістю потоку 1,0 мл хв⁻¹. Речовину 1-метил-3,5-динітро-1*H*-1,2,4-тріазол визначали за допомогою УФ-видимого детектора при 240 нм [50].

Автори [51] розробили методику визначення 5-(3-хлорфеніл)-4-гексил-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону, протиепілептичної сполуки, в гомогенаті

тканини мозку мишей шляхом мікрохвильової екстракції та високоефективної рідинної хроматографії з флуоресцентною детекцією за допомогою зовнішнього стандарту. Аналіз проводили на колонці C18 з використанням рухомої фази, що складалася з 60% ацетонітрилу у воді. Детектування флуоресценції проводили при довжині хвилі збудження 263 нм та довжині хвилі випромінювання 411 нм.

Розроблено ОФ-ВЕРХ методику визначення 1-(4-гідрозинофеніл) метил-1,2,4-тріазолу дигідрохлориду, якій є напівпродуктом в синтезі різотриптану (*N,N*-диметил-2-[5-(1*H*-1,2,4-тріазол-1-ілметил)-1*H*-індол-3-іл]етанаміна).

Показано відокремлення продуктів деградації від 1-(4-гідрозинофеніл) метил-1,2,4-тріазолу дигідрохлориду. Розділення досягнуто на колонці Kinetex 1,7 ХВ-С 18 (50 x 2,1 мм), 100 А. Розділення проводили в градієнті рухомої фази А – 0,01 М калій дигідрофосфату (рН 4,5 за допомогою фосфатної кислоти) та рухомої фази В – ацетонітрил та метанол у співвідношенні 80:20 [52].

Існує багато робіт, де чистоту та підтвердження молекулярної маси похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу визначали за допомогою ВЕРХ-МС [53-67].

Автори [68] визначали 5-аміно-3-метилтіо-1,2,4-тріазол, напівпродукт в синтезі противірусного препарату тріазавірін. Застосовано колонку Kromasil 100-5 С 18, 250 x 4,6 мм, 5 мкм розмір часток сорбенту, елюент 18% суміші ацетонітрил – метанол у співвідношенні 1:1 за об'ємом – 82% 0,03 М водного розчину натрій ацетату, діодно-матричний детектор, довжина хвилі 215 нм.

Досліджено утримування похідних 1,2,4-тріазину і 1,2,4-тріазолу із водноацетонітрильних розчинів на октадецилсилікагелі, полістиролі і пористому графітованому вуглеці [69]. Вивчено вплив концентрації ацетонітрилу в елюенті на утримування досліджуваних сполук на різних сорбентах.

Розроблено ВЕРХ методику визначення 5-метил-6-нітро-7-оксо-1,2,4-тріазоло[1,5-а]піримідиніда 1-аргінінія моногідрату, діючої речовини лікарського препарату тріазид [70]. Визначення проводили на октадецилсілановій фазі 100-5-С18 (ЕКА, Швеція) довжиною 250 мм,

внутрішнім діаметром – 4,6 мм, розмір часток сорбенту 5 мкм. Елюент складався із ацетонітрилу та буферного розчину 0,04 М L-аргінін ацетату в співвідношенні 8:92.

Monika Pitucha et al. провели ВЕРХ дослідження утримування семікарбазидів та їх циклічних аналогів 1,2,4-тріазол-3-онів, на сорбентах С-8, С-18 та іммобілізованої штучної мембрані [71].

В роботі [72] визначали ліпофільність 1,2,4-тріазолів за допомогою ВЕРХ-методики.

1,2,4-Тріазоли є частими забруднювачами підземних вод. Вони можуть потрапляти в навколишнє середовище, тому що є продуктами деградації кількох фунгіцидів, які зазвичай використовувались у сільському господарстві, а також у фарбах, що зберігають деревину. Дослідники [73] пропонували методику визначення 1,2,4-тріазолів за допомогою ТФЕ-ВЕРХ-МС/МС на картриджах ENVI-Carb Plus від Supelco із ступенем вилучення близько 100% та межею кількісного визначення близько 0,003 мкг/л.

В дослідженні [74] показано вплив структури 1,2,4-тріазолів при їх адсорбції на графітованому вуглеці – гіперкарбі.

Авторами [75] запропоновано методику розділення таутомерів 1,2,4-тріазол-3-тіону та 3-тіолу за допомогою двох мас-спектрометрів з високою роздільною здатністю. Вона включає високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) із іонізацією в електроспрей – (ESI) – часо-прольотну мас-спектрометрію (ESI-TOF-MS, режим позитивних іонів) з подальшою дисоціацією, зумовленою зіткненням (CID), і низькоенергетичною CID-тандемною мас-спектрометрією (MS/MS) аналіз, вимірний за допомогою приладу Q-TOF-MS.

Науковці із Сіаню (Китай) використовували ВЕРХ для визначення чистоти 3-аміно-1,2,4-тріазолу [76]. Хроматографічні умови: Waters T₃ хроматографічна колонка (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм) і рухома фаза метанол:вода (0,02 моль/л розчин калій дигідроген фосфату) = 20:80 (об./об.), з довжиною хвилі детектора 214 нм, швидкість потоку 0,8 мл/хв. Метод точний, простий і

відтворюваний. Методика підходить для контролю якості 3-аміно-1,2,4-тріазолу в промисловому виробництві.

1.3 Існуючі методики аналізу досліджуваних речовин

Такі нові препарати, як тіометризол, авесстим, тріфузол (похідні 3-тіо-1,2,4-тріазолу), створені школами дослідників в Запорізькому державному медичному університеті, в першу чергу звернули на себе увагу в плані вивчення наявних аналітичних методик визначення даних речовин з метою обґрунтування створення асортименту аналітичних методик, які в більшому ступені задовольняють потреби по впровадженню вказаних препаратів в фармацевтичну та ветеринарну практику.

1.3.1 Відомі методики аналізу морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Для якісного визначення морфоліну в АФІ тіометризолу субстанцію розчиняли у воді, нагрівали над полум'ям газового пальника до кипіння. Вологий червоний лакмусовий папір, піднесений до отвору пробірки, синів. Для визначення Сульфуріуму проводили подальше нагрівання. Папір, змочений розчином плюмбум ацетату, бурів. Для якісного визначення 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетатної кислоти проводили реакцію із диметиламінобензальдегідом та сумішшю ацетатного ангідриду та ацетатної кислоти, з'являлось яскраво-сунічне забарвлення. В реакції з розчином купрум (II) сульфата з'являвся осад світло блакитного кольору, із розчином ферум (III) хлориду з'являвся осад жовтоватого кольору, в реакції із реактивом Бушарда випадав осад коричневого кольору. Дані способи тривалі та малоспецифічні [1].

При кількісному визначенні АФІ та сукупної домішки в субстанції використовували високоефективну рідинно-хроматографічну систему. Спосіб дозволяє визначати тільки одну домішку – 4-(2-етоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон в даній субстанції, має невисоку чутливість, неселективний, тривалий, не дозволяє визначати усі потенційні домішки [1].

Для визначення АФІ тіометризолу в 1% та 2,5% водних розчинах, як розчинниках, використана спектрофотометрія в УФ області спектру при 275 нм. Методика характеризується низькою чутливістю та малою специфічністю.

Також запропонована методика визначення АФІ тіометризолу в субстанції за допомогою потенціометричного титрування хлорною кислотою. Методика точна, але не дозволяє визначати домішки і використовується тільки для субстанції. Запропонована методика якісного визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату (АФІ тіометризолу) та можливих домішок хромато-мас-спектрометричним методом. Після перекристалізації для морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату зняті хромато-мас-спектри. Хромато-мас-спектри знімали на високоефективному рідинному хроматографі, оснащеному діодно-матричним та мас-селективним детектором. Методика чутлива та селективна, але використана тільки для якісного випробування [77-78].

Раніше було проведено дослідження фармакокінетики тіометризолу при внутрішньовенному уведенні на кролях за допомогою спектрофотометрії в УФ-області [79], але цей метод є неселективним, малочутливим і не дозволяє зробити правильний висновок про концентрацію речовини в певний момент часу.

1.3.2 Відомі методики аналізу морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату. Якісний аналіз препарату авесстим проводили за допомогою червоного лакмусового паперу: розчин авесстиму поміщали у пробірку і нагрівали над полум'ям газового пальника до кипіння, вологий червоний лакмусовий папір, піднесений до отвору пробірки, синів (морфолін). При подальшому нагріванні папірець, змочений розчином плюмбум ацетату, піднесений до отвору пробірки, бурів (Сульфур). Розчин авесстиму поміщали в пробірку, додавали диметиламінобензальдегід, суміш ацетатний ангідрид – ацетатна кислота, нагрівали при слабкому кипінні на полум'ї пальника, розчин забарвлювався в оранжево-коричневий колір (5-(4-піридил)-1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатна кислота). Кількісне визначення АФІ

авесстиму в 1% ін'єкційному розчині проводили спектрофотометрично. Ця методика оснований на максимальному поглинанні розчину при довжині хвилі 226 нм. Методика є неспецифічною, малочутливою, не дозволяє визначати домішки до АФІ авесстиму [80].

Визначення залишкових кількостей активно діючої речовини препарату авесстим у сироватці крові, м'ясі та органах птиці виконували за допомогою УФ-спектрофотометрії при довжині хвилі 281 нм. Як встановлено авторами, сироватка крові не поглинає світло за цієї довжини хвилі. Екстракцію із м'яса та органів птиці проводили за допомогою методу Крамаренко В. Ф. Цей спосіб має низьку чутливість та є малоселективним [81].

Проведено дослідження фармакокінетики твердих капсул з морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетатом за допомогою спектрофотометрії [82]. Методика має низьку селективність.

1.3.3 Відомі методики аналізу піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Розроблені методики якісного та кількісного визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ Тріфузолу) в 1% та 2,5% розчинах. Для проведення якісного визначення використовувались наступні хімічні реагенти: 10% розчин купрум сульфату, льодяна ацетатна кислота, набір загально алкалоїдних реактивів. Методики трудомісткі, тривалі, малоселективні. Для кількісного визначення вказаної сполуки було застосовано її здатність поглинати світло в УФ області спектру. Максимум поглинання водних розчинів дорівнює 280 нм. Для проведення кількісного визначення як розчинник було використано воду дистильовану. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометру в ультрафіолетовій області спектру з використанням прямокутних кварцевих кювет. Методика має низьку чутливість, характеризується низькою селективністю [83].

Також існує методика визначення піперидиний піперидинію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції. Вона заснована на потенціометричному титруванні сполуки за допомогою розчину хлорної

кислоти. Вказані методики не дозволяють визначити АФІ тріфузолу в біологічних рідинах, а також технологічні домішки [84].

Відомі спектрофотометричні методики визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у ветеринарних супозиторіях та в ін'єкційному розчині, але вони є малоселективними [85-86].

1.4 Підходи до оптимізації умов ВЕРХ-МС експерименту

Математичні методи планування експерименту

Огляд математичних методів планування експерименту опублікований в роботі [87]. Існує 2 основних підходи до проведення оптимізації: 1) класичний підхід почергового дослідження кожного фактора; 2) математичні методи багатфакторного аналізу.

У хроматографії методи оптимізації та планування експерименту використовують для вирішення безлічі завдань.

По-перше, вивчення впливу різних факторів на аналітичний сигнал для того, щоб виявити найбільш значущі. У такому випадку застосовується факторні плани або планування Плакета-Бурмана [88]. По-друге, пошук умов виконання методики, найкращих з точки зору правильності, відтворюваності, чутливості або який-небудь іншої аналітичної характеристики. Для цього може бути використаний симплекс-оптимізація [88]. По-третє, оптимізація складу рухомих і нерухомих фаз. Можна застосувати планування для сумішей або центральний композиційний план [88].

Стадії експерименту у ВЕРХ-МС

У хромато-мас-спектрометрії можна виділити чотири стадії проведення експерименту (рис. 1.2).



Рис. 1.2. Стадії проведення експерименту в хромато-мас-спектрометрії

Фактори оптимізації

Фактори оптимізації у ВЕРХ -МС можна розділити на 3 групи (рис. 1.3).

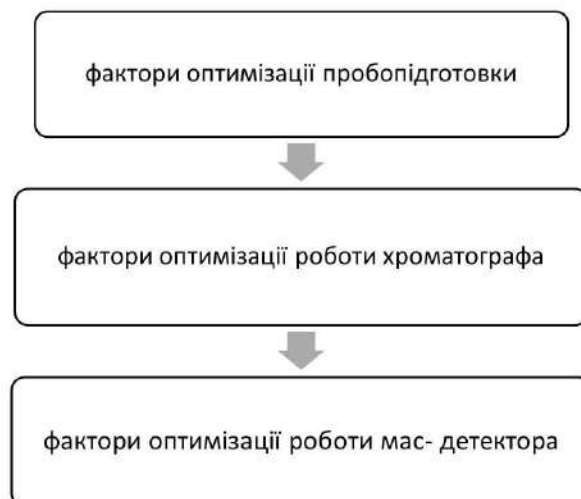


Рис. 1.3. Фактори оптимізації в ВЕРХ-МС

Оптимізація пробопідготовки (ТФЕ) складається із 4-х етапів (рис. 1.4).

Оптимізація роботи мас-детектора складається із п'яти напрямків (рис. 1.5).



Рис. 1.4. Оптимізація пробопідготовки (ТФЕ)



Рис. 1.5. Оптимізація роботи мас-детектора

Оптимізація хроматографічних умов складається із 5 найважливіх пунктів (рис. 1.6).

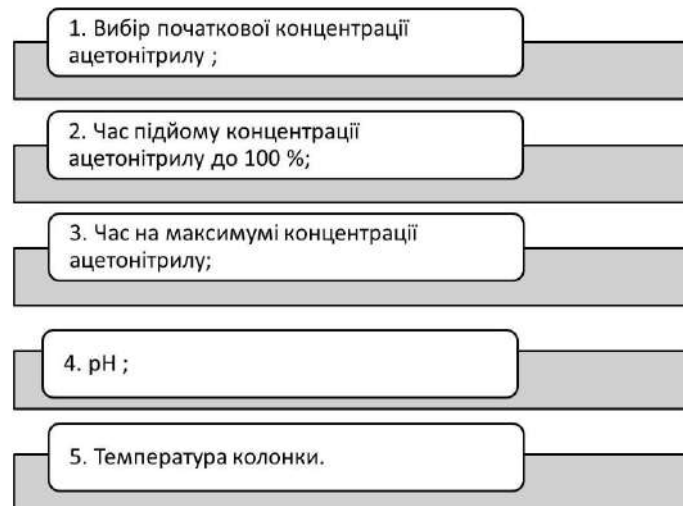


Рис. 1.6. Оптимізація хроматографічних умов

Параметри оптимізації

Параметрами оптимізації можуть бути:

- ступінь вилучення;
- відношення сигнал/шум;
- загальний час аналізу;
- час утримування та інші параметри утримування;
- величина площі піка основного компонента;
- кількість розділених компонентів;
- чутливість (вона пов'язана з площею піка);
- відтворюваність;
- правильність;
- робастність.

Оптимізація послідовно по кожному фактору

У ранніх дослідженнях і в теперешній час все ще використовується підхід, коли вибирається кожен чинник окремо і проводиться дослідження щодо впливу його на критерії оптимізації.

Багатофакторні математичні методи

У сучасній літературі все частіше зустрічається підхід з використанням хемометричних методів оптимізації – багатофакторних математичних методів. У монографії [88] описані методи, засновані на одночасному дослідженні впливу декількох факторів на функцію відгуку.

Вибір моделей

Важливим етапом в плануванні експерименту є вибір моделі залежності відгуку від факторів. Процес вибірання моделі полягає в тому, що треба вибрати вид функції, записати її рівняння. Потім треба запланувати та провести експеримент для визначення чисельних значень коефіцієнтів рівняння:

$$y = f(x_1, x_2, x_3 \dots, x_n)$$

Наступним етапом є проведення регресійного аналізу функцій відгуку, а саме визначення рівняння регресії, що емпірично описує досліджувані процеси:

$$y = f(x_1, \dots, x_n; a_1, \dots, a_m) + \varepsilon,$$

де a_1, \dots, a_m - деякі коефіцієнти;

ε – похибка.

Планування експерименту залежить від рішення 4 завдань (рис. 1.7).



Рис. 1.7. Етапи створення та використання моделі

Графічне відображення залежності функції відгуку від x_1, x_2, \dots, x_n називається поверхнею відгуку. Коли треба визначити вплив лише одного фактора x , знаходження функції відгуку дуже проста задача. При цьому необхідно провести декілька дослідів, в яких змінюється x , визначити відповідні значення функції, створити графік $y = f(x)$.

Використовуючи графік, можна підібрати математичний вираз функції відгуку. Необхідно оцінити відтворюваність дослідів, повторюючи їх кілька разів, і отримати залежність з урахуванням розкиду дослідних даних.

Практично не можливо розв'язати це завдання при трьох і більше факторах. Знайдені рішення у вигляді сукупності виразів використовувати практично неможливо.

Деяку функцію можливо розкласти у степінний ряд у вигляді полінома, який можливо використовувати при ускладненому пошуку математичного вигляда функції

$$y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n + a_{12}x_1x_2 + \dots + a_{n-1}x_{n-1}x_n + a_{11}x_{12} + \dots + a_{nn}x_{n2} + \dots$$

Степінний вид полінома може бути записаний у наступному вигляді:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{\substack{i=1, \dots, n-1 \\ j=i, \dots, n}} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i=1, \dots, n-2 \\ j=i, \dots, n-2 \\ k=j, \dots, n}} a_{ijk} x_i x_j x_k + \sum_{i=1}^n a_{iii} x_i^3 \dots$$

Експеримент потрібен для визначення коефіцієнтів полінома. При плануванні експериментів необхідно визначити число дослідів. При збільшенні числа коефіцієнтів збільшується кількість дослідів. Плануючи експерименти, треба мінімізувати число цих дослідів. Ми шукаємо такий поліном, який містить як найменше коефіцієнтів, але задовольняє вимогам, що пред'являються до моделі.

Найменше число коефіцієнтів належить поліномам першого ступеня. За допомогою цих поліномів можливо передбачення напрямку найшвидшого поліпшення параметра оптимізації.

Але поліноми першого ступеня незадовільно описують область, близьку до оптимуму. Тому планування експерименту можливо розділити на 2 стадії: на першій стадії дослідження використовують поліноми першого ступеня, і коли вони стануть неефективними, переходять до поліномів більш високих ступенів.

Факторний експеримент

Факторні плани одні з найпростіших, зазвичай використовуються для відсіювання великого числа можливих факторів. Вони мають обмеження, однак легкі для розуміння.

Повний факторний експеримент для 2-х рівнів зазвичай використовується для відсіювання, тобто для визначення впливу численних ефектів на відгук, і для виключення малозначних чинників, наступна стадія полягає в більш детальному дослідженні.

Кількість дослідів у повному факторному експерименті значно перевищує число визначуваних лінійних коефіцієнтів. Враховуючи, що найбільшу значимість зазвичай мають лінійні коефіцієнти, а коефіцієнти взаємодій, починаючи з потрійних і вище, часто не значимі, виходить, що повний факторний експеримент володіє надмірністю дослідів. Було б привабливим скоротити число дослідів за рахунок тієї інформації, яка не дуже істотна при побудові лінійних моделей. Тому існують методи, які дозволяють скоротити число дослідів [89]. Для цього використовують *дробовий факторний експеримент*, плани Плакетт-Бурмана і планування Тагучі, калібрувальні плани. Серед методів математичного планування також використовуються центральне композиційне планування чи планування поверхонь відгуку, плани сумішей, симплекс-оптимізація [88].

В оглядових статтях [90, 91] описані математичні методи аналізу факторів, що впливають на хроматографічні параметри. В роботі [90] розглянуто методи, основані на вивченні поверхні відгуку: центральне композиційне планування, матриця Дехлера, дизайн Бокс-Бенкена. Ці методи обговорені і розглянуто їх застосування для оптимізації пробопідготовки (екстракції) і визначення експериментальних умов хроматографічного розділення. Показано використання оптимізація складу сумішей для оптимізації рухливих фаз. Автори детально описали реальний приклад оптимізації поділу. Обговорено валідацію отриманої моделі. Розглянуто додатки інших багатфакторних методів для оптимізації хроматографічних методик.

D. Brynn Hibbert [91] ретельно вивчав методи планування експерименту в хроматографічних методах аналізу. Показано застосування методу Плакетт-Бурмана, дробові факторні експерименти і центральні композиційні плани. Розглянуто планування Боксу-Бенкена, планування Дехлера, D-оптимальне

планування. Обговорено приклади використання методів експериментального дизайну в хроматографії. Наведено рекомендації щодо публікації звіту про застосування методів експериментального дизайну в літературі. У даній роботі обговорюється порівняння методів експериментального дизайну і методів, заснованих на дослідженні кожного фактора по черзі. У випадку методу дослідження кожного фактора по черзі немає впевненості, що буде досягнутий оптимум умов розділення і визначення. Однак у разі використання центрального композиційного планування, інформація про поверхні відгуку буде більше ніж у спрощеному випадку.

Шлементьева зі співавторами описала оптимізацію умов пробопідготовки. Як функцію відгуку було обрано концентрацію фолієвої кислоти. Пошук оптимуму функції проводили за методом крутого сходження. Дослідження поверхні відгуку проводили з використанням центрального ортогонального композиційного планування. Після перевірки значущості коефіцієнтів за критерієм Стюдента та адекватності моделі за критерієм Фішера, отримано рівняння регресії. Як чинників оптимізації були обрані: концентрація хлороводневої кислоти, обсяг хлороводневої кислоти, температура УЗ ванни, час УЗ обробки [92].

У роботі [93] при розробці ВЕРХ-УФ і ВЕРХ-МС методики визначення торасеміду і його домішок був використаний дробовий факторний 2^{4-1} і повний факторний 3^2 плани експерименту для оптимізації хроматографічних умов поділу. Оптимізувалася концентрація ацетонітрилу, рН розчину, температура колонки і концентрація буфера. Коефіцієнти ємності сполук використовувалися в якості відгуку. Оптимізація МС умов проводилася за допомогою проточно-інжекційного аналізу, простим почерговим варіюванням факторів. Валідацію було проведено згідно з інструкцією ІСН [94].

Chang-Ping Jia and Fang Feng [95] провели оптимізацію розділення і визначення алкалоїдів нітідіна і хелерітріна в *Zanthoxylum nitidum* за допомогою ВЕРХ з Бокс-Бенкен планування по поверхнях відгуку. Вибирали концентрацію іон-парного реагенту, склад рухомої фази, рН буфера. Згідно з

планом провели 17 експериментів. Отримали поліном другого порядку і на його основі передбачили оптимальні умови поділу.

Ana V. Varanda з співавторами [96] провели оптимізацію ВЕРХ з діодно-матричним детектированием умов поділу 5 блокторів кальцієвих каналів з використанням дрібного факторного експериментального плану, центрального композиційного планування та мультисілексної оптимізації. Варіювали концентрацію ацетонітрилу, рН, концентрацію буфера і температуру колонки. У підсумку отримали оптимальний поділ 5 компонентів при мінімальному часі аналізу. Як відгук використовували ступінь поділу двох піків.

Стаття авторів V. Houbart та інших розповідає про вивчення хроматографічної поведінки 9 пептидів. По-перше, на підставі скрінінгового плану було визначено вплив важливих факторів, таких як природа та концентрація іон-парного реагенту, співвідношення органічного модифікатора на характеристики утримування та інтенсивність відгуку (чутливість). Потім, після визначення важливих факторів, був використаний повний факторний план для подальшого визначення впливу факторів на відгук. Оптимальні умови, які приводять до гарної чутливості та адекватного утримування пептидів без наложення піків [97].

Колектив дослідників [98] використовував центральне композиційне планування для визначення впливу хроматографічних факторів на розділення праміпексолу та його домішок. Були визначені важливі фактори, впливаючі на утримування. Такі фактори, як вміст ацетонітрилу, триетіламіну, рН мають суттєвий вплив. Використовуючи математичну модель, можливо передбачити утримування при різних умовах.

V. Narang зі співавторами [99] оптимізували ВЕРХ методику розділення 6 похідних піперідину на підставі математичного планування експерименту і симуляції хроматограм. Як наслідок оптимізації 6 піків було поділено протягом 11 хв. Булі досліджені наступні фактори: кількість ацетонітрилу в рухомій фазі, концентрація фосфатного буферу, концентрація октансульфоната в рухомій фазі.

Чітку послідовність дій при оптимізації ВЕРХ методики розділення та визначення моксіфлоксацина і кеторолака трометаміна запропонували автори [100]. Математичне планування було використано для багатофакторної оптимізації експериментальних умов. По-перше, треба визначити цілі оптимізації, а саме що рутинна методика повинна бути експресною, точною та специфічною. По-друге, треба оцінити критичні фактори, які впливають на критерії, такі як розділення, час аналізу, асиметрія піків тощо. По-третє, треба створити експериментальний план та математичну модель, що показує залежність між факторами та відгуком. В цій праці важливі хроматографічні фактори були відібрані на підставі попередніх експериментів та аналізу літератури. Оптимізацію на підставі цих факторів було проведено з використанням центрального композиційного плану. Три незалежних фактора: вміст метанолу в рухомій фазі, рН буферного розчину, швидкість потоку були застосовані для створення математичних моделей. Поверхності відгуку та глибину впливу цих незалежних факторів було досліджено за допомогою лицевого композиційного плану. Функція бажаності Дерінжера була застосована для одночасного оптимізування часу утримування останнього піку елюювання (кеторолак трометамін) та фактору асиметрії моксіфлоксацину. Було запропоновано розраховані оптимальні умови визначення. При оптимальних умовах обидві речовини було розділено менш ніж за 7 хв. Оптимізовані умови розділення було валідовано згідно інструкції ІСН [94] з метою підтвердження специфчності, лінійності, точності та прецизійності. Таким чином, існує багато прикладів використання математичних методів планування експерименту при визначенні оптимальних умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС (табл. 1.1).

В теперішній час дослідники приділяють все більше уваги багатофакторній оптимізації на відміну від вивчення зміни кожного фактору при постійних значеннях інших факторів.

**Приклади використання математичних методів планування та обробки
результатів експерименту в ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС**

Аналіти	Зразки	Математичний метод	Техніка	Поси- лання
1	2	3	4	5
Фолієва кислота	БАД, харчові продукти, премікси	центрального ортогонального композиційного планування з використанням методу крутого сходження	пробо- підготовка	[50]
Торасемід і його домішки	таблетки	дробовий факторний і повний факторний плани	ВЕРХ -УФ і ВЕРХ -МС	[51]
Нітідін і хелерітрін	трава	бокс-Бенкен планування по поверхнях відгуку	ВЕРХ-ФД	[53]
5 Блокаторів кальцієвих каналів (похідних 1,4-дігідропірідину)	плазма	дробовий факторний експериментальний план, центральне композиційне планування	ВЕРХ-ДМД	[54]
9 Пептидів	розчин стандартів	повний факторний план	ВЕРХ-МС/МС	[55]

1	2	3	4	5
Праміпексол та його домішки	розчин стандартів	центральне композиційне планування	ВЕРХ -УФ	[56]
6 Похідних піперідину	розчин стандартів	центральне композиційне лицеве планування	ВЕРХ-УФ	[57]
Моксіфлоксацин та кеторолак трометамін	очні краплі	лицьовій композиційний план	ВЕРХ-УФ	[58]

Огляд підходів до оптимізації умов мас-спектрометричної детекції

Існує велика кількість робіт, присвячених розробці ВЕРХ-МС методик на одноквадрупольних приладах [101-105], вони пропонують оптимальні умови ЕСІ-МС. Так, наприклад, в роботі [101] було використано ВЕРХ МС систему Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Germany) з одноквадрупольним мас-спектрометричним детектором (G1946D) з іонізацією в електроспреї. L. M. Mallis зі співавторми [102] при створенні системи відкритого доступу для визначення субстанцій лікарських речовин виконували дослідження за допомогою ВЕРХ МС системи Waters (Micromass) з Z-спрей іонізацією електророспиленням. Zakia Benayad зі співавторами при визначенні флавоноїдних глікозидів використовували наступне обладнання: ВЕРХ – Waters 717, МС – Waters 600 controllers, Hewlett-Packard series 1100 MSD, Agilent Technologies, Aldbronn, Germany [103]. Hong-Fei Duana та інші при визначенні цефкапенової кислоти в плазмі крові при фармакокінетичних дослідженнях застосували Agilent series 1100 LC/MSD VL з одноквадрупольним мас-спектрометричним детектором із іонізацією в електроспреї (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) [104]. Робота Lingjun Li та інших присвячена

визначенню дексаметазон ацетату в шкірі мишей, при цьому автори застосували Shimadzu ВЕРХ-МС систему з Shimadzu 2010EV одноквадрупольним мас-спектрометром з інтерфейсом електророспилення [105].

Використання методу ВЕРХ-МС є предметом багатьох робіт, в яких наводяться умови мас-спектрометричного детектування [106-114], але в літературі не знайдено застосування поліноміальних моделей для вибору електророзпилювальної іонізації для мас-спектрометричного детектування. У багатьох роботах використовуються математичні методи оптимізації хроматографічних умов, це відображено в огляді [87], проте в галузі вибору умов мас-спектрометричного детектування такі методи застосовуються недостатньо.

Огляд підходів до оптимізації хроматографічного розділення

Необхідною вимогою розробки методик високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовою та мас-спектрометричною детекцією (ВЕРХ-УФ та ВЕРХ-МС) є оптимізація хроматографічного розділення.

Існує багато робіт, в яких досліджувалося утримування різних сполук від структури сорбатів та від властивостей сорбатів. Лінійну залежність між логарифмами коефіцієнтів розподілу та коефіцієнта ємності можна знайти в монографії [125]:

$$\lg k = a + \text{Log}P_{ij} ,$$

де P_{ij} – коефіцієнт розподілу речовин між фазами i та j .

Наприклад, це може бути коефіцієнт розподілу між октанолом та водою:

$$\text{Log}P_{\text{октанол} / \text{вода}} = \log \frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніз}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніз}}}$$

Ряд публікацій присвячено дослідженню взаємозв'язку між характеристиками утримування та коефіцієнтами розподілу, які найчастіше

використовують для визначення характеристик ліпофільності із результатів утримування в обернено-фазовій ВЕРХ (ОФ ВЕРХ) [115-124]. Авторами [123] наведено дані щодо визначення ліпофільності нових тіосемікарбазидів та похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів на підставі результатів ОФ ВЕРХ та теоретичних розрахунків.

F. Lombardo із співавторами [124] досліджували залежності утримування та LogD (1.3) щодо іоногенних сполук.

$$\text{LogD}_{\text{октанол/вода}} = \log \frac{[\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{іоніз}} + [\text{сполука}]_{\text{октанол}}^{\text{неіоніз}}}{[\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{іоніз}} + [\text{сполука}]_{\text{вода}}^{\text{неіоніз}}}$$

Визначені залежності в більшості робіт пропонується використовувати для експериментального розрахунку LogP , LogD , які є важливими показниками при вивченні ADME.

Утримування сполук також залежить від властивостей рухомої фази, зокрема від концентрації органічного модифікатора. Так існує лінійна залежність між логарифмом коефіцієнта ємності та вмістом органічного розчинника [125]:

$$\lg k = a - b \cdot \%B,$$

де $\%B$ - процентний вміст органічного модифікатора,

a та b – константи.

Існує декілька робіт, які наводять результати досліджень залежності утримування від вмісту ацетонітрилу [126-128].

Температура є додатковим фактором щодо керування утримуванням у високоефективній рідинній хроматографії. Відомо, що існує максимальний тиск, при якому може працювати хроматографічна система. Підвищена температура знижує в'язкість елюенту, тому знижується тиск в колонці. За рахунок підвищеної температури вода краще розчиняє неполярні сполуки, тому що знижується діелектрична константа середовища. При зміні температури

може значно змінюватись селективність хроматографічної системи. Термостатування колонки дозволяє уникнути коливання утримування при зміні кімнатної температури [129]. На підставі визначення залежності температури від коефіцієнтів ємності можливо розрахувати термодинамічні характеристики переходу аналітів із мобільної фази в нерухому. Дослідження термодинамічних параметрів утримування речовин, по-перше, допомагає з'ясувати характер утримування, по-друге, покращує процес оптимізації розділення при оптимізації розділення. Наприклад, ентальпія переносу аналіту із рухомої в стаціонарну фазу показує різницю у взаємодії аналіту із рухомою фазою та із стаціонарною фазою. Це Лондоновські дисперсні зв'язки, діполь-індуковані, діполь-діпольні, водневі зв'язки і тому подібне.

Дослідження термодинамічних параметрів переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну потребує визначення коефіцієнта ємності:

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{v_S}{v_M}$$

де t_r – час утримування;

t_0 – «мертвий» час утримування (час виходу компоненту, що не утримується на колонці, або час перебування несорбованої речовини у хроматографі);

$\frac{v_S}{v_M}$ – відношення кількості речовини (моль) аналіту в стаціонарній

фазі до кількості речовини (моль) аналіту в рухомої фази.

Відношення об'ємів рухомої фази до стаціонарної фази позначаємо як β :

$$\beta = \frac{v_M}{v_S}$$

Рівняння константи рівноваги переносу речовини, що аналізується, із мобільної в стаціонарну фазу виглядає наступним чином:

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{v_S}{v_M} \cdot \frac{V_M}{V_S} = k \cdot \beta$$

Відоме рівняння, яке пов'язує константу рівноваги переносу аналіту із рухомої в стаціонарну фазу зі зміною енергії Гіббса:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$$

Розділимо рівняння (1.12) на $-RT$ та отримуємо рівняння Вант-Гоффа [88]:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

$$\ln(k \cdot \beta) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta$$

Приводимо це рівняння до лінійної форми:

$$y = mx + b,$$

де $y = \ln k$,

$$x = \frac{1}{T},$$

$$m = -\frac{\Delta H^0}{R},$$

$$b = \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta$$

Негативне значення ентальпії переносу показує, що перенос речовини із рухомої фази в стаціонарну є переважним. Лінійна залежність $\ln k$ від $1/T$, що

витає із рівняння Вант-Гоффа, дозволяє на невеликій кількості експериментів передбачати залежність хроматографічної поведінки при різних температурах. Розрахунки по рівнянню Вант-Гоффа дозволяють характеризувати колонку та порівнювати її з іншими колонками [130, 131]. В роботах [132-134] повідомляється про дослідження термодинамічних характеристик утримування різних сполук, але немає повідомлень про дослідження в цьому плані сполук, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу.

1.5 Данні із мас-спектрометричної фрагментації похідних 1,2,4-тріазолів, що описані в літературі

Існує декілька робіт, в яких наводиться інформація щодо фрагментації піридин-4-карбогідразиду (ізоніазиду) при мас-спектрометрії в комірці зіткнення потрійного квадруполя з іонізацією електророзпиленням [135-140]. При низькому значенні енергії зіткнення (18-25 eV) головним іонним фрагментом є іон з m/z , створений втратою молекули NH_3 [136, 137]: m/z 138 \rightarrow 121, також наводиться положення розриву зв'язку, але не наводиться структура іона з $m/z = 121$.

Схеми фрагментації похідних 1,2,4-тріазолу наведені в різних статтях [140-143]. Eswaran S. [140] зі співавторами надали схему мас-спектричного розпаду при ВЕРХ-МС деяких 1,2,4-тріазолтіолів. Спостерігається відщеплення SH, а потім може руйнуватися тріазоловий цикл із утворенням імінового катіон-радікалу або аміноазокатіону. Salgın-Gökşen et al. пропонували схеми фрагментації ряду 1,2,4-тріазол-5(4)-тіонів на підставі мас-спектрів електронної іонізації при прямому уведенні в іонне джерело. Описується відщеплення замісників, або їх часткова дезінтеграція в 1,2,4-тріазолтіонах [144]. В статті Kūçūkgūzel I. et al. надані схеми дезінтеграції, які включають часткову деструкцію тріазолових циклів із утворенням трохчленних діазогетероциклічних катіон-радікалів. Схеми отримані із мас-спектрів

електроної іонізації високого дозволу [145]. Подібні структури також описані при ВЕРХ-МС розкладі 1,2,4-тріазолів в роботі Gülerman et al. [146].

1.6 Хроматографічні методики визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у м'ясі, яйцях та молоці, які описані в літературі

Багато публікацій присвячено визначенню залишкових кількостей ветеринарних засобів у м'ясі, яйцях, молоці та інше [147-168].

Shalabaya A. R. et al. розробили та провалідували ВЕРХ-ДМД методику визначення залишків АФІ окситетрацикліну, тетрацикліну, хлортетрацикліну та доксицикліну в м'ясі та печінці курей. Екстракцію проводили за допомогою ультразвуку. Екстракти очищували твердофазною та рідинною екстракцією. Рідинну хроматографію виконували на HP 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) [147]. Залишкові кількості фторфеніколу в м'ясі та печінці бройлерів визначали Nasim A. et al. Використовували хроматографічну систему Sykam. Фторфенікол екстрагували етилацетатом із гомогенізованих зразків в присутності PBS-буферного розчину [148]. У дослідженні Tajabadi F. et al. пропонувано методику пробопідготовки з рідкофазної мікроекстракції на основі порожнистих волокон, перед уведенням в ВЕРХ-ДМД. Він використовувався для одночасного вилучення та визначення слідових кількостей п'яти тетрациклінів та чотирьох хінолонів у молоці, меді, рибі, печінці та м'язах ягняти та курки [149].

Наявність білків та ліпідів в яйцях є причиною труднощів у ВЕРХ визначенні. Ефективність колонки може бути знижена при їх наявності в зразках. Тиск в системі ВЕРХ різко зростає через засмічення білками. Існує кілька способів уникнути цього: депротейнізація, рідкофазна та твердофазна екстракція, діаліз. Є багато статей, в яких розглянуто визначення різних АФІ в яйцях птиці. У яйцях птиці можуть бути різні класи ветеринарних препаратів. Наприклад нітрофурани, фторхінолони, тетрацикліни, сульфаніламід.

Draiscia et al. [150] визначали залишки нітрофурану, нітрофуразону, фуразолідону та фуралтадону в курячих яйцях методом ізократичної високоефективної зворотньо-фазовою рідинної хроматографії з УФ-Vis-детектуванням на діодно-мтричному детекторі при 362 нм. Ідентифікацію речовин проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії – мас-спектрометрії із використанням джерела іонізації атмосферного тиску та іонного розпилювача. Мінімальна вага доданих речовин становила 5 мкг/кг у модельній суміші. Їх витягували з яєць ацетонітрилом і очищали рідинно-рідинною екстракцією. Finzi et al. [151] запропонували оберненофазовий ВЕРХ-МС/МС метод для аналізу метаболітів чотирьох загальноживаних нітрофуранових препаратів: фуразолідону, фуральтадону, нітрофуразону та нітрофурантоїну в м'язах птиці та яйцях. Для підтвердження та кількісного визначення використовували моніторинг множинних реакцій (MRM). Межі кількісного визначення становили 0,5 нг/г, а загальний час аналізу становив 5 хв. Мінімальна кінцева концентрація калібрувального стандарту становила 0,3 мкг/кг.

Статтю про визначення енрофлоксацину та ципрофлоксацину методом ВЕРХ у яйцях несучок опубліковано Gorla et al. [152]. Періоди відміни лікування в курей становлять шість днів для енрофлоксацину та п'ять днів для ципрофлоксацину, щоб уникнути порушення рівня залишків речовин. Під час перорального прийому було виявлено мінімальну кількість енрофлоксацину 0,54 мкг/г, ципрофлоксацину 0,14 мкг/г та максимальну при післяоральному уведенні енрофлоксацину 1,98 мкг/г і ципрофлоксацину 0,28 мкг/г.

Ципрофлоксацин, енрофлоксацин та сарафлоксацин були визначені Chu et al. [153] в яєчному жовтку та яєчному білку несучок методом ВЕРХ. Зразок готують підкисленням 1 М фосфатною кислотою з подальшою депротейнізацією ацетонітрилом. Сполуки визначали в яйцях, оброблених препратами. Загальні концентрації для ципрофлоксацину, енрофлоксацину та сарафлоксацину становили 0,229, 0,160, 0,211 мкг/г відповідно.

Christodoulou et al. [154] представили два різні ВЕРХ-ДМД методи при 275 та 255 нм для визначення 10 хінолонів (еноксацин, офлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, данофлоксацин, енрофлоксацин, сарафлоксацин, оксолінова кислота, налідиксинова кислота та флумехін) у курячих м'язах та жовтку. 0,1% TFA в CH_3OH використовували як екстрагент. LOD для яєчного жовтка становила 8,0 г/кг. Було вивчено десять жовтків. Залишків хінолонів не виявлено.

Іонно-парною ВЕРХ методикою із діодно-матричною детекцією при 355 нм, запропоновану Ruick et al. [155] для визначення тетрациклінових антибіотиків у яйцях і м'ясі бройлерів. Точність протягом доби коливалась від 8,0 до 11,8% для окситетрацикліну в яйцях. Межа виявлення та межа кількісного визначення окситетрацикліну в яйцях становили 2,2 нг/г. Препарат був виявлений в яйцях під час та після перорального прийому 840 мг/кг в кормі. Мінімальна та максимальна концентрації окситетрацикліну становили 0,026 мкг/г та 0,21 мкг/г відповідно.

Також існують інші методики з використанням методів високоефективної жидкостної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією для кількісного визначення АФІ ветеринарних препаратів у яйцях птахів, описаних у рядах публікацій [156-158].

Відомо багато методик визначення лікарських речовин у молоці за допомогою високоефективної рідинної хроматографії [159-168]. Наприклад, проста методика рідкофазної мікроекстракції з використанням везикулярного супрамолекулярного розчинника, як «зеленого» екстракційного розчинника була розроблена для збагачення тетрациклінових антибіотиків перед їх аналізом за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою. Екстрагент готували із суміші катіонних поверхнево-активних речовин: дидодецилдиметиламмоній броміду та додецилтриметиламмоній броміду при додаванні солі (NaCl) для коацервації. Продемонстровано застосовність запропонованого методу для визначення тетрациклінів у зразках молока, яєць та меду [168].

1.7 Хроматографічні методики визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в плазмі та сироватці крові, які описані в літературі

Відомо багато ВЕРХ та ВЕРХ-МС методик визначення лікарських речовин в плазмі та сировотці крові [169].

Визначали ізоніазид та піразинамід за допомогою високоефективної рідинно-хроматографічної системи, яка складалася із 1525 бінарного насосу (Waters), 2489 UV/Vis детектору (Waters). Колонка Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150 × 4,6 мм, 5 мкм розмір часток), визначали вміст речовин в плазмі крові [170].

Розроблена ВЕРХ-ДМД методика визначення езомепразолу в плазмі крові людини [171].

Запропонована ВЕРХ-ДМД методика визначення 6-меркаптопурину і 6-метилмеркаптопурину в плазмі крові [172]. Речовини розділювали в градієнтному режимі.

ВЕРХ використовували для визначення ібупрофену в плазмі крові при проведенні дослідження фармакокінетики [173].

5-Фторурацил визначали у фармацевтичних препаратах і плазмі крові людини за допомогою ВЕРХ [174]. Використали метанол як органічний модифікатор, елюювали в ізократичному режимі.

ВЕРХ-МС/МС застосували для визначення летрозолу в плазмі крові людини. Надані умови роботи джерела іонізації мас-спектрометра [175].

Лазартан та ірбесартан визначали за допомогою ВЕРХ-МС/МС [176].

Запропоновано ВЕРХ-МС/МС для визначення целекоксібу, ерлотинібу та його метаболіту десметилерлотинібу в плазмі крові людини [177].

Розроблена методика визначення амлодипіну та валсартану в плазмі крові людини за допомогою ВЕРХ-МС/МС для визначення біоеквівалентності [178].

У численних методиках використано ВЕРХ для визначення бексаротена, цефтолозана та тазобактама, цінакалцета, ципрофлоксацина та інших АФІ в плазмі крові [179-236]. Також для досліджень АФІ в плазмі крові широко

застосовується ВЕРХ-МС/МС [237-297]. У більшості вказаних методик використовують для вилучення аналітів осадження білків. В деяких випадках також використовують рідинну екстракцію.

1.8 Існуючі методи дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів

Методи дослідження стресової деградації АФІ описані в ряді публікацій [298-309]. Нормативні аспекти в розробці методів, що стосується стабільності АФІ, були представлені в оглядах Sehrawat et al.; Blessy et al.; Klick et al.; Reynolds et al.; Rawat et al. [298-302]. Умовами стресової деградації, які зазвичай вивчаються, є: кислотний гідроліз, основний гідроліз, термічний гідроліз, окислення, термічна деградація, фотодеградація.

Дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів у субстанції та лікарських формах необхідні для підтвердження селективності методики визначення у присутності продуктів розпаду та для розробки методик аналізу для вивчення стабільності. Крім того, це дослідження дозволяє передбачити вплив навколишнього середовища на лікарську речовину та запропонувати умови зберігання. Існують вимоги до методів дослідження примусової деградації ліків (ICH guidelines Q1A (R2), 2003) [306]. Відповідно до керівних принципів ІСН стрес-дослідження деградації лікарських засобів дозволяють кваліфікувати ймовірні продукти розпаду, визначаючи шляхи деградації, встановлюючи стабільність молекул, підтверджуючи якість аналітичної процедури. Деградація залежить від того, чи досліджується окремо речовина чи препарат.

Bhardwaj et al. вивчали вплив стресових факторів на еналаприл малеат згідно з рекомендаціями ІСН [307]. На основі досліджень із використанням LC-MS була запропонована схема розкладання АРІ під впливом стресових факторів.

Nageswara et al. досліджували вплив стресових факторів на ритонавір за допомогою LC-MS/MS [308].

Parmar et al. провели дослідження стресового розкладання ропініролу гідрохлориду в таблетках [309].

В роботах [5-7] наводяться результати дослідження стресової деградації похідних 1,2,4-тріазолу. Автори [7] вивчали зміну вмісту 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіона, дімера тіотрізоліну в тіотріазоліні та диметиламінобензальдегіду і (β -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолія броміду в кардіотрілі під впливом різних факторів.

В результаті проведення наукових інформаційних і патентних досліджень і аналізу відібраної патентної та науково-медичної інформації за зазначеною проблемою можна зробити наступні висновки. Основними тенденціями зі створення нових методик аналізу активних фармацевтичних інгредієнтів є збільшення використання ВЕРХ та ВЕРХ-МС методів. Однак для досліджуваних похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів спостерігається відставання від світових тенденцій. Вивчення патентної документації показує, що відсутні патенти, які присвячені визначенню АФІ тіометризолу, тріфузолу та авесстиму попередників у синтезі. Дані аналізу літературних джерел свідчать про нестачу інноваційних методик визначення щодо вказаних лікарських засобів. Тому створення способів визначення перспективних лікарських препаратів із групи похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів є актуальним завданням.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [331, 332, 336, 356].

РОЗДІЛ 2

ПРИЛАДИ, МЕТОДИ, МЕТОДИКИ ТА РЕАКТИВИ, ВИКОРИСТАНІ
ПРИ ПРОВЕДЕННІ ДОСЛІДЖЕНЬ. ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Прилади

Прилад ВЕРХ-МС, який складається з таких частин. Одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї (ESI) G6120B Single Quad LCMS. Генератор азоту NiGen LCMS 40-1. Дегазатор G4225A 1260 Hip Degasser (Agilent Technologies, Japan). Бінарний насос G1312B 1260 Bin Pump (Agilent Technologies, Germany). Автосамплер G1329B 1260 ALS (Agilent Technologies, Germany). Термостат колонки G1316C 1290 TCC (Agilent Technologies, Germany). Діодно-матричний детектор G4212B 1260 DAD (Agilent Technologies, Germany). Колонки хроматографічні Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм, 1,8 мкм та Zorbax RxSil, 50 мм x 4,6 мм, 1,8 мкм.

Обладнання для підготовки зразків. Ваги аналітичні електронні Kern ABT 100-5M. Ультразвукова баня Ultrasonic XUBA 3. Центрифуга для пробірок Епендорф Ulab UC-1512 (0-15000 об./хв, 15000 г).

Хімічний посуд та обладнання для вимірювання об'ємів. Мірні колби Simax 100,0 мл, класа «А», піпетки об'ємом 1,00 мл та 10,00 мл, що відповідають вимогам до гранично припустимих похибок для мірного посуду згідно ДФУ, Додаток 2 [312]. Піпетка-дозатор 10-200 мкл.

Вимірювання рН. рН розчинів вимірювали на іономері лабораторному И160МИ.

Програмне забезпечення. Програмний комплекс OpenLAB CDS. Програмний комплекс ACDLabs 6.0. Пакет Statistica 8.0 (StatSoft, США). Надстройка Solver (Пошук рішення) до Microsoft Excel (Frontline Systems, Inc., США).

2.2 Основні нормативно-правові документи

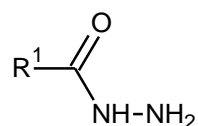
Державна Фармакопея України 1-е та 2-е видання [310-318]. Європейська Фармакопея 10-го видання [319]. Керівництво із валідації біоаналітичного методу США [320]. Вимоги із валідації біоаналітичних методик згідно вимогам Європейської агенції із лікарських засобів [321], які відображені у вітчизняних методичних рекомендаціях [322].

2.3 Об'єкти дослідження

2.3.1 Сполуки. Субстанцію піридин-4-карбогідрозид (**2.1**) кваліфікації «х. ч.» було придбано в компанії «Укроргсинтез». Використовувались субстанції сполук, які синтезовані на кафедрах фізколоїдної хімії (зав. каф. д. фарм. н., професор Каплаушенко А. Г.), природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії (зав. каф. д. фарм. н., професор Панасенко О. І.) Запорізького державного медичного університету, склад яких було доведено за допомогою ПМР, ІЧ-, хромато-мас-спектрометричного аналізу: фуран-2-карбогідрозид (**2.2**); 2-морфоліноацетогідрозид (**2.3**); 2-метоксибензогідрозид (**2.4**); 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоамід (**2.5**); 2-(фуран-2-карбоніл)-*N*-фенілгідрозин-1-карботіоамід (**2.6**); 2-(2-морфоліноацетил)-*N*-фенілгідрозин-1-карботіоамід (**2.7**); *N*-метил-2-(2-морфоліноацетил)гідрозин-1-карботіоамід (**2.8**); 2-(2-метоксибензоїл)гідрозин-1-карботіоамід (**2.9**); 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.10**); 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.11**); 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.12**); 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.13**); 4-метил-5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.14**); 4-етил-5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.15**); 5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.16**); 5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.17**), 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-

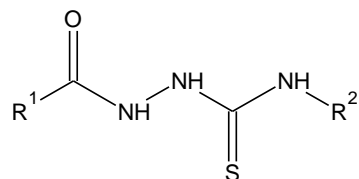
1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.18**); 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетат (**2.19**); 2-((5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.20**); 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.21**); 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.22**); 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.23**); 2-((5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.24**); 2-((5-(2-метоксифеніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.25**); морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.26**); піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.27**); морфоліній 2-((5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.28**); морфоліній 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.29**); морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.30**); морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.31**); цинку 2-((5-(2-метоксифеніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (**2.32**) (табл. 2.1-2.5).

Таблиця 2.1

Характеристика R_1 - карбогідразидів (2.1-2.4)

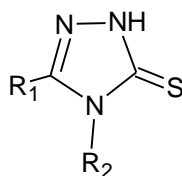
Сполука	R_1	$T_{пл}, ^\circ C$	Брутто-формула	M_r	Літера-тура
2.1	піридин-4-іл	170–174	$C_6H_7N_3O$	137,1	[323]
2.2	фуран-2-іл	75-76	$C_5H_6N_2O_2$	126,1	[324]
2.3	морфолінометіл	96-98	$C_6H_{13}N_3O_2$	159,2	[66]
2.4	2-метоксифеніл	78-82	$C_8H_{10}N_2O_2$	166,2	[325]

Таблиця 2.2

Характеристика 2-R₁-N-R₂ - гідразин-1-карботіоамідів (2.5-2.9)

Сполука	R ₁	R ₂	T _{пл} , °C	Брутто-формула	M _r	Літе-ратура
2.5	піридин-4-іл	2-метокси-феніл	270-272	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	302,4	[326]
2.6	фуран-2-іл	феніл	196-198	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	261,3	[327]
2.7	морфолінометіл	феніл	136-138	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₂ S	294,4	[66]
2.8	морфолінометіл	N-метил	119-121	C ₈ H ₁₆ N ₄ O ₂ S	232,3	[66]
2.9	2-метоксифеніл	H	179-180	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	225,3	[63]

Таблиця 2.3

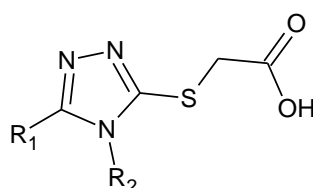
Характеристика 4-R₂-5-R₁-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіонів (2.10-2.17)

Сполука	R ₁	R ₂	T _{пл} , °C	Брутто-формула	M _r	Літе-ратура
1	2	3	4	5	6	7
2.10	піридин-4-іл	2-метокси-феніл	258-260	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ OS	284,3	[3]
2.11	фуран-2-іл	феніл	214-216	C ₁₂ H ₉ N ₃ OS	243,3	[327]
2.12	піридин-4-іл	H	321-322	C ₇ H ₆ N ₄ S	178,2	[328]
2.13	морфолінометіл	феніл	181-183	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ OS	276,4	[66]

Продовж. табл. 2.3

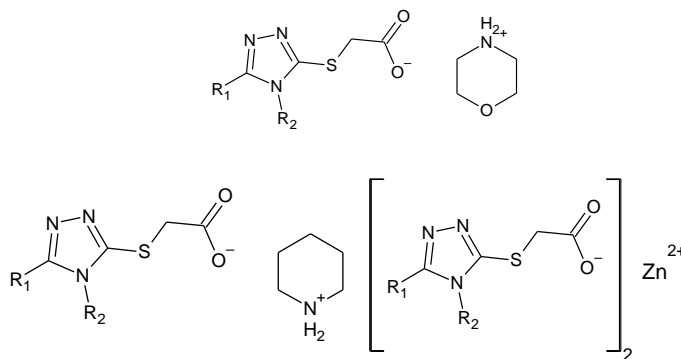
1	2	3	4	5	6	7
2.14	морфолінометіл	метіл	193-195	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214,3	[66]
2.15	морфолінометіл	етіл	145-147	C ₉ H ₁₆ N ₄ OS	228,3	[66]
2.16	морфолінометіл	H	201-203	C ₉ H ₉ N ₃ OS	200,3	[66]
2.17	2-метокси-феніл	H	199-201	C ₉ H ₉ N ₃ OS	207,3	[63]

Таблиця 2.4

Характеристика 2-((4-R₂-5-R₁-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетатів (2.18 -2.25)

Сполука	R ₁	R ₂	T _{пл} , °C	Брутто-формула	M _r	Літера-тура
2.18	піридин-4-іл	2-метокси-феніл	90–92	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	342,4	[3]
2.19	фуран-2-іл	феніл	189-191	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	243,3	[327]
2.20	піридин-4-іл	H	215-216	C ₉ H ₈ N ₄ O ₂ S	236,3	[329]
2.21	морфолінометіл	феніл	101-103	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₃ S	334,4	[66]
2.22	морфолінометіл	метіл	206-208	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃ S	272,3	[66]
2.23	морфолінометіл	етіл	111-113	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₃ S	286,4	[66]
2.24	морфолінометіл	H	151-153	C ₇ H ₁₂ N ₄ OS	258,1	[66]
2.25	2-метоксифеніл	H	110-112	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	265,3	[63]

Характеристика морфоліній 2-((4- R_2 -5- R_1 -4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетатів (2.26, 2.28-2.31), піперидиній 2-((4- R_2 -5- R_1 -4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.27), цинку 2-((4- R_2 -5- R_1 -4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.32)



Сполука	R_1	R_2	$T_{пл}, ^\circ C$	Брутто-формула	M_r	Література
2.26	піридин-4-іл	2-метокси-феніл	118-120	$C_{20}H_{23}N_5O_4S$	429,5	[3]
2.27	фуран-2-іл	феніл	145-147	$C_{18}H_{21}N_5O_3S$	386,5	[327]
2.28	піридин-4-іл	H	162-165	$C_{13}H_{17}N_5O_3S$	323,4	[329]
2.29	морфолінометіл	феніл	137–139	$C_{19}H_{27}N_5O_4S$	421,5	[330]
2.30	морфолінометіл	метіл	136–138	$C_{14}H_{25}N_5O_4S$	359,4	[330]
2.31	морфолінометіл	етіл	73–75	$C_{15}H_{27}N_5O_4S$	373,5	[330]
2.32	2-метоксифеніл	H	–	$C_{12}H_{12}N_3O_3SZn$	343,7	[63]

2.3.2 Біологічний матеріал. Зразки яєць та м'яса для дослідження залишкових кількостей АФІ після впоювання птиці були отримані від ТОВ «Агрофірма Маяк», смт Котельва, Полтавської обл. Зразки молока корів для визначення залишків АФІ отримані від Полтавського державного аграрного університету (зав. каф. хірургії та акушерства, д. вет. н., професор Киричко Б. П.).

Зразки плазми крові щурів для дослідження метаболізму та фармакокінетики отримані від НМЛЦ ЗДМУ (зав. д. мед. н., професор Абрамов А. В.). Плазма крові зібрана д. фарм. н., доцентом Пруглом Є.С.

2.4 Реактиви та розчинники. Виготовлення розчинів

Ацетонітрил кваліфікації «HPLC Super Gradient» (Avantor Performance Materials Poland S. A., Poland), мурашина кислота кваліфікації «For analysis» (98%) (AppliChem GmbH, Germany). Високоочищена вода (18 МΩ при 25°C) виготовлена з використанням системи очищення води Direct Q 3UV Millipore (Molsheim, France). Амоній ацетат кваліфікації «ХЧ» $\geq 98\%$ (Китай).

Для оптимізації умов мас-спектрометричної детекції, для дослідження оптимальних хроматографічного утримування, а також для визначення мас-спектрометричної фрагментації готували розчини із концентрацією 1 г/мл речовин **2.1-2.9** гідразидів та карботіоамідів, тіонів **2.11**, **2.13-2.16** в 50% ацетонітрилу. Тіони **2.10**, **2.12** і **2.17** аналіти розчиняли в ДМСО. Кислоти та солі **2.18-2.19** та **2.21-2.31** розчиняли в 50% ацетонітрилі. Сполуки **2.20** та **2.32** розчиняли в ДМСО.

2.5 Формули розрахунку відсоткового вмісту

Вміст АФІ в субстанції X, %, визначають за формулою:

$$X = \frac{S_x \times m_{st} \times P \times 100}{S_{st} \times m_x \times (100 - w)},$$

де S_x – середнє значення площі піку АФІ для хроматограм досліджуваного розчину;

S_{st} – середнє значення площі піку АФІ для хроматограм розчину стандартного зразка;

m_{st} – маса наважки стандартного зразка АФІ, г;

m_x – маса наважки досліджуваного зразка субстанції, г;
 P – вміст основної речовини в стандартному зразку, %;
 w – вміст води в субстанції, %.

Вміст домішок в субстанції АФІ X, %, визначають за формулою:

$$X = \frac{S_x \times m_{st} \times P}{S_{st} \times m_x \times (100 - w)},$$

де S_x – середнє значення площі піку домішки для хроматограм досліджуваного розчину;

S_{st} – середнє значення площі піку домішки для хроматограм розчину робочих стандартних зразків;

m_{st} – маса наважки робочого стандартного зразка домішки, г;

m_x – маса наважки досліджуваного зразка субстанції домішки, г;

P – вміст основної речовини в робочому стандартному зразку, %;

w – вміст води в субстанції АФІ, %.

Вміст АФІ в розчині X, %, визначають за формулою:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{st} \cdot P}{S_{st} \cdot V_x},$$

де S_x – середнє значення площі піку АФІ для хроматограм досліджуваного розчину;

S_{st} – середнє значення площі піку АФІ для хроматограм розчину робочого стандартного зразка;

m_{st} – маса наважки робочого стандартного зразка АФІ, г;

V_x – об'єм досліджуваного зразка розчину, мл;

P – вміст основної речовини в робочому стандартному зразку, %.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ УМОВ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОГО ДЕТЕКТУВАННЯ

Необхідною вимогою розроблення ВЕРХ-ЕСІ-МС методик є оптимізація мас-спектрометричного детектування, для цього необхідно визначити характеристичні іони, тиск газу небулайзера, швидкість газу осушувача, його температуру, напругу на фрагментаторі (напругу в ділянці розпаду, ініційованого зіткненнями).

В даному розділі запропонована процедура оптимізації умов мас-спектрометричного детектування ряду гідразидів, карботіоамідів, відповідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів, 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей, а саме температури газу-осушувача, напруги на фрагментаторі, тиску на небулайзері. Дослідження проводили шляхом прямого уведення зразка в камеру іонізації без хроматографічної колонки. Результати оптимізації опубліковано в роботах [331-334].

3.1 Виготовлення розчинів для оптимізації умов мас-спектрометричного детектування та опис мас-спектрометричного дослідження

Дослідження проводили шляхом прямого уведення зразка в камеру іонізації за допомогою автосамплера без хроматографічної колонки. Об'єм проби складав 2 мкл. Умови виготовлення розчинів досліджуваних сполук описані в підрозд. 2.4.

Хроматографували в ізократичному режимі, з використанням буферного розчину: А – H_2O (0,1% HCOOH) та розчину органічного модифікатору: В – CH_3CN (0,1% HCOOH); 50:50. Мас-спектрометрію проводили в джерелі іонів електроспрей, режим селективного моніторингу іонів, залежно від молекулярної маси (SIM) при позитивній полярності, при швидкості газу осушувача (азоту) 10 л/хв.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері, з використанням пакету Statistica 8.0 (StatSoft, США) на основі значень повного факторного експерименту і відповідних площ піків. Визначені поліноміальні рівняння регресії. Оптимальні значення факторів знайдені з розрахованих рівнянь, з використанням Solver (Пошук рішення) (налаштування для Excel, Frontline Systems, Inc., США).

3.2 Процедура оптимізації умов мас-спектрометричного детектування

Схема процедури оптимізації умов мас-спектрометричного детектування наведена на рис. 3.1.

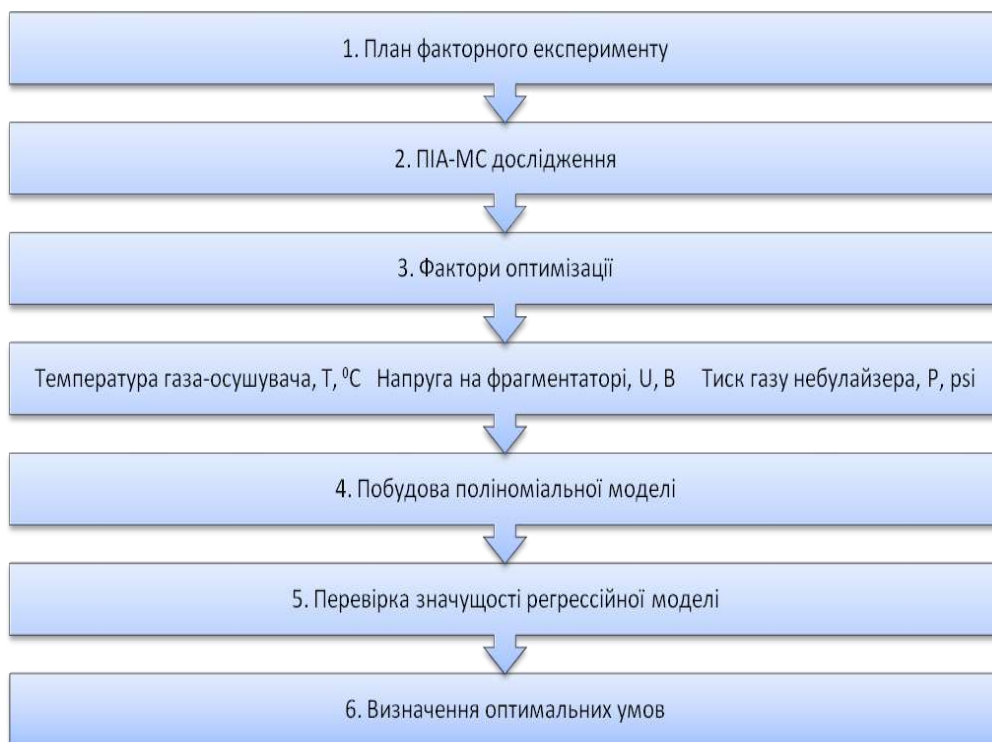


Рис. 3.1. Схема процедури оптимізації умов мас-спектрометричного детектування

Для досягнення мети роботи досліджувались різні фактори, які впливають на інтенсивність сигналу мас-детектору. Інтервал для кожного фактора був обраний відповідно до рекомендацій програмного комплексу Open

Lab. Перш ніж планувати експеримент, було обрано за цими даними витрату елюента 400 мкл/хв, швидкість потоку газа-осушувача 10 л/хв, напругу на капілярі 4000 В.

Досліджувані об'єкти, нові похідні 1,2,4-тріазолів та попередники в їх синтезі мають певну структуру, елементний склад, міцність хімічних зв'язків. Тому було вирішено оптимізувати фактори, які впливають на значення сигналу мас-детектора для кожної сполуки окремо.

При мас-спектрометричних дослідженнях істотне значення має тиск на небулайзері, швидкість газа-осушувача (азоту), температура газа-осушувача.

Так температура газа-осушувача, рекомендована за допомогою програмного забезпечення, становить 300°C, вона залежить також від швидкості потоку і температури кипіння елюента, швидкості газу осушувача, термостабільності зразка. Елюент містить воду, тому вибрали температуру 100°C, як мінімальну. Тиск на небулайзері запропоновано від 20 до 60 psi, залежно від швидкості елюенту – від 100 мкл/хв до 1 мл/хв. Обираємо 10 psi, як мінімальне значення, щоб досліджувати більш широкий діапазон і визначити оптимальне значення. Напруга на фрагментаторі може змінюватися в залежності від характеру хімічних зв'язків, тому її варіювали від 0 до 300 В. Використовували проточно-інжекційні аналіз (метод безпосереднього уведення зразка). Таким чином, необхідно було оптимізувати температуру газу-осушувача, тиск на небулайзері, напругу на фрагментаторі.

Фактори вважалися найкращими, якщо їм відповідає максимальне значення площі піку сигналу маса детектора.

Використана схема повного факторного експерименту за 3 факторами. Фактори: напруга на фрагментаторі (U, В), тиск на небулайзері (p, psi), температура газа-осушувача (азоту) (T, °C) – варіювалися за трьома рівнями: U – 0, 150, 300 В; p – 10, 30, 60 psi; t – 100, 200, 300°C. План повного факторного експерименту наведено в табл. 3.1.

**План повного факторного експерименту дослідження умов детектування
досліджуваних речовин за допомогою ЕСІ-МС детектору**

Температура газа-осушувача, Т, °С	Напруга на фрагментаторі, U, В	Тиск газу небулайзера, Р, psi
1	2	3
100	0	10
100	0	30
100	0	60
100	150	10
100	150	30
100	150	60
100	300	10
100	300	30
100	300	60
200	0	10
200	0	30
200	0	60
200	150	10
200	150	30
200	150	60
200	300	10
200	300	30
200	300	60
300	0	10
300	0	30
300	0	60
300	150	10

1	2	3
300	150	30
300	150	60
300	300	10
300	300	30
300	300	60

Параметром, що оптимізувався, була площа піків на хроматограмі. Максимальне значення площі піка відповідало оптимальним умовам детектування.

За допомогою програмного пакету для статистичного аналізу «Statistica 8» розраховані рівняння поліноміальної регресії, коефіцієнти регресії та квадрати коефіцієнтів регресії, а також значення F-критерія Фішера (табл. 3.2, 3.4, 3.6).

Якість регресійних моделей, оцінена за допомогою критерію Фішера. Якщо розрахункове значення з $f_1 = (m)$ і $f_2 = (n-m-1)$ ступенями свободи більше табличного при заданому рівні значущості, то модель вважається значущою ($m = 3$ – число факторів, $n = 27$ – число спостережень).

3.3 Оптимізація умов детектування гідрозидів та карботіоамідів

Отримані рівняння поліноміальної регресії для гідрозидів та карботіоамідів кислот (табл. 3.2). Розраховані значення F-критерію Фішера для більшості сполук (виняток **2.6** та **2.9**) перевищують табличне значення $F_{\text{крит}}$ для $f_1 = 3$, $f_2 = 27-3-1 = 23$, $\alpha = 0,05$, що дорівнює 3,03. Це свідчить про значимість рівняння поліноміальної регресії, тобто з ймовірністю 95% побудовані залежності адекватні вихідним даним. Коефіцієнти детермінації (R^2) знаходяться в інтервалі 0,18-0,90.

**Рівняння регресії мас-спектрометричного визначення
досліджуваних речовин**

Сполука	Рівняння регресії	R, R ²	F	F _{f1,f2,α, крит}
1	2	3	4	5
2.1	$S = 4606693,73 - 1615,2706 \cdot T - 18,285083 \cdot T^2$ $+ 251916,993 \cdot U - 950,35852 \cdot U^2$ $+ 311965,327 \cdot P - 2204,1330 \cdot P^2$	0,861290 0,741820	9,5775	3,03
2.2	$S = -783703,30 + 99362,6897 \cdot T - 252,25474 \cdot T^2$ $- 82862,642 \cdot U + 153,530175 \cdot U^2$ $+ 83134,1035 \cdot P + 624,395005 \cdot P^2$	0,719183 0,517224	3,5712	3,03
2.3	$S = 37164659,8 - 38963,568 \cdot T + 3,03529556 \cdot T^2$ $- 32335,124 \cdot U - 342,80577 \cdot U^2$ $+ 374593,341 \cdot P - 706,54903 \cdot P^2$	0,885691 0,784448	12,1309	3,03
2.4	$S = 7855002,47 - 45237,401 \cdot T + 108,970634 \cdot T^2$ $- 36146,831 \cdot U + 52,0642311 \cdot U^2$ $+ 121544,525 \cdot P - 1153,7580 \cdot P^2$	0,899302 0,808744	14,0953	3,03
2.5	$S = 4348929,64 + 24715,8935 \cdot T - 89,870435 \cdot T^2$ $+ 129496,561 \cdot U - 482,43898 \cdot U^2$ $+ 137671,919 \cdot P - 1254,2047 \cdot P^2$	0,834374 0,696180	7,6380	3,03
2.6	$S = 1034860,84 - 5037,4617 \cdot T + 9,03074657 \cdot T^2$ $+ 4262,78982 \cdot U - 20,146115 \cdot U^2$ $+ 20112,7906 \cdot P - 189,76630 \cdot P^2$	0,559011 0,312493	1,5151	3,03
2.7	$S = 4395899,70 + 3130,45444 \cdot T - 22,692719 \cdot T^2$ $+ 142201,890 \cdot U - 550,58065 \cdot U^2$ $+ 213114,967 \cdot P - 2160,5353 \cdot P^2$	0,947276 0,897332	29,1340	3,03

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5
2.8	$S = 4032066,38 - 8240,8806 \cdot T + 15,1648602 \cdot T^2$ $+ 26762,5377 \cdot U - 132,85517 \cdot U^2$ $+ 74566,0325 \cdot P - 754,55410 \cdot P^2$	0,823518 0,678182	7,0245	3,03
2.9	$S = 991916,101 + 7553,13891 \cdot T - 35,978985 \cdot T^2$ $- 693,81018 \cdot U - 2,0207152 \cdot U^2$ $+ 87695,6160 \cdot P - 1133,6997 \cdot P^2$	0,429386 0,184373	0,7535	3,03

За розрахованими рівняннями з використанням надбудови «Пошук рішення» програми Excel знайдені оптимальні значення факторів. Пошук зійшовся за ймовірністю до глобального рішення. В табл. 3.3 надані розраховані оптимальні умови визначення відповідних сполук.

Таблиця 3.3

Оптимальні умови іонізації в електроспреї для гідразидів та карботіоамідів

(Т – температура газу осушувача, U – напруга на фрагмента торі,

Р – тиск на небулайзері)

Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T	U	P
2.1	138	100	133	60
2.2	127	197	0	60
2.3	160	100	0	60
2.4	167	100	0	53
2.5	303	138	134	55
2.6	262	100	106	53
2.7	295	100	129	49
2.8	233	100	101	49
2.9	226	105	0	39

Як видно з табл. 3.3 умови залежать від структури речовин. Так, для більшості гідразидів найкращим є нульове значення напруги на фрагментаторі, що пов'язано з лабільністю зв'язків. Досліджувані сполуки, що є гідрازیдами та карботіоамідами, мають деяку термолабільність, тому для більшості речовин рекомендуємо температуру газу-осушувача біля 100°C.

3.4 Оптимізація умов детектування тіонів

Вивчені 27 комбінацій факторів (3^3) для кожного 1,2,4-тріазол-3-тіону. Всього було зроблено 216 експериментів. Кожна комбінація повторена три рази. Таким чином проведено 648 вимірів.

Розраховані рівняння поліноміальної регресії для залежності інтенсивності сигналу мас-детектора від трьох чинників: температура газу-осушувача, напруга на фрагментаторі, тиск газу-розпилювача (небулайзера). Адекватність отриманих моделей перевірена з використанням критеріїв Фішера. Розрахункове значення статистики Фішера $F_{\text{розрах.}}$ для всіх сполук більше, ніж $F_{\text{крит.}}$ табличних значень для $f_1 = 3$, $f_2 = 23$, $\alpha = 0,05$, що становить 3,03, що вказує на значущість поліноміальною рівняння регресії. Коефіцієнти детермінації (R^2) для перебувають у діапазоні 0,53-0,95 (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Рівняння регресії для мас-спектрометричного детектування речовин

Сполука	Рівняння регресії	R, R ²	F _{calc}	F _{f1,f2,α, крит.}
1	2	3	4	5
2.10	$S = 4118250,98 - 12777,609 \cdot T + 53,8893833 \cdot T^2$ $+ 359928,242 \cdot U - 1260,7557 \cdot U^2$ $+ 104089,817 \cdot P - 393,19365 \cdot P^2$	R^2 0,975171 0,950958	64,6	3,03

Продовж. табл. 3.4

1	2	3	4	5
2.11	$S = 1565874,72 - 18586,382 \cdot T + 51,7684279 \cdot T^2$ $+ 62410,7234 \cdot U - 216,66037 \cdot U^2$ $+ 47798,1473 \cdot P - 374,52322 \cdot P^2$	$0,955808$ $0,913569$	35,2	3,03
2.12	$S = -2634692,0 + 23192,6314 \cdot T + 62,112728 \cdot T^2$ $+ 637928,295 \cdot U - 2205,3596 \cdot U^2$ $+ 517198,506 \cdot P - 4891,4904 \cdot P^2$	$0,964899$ $0,931030$	44,9	3,03
2.13	$S = 3410900,31 - 42541,095 \cdot T + 111,018572 \cdot T^2$ $+ 122595,835 \cdot U - 458,85424 \cdot U^2$ $+ 285964,863 \cdot P - 2930,0861 \cdot P^2$	$0,894853$ $0,800762$	13,4	3,03
2.14	$S = 2929281,14 + 5097,55089 \cdot T + 17,001536 \cdot T^2$ $+ 59439,8118 \cdot U - 252,38307 \cdot U^2$ $+ 133239,578 \cdot P - 1550,2213 \cdot P^2$	$0,872500$ $0,761255$	10,6	3,03
2.15	$S = 2421565,82 - 6703,0294 \cdot T + 16,2619500 \cdot T^2$ $+ 37001,4610 \cdot U - 159,09844 \cdot U^2$ $+ 68908,2841 \cdot P - 551,18155 \cdot P^2$	$0,871407$ $0,759350$	10,5	3,03
2.16	$S = -279018,59 + 9838,26968 \cdot T + 20,735148 \cdot T^2$ $+ 59972,0000 \cdot U - 216,85533 \cdot U^2$ $+ 56634,5387 \cdot P - 555,88194 \cdot P^2$	$0,975704$ $0,951998$	66,1	3,03
2.17	$S = 5354847,93 - 55171,225 \cdot T + 143,746231 \cdot T^2$ $+ 43231,8132 \cdot U - 139,09561 \cdot U^2$ $- 36117,971 \cdot P + 496,813383 \cdot P^2$	$0,728245$ $0,530340$	3,76	3,03

При розрахунку за допомогою «Solver» для Excel отримані оптимальні значення факторів при визначенні максимумів функцій, пошук зійшовся за ймовірністю до глобального вирішення. Оптимальні умови надані в табл. 3.5.

Оптимальні умови іонізації в електроспреї для тіонів (Т – температура газу осушувача, U – напруга на фрагментаторі, P – тиск на небулайзері)

Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T, °C	U, B	P, psi
2.10	285	300	143	60
2.11	244	300	144	60
2.12	179	187	145	53
2.13	277	300	134	49
2.14	215	150	118	43
2.15	229	100	116	60
2.16	201	237	138	51
2.17	208	300	155	10

Вплив температури газу-осушувача на інтенсивність сигналу мас-детектора, як правило, описується наступним чином: більш високі температури ведуть до більш ефективного створення іонів, але при певній температурі термічний розклад молекул і іонів речовини збільшується. Таким чином, цілком імовірно, що при відповідній температурі повинен спостерігатися максимум інтенсивності. Що і виявлено на практиці.

Аналізуючи оптимальну температуру газу-осушувача (табл. 3.5), можна відзначити наступне. Більшість сполук, для яких оптимальна температура становить 300°C, мають у 4-му положенні 1,2,4-тріазольного циклу метоксифенільний або фенільний радикал (**2.10-2.11, 2.14**), виняток становить сполука **2.17**, в якій немає замісників у 4-му положенні 1,2,4-тріазольного циклу. Це можна пояснити тим, що уведення фенільного радикала призводить до π - π супряження з 1,2,4-тріазоловим циклом, що стабілізує молекулу в цілому. Цей факт корелює з даними, отриманими при аналізі сполук **2.10** і **2.12**,

що відрізняються тільки наявністю 2-метоксифенільного замісника в 4-му положенні 1,2,4-тріазольного циклу у сполуки **2.10** і відсутність для сполуки **2.12**, оптимальні температури 300°C і 187°C відповідно (оптимальна температура для сполуки **2.12** нижча, ніж для сполуки **2.10**).

Що стосується результатів експерименту речовин, що містять морфолінометиленові замісники в 5-му положенні 1,2,4-тріазольного ядра (**2.13-2.16**), то слід зазначити, що висока температура 300°C є оптимальною для сполуки, що містить феніл в 4-му положенні (**2.13**). Для тіону без замісника в N-4 кращою температурою є 237°C. Заміна метилового замісника на етил (**2.14-2.15**) створює умови для зниження оптимальної температури (від 150°C до 100°C). Цей факт можна пояснити тим, що радикал феніл стабілізує сполуку через π - π супряження з 1,2,4-тріазоловим циклом. Відсутністю замісника характеризується нульовий ефект (**2.16**). У той же час електронно-донорні властивості алкільних радикалів зростають (від тіонів **2.14** до **2.15**), що дестабілізує сполуки.

Дослідники компанії Agilent Technologies уважно вивчили зв'язок напруги на фрагментаторі і інтенсивності сигналу мас-детектора [335]. Можна припустити, що зі збільшенням напруги на фрагментаторі інтенсивність сигналу мас-детектора повинна зменшуватися, тому що іони розпадаються на фрагменти більш активно. Але, як ми бачимо, інтенсивність сигналу даних сполук спочатку збільшується, проходить через максимум, а потім зменшується. Напруга на капілярі і фрагментаторі, прикладеному на вході і виході капіляра, істотно впливає на перехід іонів в детектор. Напруга також призводить до фрагментації іонів зразка. Зазвичай, чим вище напруга, тим краще перехід іонів через область щодо високого тиску між виходом з капіляра і входом в скіммер. Висока напруга на фрагментаторі може привести до фрагментації, яка забезпечує структурну інформацію. Для сполук, які важко фрагментуються, збільшення напруги, як правило, призводить до поліпшення передачі іонів.

Як видно з табл. 3.5, оптимальні умови фрагментації знаходяться в діапазоні від 116 до 155 В. Цей фактор залежить від структури сполуки. Таким чином, для морфолінометиленових похідних (**2.13-2.16**) спостерігається найнижча оптимальна напруга на фрагментаторі, а саме від 116 до 138 В. Можна помітити, що при вкороченні алкільного ланцюга на метиленову групу (**2.14-2.16**) спостерігається збільшення оптимальної напруги на фрагментаторі, тобто електронно-донорні замісники зменшують стабільність молекул. Наявність ароматичних замісників стабілізує молекулу в цілому за рахунок π - π супряження з тріазольним циклом (**2.10-2.12, 2.16-2.17**).

3.5 Оптимізація умов детектування кислот та солей

Для кожного об'єкту – нових сполук з ряду 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей, проведено дослідження 27 комбінацій факторів (3^3). Крім того кожна комбінація повторена 3 рази для підвищення достовірності. Всього при вивченні цих речовин проведено 1215 вимірювань. Для сполуки **2.24** відповідні солі не досліджувалися, тому що отримані солі дуже гігроскопчні.

Розраховані рівняння поліноміальної регресії зв'язують інтенсивність сигналу мас-детектору з трьома важливими факторами: температурою газу осушувача, напругою на фрагментаторі, тиском на небулайзері (табл. 3.6). Адекватність моделей, що отримані, перевірена за допомогою критерію Фішера. Розраховані значення F статистики Фішера для більшості сполук більше табличного значення $F_{\text{крит.}}$ для $f_1 = 3$, $f_2 = 23$, $\alpha = 0,05$, яке дорівнює 3,03, що свідчить про значимість рівняння поліноміальної регресії. Винятком є тільки сполука **2.30**. Коефіцієнти детермінації (R^2) для більшості сполук знаходяться в інтервалі 0,50-0,95, теж за винятком сполуки **2.30**, він дорівнює 0,45.

**Рівняння регресії взаємозв'язку площини піків (S) та факторів (T, U, P)
мас-спектрометричного визначення досліджуваних речовин**

Сполука	Рівняння регресії	R, R ²	F	F _{f1,f2,α, крит}
1	2	3	4	5
2.18	$S = -2033328,8 + 13691,0792 \cdot T - 13,601927 \cdot T^2$ $+ 113801,755 \cdot U - 400,90302 \cdot U^2$ $+ 123623,645 \cdot P - 1291,4057 \cdot P^2$	0,973240 0,947196	59,8	3,03
2.19	$S = 58601313,1 - 467216,83 \cdot T + 1154,51478 \cdot T^2$ $+ 285655,023 \cdot U - 1033,2363 \cdot U^2$ $- 630372,71 \cdot P + 6441,58952 \cdot P^2$	0,758216 0,574892	4,5	3,03
2.20	$S = -7561879,1 + 33553,9460 \cdot T + ,064750463 \cdot T^2$ $+ 508002,162 \cdot U - 1761,9178 \cdot U^2$ $+ 471048,290 \cdot P - 4585,2630 \cdot P^2$	0,975930 0,952440	66,8	3,03
2.21	$S = -401859,28 + 9457,40885 \cdot T - 1,3223246 \cdot T^2$ $+ 165588,516 \cdot U - 595,01746 \cdot U^2$ $+ 164446,908 \cdot P - 1598,6500 \cdot P^2$	0,975707 0,952004	66,1	3,03
2.22	$S = 3548,33531 + 9962,46906 \cdot T - 22,283962 \cdot T^2$ $+ 67260,2246 \cdot U - 249,53586 \cdot U^2$ $+ 95210,0721 \cdot P - 980,56583 \cdot P^2$	0,968959 0,938882	51,2	3,03
2.23	$S = -3914849,8 + 37003,7706 \cdot T - 78,950305 \cdot T^2$ $+ 53936,3280 \cdot U - 196,61331 \cdot U^2$ $+ 101675,253 \cdot P - 1033,4969 \cdot P^2$	0,901469 0,812646	14,4	3,03
2.24	$S = -244817,48 + 2793,70354 \cdot T - 1,0298427 \cdot T^2$ $+ 43443,8036 \cdot U - 154,76270 \cdot U^2$ $+ 46297,6634 \cdot P - 435,99774 \cdot P^2$	0,968314 0,937632	50,1	3,03

Продовж. табл. 3.6

1	2	3	4	5
2.25	$S = -1326083,3 + 20152,8835 \cdot T - 50,026447 \cdot T^2$ $-56,958434 \cdot U - 7,3087150 \cdot U^2$ $+15541,7886 \cdot P - 137,69629 \cdot P^2$	0,709898 0,503955	3,38	3,03
2.26	$S = -319136,51 + 2701,25916 \cdot T + 0,857299703 \cdot T^2$ $+42105,7735 \cdot U - 148,24495 \cdot U^2$ $+34785,9777 \cdot P - 329,67453 \cdot P^2$	0,962989 0,927348	42,5	3,03
2.27	$S = -7305050,2 + 40744,2051 \cdot T - 82,415167 \cdot T^2$ $+131396,434 \cdot U - 441,69636 \cdot U^2$ $+255250,839 \cdot P - 2780,4523 \cdot P^2$	0,842855 0,710405	8,18	3,03
2.28	$S = -164069,55 - 7427,0254 \cdot T + 45,7666537 \cdot T^2$ $+166762,123 \cdot U - 580,78803 \cdot U^2$ $+163313,967 \cdot P - 1642,6807 \cdot P^2$	0,963527 0,928384	43,2	3,03
2.29	$S = -779571,60 + 5115,34730 \cdot T - 2,9339936 \cdot T^2$ $+42049,4183 \cdot U - 149,33848 \cdot U^2$ $+43466,8170 \cdot P - 419,86482 \cdot P^2$	0,957643 0,917081	36,9	3,03
2.30	$S = 3894188,88 - 24131,175 \cdot T + 94,1571901 \cdot T^2$ $+68198,3003 \cdot U - 236,07386 \cdot U^2$ $-162335,79 \cdot P + 1863,02117 \cdot P^2$	0,672335 0,452034	2,7	3,03
2.31	$S = -466992,94 + 5825,68051 \cdot T - 12,797054 \cdot T^2$ $+17417,1220 \cdot U - 62,858538 \cdot U^2$ $+17344,9692 \cdot P - 152,36381 \cdot P^2$	0,952132 0,906555	32,3	3,03
2.32	$S = 108393,884 + 782,733333 \cdot T + 0,485792593 \cdot T^2$ $+51706,2570 \cdot U - 178,48736 \cdot U^2$ $+39826,8144 \cdot P - 297,47670 \cdot P^2$	0,969677 0,940273	52,5	3,03

При проведенні розрахунків за допомогою надбудови «Пошук рішення» програми Excel оптимальних значень факторів при визначенні максимумів

отриманих функцій залежності інтенсивності сигналу детектору від факторів, що оптимізувалися, пошук зійшовся за ймовірністю до глобального рішення. Оптимальні значення відповідних факторів наведено в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

**Порівняння оптимальних умов мас-спектрометричного визначення
досліджуваних речовин в кислотах та їх солях**

Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови			Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T	U	P			T	U	P
2.18	343	300	142	48	2.26	343	300	142	53
2.19	302	100	138	10	2.27	302	247	149	46
2.20	237	300	144	51	2.28	237	300	144	50
2.21	335	300	139	51	2.29	335	300	141	52
2.22	273	224	135	48	2.30	287	228	138	57
2.23	287	234	137	49	2.31	273	300	144	10
2.24	259	300	140	53	2.32	266	300	145	60
2.25	266	201	0	56	–	–	–	–	–

Вплив температури газа-осушувача на інтенсивність сигналу мас-детектора описується наступним чином: вища температура приводить до відділення аналітів від рухомої фази, тому що вона більш летка, а також до більш ефективного створення іонів, але за відповідної температури буде зростати температурний розпад молекул та іонів досліджуваної речовини. Тому ймовірно, що буде спостерігатися максимум інтенсивності сигналу мас-детектора при відповідній температурі.

Як видно з табл. 3.6, для ряду кислот та відповідних солей спостерігаються близькі оптимальні умови: сполуки **2.18** та **2.26**; **2.20** та **2.28**; **2.21** та **2.29**; **2.22** та **2.30**. Це можна пояснити тим, що речовини в цих парах визначаються в однакових умовах, тобто в однакових формах (протонованих за допомогою формиатної кислоти). Решта сполук можливо відрізняються тим, що при аналізі солей

додаються матричні ефекти, в тому числі іонної супресії або посилення сигналу (**2.32** – цинкова сіль, ймовірно катіон Цинку посилює сигнал).

Аналізуючи оптимальні температури газу-осушувача, можна бачити, що максимальну температуру 300°C витримують більшість кислот та солей, але, наприклад сполука **2.19** та відповідно **2.27** містять замісник фурил, тому вони менш стійкі ніж інші. Оптимальні умови фрагментації не значно відрізняються для всіх кислот та солей і знаходяться в межах 135-149 В. Винятком є сполука **2.25**, оптимальним значенням для неї є 0. Але відповідна цинкова сіль має оптимальне значення напруги фрагментації 145 В, що можна пояснити стабілізацією за допомогою Цинку.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновані рівняння поліноміальної регресії для гідразидів, гідразінкарботіоамідів, 1,2,4-тріазолтіонів, 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот та їх солей. Рівняння показують залежність інтенсивності сигналу мас-детектору від трьох важливих факторів: температури газу осушувача, напругі на фрагментаторі, тиску на небулайзері. Значущість рівнянь підтверджено за допомогою критерію Фішера.

2. На підставі знаходження максимумів розрахованих функцій поліноміальної регресії отримані оптимальні умови мас-спектрометричного детектування для ВЕРХ-ЕСІ-МС ряду гідразидів і карботіоамідів, 1,2,4-тріазолтіонів, 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот та їх солей по 8 схемах синтезу за допомогою повного факторного експерименту по 3 факторам.

3. Запропонований підхід щодо оптимізації умов роботи іонного джерела електроспреї, який був опрацьований на похідних 1,2,4-тріазолів, може бути застосований для інших сполук.

За матеріалами розділу опубліковані роботи [331-334, 336, 337, 351, 353, 359].

РОЗДІЛ 4
ОБГРУНТУВАННЯ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБЛЕННЯ І ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК
ВИЗНАЧЕННЯ АФІ
В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

4.1 Дослідження хроматографічних параметрів утримування речовин

Для того щоб підібрати оптимальні умови хроматографічного визначення напівпродуктів та сировини при синтезі солей 1,2,4-тріазолтіоацетатних кислот, необхідно було дослідити залежність утримування від різних факторів, в першу чергу від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі, який є найбільш суттєвим фактором, що впливає на утримування сполук при їх хроматографуванні [236-238]. Даний підрозділ присвячений встановленню залежностей характеристик ВЕРХ утримування низки сполук, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів.

4.1.1 Умови проведення хроматографічного дослідження. Умови виготовлення розчинів досліджуваних сполук описані в підрозд. 2.4. Хроматографічне дослідження проводили в ізократичному режимі, з використанням буферного розчину: А – H_2O (0,1% HCOOH) та розчину органічного модифікатора: В – CH_3CN (0,1% HCOOH) – 3, 5, 15, 30, 50, 65, 80, 95, 98, 100% В (десять різних складів елюентів). Застосовували колонку Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм, 1,8 мкм, при температурі 40°C. Швидкість потоку елюенту складала 0,4 мл/хв. Як джерело іонів використовували електроспрей в SIM режимі реєстрації іонів, відповідно до молекулярної маси сполук, як вказано в розд. 3, при позитивній полярності. Швидкість газу осушувачу (азоту) дорівнювала 10 л/хв. Напруга на капілярі була 4000 В. Оптимальні умови роботи джерела іонізації наведено в табл. 3.3, 3.5, 3.7.

4.1.2 Процедура оптимізації хроматографічних умов визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та проміжних речовин в їх синтезі. Схема процедури оптимізації хроматографічних умов визначення наведено на рис. 4.1.



Рис. 4.1. Схема процедури оптимізації хроматографічних умов визначення

Автори [5-7, 339] описали умови кількісного визначення похідних ряду 3-тіо-1,2,4-тріазолів методом ВЕРХ із спектрофотометричним детектуванням, для підкислення використовували фосфатний буферний розчин. На відміну від LogP, який пропонується авторами [7, 339] для характеристики похідних 1,2,4-тріазолів пропонуємо використовувати LogD, якій є більш універсальним, тому що залежить від рН середовища і враховує іоногенний характер сполук, також досліджено його зв'язок з утримуванням. Таким чином, знаючи LogD, можна розрахувати коефіцієнти ємності.

Для того щоб охарактеризувати ліпофільні властивості та врахувати іонізацію сполук при різних рН розраховували значення LogD за допомогою програмного комплексу ACDLabs 6.0.

Автор [5, 6] використовував форміатну кислоту як підкислювач, але лише при ідентифікації АФІ, похідних 1,2,4-тріазолу, за допомогою ВЕРХ-МСД-ДМД-ELSD. Пропонуємо також використовувати форміатну кислоту і для кількісного визначення, як більш універсальну, яка не має негативних

властивостей солевих буферів. Форміатна кислота летка, що не заважає використанню за МСД, а також не може впливати негативно на плунжери насосів, які можуть бути подразнені кристалами солі солевого буфера.

Буферний розчин на основі деіонізованої води містив 0,1% мурашиної кислоти. Згідно специфікації Sigma-Aldrich рН такого розчину дорівнює 2,6-2,8 [341]. Що підтверджується розрахунком за загальновідомою формулою: $pH = 1/2pK_a - 1/2lgC_a = 1/2 \cdot 3,75 - 1/2 \cdot lg0,0265 = 2,66$.

Експериментально виміряні значення рН для 100% буферного розчину (вода з 0,1% мурашиної кислоти), та суміші, що складається з 15% органічного модифікатору (ацетонітрил з 0,1% мурашиної кислоти) та 85% буферного розчину (вода з 0,1% мурашиної кислоти), які склали 2,76 та 2,80 відповідно.

Даний розділ в першу чергу присвячений дослідженню зв'язку утримування з вмістом ацетонітрилу в рухомій фазі, який є найбільш суттєвим і специфічним для різних сполук фактором утримування. Таким чином, можна підібрати оптимальний вміст ацетонітрилу для визначення сполук на підставі цільових коефіцієнтів ємності чи графічним способом підібрати умови розділення сполук.

4.1.3 Дослідження характеристик утримування гідразидів карбонових кислот та карботіоамідів. Вивчено закономірності утримування ряду гідразидів та карботіоамідів – вихідних речовин при синтезі солей відповідних 1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатних кислот [336]. Умови мас-спектрометричного детектування наведено в підрозд. 3.3.

Було експериментально досліджено залежність коефіцієнта ємності k для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектору від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі (рис. 4.2-4.5). Можна зазначити, що для гідразидів карбонових кислот (2.1-2.4) спостерігається на початку зменшення коефіцієнту ємності зі зростанням вмісту ацетонітрилу (обернено-фазовий механізм утримування), який, як вказується в монографії Шац та Сахартової [342], близький до розподільного, а потім (більше 80% ацетонітрилу) зростання коефіцієнту ємності (іоно-обмінний механізм взаємодії з сіланоольними групами

азотовмісних катіонів). В разі ж гідразинокарботіоамідів спостерігається виключно обернено-фазовий механізм утримування.

На рис. 4.2-4.7 наявні графіки залежності логарифма коефіцієнта ємності від вмісту ацетонітрилу для мас-спектрометричного детектору.

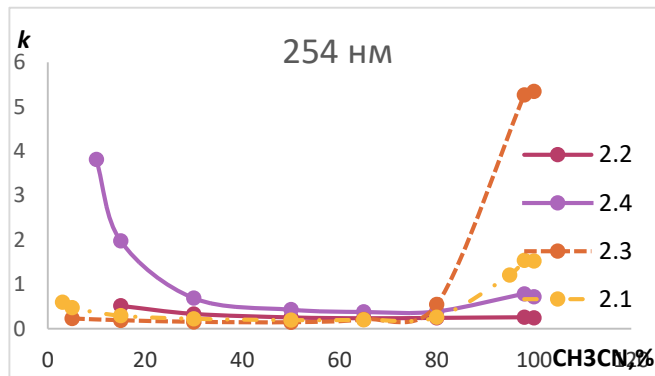


Рис. 4.2. Залежність коефіцієнта ємності (k) гідразидів (2.1-2.4) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

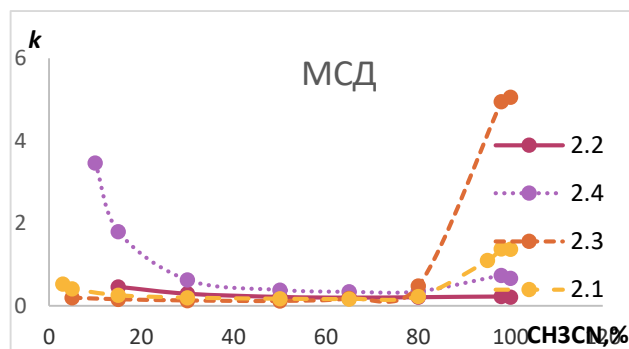


Рис. 4.3. Залежність коефіцієнта ємності (k) гідразидів карбонових кислот (2.1-2.4) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

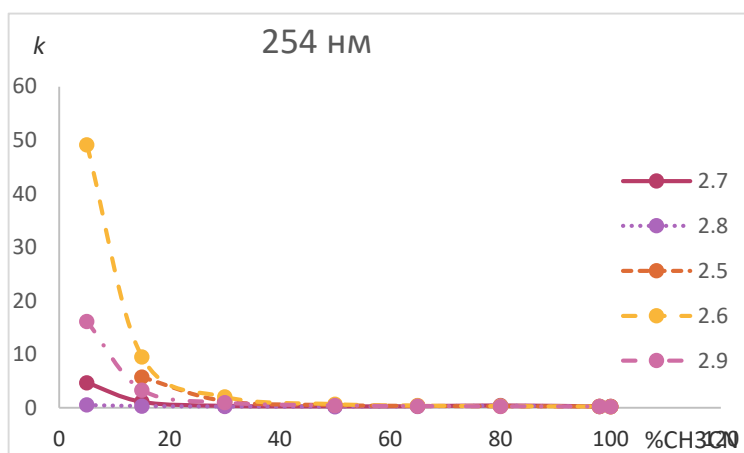


Рис. 4.4. Залежність коефіцієнта ємності (k) гідразинокарботіоамідів (2.5-2.9) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

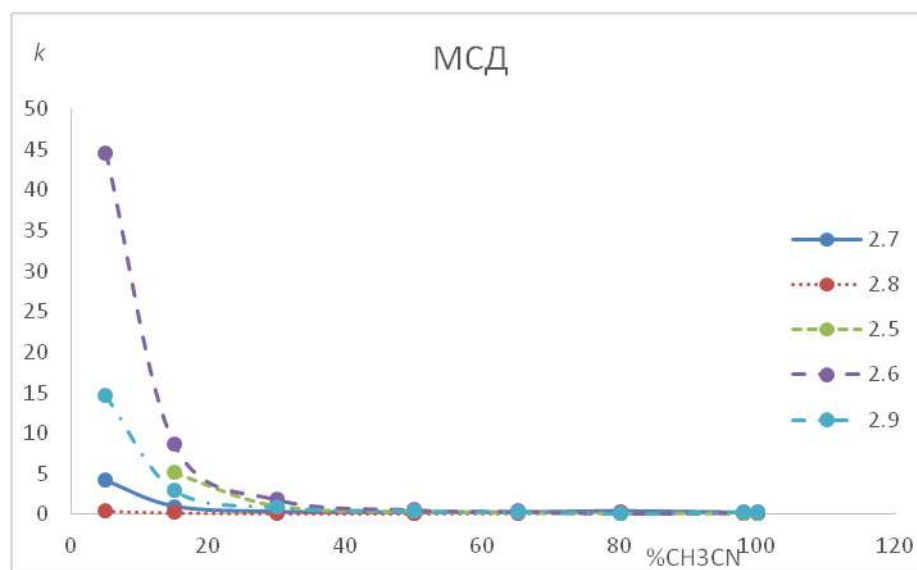


Рис. 4.5. Залежність коефіцієнта ємності (k) гідразинокарботіоамідів (2.5-2.9) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

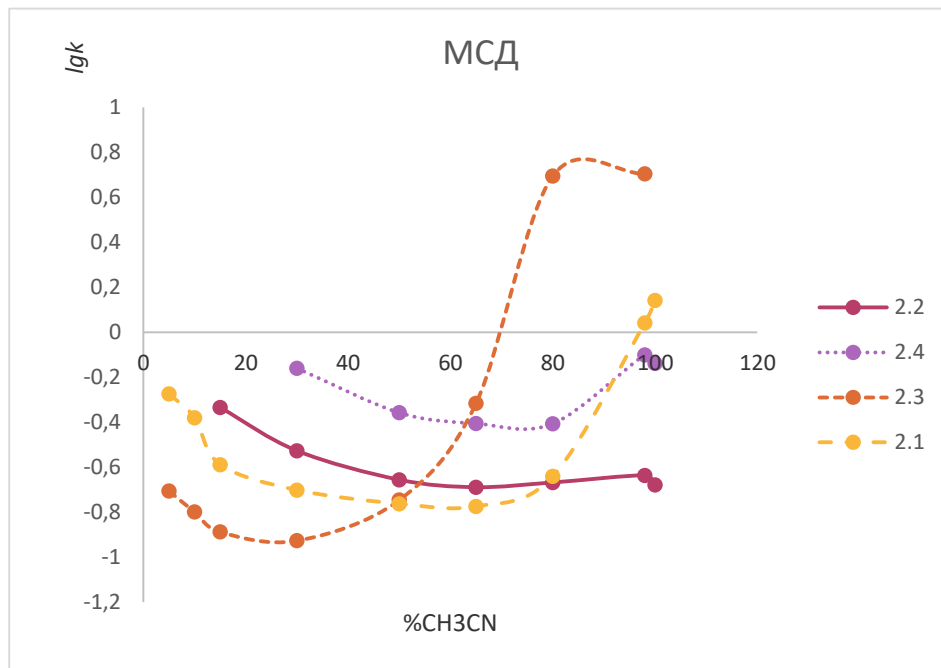


Рис. 4.6. Залежність логарифму коефіцієнта ємності lgk гідразидів (2.1-2.4) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

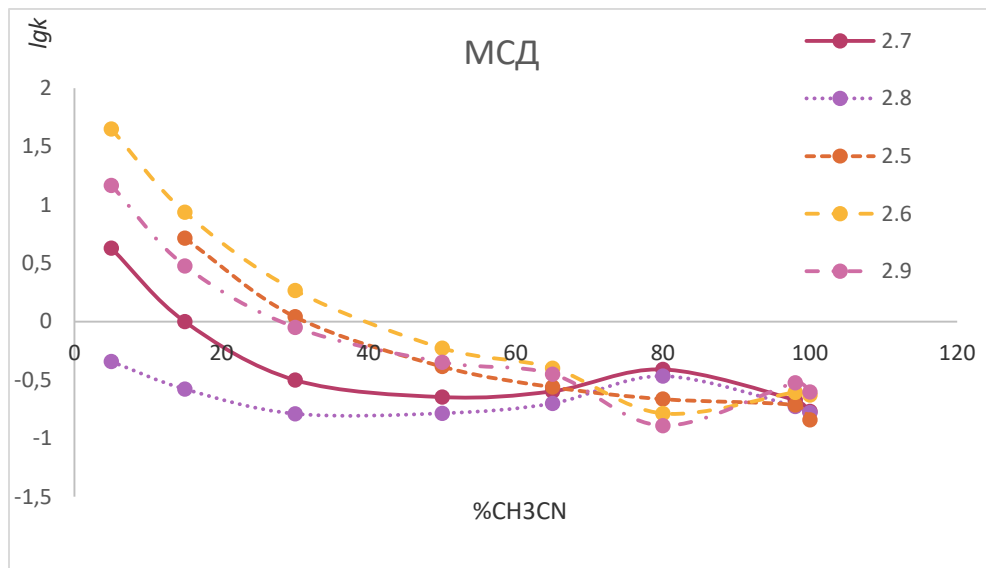


Рис. 4.7. Залежність логарифму коефіцієнта ємності (lgk) гідразинокарботіоамідів (2.5-2.9) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

За допомогою програми ACDLabs 6 розраховані значення LogP. Найбільш гідрофобні молекули краще утримуються на обернено-фазовому сорбенті та краще розчиняються в октанолі ніж у воді. В ряду досліджуваних сполук спостерігається залежність між коефіцієнтом ємності та LogP. Виключенням є сполуки **2.1-2.2**, **2.5** та **2.8** (рис. 4.8-4.9). Це можна пояснити тим, що є значний вплив рН на співвідношення іонізованої та неіонізованої форми, внаслідок різних констант іонізації.

Для того щоб врахувати іонізацію сполук при відповідних значеннях рН розраховані значення LogD (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

**Значення LogP, LogD та коефіцієнтів ємності *k* при 15% CH₃CN
(по мас-спектрометричному детектору)**

Сполука	<i>k</i> , 15%CH ₃ CN, МСД	LogP	LogD при 2,8
2.1	0,257071	-0,89+/- 0,24	-2,01
2.2	0,462121	-0,96+/- 0,26	-1,3
2.3	0,158586	-1,71+/- 0,40	-4,58
2.4	1,80101	0,25+/- 0,25	-0,13
2.5	5,181818	1,27+/- 0,60	0,68
2.6	8,641414	1,43+/- 0,61	1,43
2.7	0,999495	0,81+/- 0,64	-1,68
2.8	0,264141	-0,94+/- 0,64	-3,47
2.9	2,993434	0,28+/- 0,60	0,27

Порівняння рис. 4.8, 4.10 та рис. 4.9, 4.11 показує, що LogD краще ніж LogP корелює із коефіцієнтами ємності.

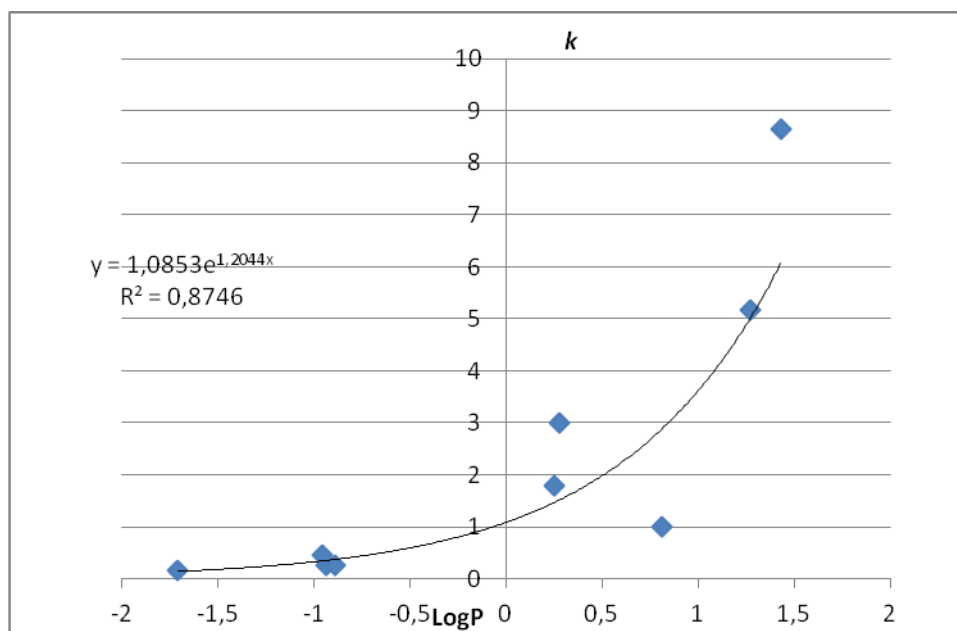


Рис. 4.8. Залежність коефіцієнта ємності k для сполук **2.1-2.9** (при 15% CH_3CN) від LogP

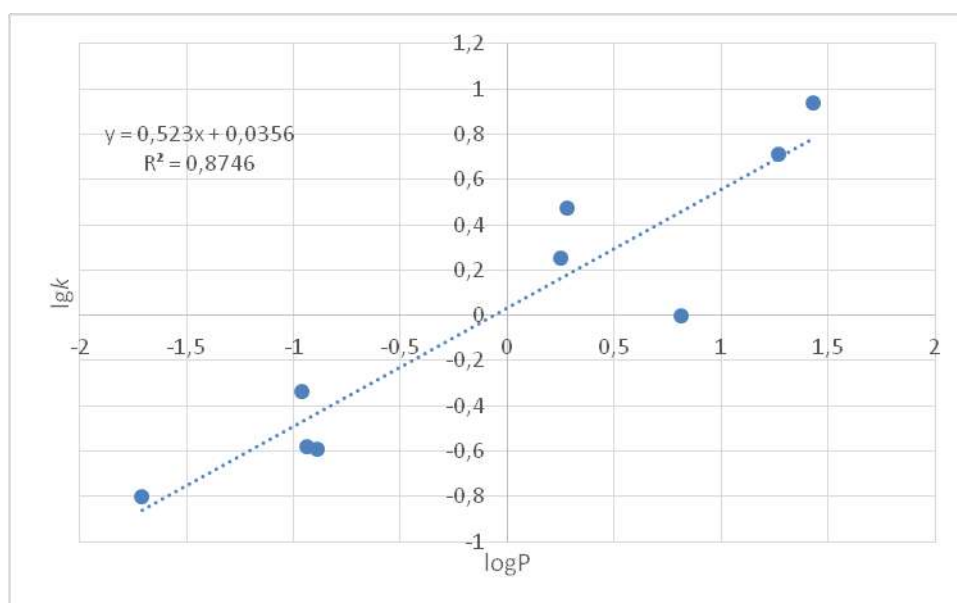


Рис. 4.9. Залежність логарифма коефіцієнта ємності сполук **2.1-2.9** (15% CH_3CN) від LogP

Коефіцієнти ємності при цьому синхронно (експоненціальна залежність) змінюються з розрахованими значеннями LogD (рис. 4.10).

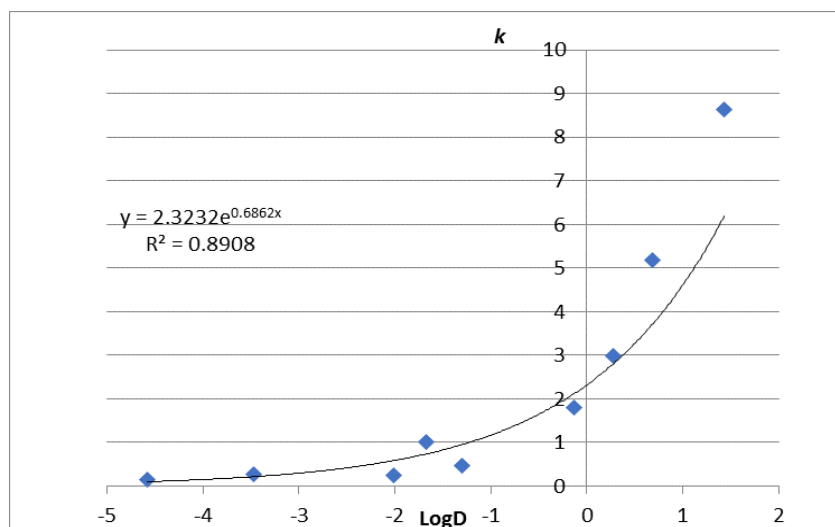


Рис. 4.10. Залежність коефіцієнта ємності k для сполук **2.1-2.9** (при 15% CH_3CN) від LogD

Зв'язок $\lg k$ та LogD носить лінійний характер (рис. 4.11).

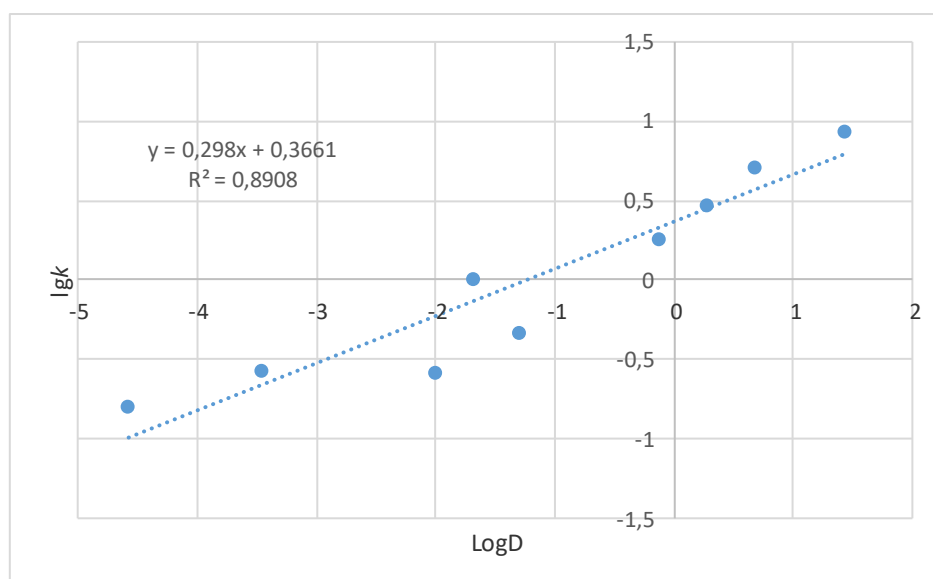


Рис. 4.11. Залежність логарифма коефіцієнта ємності ($\lg k$) для сполук **2.1-2.9** (15% CH_3CN) від LogD

Отримані рівняння можна запропонувати для визначення LogD із результатів визначення коефіцієнтів ємності при хроматографії.

4.1.4 Дослідження характеристик утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів. Експериментально досліджено залежність коефіцієнта ємності

k для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектору від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі (рис. 4.12-4.13). В підрозд. 3.4 запропоновані умови мас-спектрометричної детекції.

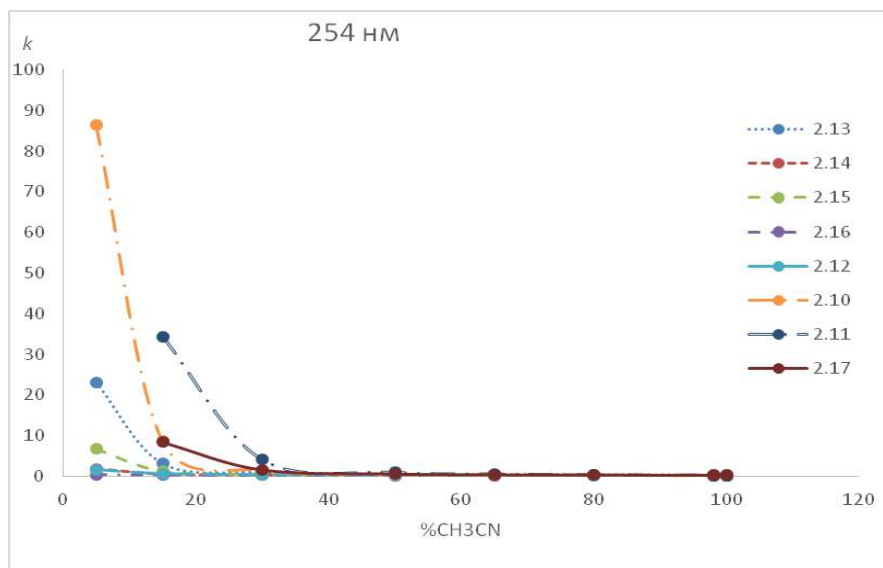


Рис. 4.12. Залежність коефіцієнта ємності (k) тіонів від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

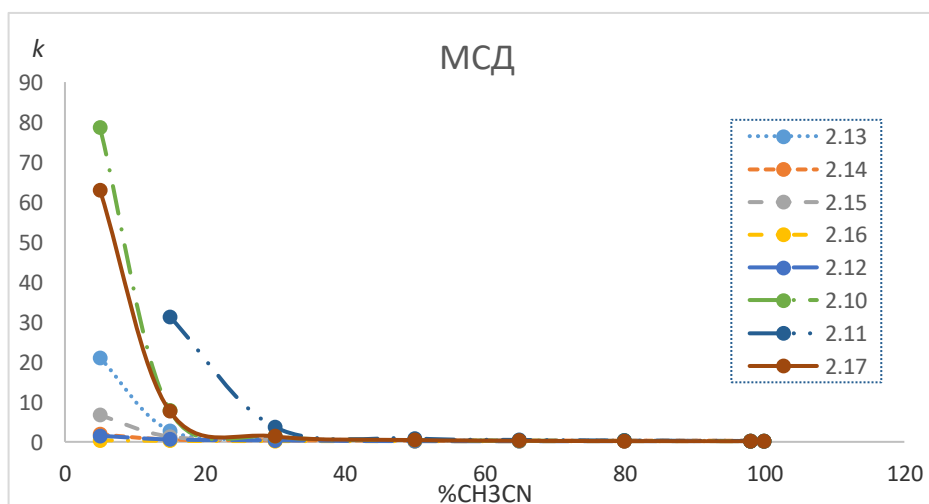


Рис. 4.13. Залежність коефіцієнта ємності (k) тіонів від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

На рис. 4.14 наведено графік залежності логарифму коефіцієнта ємності від вмісту ацетонітрилу для мас-спектрометричного детектору.

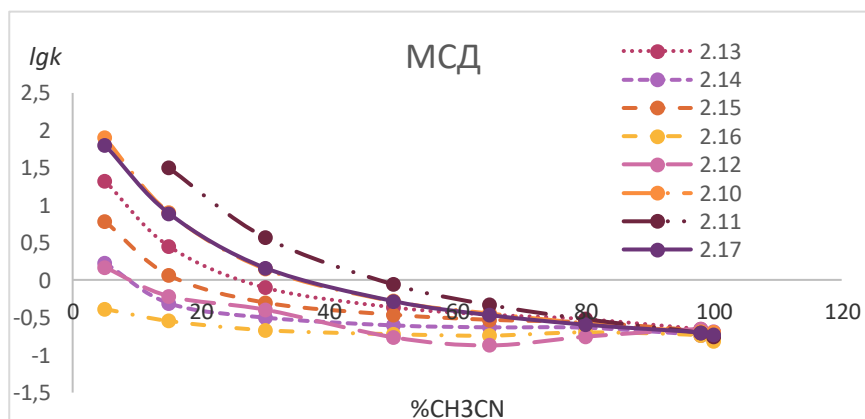


Рис. 4.14. Залежність логарифма коефіцієнта ємності (lgk) тіонів **2.10-2.17** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

На рис. 4.15-4.16 наведено залежність логарифму коефіцієнта ємності від логарифму вмісту ацетонітрилу для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектору. Для більшості аналітів (виняток **2.12**) спостерігається практично лінійний зв'язок між логарифмами коефіцієнтів ємності та логарифмом вмісту ацетонітрилу.

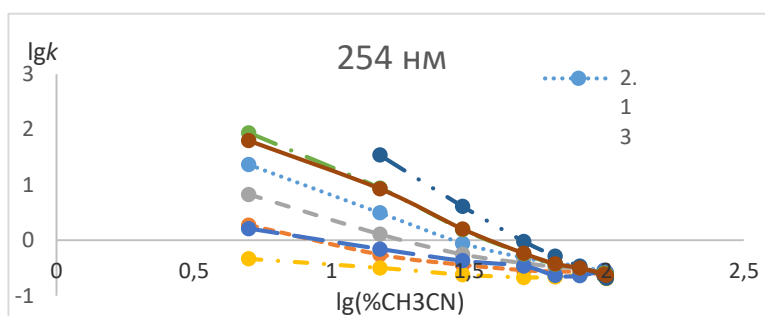


Рис. 4.15. Залежність логарифму коефіцієнта ємності (lgk) тіонів **2.10-2.17** від логарифма концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

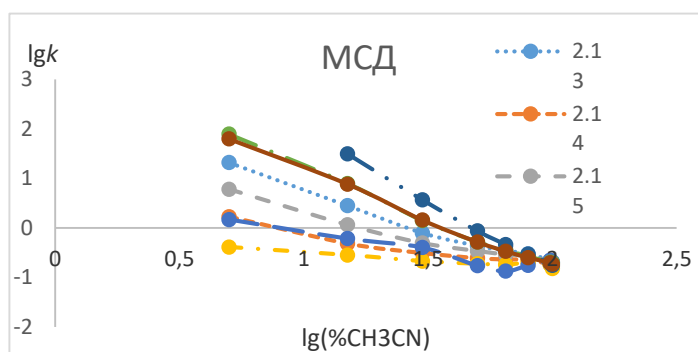


Рис. 4.16. Залежність логарифма коефіцієнта ємності ($\lg k$) тіонів **2.10-2.17** від логарифму концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

Можна зазначити, що для більшості досліджуваних 1,2,4-тріазол-3-тіонів (**2.10-2.11**, **2.13-2.17**) спостерігається зменшення коефіцієнту ємності зі зростанням вмісту ацетонітрилу, що відповідає звичайному механізму утримування в обернено-фазовій хроматографії. В обернено-фазовій хроматографії час перебування сполуки в колонці більше для полярних рухомих фаз, з ростом концентрації ацетонітрилу полярність рухомої фази знижується, тому утримування знижується [342-344]. Як відомо із літератури [342] для ряду аналітів може спостерігатися параболічна залежність логарифма коефіцієнта ємності від логарифма вмісту ацетонітрилу. У цих аналітів найімовірніше присутній також іонообмінний механізм сорбції.

Розраховано LogD для тіольної та тіонної таутомерних форм сполук при рН 2,8 (табл. 4.2).

Коефіцієнти ємності при цьому синхронно (експоненціальна залежність) змінюються з розрахованими значеннями LogD (рис. 4.17).

**Значення LogD та коефіцієнтів ємності k при 15% CH₃CN
(за мас-спектрометричним детектором)**

Сполука	LogD при рН 2,8 тіольна форма	LogD при рН 2,8 тіонна форма	k , 15% CH ₃ CN, МСД	$\lg k$, 15% CH ₃ CN, МСД
2.10	2,88	-1,54	7,89	0,897
2.11	2,19	1,12	31,3	1,495
2.12	0,004000	-1,66	0,608	-0,216
2.13	-0,0110	-1,96	2,82	0,450
2.14	-2,51	-3,80	0,486	-0,313
2.15	-2,02	-3,27	1,15	0,0618
2.16	-2,55	-3,56	0,284	-0,546
2.17	1,02	0,540	7,70	0,886

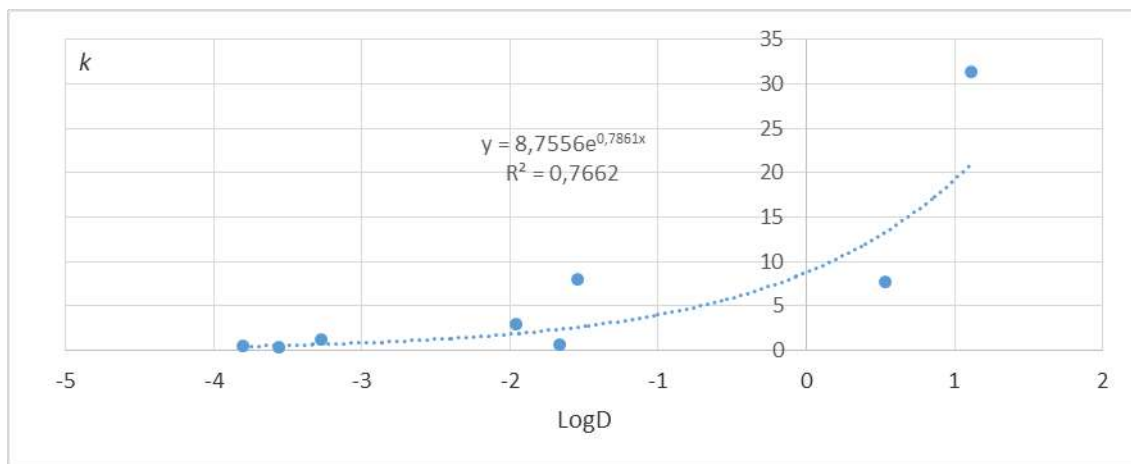


Рис. 4.17. Залежність коефіцієнта ємності k тіонних форм (при 15% CH₃CN) від LogD (по мас-спектрометричному детектору)

Зв'язок $\lg k$ та LogD носить лінійний характер (рис. 4.18).

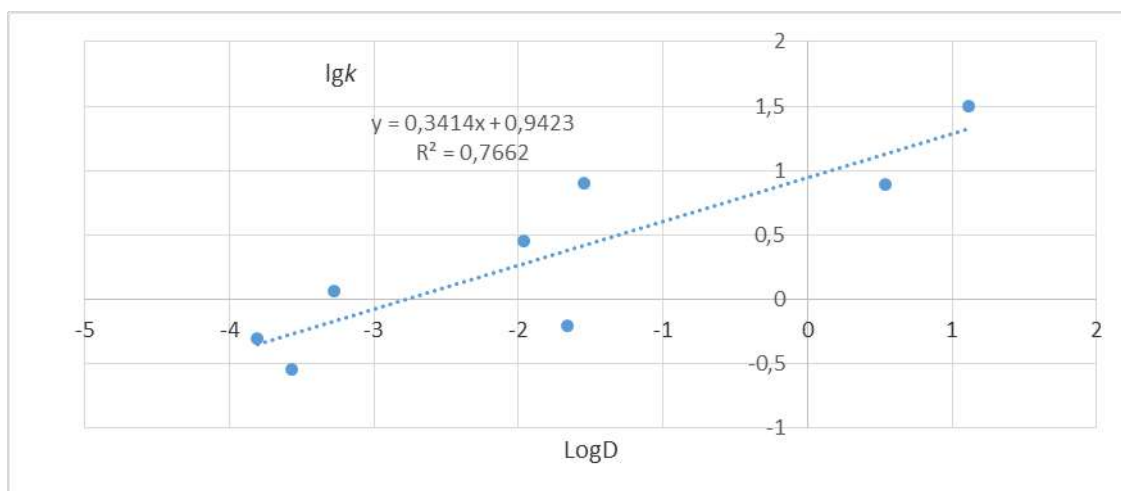


Рис. 4.18. Залежність логарифму коефіцієнта ємності lgk тійонних форм (15% CH_3CN) від $LogD$ (по МСД)

Розраховані залежності можна використовувати для визначення $LogD$ із результатів визначення коефіцієнтів ємності при проведенні хроматографічних досліджень.

4.1.5 Дослідження характеристик утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей. З метою дослідження характеру залежності часу утримування від складу рухомої фази для ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС визначення ряду 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот та їх солей було експериментально вивчено залежність коефіцієнта ємності k для діодно-матричного та мас-спектрометричного детектора від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі (рис. 4.19-4.22), для подальшого використання отриманих залежностей при розробці методик їх кількісного визначення як індивідуально, так і разом із домішками до субстанцій (гідразидами, карботіоамідами кислот, та відповідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів). Мас-спектрометричне детектування проводили в режимі іонізації в електроспреї, оптимальні умови якої були встановлені експериментально та описані в підрозд. 3.5.

1,2,4-Тріазоліл-3-тіоацетатні кислоти та відповідні солі елюються практично однаково, тому що в кислому середовищі елюенту солі переходять в кислотну форму.

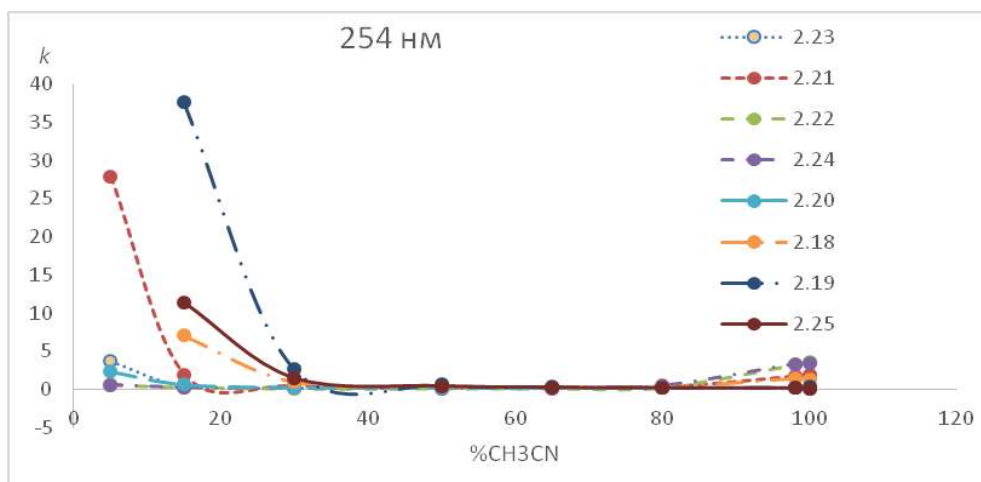


Рис. 4.19. Залежність коефіцієнта ємності (k) 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот **2.18-2.25** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

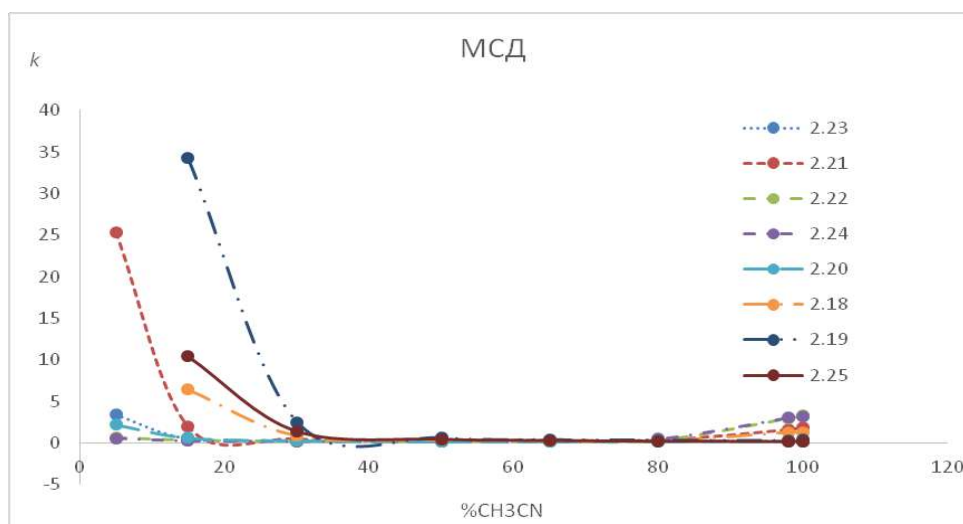


Рис. 4.20. Залежність коефіцієнта ємності (k) 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот **2.18-2.25** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

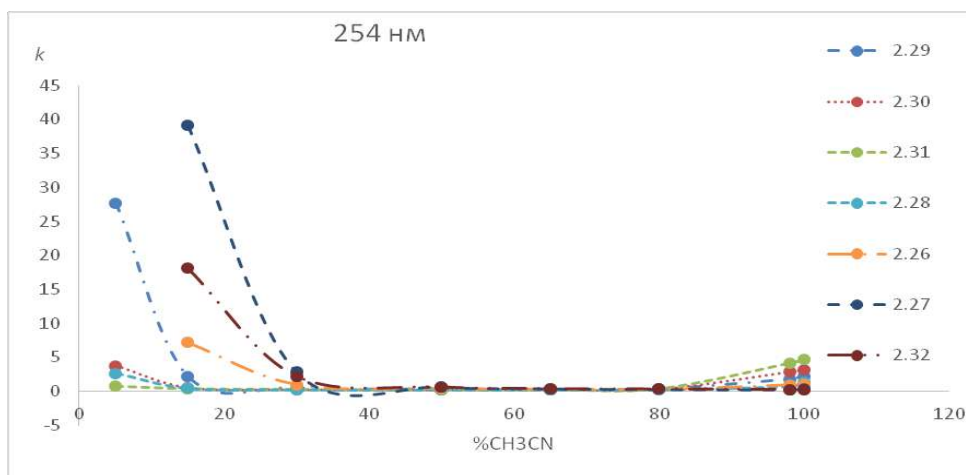


Рис. 4.21. Залежність коефіцієнта ємності (k) солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот **2.26-2.32** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі при 254 нм

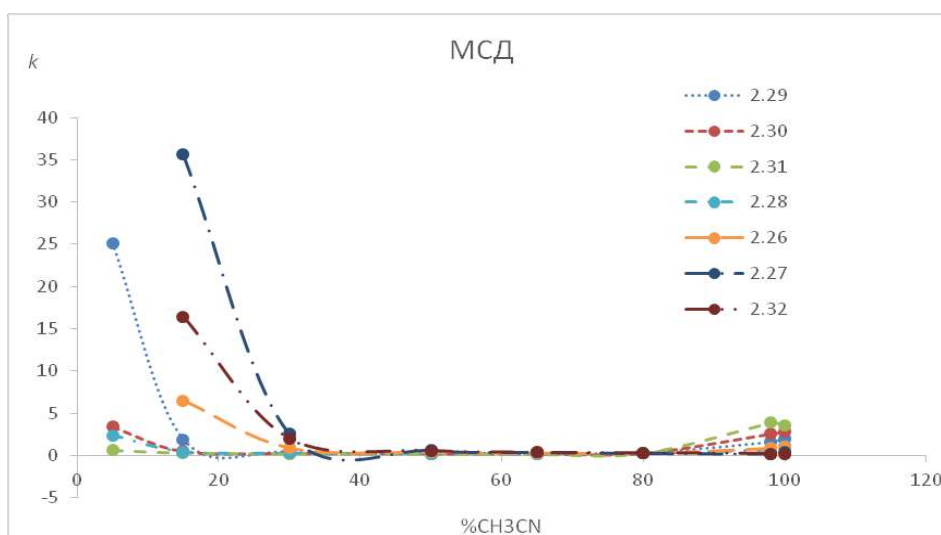


Рис. 4.22. Залежність коефіцієнта ємності (k) солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот **2.26-2.32** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

Можна зазначити, що для досліджуваних 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот (**2.18-2.25**) (рис. 4.23-4.24) та відповідних солей (**2.26-2.32**) (рис. 4.25-4.26) спочатку спостерігається зменшення коефіцієнту ємності зі зростанням вмісту ацетонітрилу (обернено-фазовий механізм утримування).

При концентрації ацетонітрилу більше 80% фіксується зростання коефіцієнта ємності зі збільшенням вмісту ацетонітрилу (іонно-обмінний

механізм взаємодії з силанольними групами). Повідомляється [342], що подібна залежність спостерігається для широкого кола протонуваних лікарських речовин основного характеру. В роботі [342] також стверджується, що підвищення утримування при більших концентраціях органічного модифікатору обумовлено полярною взаємодією речовин із стаціонарною фазою та найбільш ймовірним механізмом такої взаємодії є іонний обмін.

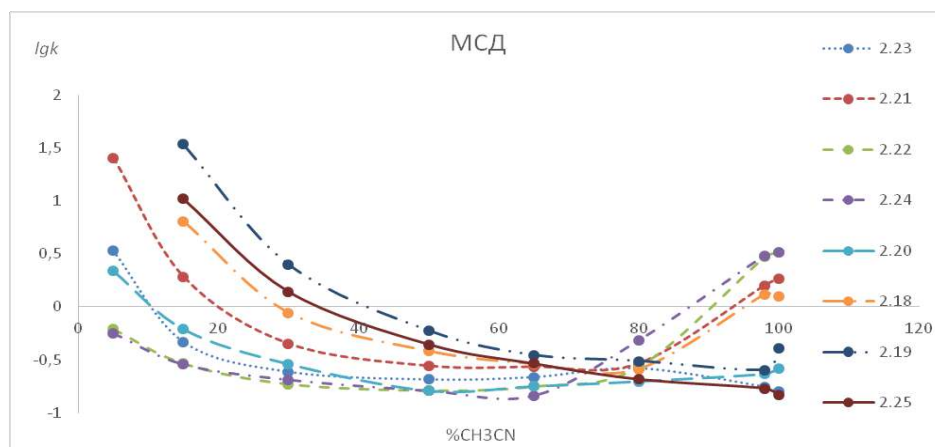


Рис. 4.23. Залежність логарифма коефіцієнта ємності (lgk) 1,2,4-тріазол-3-ілітіоацетатних кислот **2.18-2.25** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

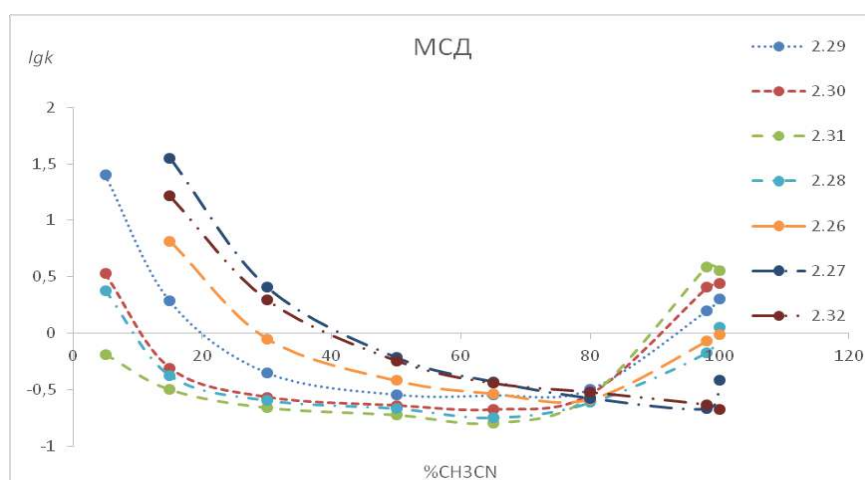


Рис. 4.24. Залежність логарифма коефіцієнта ємності (lgk) солей 1,2,4-тріазол-3-ілітіоацетатних кислот **2.26-2.32** від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

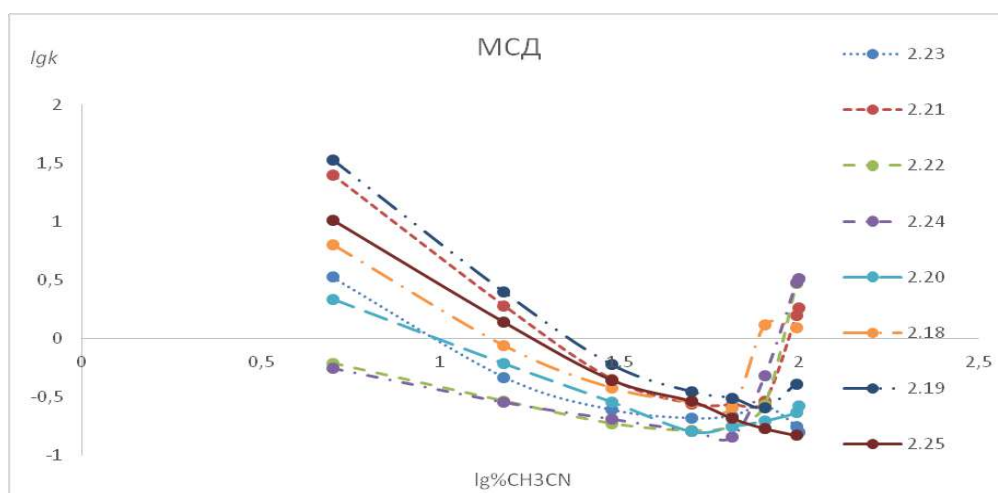


Рис. 4.25. Залежність логарифма коефіцієнта ємності ($\lg k$) 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот **2.18-2.25** від логарифму концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

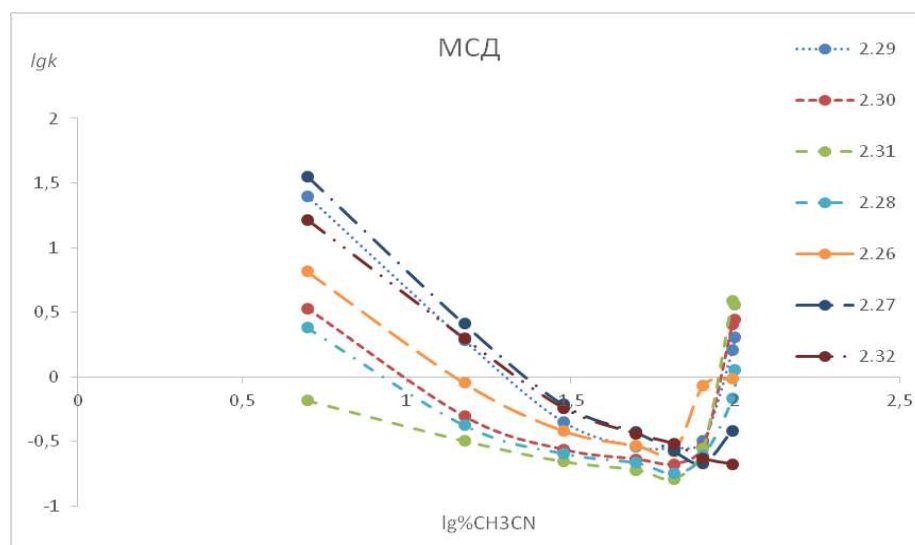


Рис. 4.26. Залежність логарифма коефіцієнта ємності ($\lg k$) солей 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот **2.26-2.32** від логарифму концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на мас-спектрометричному детекторі в режимі SIM

Для більшості аналітів спостерігається наступна залежність: практично лінійне зниження логарифма коефіцієнту ємності із зростанням логарифма вмісту ацетонітрилу при зміні вмісту ацетонітрилу від 5 до 65%, а потім

зростання при зміні вмісту ацетонітрилу від 65 до 100%. Для кислоти **2.25** та відповідної солі **2.32** спостерігається практично лінійне зниження протягом всього діапазону концентрацій ацетонітрилу (рис. 4.25-4.26).

На підставі отриманих залежностей можливо обрати умови хроматографічного дослідження з необхідним часом аналізу окремих сполук, а також підібрати умови визначення таких сполук в сумішах, визначивши максимальну різницю в коефіцієнтах утримування графічним способом. При наявності подібних залежностей для інших сполук можливим є теоретичне обґрунтування умов їх розділення в сумішах з відповідними сполуками.

Коефіцієнти ємності при цьому синхронно (експоненціальна залежність) змінюються з розрахованими значеннями LogD (рис. 4.27).

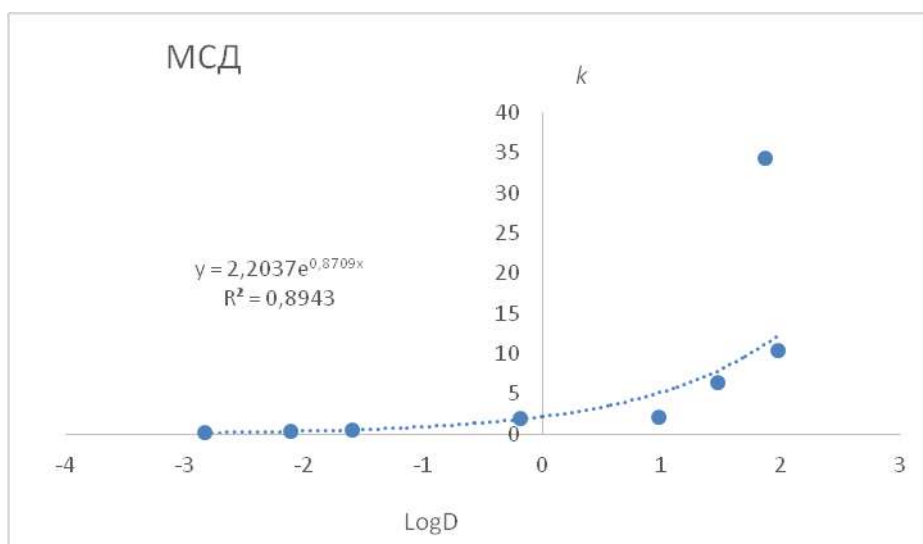


Рис. 4.27. Залежність коефіцієнта ємності k 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот (2.18-2.25) (при 15% CH_3CN) від LogD

Зв'язок $\lg k$ та LogD носить лінійний характер (рис. 4.28).

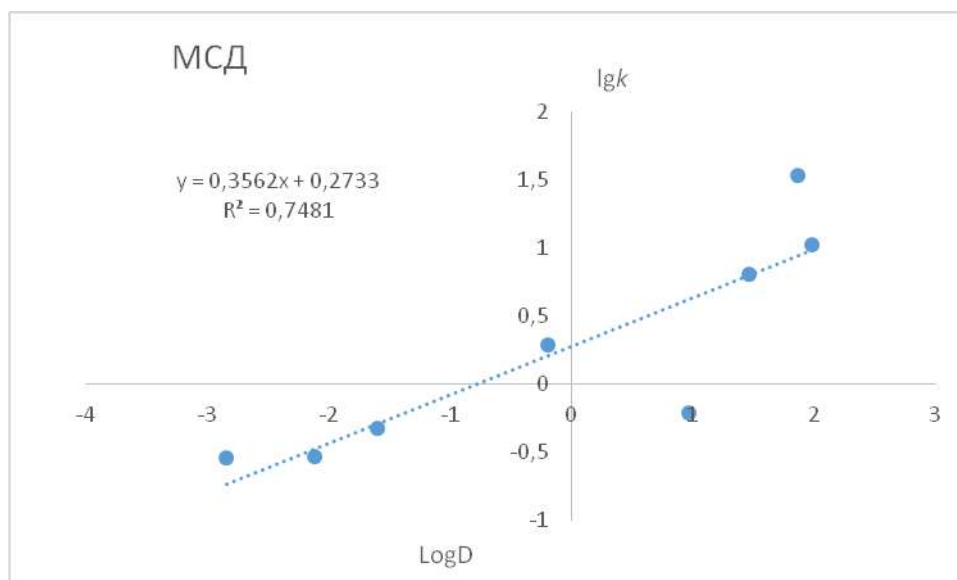


Рис. 4.28. Залежність логарифма коефіцієнта ємності lgk 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот **2.18-2.25** (15% CH_3CN) від $LogD$

Отримані закономірності можна пропонувати для визначення $LogD$ нових 1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатних кислот на підставі хроматографічних даних утримування.

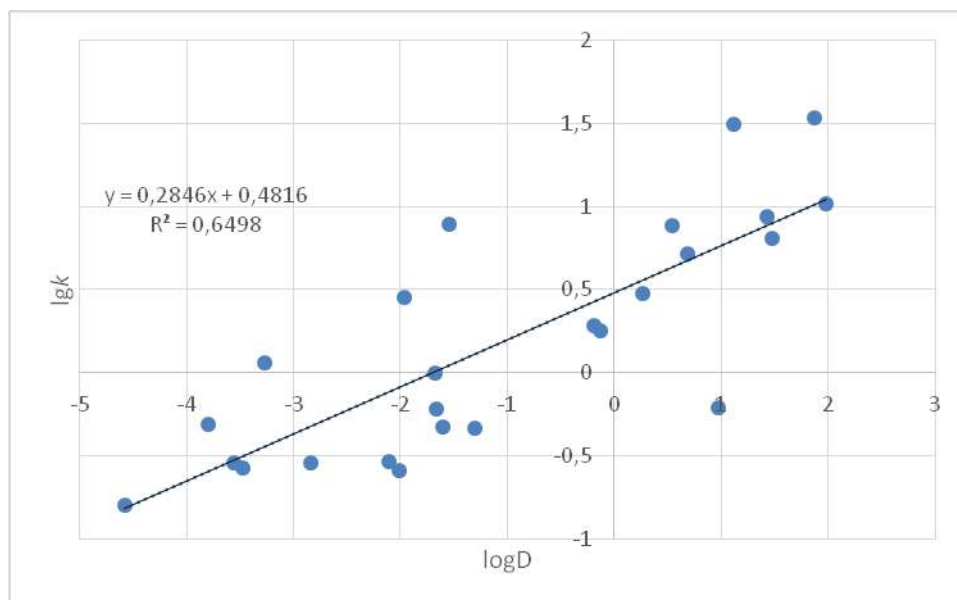


Рис. 4.29. Об'єднана залежність логарифма коефіцієнта ємності lgk для гідразидів та карботїоамїдів кислот **2.1-2.9**, 1,2,4-тріазол-3-тіонів **2.10-2.17**, 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот **2.18-2.25** (15% CH_3CN) від $LogD$

На рис. 4.29 наведена залежність логарифму коефіцієнта ємності для гідразидів та карботіоамідів кислот, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот від LogD . Аналіз даних показує близькість загальної залежності до лінійної, але якість кореляції краще для окремих класів сполук, що показує зв'язок даної закономірності зі структурою. Для усіх класів тангенс кута нахилу (кутовий коефіцієнт) близький до 0,3. Найбільша різниця спостерігається для вільного члена в рівнянні прямої та є більш специфічною величиною для кожного класу.

4.2 Хроматографічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок до нього

Як показано в огляді літератури технологічними домішками до солей 2-тіо-1,2,4-тріазолів можуть бути відповідні карботіоаміди та 1,2,4-тріазоліл-5-тіони [6, 7]. Виходячи зі схеми синтезу (рис. 4.30) основними специфічними домішками для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (**2.26**) можуть бути піридин-4-карбогідрозид (**2.1**), 2-ізонікотіноіл-*N*-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоамід (**2.5**), 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.10**), що підтверджується хромато-мас-спектрометричними дослідженнями субстанції. Вказані речовини можуть потрапляти в субстанцію тіометризолу в процесі синтезу.

Внаслідок необхідності визначення цих речовин проведено вибір оптимальних умов розділення домішок та АФІ Тіометризолу, а також розроблено та провалідовано хроматографічні методики визначення цих речовин.

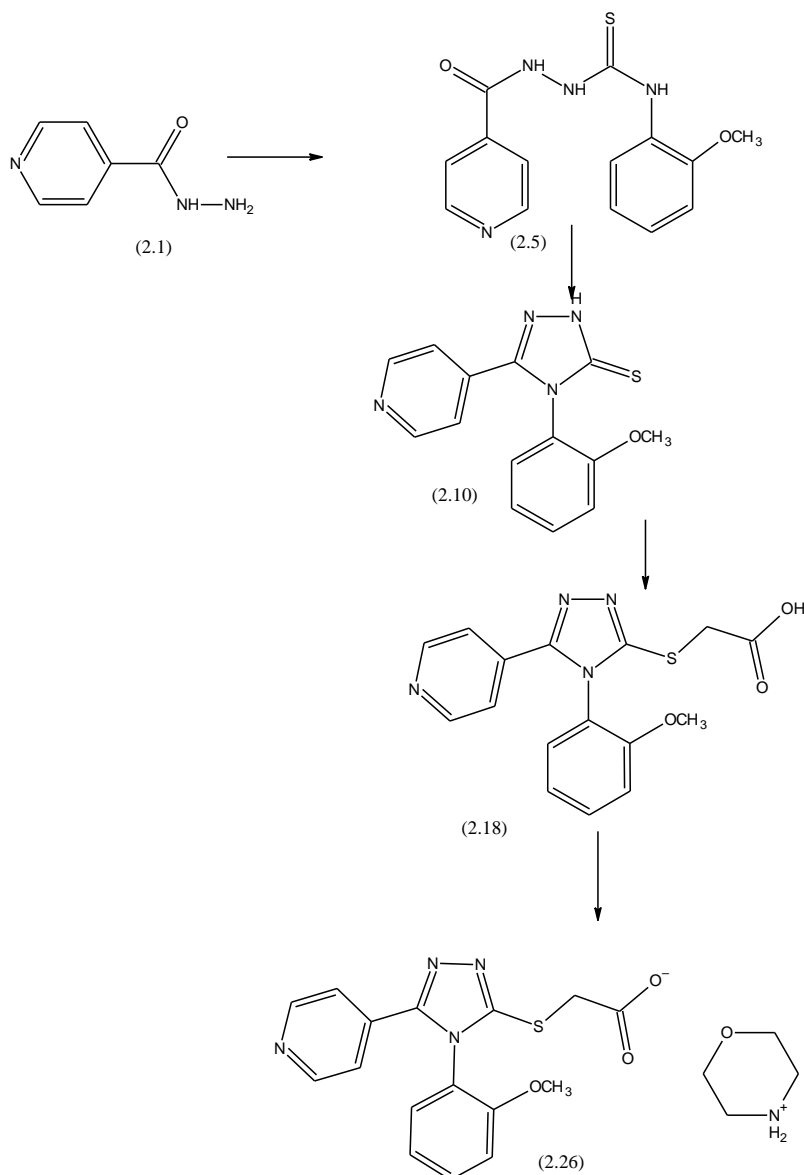


Рис. 4.30. Схема синтезу АФІ Тіометризолу

4.2.1 Вибір оптимальних умов розділення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок до нього, використання цих умов для створення методики кількісного визначення. В розд. 4.1 запропоновано та обґрунтовано вибір нерухої та рухої фази, проведено дослідження хроматографічної поведінки ряду похідних 1,2,4-триазолу та напівпродуктів при їх синтезі.

Виходячи з отриманих даних, будемо графік залежності коефіцієнта ємності від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі для потенційних домішок та АФІ тіометризолу.

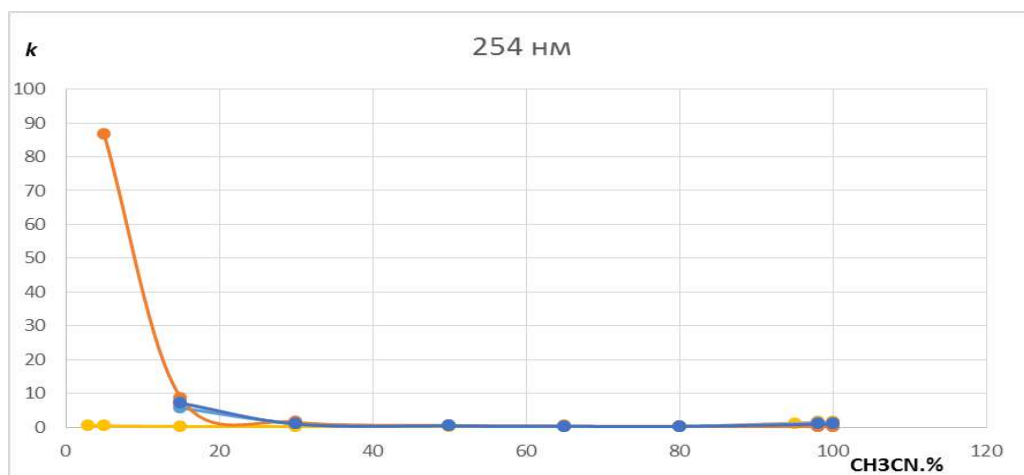


Рис. 4.31. Залежність коефіцієнта ємності від концентрації ацетонітрилу

З графіку видно, що максимальна різниця між лініями знаходиться біля 16-18%. Коефіцієнт розділення (R_s) є показником, який показує якість розділення. У цьому дослідженні важливим є розділення між піками АФІ та піками карботіоаміду (2.5) та тіону (2.10). Експериментальне визначення та розрахунок коефіцієнту розділення (R_s) проведено згідно ДФУ (ЄФ) [310, 319] за допомогою OpenLAB CDS Software.

Згідно із вимогами ДФУ [310] коефіцієнт розділення повинен бути більше, ніж 1,0. Сума коефіцієнтів розділення максимальна і стандартне відхилення значень цих коефіцієнтів було мінімальне при 16% (табл. 4.3). Тому оптимальний вміст ацетонітрилу є 16%.

Таблиця 4.3

**Залежність коефіцієнта розділення від вмісту ацетонітрилу
для сполук 2.5 і 2.26, 2.26 і 2.10**

Показник	Концентрація		
	16%	17%	18%
R_s 2.5 і 2.26	2,96	2,1	1,27
R_s 2.26 і 2.10	2,65	3,37	3,62
Сума	5,61	5,47	4,89
SD	0,219	0,898	1,662

Дослідження УФ спектрів АФІ тіометризолу та домішок дозволяє вибрати аналітичні довжини хвилі, які можна використовувати для визначення відповідних сполук. Максимуми поглинання сполук відповідно мають значення 266 нм (гідразид **(2.1)**), 254 нм (карботіоамід **(2.5)**), 258 нм (тіон **(2.10)**) (рис. 4.32).

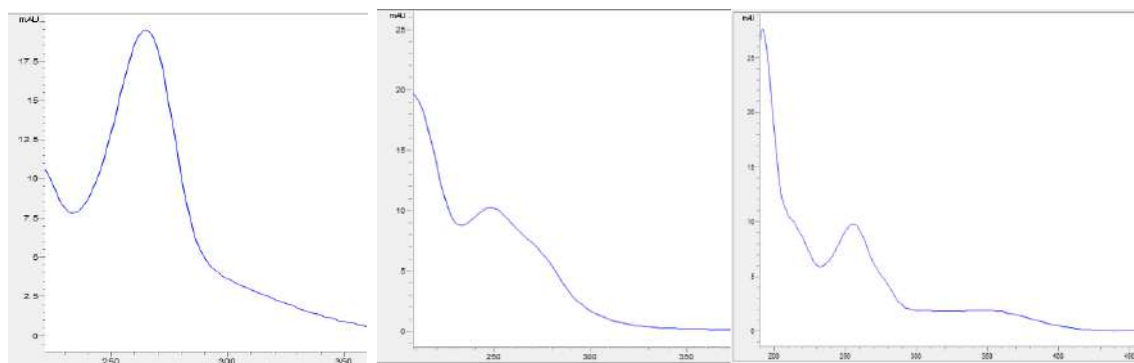


Рис. 4.32. УФ-спектри піридин-4-карбогідрозиду, 2-ізонікотіноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону

Пік активного фармацевтичного інгредієнту є однорідним, що підтверджується, як за допомогою мас-спектрометричного (рис. 4.33), так і діодно-матричного детектору (рис. 4.34).

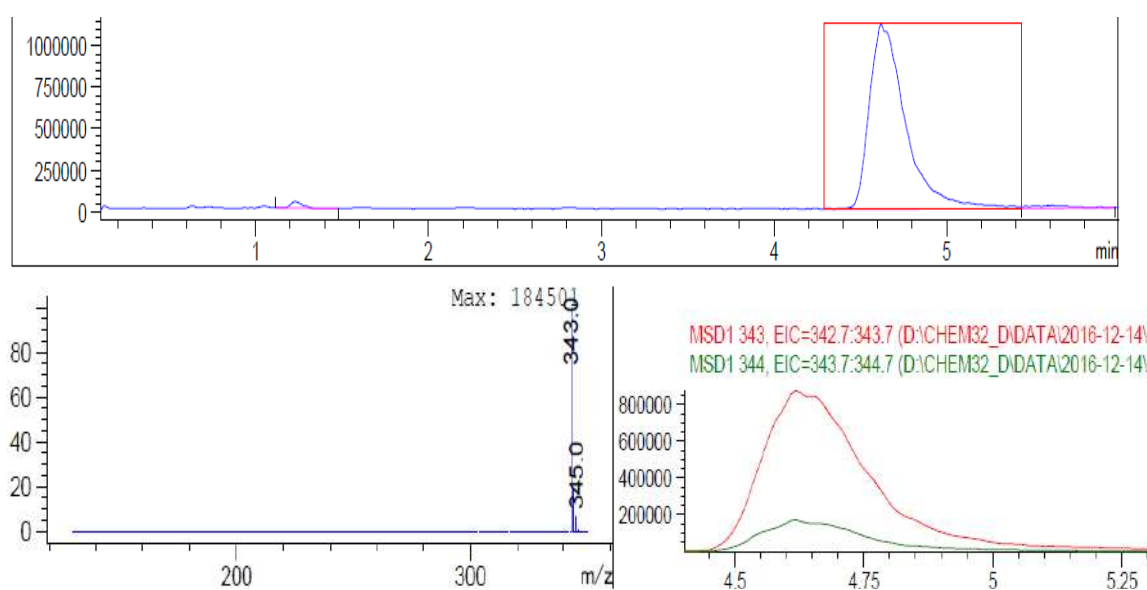


Рис. 4.33. Хроматограми за мас-спектрометричним детектором та мас-спектр сполуки **2.26** (АФІ Тіометризолу)

УФ-спектри, що отримані на різних частинах хроматографічного піку співпадають (рис. 4.33), що підтверджує чистоту піку. Максимум поглинання світла для АФІ дорівнює 272 нм. Спектри поглинання вимірювали в кюветі діодно-матричного детектору при елююванні речовини 16% ацетонітрилом, що містить 0,1% мурашиної кислоти.

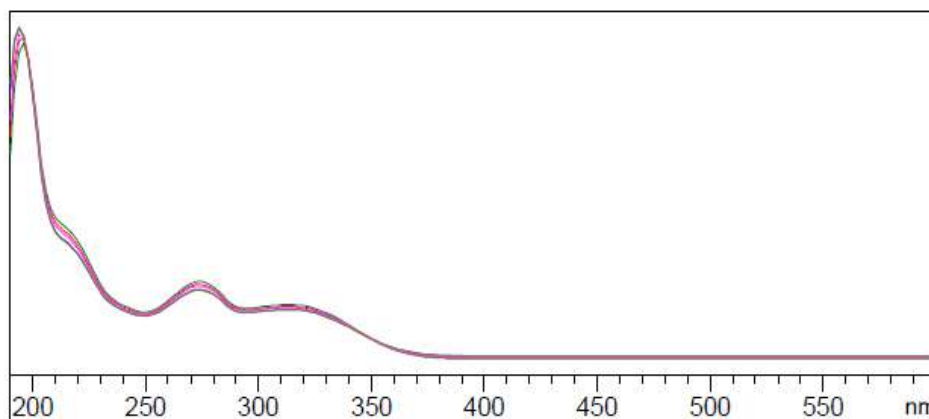


Рис. 4.34. Спектри сполуки **2.26** (АФІ) на ДМД на різних частках хроматографічного піку

На хроматограмі (рис. 4.35) модельного розчину субстанції тіометризолу із додаванням домішок при 272 нм (концентрація АФІ 0,5 г/л, об'єм інжекції 5 мкл) спостерігалися домішки гідразиду (**2.1**) (0,694 хв), карботіоаміду (**2.5**) (3,859 хв), тіону (**2.10**) (5,566 хв). Час утримування АФІ 4,919 хв.

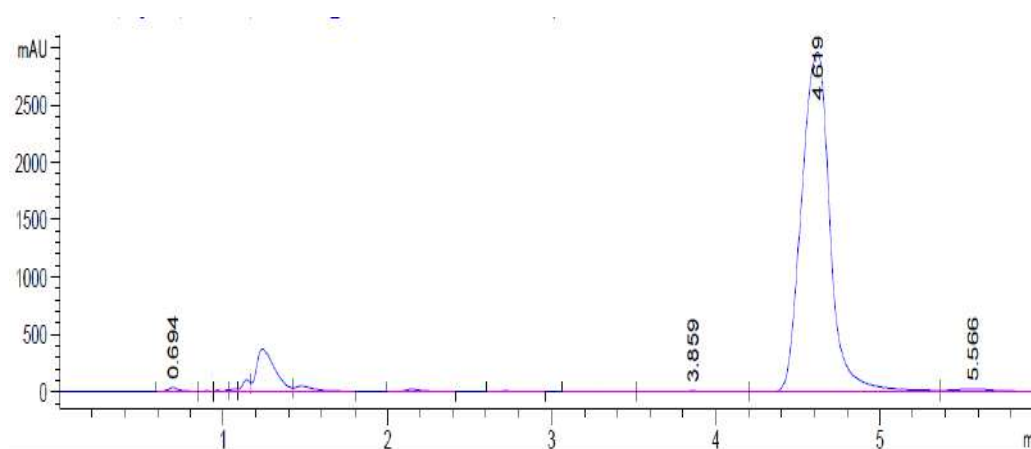


Рис. 4.35. Хроматограма модельного розчину субстанції Тіометризолу з додаванням домішок при 272 нм

Характеристики хроматографічних піків (ефективність колонки N за піком, коефіцієнт розділення R) наведені в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Характеристики хроматографічних піків сполук 2.1, 2.5, 2.10, 2.26 (АФІ)

N				R	
2.1, т.т.	2.5, т.т.	2.10, т.т.	2.26, т.т.	(між 2.26 та 2.5)	(між 2.10 та 2.26)
500	4700	3500	4500	2,96	2,65

Методики визначення сполук **2.1, 2.5, 2.10, 2.26** [345-347] запропоновані на підставі оптимальних умов розділення [336-338].

4.2.2 Методика визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції. Випробування проводять методом високоефективної рідинної хроматографії з діодноматричною детекцією.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Сертифікований фармакопейний стандартний зразок: морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (АФІ) [349].

Робочі стандартні зразки: піридин-4-карбогідразид, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон.

Умови хроматографування:

- колонка – \varnothing 4,6 × 30 мм, обернена фаза C18, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (84:16);

- об'єм проби – 2 мкл;
- детектор – діодно-матричний ($\lambda = 272$ нм (АФІ), 266 нм (**2.1**), 254 нм (сполука **2.5**), 258 нм (**2.10**)).

Перевірка придатності хроматографічної системи. Ефективність колонки N за піком АФІ повинна становити ≥ 4500 теоретичних тарілок, коефіцієнт розділення повинен становити $R \geq 2,96$ (між піками АФІ та сполуки **2.5**) та $R \geq 2,65$ (між піками **2.10** та АФІ).

Приготування рухомої фази А. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування рухомої фази В. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, доводять об'єм розчину до позначки тим же розчинником та перемішують.

Приготування розчину стандартного зразка АФІ (розчин порівняння). Близько 50 мг (точна наважка) стандарту зразку морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату поміщають в мірну колбу 100,0 мл, розчиняють у 50 мл воді високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим же розчинником і ретельно перемішують.

Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. 5 мг робочих стандартних зразків сполук **2.1**, **2.5**, **2.10** додають до мірної колби 100,0 мл, розчиняють в 50 мл диметилсульфоксиду, доводять до позначки водою і ретельно перемішують (розчин **IA**).

50 мг робочого стандартного зразка АФІ додають до мірної колби 100,0 мл, розчиняють в 50 мл суміш вода високоочищена – ацетонітрил (84:16) додають 1,00 мл розчину **IA**, доводять об'єм до позначки з таким самим розчинником і ретельно перемішали (розчин **IB**).

Приготування досліджуваного розчину. Приблизно 50 мг (точна наважка) досліджуваного зразка субстанції АФІ додають до мірної колби 100,0 мл, розчиняють у 50 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим же розчинником і ретельно перемішують.

Хроматографують розчин для перевірки придатності хроматографічної системи (розчин **ІВ**) n разів, розраховують RSD для площі піку АФІ; хроматографування припиняють, коли одержані значення RSD не перевищують значення RSD_{\max} , що наведено у ДФУ (Додаток 1 та 2) для допуску вмісту АФІ $B = 2\%$ (табл 4.5) [311, 312].

Почергово хроматографують розчин стандартного зразка і досліджуваний розчин встановлену кількість разів (n) і використовують у подальших розрахунках середні значення.

При хроматографуванні за зазначених умов час утримування піку АФІ має становити близько 4,6 хв.

Таблиця 4.5

Вимоги до RSD_{\max}

n	2	3	4	5	6	7	8
RSD_{\max}	0,32	0,84	1,20	1,48	1,72	1,93	2,11

Вміст морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції X, % визначають за формулою, наведеною в підрозд. 2.4.

4.2.3 Валідація методики визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок невизначеності приготування розчину стандартного зразка:

- взяття наважки стандартного зразка морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату: $(0,2 \text{ мг} / 50 \text{ мг}) \times 100 = 0,4\%$;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,00 мл: 0,12%.

Розрахунок невизначеності приготування досліджуваного розчину:

- взяття наважки досліджуваного зразка субстанції тіометрізолу: $(0,2 \text{ мг} / 50 \text{ мг}) \times 100 = 0,4\%$;

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,00 мл: 0,12%.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,4^2 + 0,12^2 + 0,4^2 + 0,12^2} = 0,58\%$$

Згідно з ДФУ (Доповнення 1 та 2) невизначеність пробопідготовки повинна бути незначущою у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу, тобто $\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot 2 = 0,64\%$. Таким чином, прогнозоване значення Δ_{SP} відповідає вимогам ДФУ ($0,58\% < 0,64\%$) [311, 312].

Валідаційні характеристики методики

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ у варіанті методу стандарту за наведеною стандартизованою процедурою. Визначали лінійність, специфічність, прецизійність на рівні збіжності та правильність. Допуск вмісту АФІ в субстанції тіометрізолу становить 98-102%.

Лінійність. Метрологічні характеристики лінійної залежності для діапазону застосування методики 80-120% від номінального вмісту АФІ наведено в табл. 4.6. Вони відповідають вимогам ДФУ до цих показників. Графік лінійної залежності наведений на рис. 4.36.

Таблиця 4.6

Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики кількісного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, $Y = bX + a$

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($B = 2\%$, $g = 9$)	Висновок
b	1,0313	–	–
s _b	0,0164	–	–
a	- 3,2294	≤ 3,2	відповідає
s _a	1,627	–	–
RSD ₀	0,7475	≤ 1,06	відповідає
R _c	0,9991	≥ 0,99702	відповідає

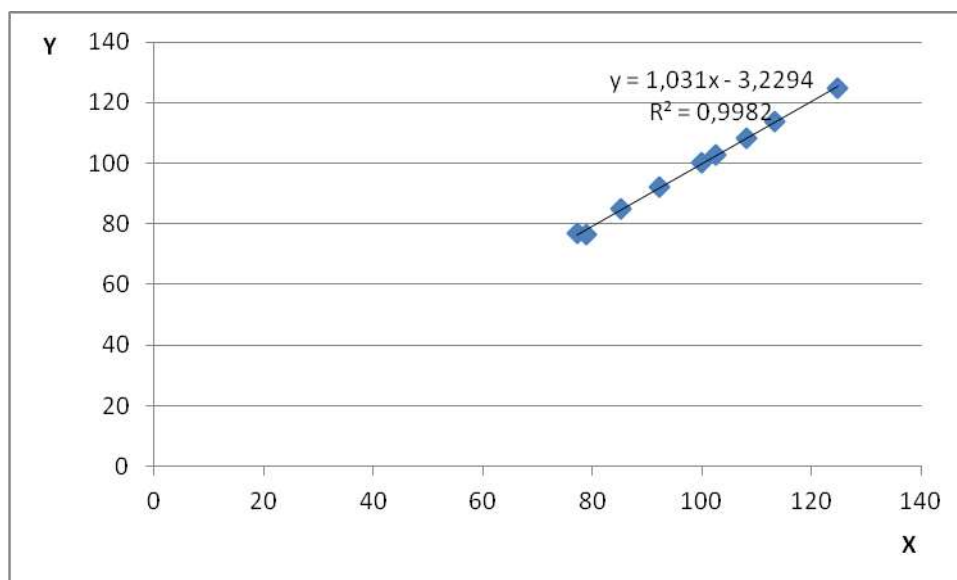


Рис. 4.36. Лінійна залежність площі піку від концентрації АФІ тіометризолу в нормалізованих координатах

Специфічність. Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук **2.1**, **2.5**, **2.10** (рис. 4.35, табл. 4.3).

Прецизійність та правильність. Визначали прецизійність на рівні сходимості. Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведено в табл. 4.7.

Таблиця 4.7

Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Номер модельного розчину	Наважка АФІ, г ($m_{st} = 0,05089$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 2625$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	2	3	4	5	6
1	0,03928	77,19	2004	77,14	99,94

Продовж. табл. 4.7

1	2	3	4	5	6
2	0,04008	78,76	2025	76,34	96,93
3	0,04340	85,28	2232	85,03	99,70
4	0,04690	92,16	2416	92,04	99,87
5	0,05085	99,92	2629	100,2	100,23
6	0,05220	102,6	2695	102,7	100,09
7	0,05505	108,2	2841	108,2	100,05
8	0,05763	113,2	2986	113,8	100,45
9	0,06350	124,8	3279	124,9	100,11
Середнє, \bar{Z} , %					99,71
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					1,065
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_Z = RSD_Z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_Z \cdot 1,8595$					1,981
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 2,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					0,2914
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_Z / 3 = 1,981 / 3 = 0,66$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 2 = 0,64$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

4.2.4 Застосування розробленої методики для кількісного визначення АФІ тіометрізолу в субстанції. Хроматографували розчин порівняння 6 разів. Результати наведено в табл. 4.8.

Одержане значення RSD не перевищувало вимоги ДФУ до $RSD\%_{\max}$ [310, 319] при усіх значеннях n, починаючи с n = 2. Тому достатньо по 2 рази почергово хроматографувати розчини порівняння (рис. 4.37) та випробуваний розчин для кожної наважки субстанції (рис. 4.38).

Результати перевірки пригодності хроматографічної системи по RSD

Хроматограма	S_{st}	Середнє S_{st}	RSD%	RSD% _{max} по ДФУ
1	2761	—	—	—
2	2772	2767	0,2523	0,32
3	2777	2770	0,2714	0,84
4	2755	2766	0,3460	1,20
5	2770	2767	0,3052	1,48

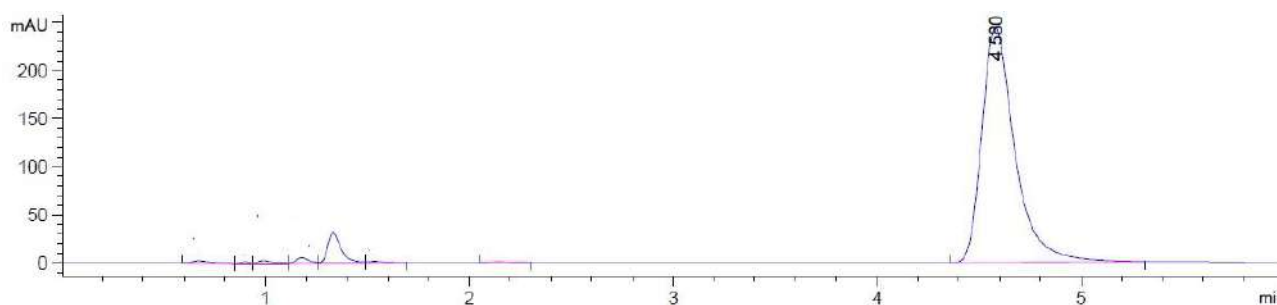


Рис. 4.37. Хроматограма розчину порівняння АФІ тіометризолу

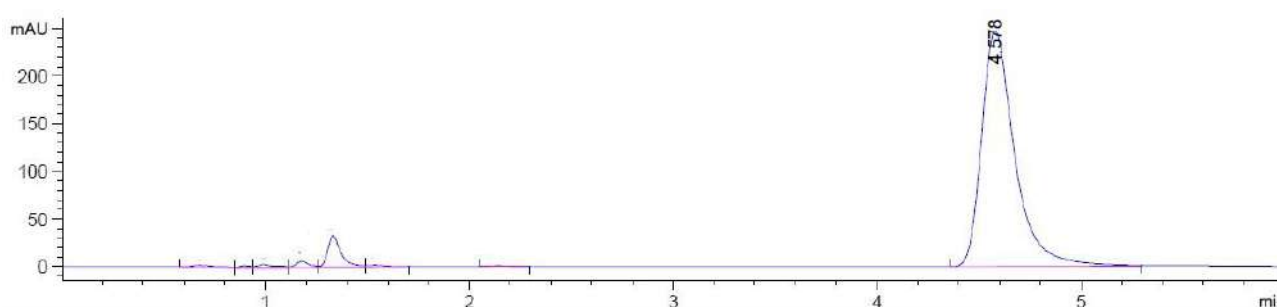


Рис. 4.38. Хроматограма досліджуваного розчину субстанції тіометризолу

В табл. 4.9 наведені результати визначення АФІ тіометризолу в субстанції.

Результати кількісного визначення АФІ тіометризолу в субстанції

Дослід	Наважка, г	Площа піку		Знайдено АФІ У %	Метрологічні характеристики, n – 1 = 5, P = 0,95
1	0,05076	2790	2785	100,5	$\bar{X} = 100,0$ $S=0,9340$ $S_r= 0,9340$ $\Delta\bar{X}=0,9800$ $\varepsilon=0,9800\%$
		2780			
2	0,04956	2720	2724	100,7	
		2728			
3	0,0502	2763	2756	100,6	
		2749			
4	0,0506	2782	2777	100,6	
		2772			
5	0,05056	2740	2738	99,25	
		2736			
6	0,05079	2726	2729	98,47	
		2732			
Стандартний зразок	0,05066	2767		–	–

4.2.5 Методика визначення домішок морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в його субстанції. Випробування проводять методом високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричною детекцією.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Робочі стандартні зразки: морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (АФІ), піридин-4-карбогідразид (сполука 2.1), 2-ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід

(сполука **2.5**), 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука **2.10**).

Умови хроматографування:

- колонка – \varnothing 4,6 × 30 мм, обернена фаза C18, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (84:16);
- об'єм проби – 5 мкл;
- детектор – діодно-матричний (λ = 272 нм (АФІ), 266 нм (**2.1**), 254 нм (**2.5**), 258 нм (**2.10**)).

Перевірка придатності хроматографічної системи. Ефективність колонки *N* за піком сполуки **2.1** повинна становити $N \geq 500$ теоретичних тарілок, за піком сполуки **2.5** – $N \geq 4700$, за піком сполуки **2.10** – $N \geq 3500$. Роздільна здатність повинна становити $R \geq 2,96$ (між піками АФІ та сполуки **2.5**), $R \geq 2,65$ (між піками сполуки **2.10** та АФІ).

Приготування рухомої фази А. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування рухомої фази В. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування розчину робочих стандартних зразків. Близько 25 мг (точні наважки) кожного з робочих стандартних зразків піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону додають до мірної колби ємністю 100,0 мл, розчиняють в 50 мл диметилсульфоксиду, об'єм розчину доводять до позначки тим же розчинником та ретельно змішують (розчин **IIA**).

До мірної колби ємністю 10,0 мл додають 1,00 мл отриманого розчину, доводять об'єм розчину до позначки сумішню води високоочищеної та ацетонітрилу (84:16) та ретельно змішують (розчин **ІВ**).

Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. 250 мг (точна наважка) стандартного зразка морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (84:16), додають 1,00 мл розчину **ІА**, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Приготування досліджуваного розчину. Близько 250 мг (точна наважка) досліджуваного зразка субстанції Тіометризолу вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (84:16), доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Хроматографують розчин для перевірки придатності хроматографічної системи n разів, розраховують RSD для площ піків сполук **2.1**, **2.5**, **2.10**, хроматографування припиняють, коли одержані значення RSD не перевищують значення RSD_{\max} , розраховані у відповідності до вимог ДФУ (доповнення 1 та 2) для допуску вмісту сполуки **2.1** – $B = 16\%$ та допуску вмісту сполук **2.5** та **2.10** – $B = 5\%$ (табл 2.1-2.2).

Почергово хроматографують розчин робочих стандартних зразків (розчин **ІВ**) і досліджуваний розчин встановлену кількість разів (n) і використовують у подальших розрахунках середні значення.

При хроматографуванні за зазначених умов час утримування піків має становити: близько 0,7 хв – сполука **2.1**, близько 3,9 хв – сполука **2.5**, близько 5,6 хв – сполука **2.10**, близько 4,6 хв – АФІ.

Вміст піридин-4-карбогідрозиду, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону в субстанції тіометризолу X , % визначають за формулою, наведеною в підрозд. 2.4.

Таблиця 2.1

Вимоги до RSD_{max} для допуску вмісту 5%

n	2	3	4	5	6	7	8
RSD _{max}	0,79	2,10	3,00	3,71	4,30	4,81	5,28

Таблиця 2.2

Вимоги до RSD_{max} для допуску вмісту 16%

n	2	3	4	5	6	7	8
RSD _{max}	2,53	6,71	9,61	11,86	13,75	14,44	16,89

4.2.6 Валідація методики визначення домішок морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в його субстанції

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок невизначеності приготування розчину робочих стандартних зразків:

- взяття наважки робочого стандартного зразка сполук **2.1, 2.5** або **2.10**:
(0,2 мг / 25 мг) × 100 = 0,8%;

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%;

- взяття аліквоти розчину піпеткою місткістю 1,00 мл: 0,6%;

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%.

Розрахунок невизначеності приготування досліджуваного розчину:

- взяття наважки досліджуваного зразка: (0,2 мг / 250 мг) × 100 = 0,08%;

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,00 мл: 0,12%.

$$\Delta_{sp} = \sqrt{0,8^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2 + 0,08^2 + 0,12^2} = 1,36\%$$

Згідно з ДФУ (Доповнення 1 та 2) невизначеність пробопідготовки повинна бути незначущою у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу, тобто $\Delta_{sp} \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6\%$. Таким чином,

прогнозоване значення Δ_{sp} відповідає вимогам ДФУ ($1,36\% < 1,6\%$).

Валідаційні характеристики методики

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ [310-312] у варіанті методу стандарту за наведеною стандартизованою процедурою [312, 340, 350]. Максимально допустима невизначеність аналізу при кількісному визначенні домішок становить 5%, при граничному випробуванні – 16%. Для розрахунку валідаційних критеріїв для сполуки **2.1** було обрано 16%, а при розрахунку валідаційних критеріїв для сполук **2.5** та **2.10** обрано більш жорсткі вимоги – 5%, тому що результати відповідали цим вимогам.

Лінійність. Метрологічні характеристики лінійних залежностей для діапазону застосування методики 25-125% від номінального вмісту відповідної домішки наведено в табл. 4.8-4.10. Графіки лінійної залежності наведені на рис. 4.39-4.41.

Таблиця 4.8

Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики кількісного визначення сполуки 2.1, $Y = bX + a$

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 16\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,910	–	–
s_b	0,0344	–	–
a	2,163	$\leq 6,8$	відповідає
s_a	2,845	–	–
RSD_0	3,733	$\leq 8,4$	відповідає
R_c	0,995	$\geq 0,9755$	відповідає

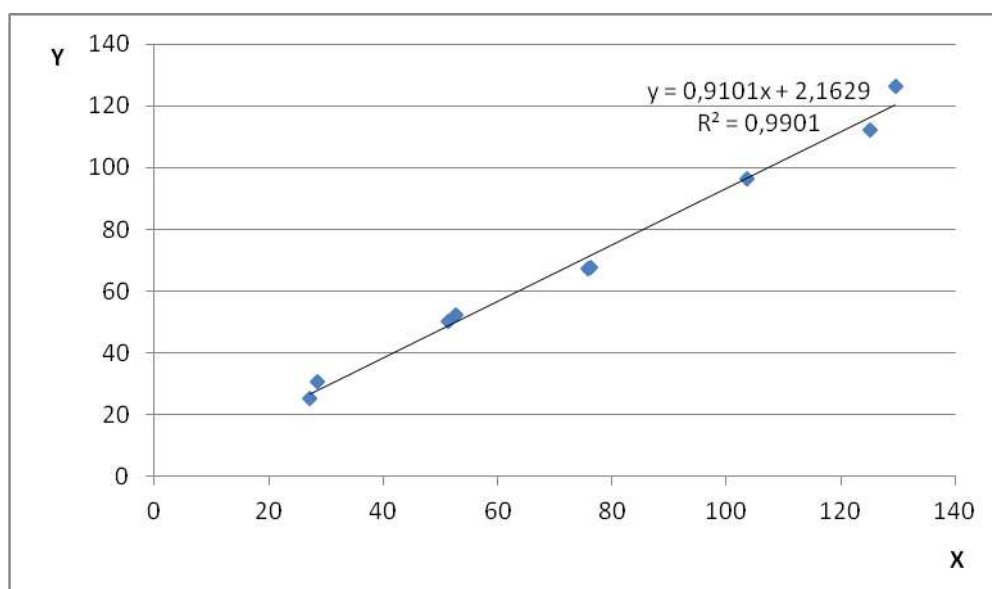


Рис. 4.39. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки 2.1 в нормалізованих координатах

Таблиця 4.9

**Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики
кількісного визначення сполуки 2.5, $Y = bX + a$**

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	1,005	—	—
s_b	0,00956	—	—
a	-0,739	$\leq 2,1$	відповідає
s_a	0,731	—	—
RSD_0	0,985	$\leq 2,65$	відповідає
R_c	0,9997	$\geq 0,9976$	відповідає

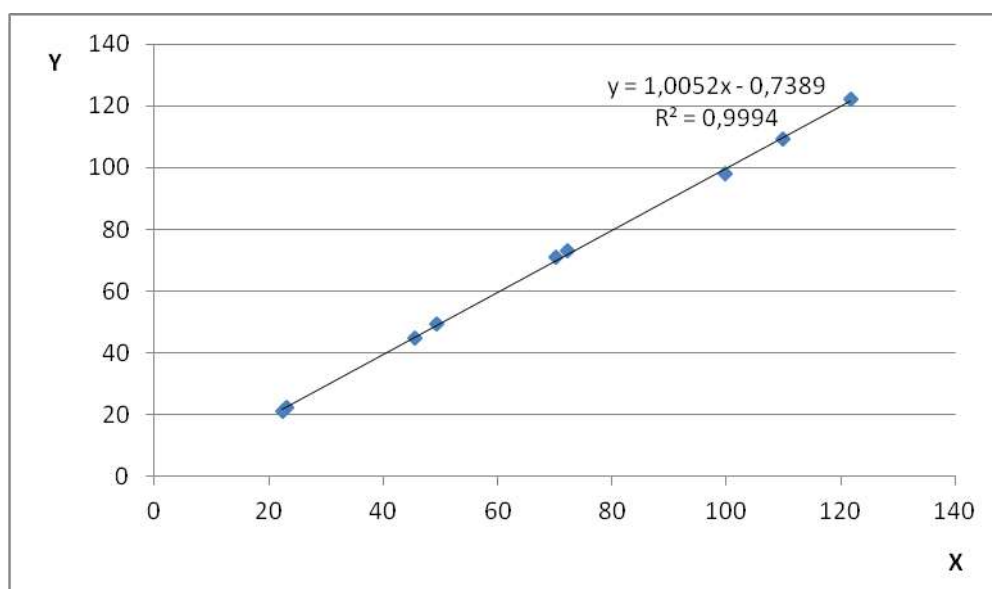


Рис. 4.40. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки 2.5 в нормалізованих координатах

Таблиця 4.10

Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики кількісного визначення сполуки 2.10, $Y = bX + a$

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	1,008	—	—
s_b	0,01935	—	—
a	-0,9515	$\leq 2,1$	відповідає
s_a	1,512	—	—
RSD_0	2,023	$\leq 2,65$	відповідає
R_c	0,9987	$\geq 0,9976$	відповідає

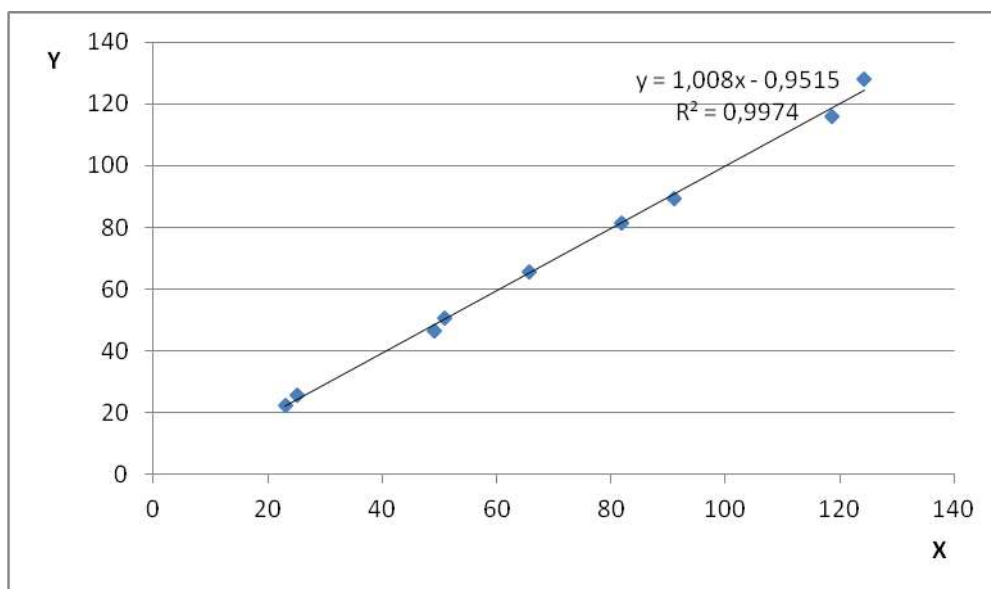


Рис. 4.41. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки **2.10** в нормалізованих координатах

Специфічність. Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук **2.1**, **2.5**, **2.10**. $R \geq 2,96$ (між піками АФІ та сполукою **2.5**) та $R \geq 2,65$ (між піками сполуки **2.10** та АФІ).

Прецизійність та правильність. Прецизійність визначали на рівні сходимості. Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення домішок в субстанції морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведено в табл. 4.11-4.13.

**Результати визначення прецизійності та правильності методики
кількісного визначення сполуки 2.1**

Модель- ний розчин	Наважка сполуки (2.1), г ($m_{st} = 0,02422$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 98,61$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	0,00659	27,2	25,08	25,43	93,5
2	0,00689	28,5	30,44	30,87	109
3	0,01279	52,81	51,77	52,50	99,42
4	0,01245	51,40	49,72	50,42	98,09
5	0,01835	75,76	66,49	67,42	80,90
6	0,01849	76,34	66,78	67,72	88,71
7	0,02509	103,6	95,13	96,47	93,13
8	0,03139	129,6	124,5	126,31	97,42
9	0,03030	125,1	110,8	112,35	89,82
Середнє, \bar{Z} , %					95,3
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					6,69
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_Z = RSD_Z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_Z \cdot 1,8595$					12,4
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 16$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					4,72
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_Z / 3 = 12,44 / 3 = 4,15$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 16 = 5,12$					не відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

**Результати визначення прецизійності та правильності методики
кількісного визначення сполуки 2.5**

Модель- ний розчин	Наважка сполуки (2.5), г ($m_{st} = 0,02575$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 82,79$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	0,00591	23,2	18,44	22,27	96,0
2	0,00571	22,4	17,50	21,14	94,3
3	0,01255	49,29	40,88	49,38	100,2
4	0,01160	45,56	37,05	44,75	98,22
5	0,01789	70,27	58,87	71,11	101,2
6	0,01840	72,28	60,51	73,09	101,1
7	0,02539	99,72	81,11	97,97	98,24
8	0,03100	121,76	101,11	122,12	100,3
9	0,02800	109,98	90,40	109,19	99,29
Середнє, \bar{Z} , %					98,8
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					2,41
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_z \cdot 1,8595$					4,47
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 5,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					1,25
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 4,474 / 3 = 1,491$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

**Результати визначення прецизійності та правильності методики
кількісного визначення сполуки 2.10**

Модель- ний розчин	Наважка сполуки (2.10), г ($m_{st} = 0,02460$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 117,94$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	0,00638	25,1	30,48	25,84	103
2	0,00585	23,1	26,48	22,45	97,4
3	0,0129	50,83	59,84	50,74	99,83
4	0,01245	49,05	55,02	46,65	95,10
5	0,01665	65,60	77,41	65,64	100,1
6	0,02080	81,95	95,95	81,36	99,27
7	0,02312	91,10	105,15	89,16	97,87
8	0,03155	124,3	151,05	128,1	103,03
9	0,03009	118,6	136,98	116,1	97,97
Середнє, \bar{Z} , %					99,3
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					2,57
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_z \cdot 1,8595$					4,78
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 5,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					0,740
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 4,779 / 3 = 1,593$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

4.2.7 Застосування розробленої методики для кількісного визначення домішок тіометризолу в субстанції. У досліджуваних серіях субстанції тіометризолу домішка карботіоаміду (**2.5**) не детектувалась. Тому було проведено визначення сполук **2.1** та **2.10**. Хроматографували розчин порівняння 5 разів. Результати наведені в табл. 4.14-4.15.

Таблиця 4.14

**Результати перевірки придатності хроматографічної системи
за RSD для сполуки 2.1**

Хроматограма	S_{st}	Середнє S_{st}	RSD%	RSD% _{max}
1	97,28	–	–	–
2	97,44	97,36	0,1232	2,534
3	97,94	97,55	0,3562	6,710
4	98,19	97,71	0,4364	9,613
5	97,68	97,70	0,3782	11,86

Таблиця 4.15

**Результати перевірки придатності хроматографічної системи
за RSD для сполуки 2.10**

Хроматограма	S_{st}	Середнє S_{st}	RSD%	RSD% _{max}
1	117,53	–	–	–
2	117,02	117,28	0,3050	0,7918
3	117,26	117,27	0,2158	2,097
4	117,96	117,44	0,3417	3,004
5	118,15	117,58	0,3990	3,708

Одержане значення RSD не перевищувало розраховане згідно вимогам ДФУ до RSD%_{max} для максимальної невизначеності 16% (**2.1**) та 5% (**2.10**) при усіх значеннях n, починаючи с n = 2. Тому достатньо по 2 рази почергово

хроматографувати розчини порівняння (рис. 4.42) та випробуваний розчин (рис. 4.43) для кожної наважки субстанції [311, 312].

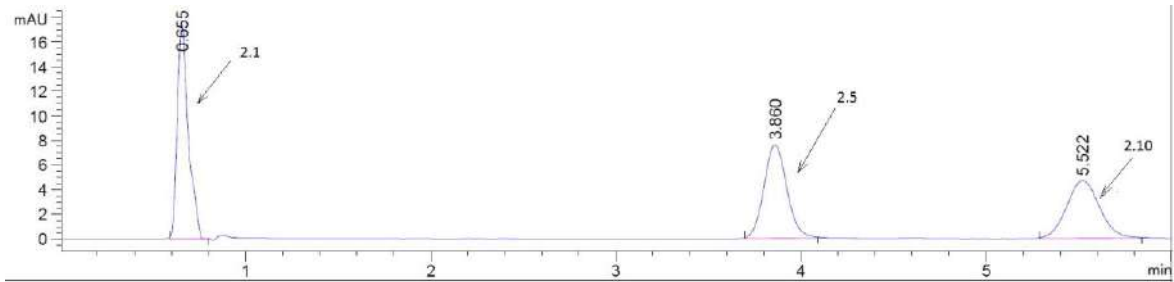


Рис. 4.42. Хроматограма розчину порівняння (розчин ІВ, сполуки **2.1**, **2.5**, **2.10**) домішок до АФІ тіометризолу при 266 нм

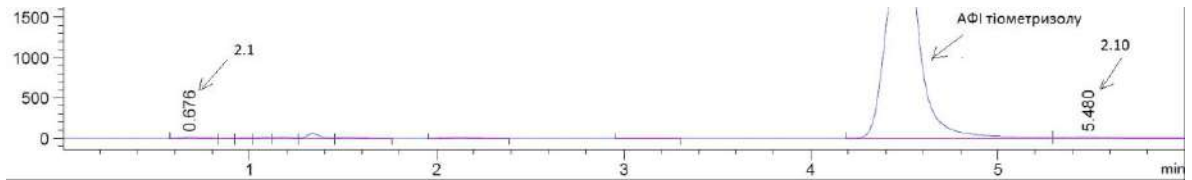


Рис. 4.43. Хроматограма досліджуваного розчину субстанції тіометризолу для визначення домішок при 266 нм

Таблиця 4.16

Результати кількісного визначення сполуки 2.1 в субстанції

Дослід	Наважка, г	Площа піку		Знайдено, у %	Метрологічні характеристики, n – 1 = 5, P = 0,95
1	2	3		4	5
1	0,25085	122,9	125,3	0,1256	$\bar{X} = 0,1365$ $S = 0,00868$ $S_r = 6,361\%$ $\Delta\bar{X} = 0,009107$ $\epsilon = 6,674\%$
		127,7			

Продовж. табл. 4.16

1	2	3	4	5	6	
2	0,24898	146,1	146,4	0,1478		
		146,6				
3	0,25028	129,1	128,9	0,1295		
		128,6				
4	0,27094	157,0	156,5	0,1453		
		156,0				
5	0,23028	125,1	123,5	0,1349		
		121,9				
6	0,23016	124,1	124,1	0,1356		
		124,1				
Стандартний зразок	0,02446	97,36		–		–

Таблиця 4.17

Результати кількісного визначення сполуки 2.10 в субстанції

Дослід	Наважка, г	Площа піку		Знайдено, у %	Метрологічні характеристики, n – 1 = 5, P = 0,95
1	2	3		4	5
1	0,25085	388,1	388,7	0,3357	$\bar{X} = 0,3469$ $S = 0,02657$ $S_r = 2,607\%$ $\Delta\bar{X} = 0,009439$ $\varepsilon = 2,735\%$
		389,3			
2	0,24898	395,9	399,3	0,3474	
		402,7			
3	0,25028	401,2	401,2	0,3473	
		401,2			

1	2	3		4	5
4	0,27094	448,6	450,8	0,3604	
		453,0			
5	0,23028	371,5	358,4	0,3372	
		345,3			
6	0,23016	359,9	363,55	0,3422	
		367,2			
Стандартний зразок	0,02538	117,27		—	—

Відтворюванність результатів при визначенні сполуки **2.10** вище, ніж відтворюванність результатів при визначенні сполуки **2.1**. Це можна пояснити малим часом утримування сполуки **2.1**.

Результати валідації методик свідчать про специфічність, відповідність вимогам лінійності, прецизійності та правильності. Результати визначення вмісту сполук у реальних зразках субстанції вказують на те, що методики можуть бути запропоновані для контролю якості субстанції морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

4.3 Хроматографічне дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату та його домішок

З огляду літератури [6, 7] відомо, що при виробництві препаратів похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу в кінцевому продукті можуть міститися домішки карботіоамідів та 1,2,4-тріазол-3-тіонів. Основні специфічні домішки, що можуть потрапляти в субстанцію тріфузолу в процесі синтезу (рис. 4.44), є фуран-2-карбогідразид (**2.2**), 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідразид-1-карботіоамід (**2.6**), 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.11**).

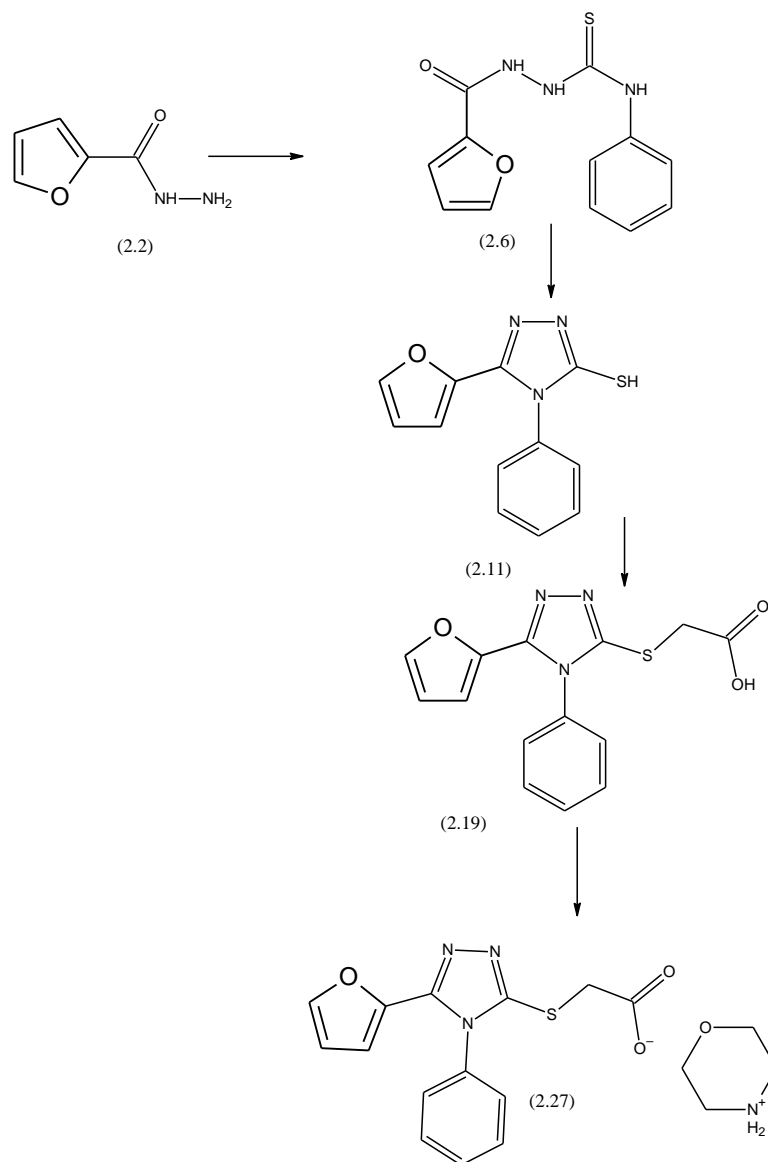


Рис. 4.44. Схема синтезу АФІ тріфузолу

Для кількісного визначення домішок та АФІ вибрані оптимальні умови розділення домішок та АФІ тріфузолу [336-338], а також розроблено та провалідовано хроматографічні методики визначення цих речовин [351-353].

4.3.1 Вибір оптимальних умов розділення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату та його домішок

Оптимізація вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі. Стаціонарну та рухому фази обрано в підрозд. 4.1, також було досліджено хроматографічну поведінку похідних 1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в синтезі. Дані закономірності

використали для побудови кривих залежності коефіцієнтів ємності від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі для потенціальних домішок (фуран-2-карбогідразиду (**2.2**), 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідразид-1-карботіаміду (**2.6**), 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону (**2.11**) та піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ) на діодно-матричному детекторі при довжині хвилі 254 нм (рис. 4.45).

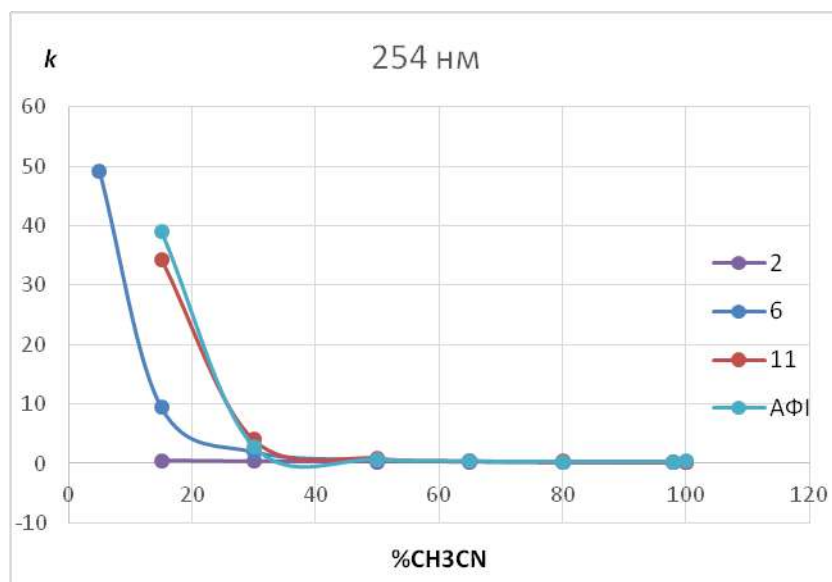


Рис. 4.45. Залежність коефіцієнту ємності (k) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі для сполук **2.2**, **2.6**, **2.11** та АФІ тріфузолу

На графіку (рис. 4.45) мінімальна прийнятна різниця між кривими спостерігається на 30% при мінімальному значенні коефіцієнта ємності, тобто при мінімальному часі утримування та мінімальному часі аналізу. Коефіцієнт розділення (R_s) може бути застосований як критерій прийнятності та якості розділення. Експериментальне визначення коефіцієнту розділення було проведено згідно ЕФ 2.2.46 та ДФУ 2.2.29 з використанням OpenLAB CDS Software [310, 319]. Отримані значення коефіцієнту розділення: $R_s \geq 4,1$ (між піком АФІ тріфузолу та піком сполуки **2.6**) та $R_s \geq 2,7$ (між піком **2.11** та піком АФІ). Розділення між піком АФІ та піком карботіоаміду (**2.6**), а також розділення між піком АФІ та піком тіону (**2.11**) є задовільним, тому що відповідає ДФУ 2.2.29 (повинно бути ≥ 1) [310].

Хроматограма розчину порівняння (розчину стандартного зразку субстанції піпередінію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату) надана на рис. 4.46.

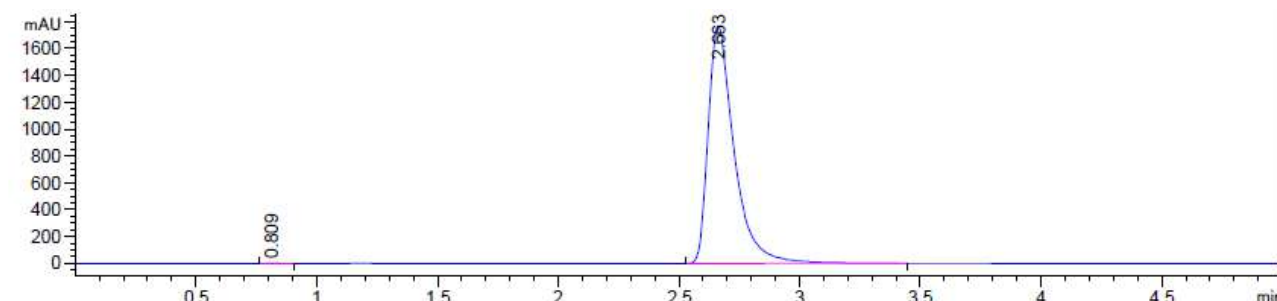


Рис. 4.46. Хроматограма розчину порівняння тріфузолу при 276 нм

Вибір аналітичної довжини хвилі для визначення АФІ робили на підставі УФ-спектра (рис. 4.47). Спектр абсорбції вимірювали в ячейці діодно-матричного детектора в елюєнті, що містив 30% ацетонітрилу із 0,1% мурашиної кислоти.

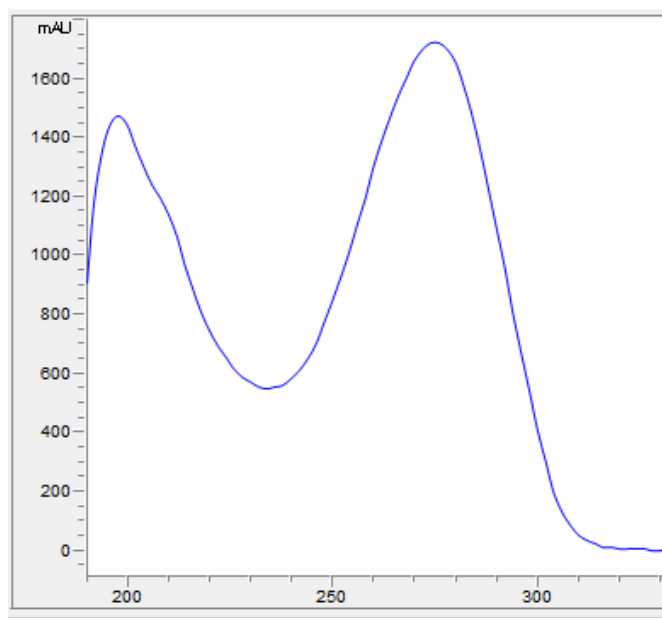


Рис. 4.47. Спектр абсорбції АФІ тріфузолу

Чистота піку АФІ була підтверджена за допомогою мас-спектрометричного детектору (рис. 4.48).

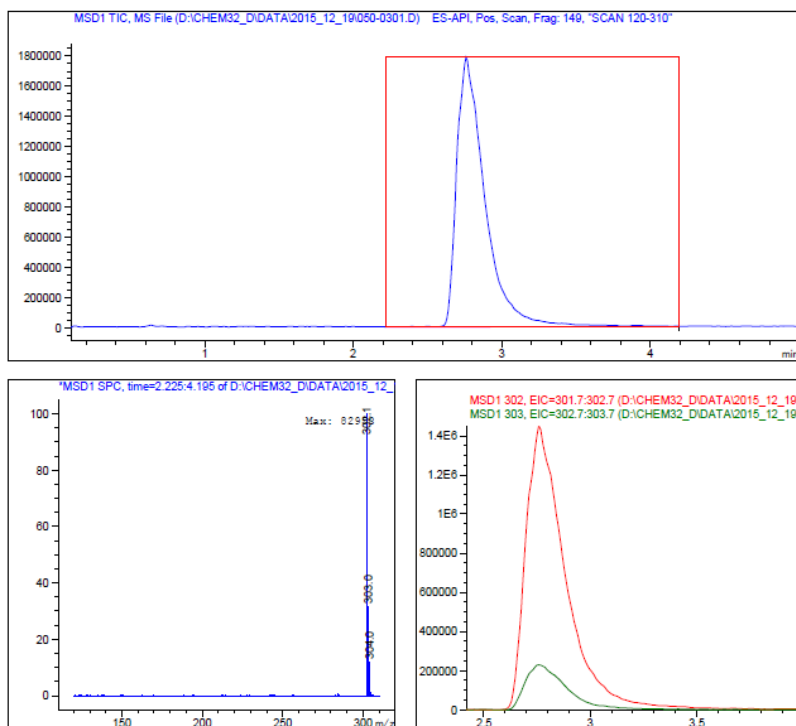


Рис. 4.48. Хроматограми за мас-спектрометричним детектором та мас-спектр сполуки **2.27** (АФІ тріфузолу)

Згідно звіту програмного забезпечення, що використовувалось для запису мас-спектру (OpenLAB CDS Software), в піку знаходиться тільки один компонент, відмічений як чистий пік, провідними іонами є іони із m/z 302, 303.

4.3.2 Методика визначення АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД. Випробування проводять методом вискоєфективної рідинної хроматографії з діодно-матричною детекцією.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Робочі стандартні зразки: піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (АФІ), фуран-2-карбогідрозид (**2.2**), 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідрозид-1-карботіоамід (**2.6**), 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.11**).

Умови хроматографування:

- колонка – \varnothing 4,6 × 30 мм, обернена фаза C18, 1,8 мкм;

- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (70:30);
- об'єм проби – 5 мкл;
- детектор – діодно-матричний ($\lambda = 276$ нм (АФІ), 256 нм (**2.2**), 258 нм (**2.6**), 258 нм (**2.11**)).

Перевірка придатності хроматографічної системи. Ефективність колонки N за піком АФІ повинна становити ≥ 2200 теоретичних тарілок, роздільна здатність повинна становити $R \geq 4,1$ (між піками АФІ та **2.6**) та $R \geq 2,7$ (між піками **2.11** та АФІ).

Приготування рухомої фази А. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування рухомої фази В. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування розчину робочого стандартного зразка. Близько 50 мг (точна наважка) робочого стандартного зразка піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. По 5 мг робочих стандартних зразків домішок **2.2**, **2.6**, **2.11** вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (70:30), доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують (розчин **IA**).

50 мг робочого стандартного зразка АФІ вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена –

ацетонітрил (70:30), додають 1,00 мл розчину **IA**, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують (розчин **IB**).

Приготування досліджуваного розчину. Близько 50 мг (точна наважка) досліджуваного зразка субстанції тріфузолу вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Хроматографують розчин для перевірки придатності хроматографічної системи (розчин **IB**) n разів, розраховують RSD для площі піку АФІ; хроматографування припиняють, коли одержані значення RSD не перевищують значення RSD_{\max} , що наведено у ДФУ (доповнення 1 та 2) для допуску вмісту АФІ В = 3% (табл. 4.18) [311, 312].

Почергово хроматографують розчин робочого стандартного зразка і досліджуваний розчин встановлену кількість разів (n) і використовують у подальших розрахунках середні значення. При хроматографуванні за зазначених умов час утримування піку АФІ має становити близько 2,7 хв.

Таблиця 4.18

Вимоги до RSD_{\max}

n	2	3	4	5	6	7	8
RSD_{\max}	0,48	1,26	1,80	2,23	2,58	2,89	3,17

Вміст піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції Тріфузолу X , %, визначають за формулою, що наведена в підрозд. 2.4.

4.3.3 Валідація методики визначення АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок невизначеності приготування розчину робочого стандартного зразка:

- взяття наважки робочого стандартного зразка піперидиній

2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату:

$$(0,2 \text{ мг} / 50 \text{ мг}) \times 100 = 0,4\%;$$

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%.

Розрахунок невизначеності приготування досліджуваного розчину:

- взяття наважки досліджуваного зразка субстанції Тріфузолу:

$$(0,2 \text{ мг} / 50 \text{ мг}) \times 100 = 0,4\%;$$

- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,00 мл: 0,12%.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,4^2 + 0,12^2 + 0,4^2 + 0,12^2} = 0,58\%$$

Згідно з ДФУ (Доповнення 1 та 2) невизначеність пробопідготовки повинна бути незначущою в порівнянні з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу, тобто $\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot 3 = 0,96\%$. Таким чином, прогнозоване значення Δ_{SP} відповідає вимогам ДФУ ($0,58\% < 0,96\%$).

Валідаційні характеристики методики

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ у варіанті методу стандарту за наведеною стандартизованою процедурою; допуск вмісту АФІ в субстанції Тріфузолу становить 97-103%.

Лінійність. Графік лінійної залежності наведений на рис. 4.49.

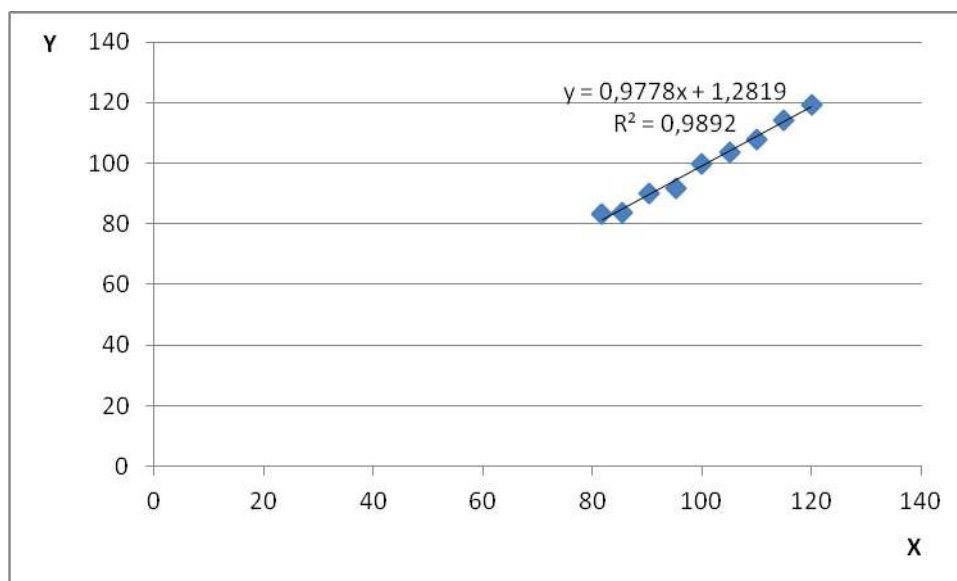


Рис. 4.49. Лінійна залежність площі піку від концентрації АФІ тріфузолу в нормалізованих координатах

Метрологічні характеристики лінійної залежності для діапазону застосування методики 80-120% від номінального вмісту АФІ наведено в табл. 4.19.

Таблиця 4.19

**Метрологічні характеристики лінійної залежності
для методики ількісного визначення
піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату**

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($B = 3\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,9778	—	—
s_b	0,0387	—	—
a	1,2819	$\leq 4,8$	відповідає
s_a	3,91	—	—
RSD_0	1,453	$\leq 1,58$	відповідає
R_c	0,9946	$\geq 0,9933$	відповідає

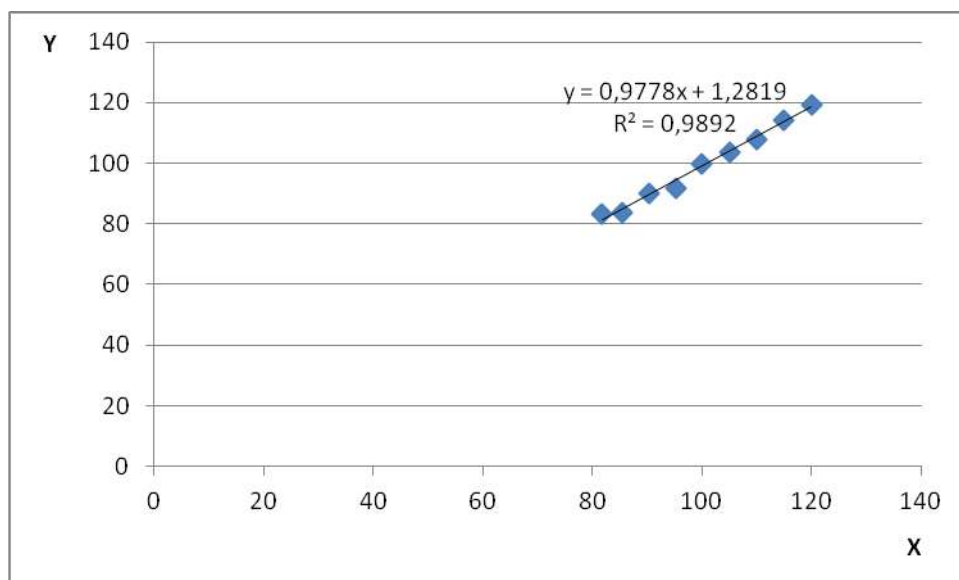


Рис. 4.49. Лінійна залежність площі піку від концентрації АФІ тріфузолу в нормалізованих координатах

Специфічність. Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук **2.2**, **2.6**, **2.11**. Роздільна здатність становить $R \geq 4,1$ (між піками **2.6** та АФІ) та $R \geq 2,7$ (між піками **2.11** та АФІ).

Прецизійність та правильність. Прецизійність визначали на рівні сходимості. Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведено в табл. 4.20.

Таблиця 4.20

**Результати визначення прецизійності та правильності
методики кількісного визначення піперидиній
2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату**

Модель- ний розчин	Наважка АФІ, г ($m_{st} = 0,05002$ г)	Введено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 15539$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	2	3	4	5	6
1	0,04086	81,72	12924	83,17	101,8
2	0,04267	85,34	13027	83,84	98,24
3	0,04515	90,30	13989	90,03	99,70
4	0,04757	95,14	14243	91,65	96,34
5	0,04997	99,94	15535	99,97	100,03
6	0,05252	105,04	16102	103,62	98,65
7	0,05495	109,90	16766	107,90	98,18
8	0,0575	115,00	17764	114,32	99,41
9	0,05997	119,94	18549	119,37	99,52
Середнє, \bar{Z} , %					99,10
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					1,510

1	2	3	4	5	6
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_z \cdot 1,8595$					2,810
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 3,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					0,900
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 2,81 / 3 = 0,94$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 3 = 0,96$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

Визначення АФІ тріфузолу в субстанції проводять, почергово хроматографуючи розчини порівняння (рис. 4.50) та досліджувані розчини субстанції тріфузолу (рис. 4.51).

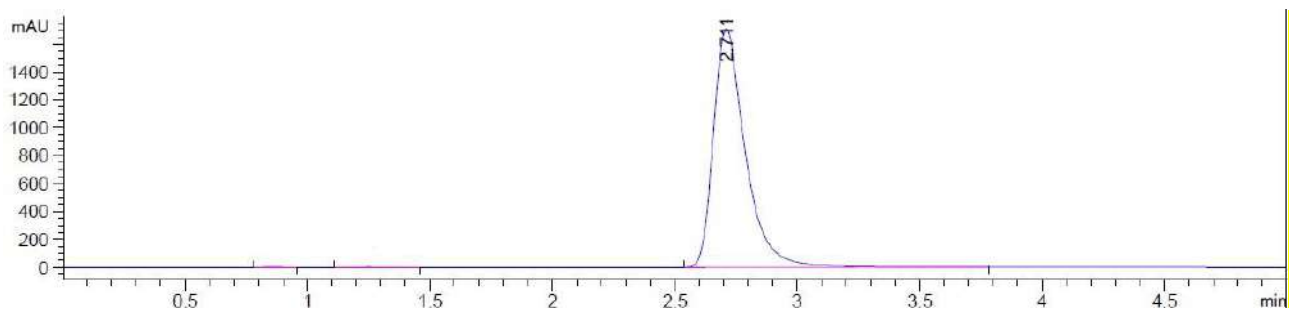


Рис. 4.50. Хроматограма розчину порівняння АФІ тріфузолу

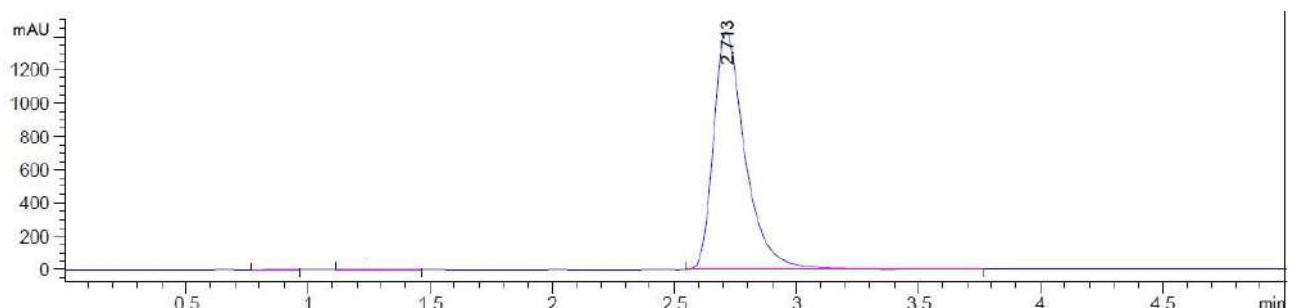


Рис. 4.51. Хроматограма досліджуваного розчину субстанції тріфузолу

4.3.4 Методика визначення домішок до піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції за допомогою методу ВЕРХ-ДМД. Випробування проводять методом високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричною детекцією.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Робочі стандартні зразки: піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (АФІ), фуран-2-карбогідрозид (**2.2**), 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідрозид-1-карботіамід (**2.6**), 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.11**).

Умови хроматографування:

- колонка – \varnothing 4,6 × 30 мм, обернена фаза С18, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (70:30);
- об'єм проби – 5 мкл;
- детектор – діодно-матричний (λ = 276 нм (АФІ), 256 нм (**2.2**), 258 нм (**2.6**), 258 нм (**2.11**)).

Перевірка придатності хроматографічної системи. Ефективність колонки *N* за піком сполуки **2.2** повинна становити $N \geq 750$ теоретичних тарілок, за піком сполуки **2.6** – $N \geq 2240$, за піком сполуки **2.11** – $N \geq 2280$. Роздільна здатність повинна становити $R \geq 4,1$ (між піками АФІ та **2.6**), $R \geq 2,7$ (між піками **2.11** та АФІ) та $R \geq 8,0$ (між піками **2.2** та **2.6**).

Приготування рухомої фази А. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування рухомої фази В. 1,00 мл кислоти мурашиної вносять до мірної колби місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 100 мл ацетонітрилу, доводять

об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

Приготування розчину робочих стандартних зразків. Близько 25 мг (точні наважки) кожного з робочих стандартних зразків фуран-2-карбогідразиду, 2-(фуран-2-карбоксі)-*N*-фенілгідразид-1-карботіаміду, 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (70:30), доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують (розчин **IIA**). 1,00 мл отриманого розчину переносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки сумішшю вода високоочищена – ацетонітрил (70:30) та ретельно перемішують (розчин **IIB**).

Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. 250 мг (точна наважка) робочого стандартного зразка піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату вносять до мірної колби місткістю 100,00 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (70:30), додають 1,00 мл розчину **IIA**, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Приготування досліджуваного розчину. Близько 250 мг (точна наважка) досліджуваного зразка субстанції тріфузолу вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл суміші вода високоочищена – ацетонітрил (70:30), доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Хроматографують розчин для перевірки придатності хроматографічної системи *n* разів, розраховують RSD для площ піків сполук **2.2**, **2.6**, **2.11**, хроматографування припиняють, коли одержані значення RSD не перевищують значення RSD_{max}, які розраховані у відповідності до вимог ДФУ (Доповнення 1 та 2) для допуску вмісту $B = 5\%$ (табл 4.21).

Почергово хроматографують розчин робочих стандартних зразків (розчин **IIB**) і досліджуваний розчин встановлену кількість разів (*n*) і використовують у подальших розрахунках середні значення.

При хроматографуванні за зазначених умов час утримування піків має становити: близько 0,74 хв – сполука **2.2**, близько 1,9 хв – сполука **2.6**, близько 3,5 хв – сполука **2.11**, близько 2,7 хв – АФІ.

Таблиця 4.21

Вимоги до RSD_{\max}

n	2	3	4	5	6	7	8
RSD_{\max}	0,79	2,10	3,00	3,71	4,30	4,81	5,28

Вміст фуран-2-карбогідрозиду, 2-(фуран-2-карбоксі)-*N*-фенілгідрозид-1-карботіаміду, 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону в субстанції тріфузолу *X*, %, визначають за формулою, що наведена в підрозд. 2.4.

4.3.5 Валідація методики визначення домішок АФІ піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату за допомогою методу ВЕРХ-ДМД

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок невизначеності приготування розчину робочих стандартних зразків:

- взяття наважки робочого стандартного зразка сполуки **2.2**, **2.6** або **2.11**: $(0,2 \text{ мг} / 25 \text{ мг}) \times 100 = 0,8\%$;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%;
- взяття аліквоти розчину піпеткою місткістю 1,00 мл: 0,6%;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%.

Розрахунок невизначеності приготування досліджуваного розчину:

- взяття наважки досліджуваного зразка: $(0,2 \text{ мг} / 250 \text{ мг}) \times 100 = 0,08\%$;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,8^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2 + 0,08^2 + 0,12^2} = 1,36\%$$

Згідно з ДФУ (Доповнення 1 та 2) невизначеність пробопідготовки повинна бути незначущою у порівнянні з максимально допустимою

невизначеністю методики аналізу, тобто $\Delta_{sp} \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6\%$. Таким чином, прогнозоване значення Δ_{sp} відповідає вимогам ДФУ ($1,36\% < 1,6\%$).

Валідаційні характеристики методики

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ у варіанті методу стандарту за наведеною стандартизованою процедурою. Максимально допустима невизначеність аналізу при кількісному визначенні домішок становить 5%, при граничному випробуванні – 16%. Для розрахунку валідаційних критеріїв обрано більш жорсткі вимоги – 5%.

Лінійність. Метрологічні характеристики лінійних залежностей для діапазону застосування методики 25-125% від номінального вмісту відповідної домішки наведено в табл. 4.22-4.24. Графіки лінійної залежності наведені на рис. 4.52-4.54.

Таблиця 4.22

Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики кількісного визначення сполуки 2.2

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,9805	–	–
s_b	0,0090	–	–
a	0,4057	$\leq 2,1$	відповідає
s_a	0,7233	–	–
RSD_0	0,9722	$\leq 2,65$	відповідає
R_c	0,9997	$\geq 0,9976$	відповідає

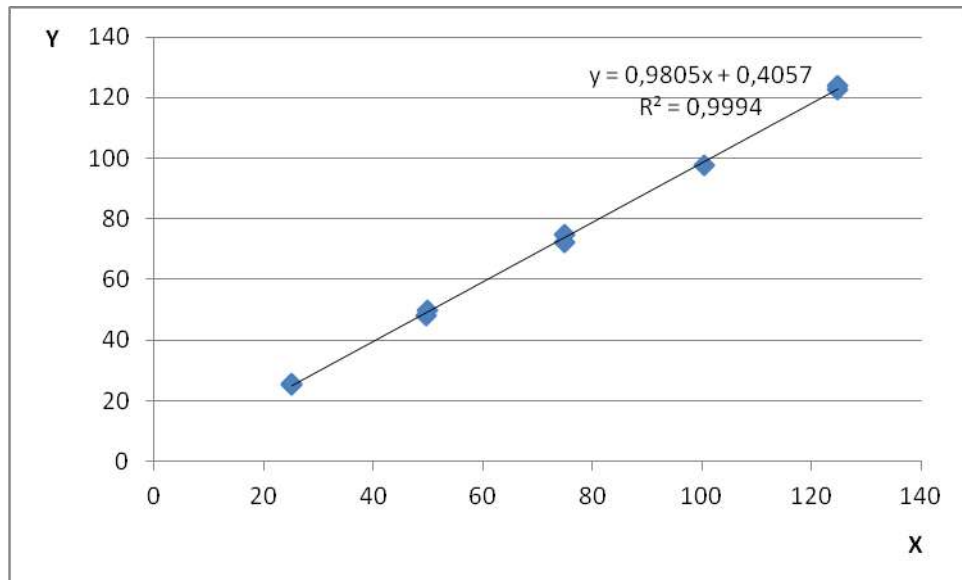


Рис. 4.52. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки 2.2 в нормалізованих координатах

Таблиця 4.23

**Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики
кількісного визначення сполуки 2.6**

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,9871	–	–
s_b	0,0146	–	–
a	–0,0328	$\leq 2,1$	відповідає
s_a	1,1465	–	–
RSD_0	1,5406	$\leq 2,65$	відповідає
R_c	0,9992	$\geq 0,9976$	відповідає

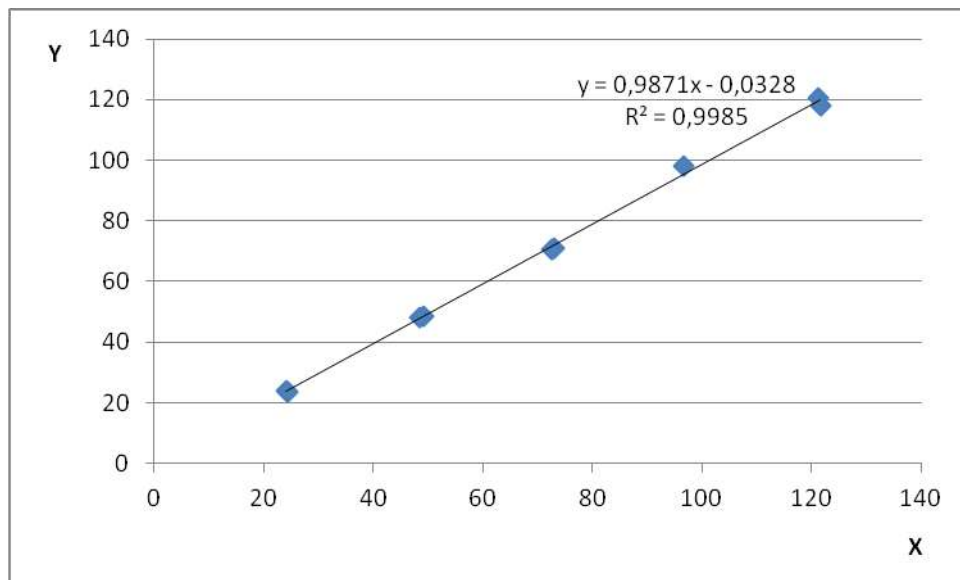


Рис. 4.53. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки 2.6 в нормалізованих координатах

Таблиця 4.24

**Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики
кількісного визначення сполуки 2.11**

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($\Delta_{As} = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,9883	–	–
s_b	0,01381	–	–
a	–0,1894	$\leq 2,1$	відповідає
s_a	1,1140	–	–
RSD_0	1,4790	$\leq 2,65$	відповідає
R_c	0,9993	$\geq 0,9976$	відповідає

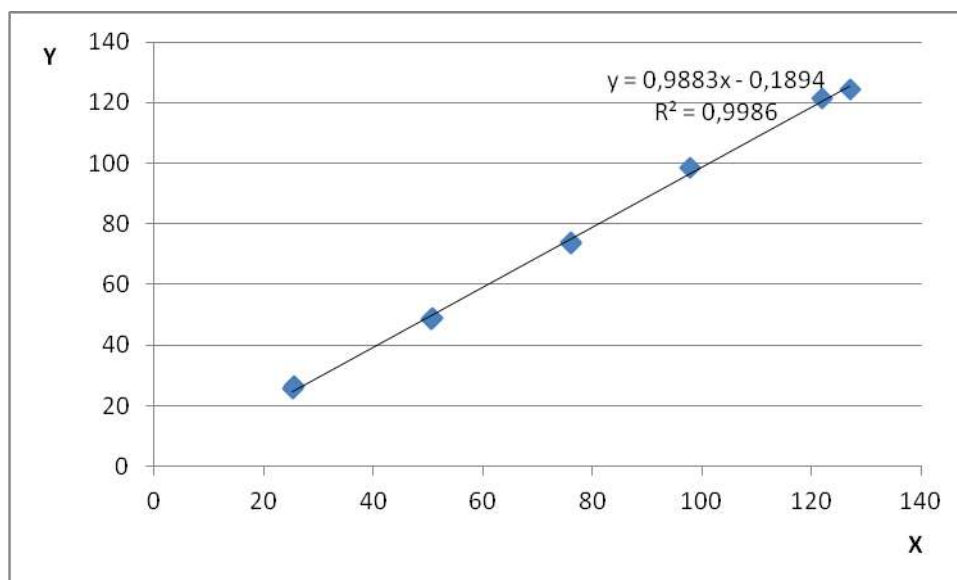


Рис. 4.54. Лінійна залежність площі піку від концентрації сполуки (2.11) в нормалізованих координатах

Специфічність. Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук 2.2, 2.6, 2.11. Роздільна здатність становить $R \geq 4,1$ (між піками АФІ та домішки 2.6), $R \geq 2,7$ (між піками домішки 2.11 та АФІ) та $R \geq 8,0$ (між піками сполук 2.2 та 2.6).

Прецизійність та правильність. Прецизійність визначали на рівні сходимості. Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення домішок в субстанції пріфузолу наведено в табл. 4.25-4.27.

Таблиця 4.25

Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення сполуки 2.2

Модель-ний розчин	Наважка, г ($m_{st} = 0,02504$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 118,38$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	2	3	4	5	6
1	0,00629	25,1	30,08	25,41	101

Продовж. табл. 4.25

1	2	3	4	5	6
2	0,00629	25,1	30,17	25,49	102
3	0,01242	49,60	57,14	48,26	97,31
4	0,01249	49,88	58,74	49,62	99,48
5	0,01875	74,88	88,61	74,85	99,96
6	0,01874	74,84	85,54	72,25	96,55
7	0,02513	100,36	115,76	97,78	97,44
8	0,03121	124,64	145,26	122,70	98,44
9	0,03124	124,76	146,56	123,80	99,23
Середнє, \bar{z} , %					99,0
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , %					1,74
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n-1) = RSD_z \cdot 1,8595$					3,23
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 5,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{z} $					0,990
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 3,23 / 3$ = 1,08; 2) $\delta < 0,32 \cdot 5 = 1,6$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

**Результати визначення прецизійності та правильності методики
кількісного визначення сполуки 2.6**

Модель- ний розчин	Наважка, г ($m_{st} = 0,02575$ г)	Введено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 143,22$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	0,00621	24,1	34,50	24,08	99,9
2	0,00629	24,4	33,89	23,66	96,9
3	0,01263	49,05	69,74	48,70	99,28
4	0,01245	48,35	68,70	47,96	99,20
5	0,01883	73,13	101,78	71,06	97,18
6	0,01871	72,66	101,10	70,59	97,15
7	0,02488	96,62	140,56	98,14	101,57
8	0,03124	121,32	172,98	120,78	99,55
9	0,03132	121,63	168,76	117,83	96,87
Середнє, \bar{Z} , %					98,6
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					1,69
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_z \cdot 1,8595$					3,15
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 5,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					1,39
Критерій незначущості систематичної похибки:					
1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 3,23 / 3 = 1,08$					відповідає
2) $\delta \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6$					відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

**Результати визначення прецизійності та правильності методики
кількісного визначення сполуки 2.11**

Модель- ний розчин	Наважка, г ($m_{st} = 0,02460$ г)	Уведено у % до концентрації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 143,22$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	0,00630	25,6	28,71	26,33	103
2	0,00621	25,2	28,03	25,71	102
3	0,01250	50,81	53,54	49,10	96,64
4	0,01241	50,44	52,90	48,52	96,18
5	0,01872	76,10	80,59	73,91	97,13
6	0,01870	76,02	79,97	73,34	96,48
7	0,02405	97,76	107,57	98,66	100,92
8	0,03125	127,03	135,77	124,52	98,02
9	0,03000	121,95	132,47	121,50	99,63
Середнє, \bar{Z} , %					98,8
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %					2,55
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_Z = RSD_Z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_Z \cdot 1,8595$					4,74
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 5,00$					відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $					1,15
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_Z / 3 = 3,23 / 3 = 1,08$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6$					відповідає відповідає
Загальний висновок про методику					коректна

Визначення домішок до АФІ тріфузолу проводять почергово хроматографуючи розчини порівняння (рис. 4.55) та досліджувані розчини субстанції тріфузолу (рис. 4.56).

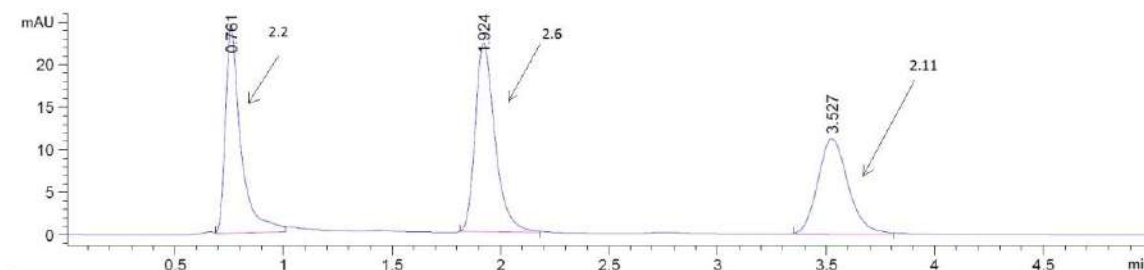


Рис. 4.55. Хроматограма розчину порівняння (розчин ІІВ, сполуки **2.2**, **2.6**, **2.11**) домішок до АФІ тіометризолу при 256 нм

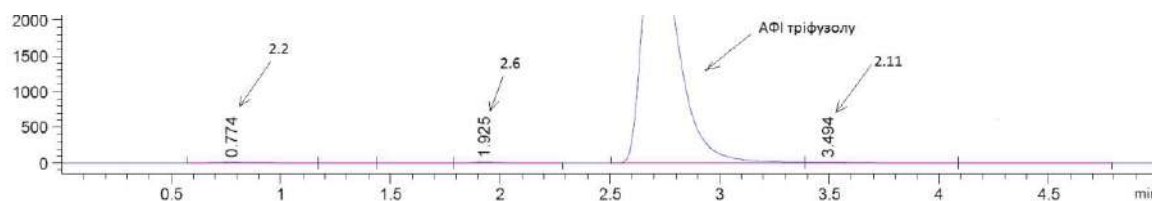


Рис. 4.56. Хроматограма досліджуваного розчину субстанції тріфузолу для визначення домішок (модельний розчин) при 256 нм

4.3.6 Методика визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій. Випробування проводять методом вискоєфективної рідинної хроматографії з діодно-матричною детекцією.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Робочі стандартні зразки: піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (АФІ), фуран-2-карбогідрозид (**2.2**), 2-(фуран-2-карбокси)-*N*-фенілгідрозид-1-карботіоамід (**2.6**), 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.11**).

Умови хроматографування:

- колонка – \varnothing 4,6 × 30 мм, обернена фаза C18, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H₂O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH₃CN – 0,1% HCOOH;
- потік – 400 мкл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (70:30);
- об'єм проби – 2 мкл;
- детектор – діодно-матричний (λ = 276 нм (АФІ), 256 нм (2.2), 258 нм (2.6), 258 нм (2.11)).

Виготовлення рухомої фази А. 1,00 мл мурашиної кислоти розбавляють до 1000,0 мл водою.

Виготовлення рухомої фази В. 1,00 мл форматної кислоти розбавляють до 1000,0 мл ацетонітрилом.

Виготовлення розчину порівняння. 100 мг (точна наважка) робочого стандартного зразка піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату вносять до мірної колби місткістю 100,0 розчиняють в воді і доводять до 100,0 мл водою та ретельно перемішують.

Виготовлення досліджуваного розчину. 10,00 мл 1% розчину Тріфузолу для ін'єкцій вносять до мірної колби місткістю 100,0 мл, змішують із 50 мл води високоочищеної, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та ретельно перемішують.

Виготовлення розчину для перевірки придатності хроматографічної системи. 5 мг робочого стандартного зразка кожної домішки розчиняють в суміші розчинників (вода/ацетонітрил – 70:30) і розбавляють вказаною сумішшю розчинників до 100,0 мл, ретельно змішують (розчин ІА).

50 мг робочого стандартного зразку піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату додають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють в суміші розчинників (вода/ацетонітрил – 70:30), додають 1,00

мл розчину **IA** та розбавляють до 100,0 мл сумішшю розчинників. Ретельно перемішують (розчин **IB**).

Хроматографічне визначення. Умови рідинної хроматографії були описані вище. Розчин для перевірки здатності хроматографічної системи індексують n разів. RSD розраховують за площею піку АФІ. Хроматографування припиняють, коли одержані значення RSD не перевищують значення RSD_{\max} , які розраховані у відповідності до вимог ДФУ (Доповнення 1 та 2) до RSD_{\max} для допуску вмісту $B = 5\%$ (табл. 4.21) [311, 312].

Розчин стандартного зразка та досліджуваній розчин вводять по черзі встановлену кількість разів (n). Середні результати використовують у наступних розрахунках. Час утримування піку АФІ становить близько 2,7 хв.

Відсотковий вміст піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату розраховують з використанням вмісту сполуки в розчині порівняння.

Вміст піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в субстанції тріфузолу X , %, визначають за формулою, що наведена в підрозд. 2.4.

4.3.7 Валідація методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій

Виготовлення 1% модельних розчинів Тріфузолу для валідації методики визначення. Використовують 8,00, 8,50, 9,00, 9,50, 5,00, 10,50, 11,00, 11,50, 12,00 мл кожного розчину, поміщають у колбу на 100,0 мл, додають води та доводять водою до мітки.

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок невизначеності приготування розчину робочого стандартного зразка:

- взяття наважки робочого стандартного зразка піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату: $(0,1 \text{ мг}/100 \text{ мг}) \times 100 = 0,1 \%$;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,0 мл: 0,12%.

Розрахунок невизначеності приготування досліджуваного розчину:

- відмірення об'єму 1% досліджуваного розчину піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату 10,00 мл: 0,5%;
- доведення об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100,00 мл: 0,12%.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,1^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2} = \sqrt{0,01 + 0,0144 + 0,25 + 0,0144} = 0,537\%$$

Згідно з ДФУ (Доповнення 1 та 2) невизначеність пробопідготовки повинна бути незначущою у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу, тобто $\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 * 0,32 * 5 = 0,512\%$ [311, 312]. Таким чином, прогнозоване значення Δ_{SP} не відповідає вимогам ДФУ ($0,537\% > 0,51\%$). Тому до кінцевої аналітичної операції повинні ставитись більш жорсткі вимоги.

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = 0,32 * 5 = 1,6\%$$

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{\Delta_{As}^2 - \Delta_{SP}^2} = \sqrt{1,6^2 - 0,537^2} = \sqrt{2,65 - 0,288} = 1,54\%$$

Валідаційні характеристики методики

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ у варіанті методу стандарту за наведеною стандартизованою процедурою [312, 340, 350]. Допуск вмісту АФІ в 1% розчині для ін'єкцій становить 5%.

Лінійність. Графік лінійної залежності площі піку від концентрації АФІ в нормалізованих координатах, рівняння калібрувального графіку та значення R^2 надані на рис. 4.57.

Метрологічні характеристики лінійної залежності для діапазону застосування методики 80-120% від номінального вмісту АФІ наведено в табл. 4.28. Методика лінійна на всьому діапазоні та відповідає вимогам ДФУ (Доповнення 2) [312].

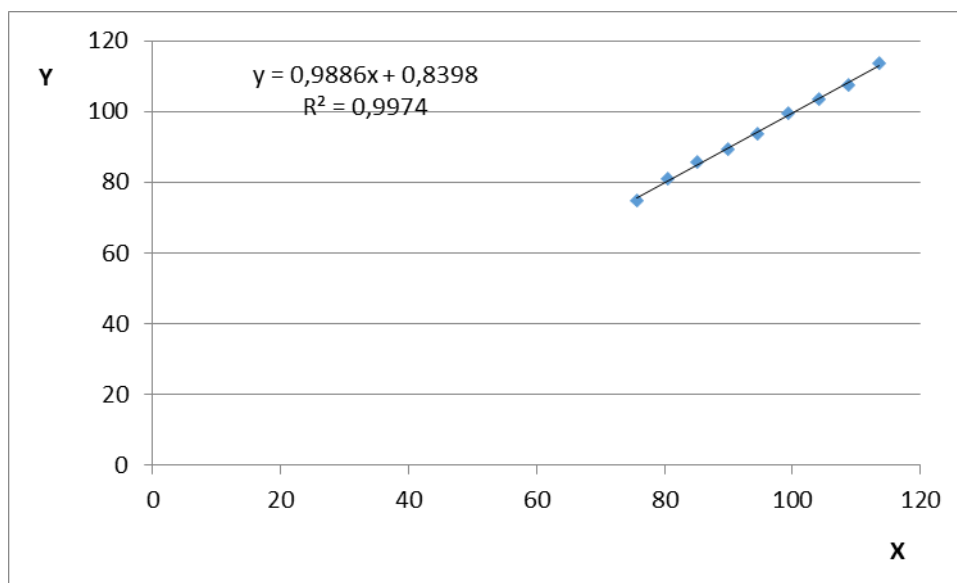


Рис. 4.57. Лінійна залежність площі піку від концентрації АФІ тріфлузолу в модельних розчинах для ін'єкції в нормалізованих координатах

Таблиця 4.28

Метрологічні характеристики лінійної залежності для методики кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій, $Y = bX + a$

Параметр	Значення	Критерій прийнятності ($B = 5\%$, $g = 9$)	Висновок
b	0,9886	—	—
s_b	0,01891	—	—
a	0,8398	$\leq 2,6$	відповідає
s_a	1,803	—	—
RSD_0	0,6926	$\leq 0,84$	відповідає
R_c	0,9987	$\geq 0,9981$	відповідає

Специфічність. Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук **2.2**, **2.6**, **2.11**. Роздільна здатність становить $R \geq 4,1$ (між піками АФІ та **2.6**) та $R \geq 2,7$ (між піками **2.11** та АФІ).

Прецизійність та правильність. Прецизійність визначали на рівні збіжності. Результати визначення прецизійності та правильності методики кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведено в табл. 4.29. Результати свідчать, що методика відповідає вимогам ДФУ до прецизійності та правильності [312].

Таблиця 4.29

**Результати визначення прецизійності та правильності
методики кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-
4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в 1% розчині для ін'єкцій**

Модель- ний розчин	Об'єм 1% модельного розчину АФІ, мл ($c_{st} = 0,10606$ г/100 мл)	Масса АФІ уведено, г/мл хром. розчину	Уведено у % до концен- трації розчину СЗ, X_i	Середня площа піку, S_i ($S_{st} = 13329$)	Знайдено у % до площі піку розчину СЗ, Y_i	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%$
1	2	3	4	5	6	7
1	8,00	0,000800	75,7	9999,4	75,02	99,2
2	8,50	0,000850	80,4	10808,2	81,09	101
3	9,00	0,000900	85,1	11418,6	85,67	101
4	9,50	0,000950	89,8	11908,3	89,34	99,4
5	10,00	0,001000	94,58	12469,8	93,55	98,91
6	10,50	0,001050	99,31	13254	99,44	100,1
7	11,00	0,001100	104,4	13797,7	103,52	99,50
8	11,50	0,001150	108,8	14352,1	107,67	98,99
9	12,00	0,001200	113,56	15162,4	113,75	100,2
Середнє, \bar{Z} , %						99,8
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z , %						0,726

1	2	3	4	5	6	7
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z = RSD_z \cdot t(95\%; n - 1) = RSD_z \cdot 1,8595$						1,35
Критерій прийнятності для збіжності результатів: $\Delta_{As} \leq 0,32 \cdot 5,00 = 1,6$						відповідає
Систематична похибка, $\delta = 100 - \bar{Z} $						0,238
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_z / 3 = 1,35 / 3 = 0,45$ 2) $\delta \leq 0,32 \cdot 5 = 1,6$						відповідає відповідає
Загальний висновок про методику						коректна

4.3.8 Застосування розробленої методики для кількісного визначення АФІ тріфузолу в 1% розчині для ін'єкцій. До 6 мірних колб ємністю 100,0 мл поміщають по 10,00 мл досліджуваного розчину піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, доводять водою до мітки. Хроматографують розчин порівняння для визначення кількості повторних інжекцій. Хроматографують досліджувані розчини. Хроматографування розчину порівняння проведено 5 разів. Результати наведено в табл. 4.30.

Таблиця 4.30

Результати перевірки пригодності хроматографічної системи по RSD

Хроматограма	S_{st}	Середнє S_{st}	RSD%	RSD% _{max} по ДФУ
1	13480,8	—	—	—
2	13488,6	13484,7	0,04090	0,25
3	13477,7	13482,4	0,04166	0,67
4	13478,9	13481,5	0,03636	0,96
5	13472,5	13479,7	0,03636	1,19

Одержане значення RSD не перевищувало вимоги ДФУ до $RSD\%_{\max}$ при усіх значеннях n, починаючи с $n = 2$. Тому достатньо по 2 рази почергово хроматографувати розчини порівняння (рис. 4.58) та випробувальний розчин (рис. 4.59) для кожної проби розчину [311, 312].

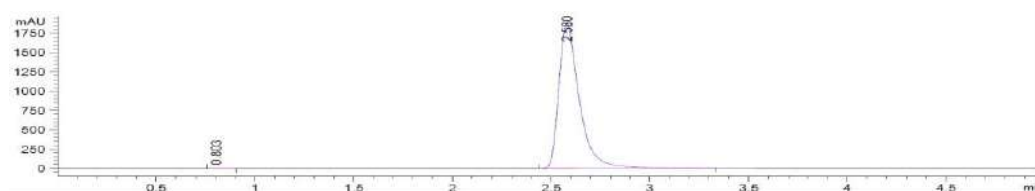


Рис. 4.58. Хроматограма розчину порівняння АФІ тріфузолу при 276 нм

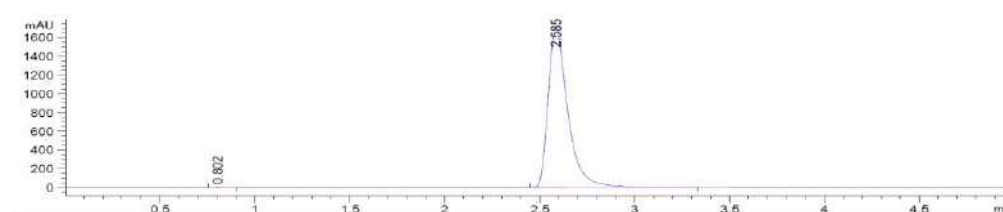


Рис. 4.59. Хроматограма досліджуваного 1% розчину тріфузолу при 276 нм

Результати визначення АФІ в реальних розчинах (табл. 4.31) характеризуються відтворюваністю. Методика може бути використована для визначення зразків розчинів для ін'єкцій при їх виготовленні та зберіганні.

Таблиця 4.31

Результати кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату 1% розчині для ін'єкцій

Дослід	Наважка, мл	Площа піку		Знайдено АФІ, у %	Метрологічні характеристики, $n - 1 = 5, P = 0,95$
1	2	3		4	5
1	10,00	12319,7	12305,3	0,9678	
		12290,9			

1	2	3		4	5
2	10,00	12258,8	12232,7	0,9621	$\bar{X} = 0,9733$ $S=0,01343$ $Sr= 1,380$ $\Delta\bar{X}=0,01409$ $\varepsilon=1,448\%$
		12206,6			
3	10,00	13544,9	13572,5	0,9669	
		13600,2			
4	10,00	12273,3	12284,6	0,9662	
		12296,0			
5	10,00	12414,1	12429,1	0,9785	
		12444,0			
6	10,00	12724,3	12693,4	0,9984	
		12662,6			
Стандартний зразок	0,1061	13484,7		–	–

4.4 Термодинамічна характеристика оберненофазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату та його технологічних домішок

4.4.1 Методика визначення термодинамічних параметрів оберненофазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок

Об'єкти дослідження. Розчин морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.26) з концентрацією 0,01% у воді. Розчини піридин-4-карбогідразиду (2.1), 2-ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гидразин-1-карботіоаміду (2.5) з концентрацією 0,1% в 50% ацетонітрилі. Розчин 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.10) з концентрацією 0,1% в диметилсульфоксиді.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.»,

високоочищена вода.

Обладнання. Високоефективна рідинно-хроматографічна система, що складалась із дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостата колонки, діодно-матричного детектора.

Хроматографічні умови. Колонка Zorbax SB-C18; 30 мм × 4,6 мм; 1,8 мкм. Температура колонки 40°C. Рухома фаза складалась із води (0,1% HCOOH) та ацетонітрилу (0,1% HCOOH) (84:16). Швидкість потоку 0,4 мкл/мл. Довжина хвилі діодноматричного детектору 272 нм. Об'єм, що було інжектровано, 5 мкл.

Дослідження впливу температури на характеристики утримування. Визначали шість разів час утримування кожної речовини при різних температурах від 30°C до 70°C градусів із кроком в 5 градусів.

4.4.2 Термодинамічні параметри оберненофазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок. Для дослідження ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в нерухому було використано методику розділення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, піридин-4-карбонгидразид, 2-изонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамиду та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону на колонці Zorbax C18 30 x 4,6, 1,8 мкм розмір зерна сорбенту [345, 346].

Згідно до рівнянь для визначення термодинамічних параметрів переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну (підрозд. 1.4) необхідно визначити коефіцієнт ємності в залежності від зміни абсолютної температури та створити графік $\ln k$ від $1/T$, в подальшому за допомогою методу найменших квадратів побудувати рівняння лінійної залежності.

Вплив температури на хроматографічне утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведено на рис. 4.60.

«Мертвий» час утримування дорівнював 0,6 хв. Знаходили середнє значення часу утримування для кожної температури, розраховували коефіцієнти ємності k . Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$ для усіх речовин було розраховано за методом найменших квадратів в програмі Microsoft Excel та наведено на рис. 4.61 і в табл. 4.32.

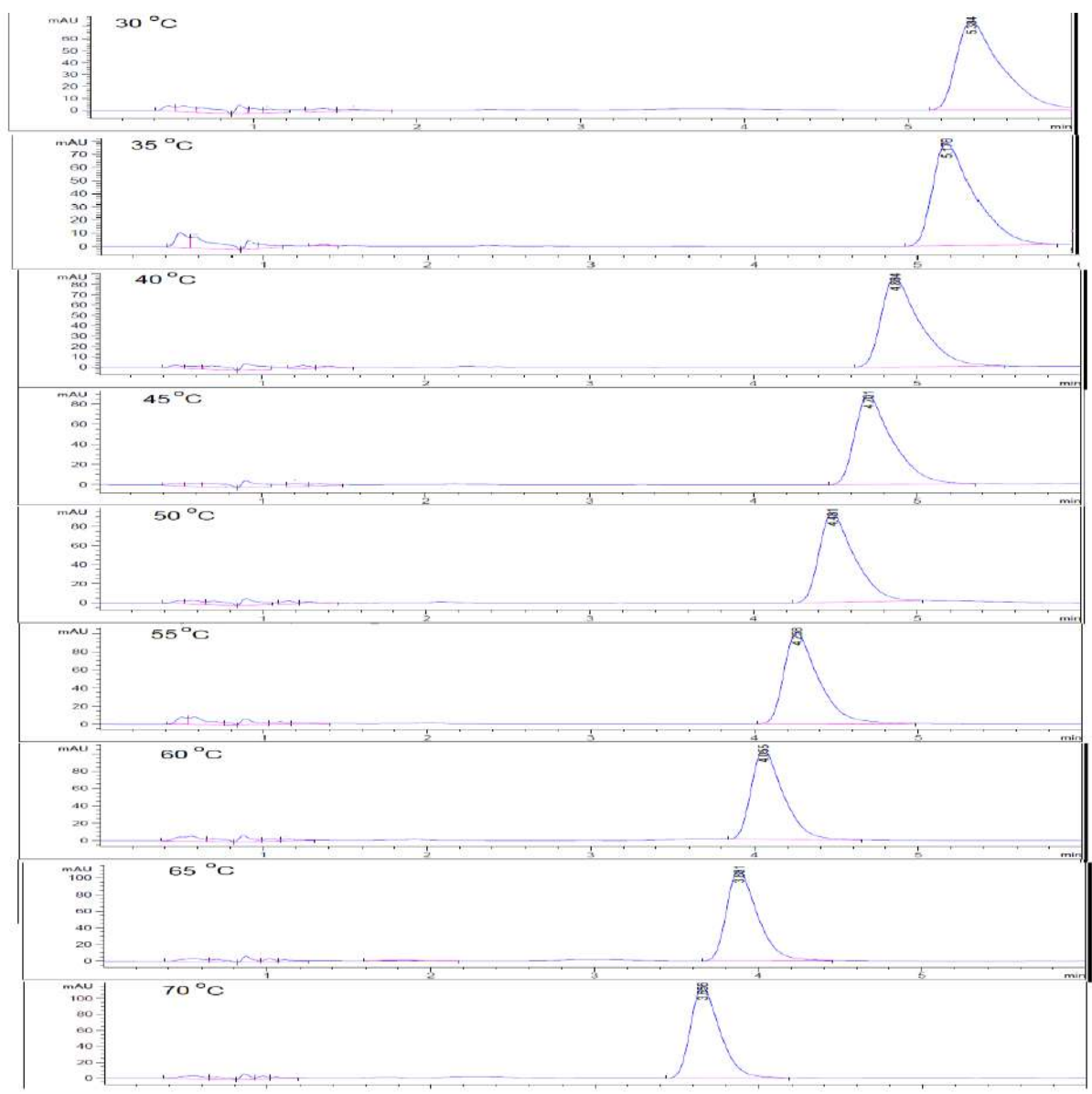


Рис. 4.60. Хроматограми морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при різних значеннях температури

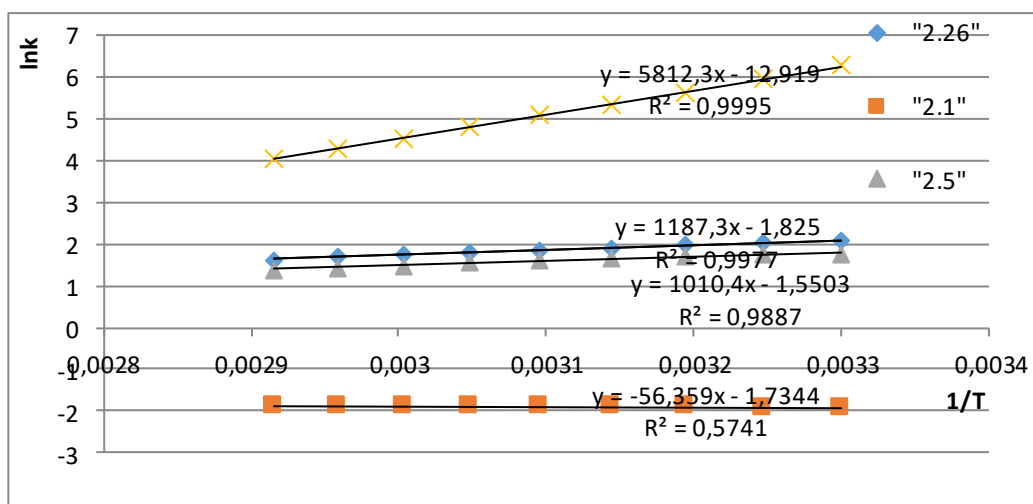


Рис. 4.61. Графіки залежності $\ln k$ від $1/T$ для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (**2.26**), піридин-4-карбогідразиду (**2.1**), 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду (**2.5**), 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону (**2.10**)

Таблиця 4.32

Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$, де $x = 1/T$, $y = \ln k$

Сполука	Речовина	Рівняння	R ²	Стандартна похибка регресії, S
2.10	4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон	$y = 5812,3x - 12,919$	0,9995	0,01885
2.26	морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат	$y = 1187,3x - 1,825$	0,9977	0,007955
2.5	2-ізонікотиноїл- <i>N</i> -(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід	$y = 1010,4x - 1,5503$	0,9887	0,01521
2.1	піридин-4-карбогідразид	$y = -56,359x - 1,7344$	0,5741	0,006834

Розрахунок стандартної молярної ентальпії переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу

Виходячи із рівнянь підрозд. 1.4, кутовий коефіцієнт m рівняння лінійної залежності дозволяє розрахувати стандартну ентальпію переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну фазу: $\Delta H^0 = -m \cdot R$ (табл. 4.33).

Для 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тиону: $\Delta H = -5812,3 \cdot 8,31 = -48,30$ кДж/моль.

Для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату: $\Delta H = -1187,3 \cdot 8,31 = -9,87$ кДж/моль.

Для 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл) гідразин-1-карботіоаміду: $\Delta H = -1010,4 \cdot 8,31 = -8,40$ кДж/моль.

Для піридин-4-карбогідразиду: $\Delta H = -(-56,359) \cdot 8,31 = 0,47$ кДж/моль.

Таблиця 4.33

Стандартні ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну

Сполука	Речовина	ΔH^0 , кДж/моль
2.10	4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тион	-48,30
2.26	морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетат	-9,87
2.5	2-ізонікотиноїл- <i>N</i> -(2-метоксифеніл) гідразин-1-карботіоамід	-8,40
2.1	піридин-4-карбогідразид	0,47

Ентальпії переносу для речовин **2.5**, **2.10**, **2.26** є негативними, тобто процес адсорбції на оберненофазовому сорбенті відбувається з виділенням теплоти та є екзотермічним. Це пояснює, що ці речовини переважно переходять із рухомої фази в стаціонарну, а не навпаки. Таким чином, вони добре утримуються на оберненофазовому сорбенті. Речовина **2.1** має найбільше значення ентальпії, що пояснюється зі збільшенням гідрофобності і відповідно

більшою взаємодією із октадецильним сорбентом. Але для піридин-4-карбогідразиду значення ентальпії переносу є позитивним, що пояснює погане утримування на оберненофазовому сорбенті.

4.5 Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідрофільної хроматографії

4.5.1 Методика визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідрофільної хроматографії

Об'єкти дослідження: морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетат, піридин-4-карбогідразид, 2-ізонікотиноіл-*N*-(2-метоксифеніл) гідразин-1-карботіоамід та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіон синтезовано на кафедрі фізколоїдної хімії ЗДМУ і підтверджено структуру під керівництвом д. фарм. н., професора Каплаушенка А. Г.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Обладнання. Застосовувалась ВЕРХ система, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор.

Хроматографічні умови. Використано колонку Agilent Zorbax Rx-Sil (4,6 × 50 мм, 1,8 мкм). Елюент складався із 0,1% HCOOH в ацетонітрилі 100 мМ та HCOONH₄ у воді (80:20). Швидкість потоку дорівнювала 0,4 мл/хв, та об'єм інжекції дорівнював 1 мкл. Довжина хвилі діодно-матричного детектору 272 нм.

Приготування розчинів. Розчин морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату із концентрацією 0,01% готували розчиненням речовини у воді. Розчини піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотиноіл-*N*-(2-метоксифеніл) гідразин-1-карботіоамід готували в 50%

ацетонітрилі із концентрацією 0,1%. Розчин 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон із концентрацією 0,1% готували в диметилсульфоксиді.

Дослідження впливу температури на характеристики утримування. Температуру змінювали від 30°C до 70°C із кроком у 5 градусів. Хроматографували шість разів при кожній температурі та визначали час утримування.

4.5.2 Термодинамічні параметри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його домішок в умовах гідروفільної хроматографії. Визначення ентальпії переносу речовин із рухомої фази в нерухому проводили за допомогою методики, із використанням колонці Agilent Zorbax Rx-Sil (4,6 × 50 мм, 1,8 мкм) в режимі гідروفільної хроматографії яка описана в роботі [354].

Виходячи із отриманих в підрозд. 1.4 рівнянь для визначення ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну, визначили коефіцієнт ємності в залежності від зміни абсолютної температури та побудували криві залежності $\ln k$ від $1/T$ (рис. 4.62).

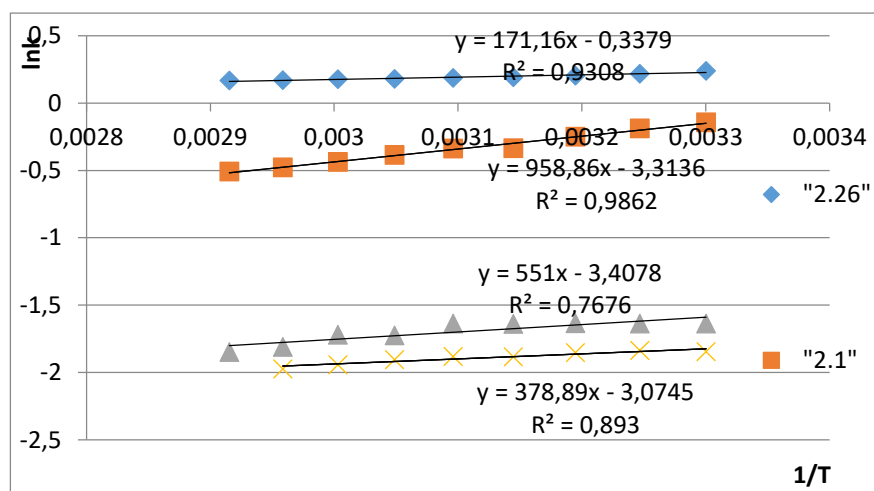


Рис. 4.62. Графіки залежності $\ln k$ від $1/T$ для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.26), піридин-4-карбогідразиду (2.1), 2-ізонікотиноїл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіо-аміду (2.5), 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону (2.10)

Для створення рівняння лінійної залежності для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону застосували метод найменших квадратів (табл. 4.34).

Таблиця 4.34

Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$, де $x = 1/T$, $y = \ln k$

Сполука	Речовина	Рівняння	R ²	Стандартна похибка регресії, S
2.10	4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон	$y = 378,89x - 3,0745$	0,893	0,016938
2.26	морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат	$y = 171,16x - 0,3379$	0,9308	0,006573
2.5	2-ізонікотиноїл- <i>N</i> -(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід	$y = 551x - 3,4078$	0,7676	0,042683
2.1	піридин-4-карбогідразид	$y = 958,86x - 3,3136$	0,9862	0,015988

На рис. 4.63 показані хроматограми морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в залежності від температури.

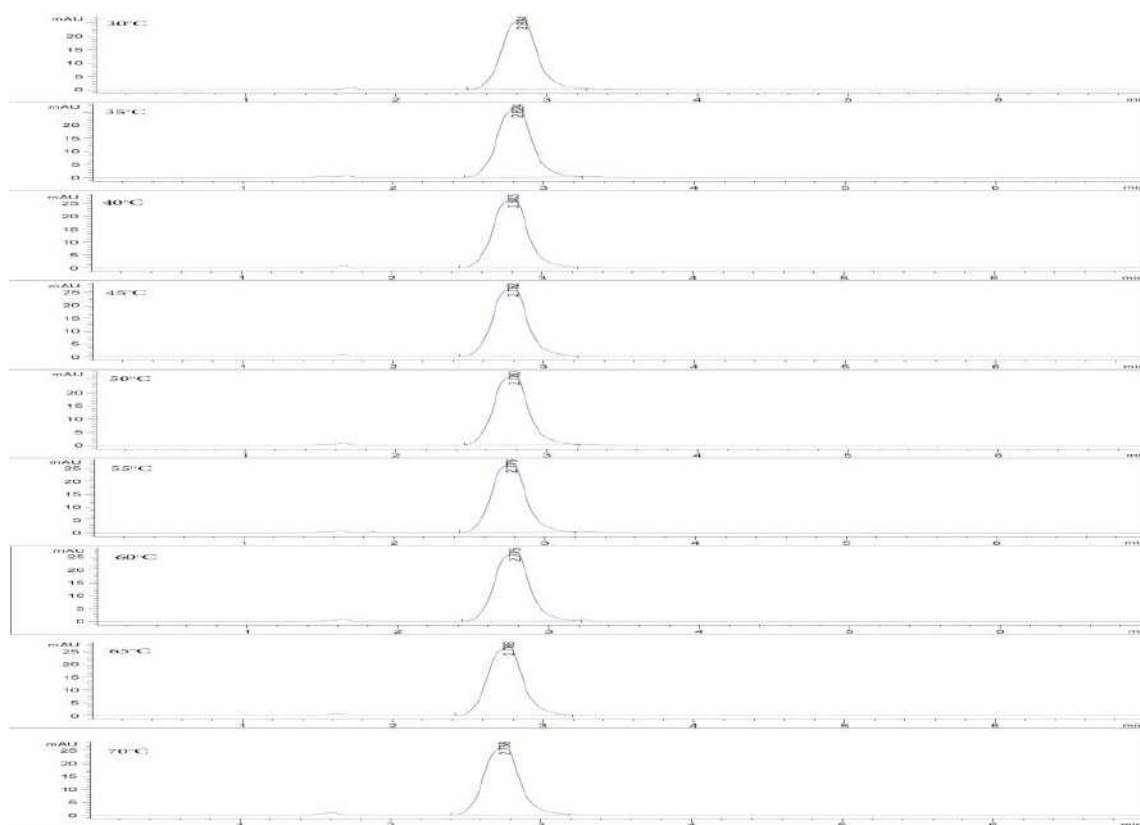


Рис. 4.63. Хроматограми морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в залежності від температури колонки

Визначення стандартної молярної ентальпії переносу аналітів із мобільної в стаціонарну фазу

Стандартну ентальпію переносу аналіту із мобільної в стаціонарну фазу розраховували на підставі кутового коефіцієнта m рівняння лінійної залежності (підрозд 1.4). Результати розрахунків стандартних ентальпій переносу наведено в табл. 4.35.

Негативні значення ентальпії переносу для усіх речовин показують, що речовини адсорбуються на поверхні силікагелю із виділенням теплоти. Тому процес переходу речовини із рухомої фази в стаціонарну переважає над зворотнім процесом. Це пояснює, що речовини в режимі гідрофільної хроматографії добре утримуються на силікагелі. Речовина **2.1** має найбільше значення ентальпії, тому що є найбільш гідрофільною і відповідно краще взаємодіє із сорбентом.

Стандартні ентальпії та умовні стандартні ентропії переносу аналітів із мобільної фази в стаціонарну

Сполука	Речовина	ΔH^0 , кДж/моль	ΔS^0 , кДж/моль
2.10	4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл) - 2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон	-3,15	-0,0271
2.26	морфоліній 2-((4-(2- метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H- 1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетат	-1,42	-0,00436
2.5	2-ізонікотиноїл-N-(2-метокси- феніл) гідрозин-1-карботіоамід	-4,58	-0,0299
2.1	піридин-4-карбогідрозид	-7,97	-0,0291

Оцінювання стандартної ентропії переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну

Важливою термодинамічною характеристикою утримування є ентропія переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу. Пересічення графіку із віссю ординат дозволяє визначити ентропію переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну фазу: $\Delta S^0 = (b + \ln\beta) \cdot R$

Порівнюючи значення у-перетину (коефіцієнтів b) (табл. 4.34) можна порівняти значення ентропійного фактору для різних аналітів. Усі коефіцієнти b мають негативне значення. Чим більшим є за абсолютною величиною цей коефіцієнт, тим більше знижується ентропійний фактор, і більше знижується утримування. У порядку зниження ентропійного фактору речовини можна розташувати наступним чином: **2.26, 2.10, 2.1, 2.5**.

Приблизно розрахувати ентропійний фактор пропонуємо використовуючи наступну модель.

Відношення об'ємів рухомої до стаціонарної фази β можна оцінити та розрахувати об'єм рухомої фази наступним чином:

$$V_M = t_0 \cdot v,$$

де t_0 – «мертвий час»;

v – швидкість потоку.

«Мертвий час» було визначено за допомогою компонента, що не утримується на силікагелі в умовах гідрофільної хроматографії KNO_3 . Він дорівнював 1,25 хв: $V_M = t_0 \cdot v = 1,25 \cdot 0,4 = 0,5$ мл

Об'єм стаціонарної фази було розраховано згідно із моделлю, де колонку було максимально щільно упаковано сферичними частками сорбента. Згідно з гіпотезою Кеплера, яку доказав Т. К. Хейлз [355], максимальна щільність упаковки сфер $\epsilon = \pi/\sqrt{18} \approx 0,74048$. Тому сферичний сорбент може займати максимально 74%. Колонка має циліндричну форму, тому її об'єм можна розрахувати наступним чином: $V_{column} = h \cdot \pi \cdot r^2 = 5 \cdot 3,14 \cdot 0,23^2 = 0,83$ мл

При щільності пакування 74% (ідеальне пакування) максимальний об'єм стаціонарної фази складає: $V_{s(max)} = 0,74 \cdot 0,83 = 0,6$ мл

Але справжній об'єм стаціонарної фази, в якому буде присутній аналіт, є меншим, тому пропонуємо увести умовну величину β' : $\beta' = \frac{V_M}{V_{s(max)}} = \frac{0,5}{0,6} = 0,83$

Оскільки справжнє значення відношення об'ємів рухомої до стаціонарної фази невідомо, пропонуємо розрахувати умовне (приблизне) значення стандартної ентропії переносу аналізу із рухомої фази в стаціонарну: $\Delta S^{0'} = (b + \ln \beta') \cdot R$

Результати розрахунку умовного значення ентропії (табл. 4.35) мають таку ж послідовність зниження, як визначено на підставі у-перетину: **2.26, 2.10, 2.1, 2.5**. Найбільшу величину має морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазоліл)тіо)ацетат, а точніше його протонувана кислотна форма, яка утворюється в присутності мурашиної кислоти елюенту. Поряд із негативним

значенням ентальпії переносу це характеризує гарну здібність адсорбуватись на силікагелі.

Результати показують, що умовний ентропійний фактор порівняно із ентальпійним фактором має дуже невеликі значення (приблизно в 100 разів менше).

4.6 Визначення термодінамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії

4.6.1 Методика встановлення термодінамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії. Заропоновано високоефективну рідинно-хроматографічну методику для визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацета в субстанції [359].

Хроматографічне обладнання. Високоефективна рідинно-хроматографічна система, що складалась із дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостата колонки, діодно-матричного детектора

Хроматографічні умови. Колонка Zorbax SB-C18; 30 мм × 4,6 мм; 1,8 мкм. Температура колонки 40°C. Рухома фаза складалась із води (0,1% HCOOH) та ацетонітрилу (0,1% HCOOH) (95:5). Швидкість потоку 0,4 мкл/мл. Довжина хвилі діодно-матричного детектору 244 нм. Об'єм, що було інжектровано, 5 мкл.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Виготовлення розчинів. Виготовлено розчини морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату (**2.28**) із концентрацією 0,1% у воді. Розчин 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону (**2.12**) готували із концентрацією 0,1% в диметилсульфоксиді, розчин піридин-4-карбогідрозиду (**2.1**) із концентрацією 0,1% готували в 50% ацетонітрилі.

Визначення залежності утримування від температури.

Хроматографували розчини кожної речовини при різних температурах від 30°C до 70°C із кроком в 5 градусів.

4.6.2 Дослідження умов розділення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату та його домішок. В підрозд. 4.1 надані результати досліджень залежності хроматографічного утримування від вмісту ацетонітрилу для піридин-4-гідразиду, 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-тріазол-3-тіону, морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату при 40°C.

Побудуємо графіки залежності коефіцієнта ємності від відсоткового вмісту ацетонітрилу із використанням цих даних (рис. 4.64).

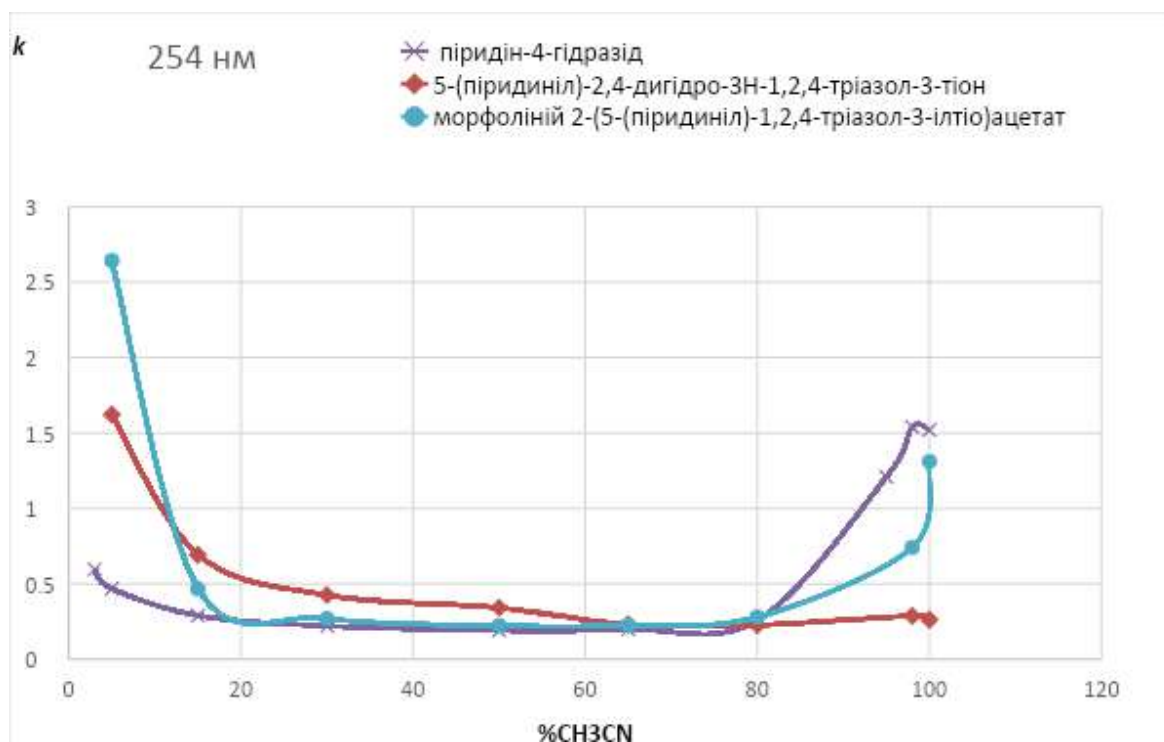


Рис. 4.64. Графіки залежності коефіцієнтів ємності сполук від вмісту ацетонітрилу в елюенті

Максимальне розділення між речовинами при найбільшому утриманні спостерігається при 5% ацетонітрилу (рис. 4.65).

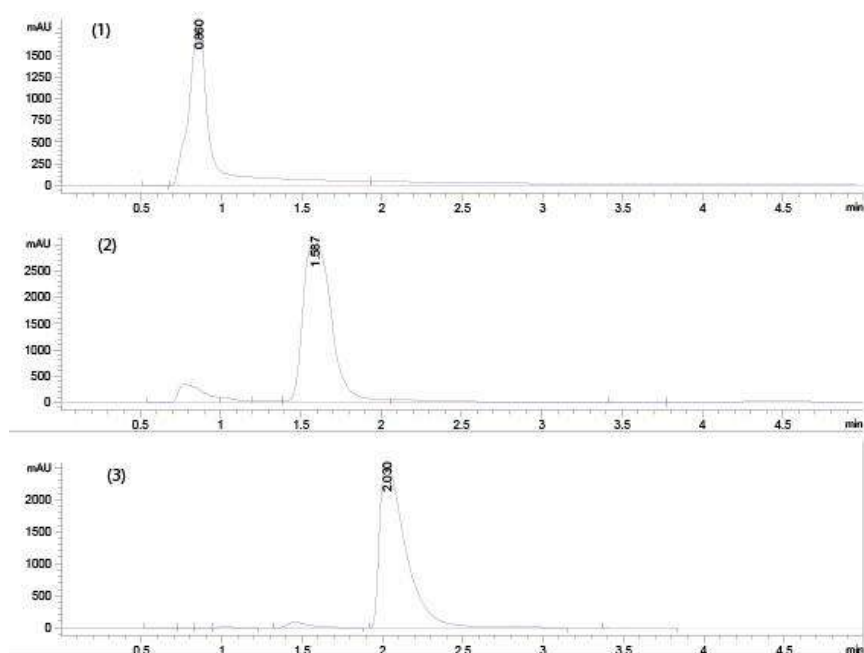


Рис. 4.65. Хроматограми піридин-4-гідрозиду (1), 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону (2), морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату (3)

4.6.3 Термодінамічні параметри морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії. Вплив температури на хроматографічне утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату наведено на рис. 4.66. При взаємодії із мурашиною кислотою елюента сіль утворює кислотну форму активного фармацевтичного інгредієнта, тому фактично хроматограми, що наведені на рис. 4.66, відповідають кислоті.

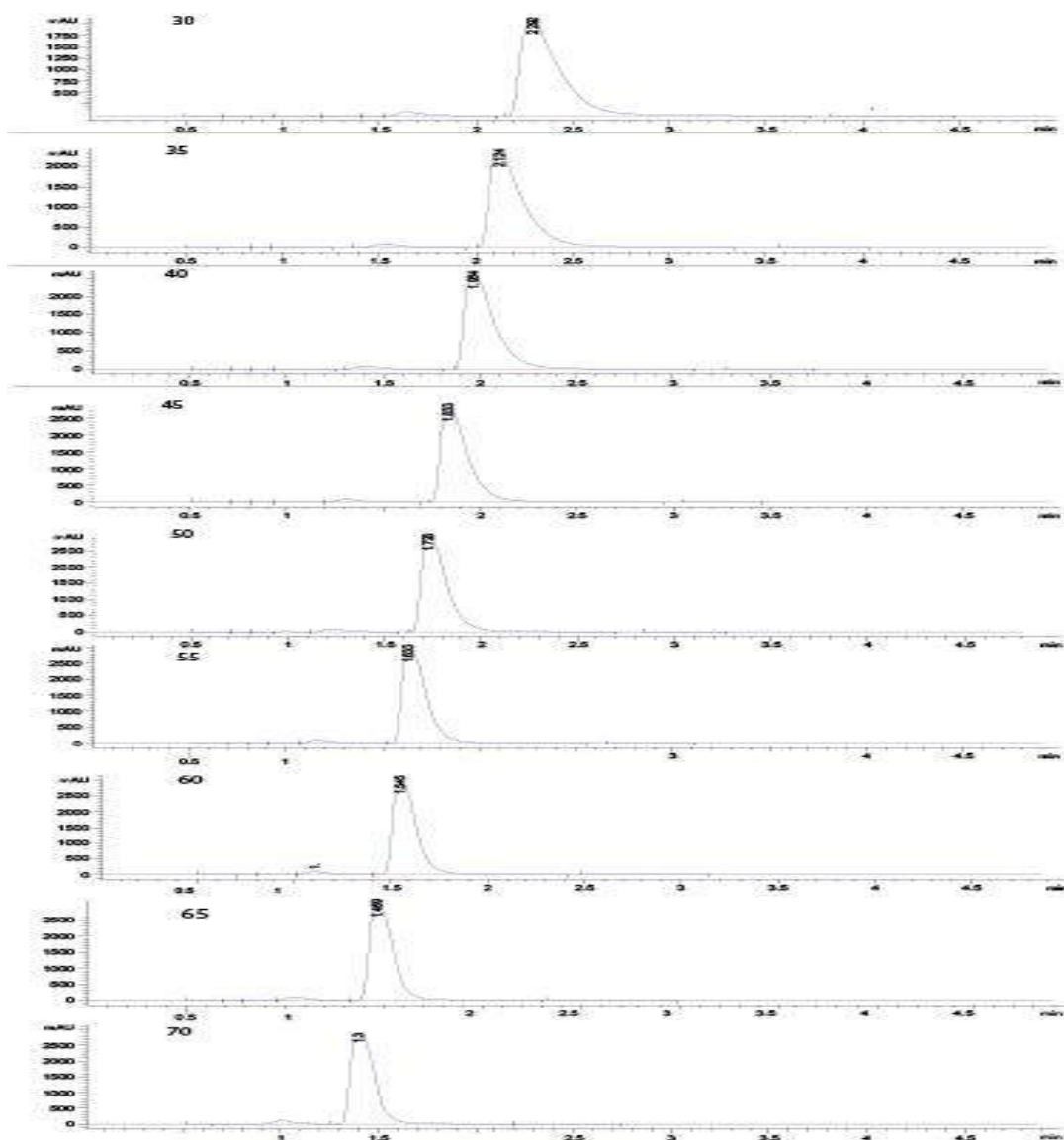


Рис. 4.66. Хроматограми морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату при різних значеннях температури (30-70°C)

Значення «мертвого» часу утримування визначали на момент виходу сполуки KNO_3 , що не затримується на сорбенті. Його значення склало 0,6 хв.

Середні значення часу утримування для речовин при температурах від 30°C до 70°C використовували для розрахунку коефіцієнтів ємності k . За методом найменших квадратів у програмі Microsoft Excel розраховували рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$, в табл. 4.36.

Таблиця 4.36

Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$, де $x = 1/T$, $y = \ln k$

Сполука	Речовина	Рівняння	R^2	Стандартна похибка регресії, S
2.12	5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон	$y=1379,11x-3,94$	0,9971	0,01035
2.28	морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетат	$y=1942,0x-5,370$	0,9997	0,004834
2.1	піридин-4-гідразид	$y=725,71x-3,162$	0,9935	0,008249

Розрахування стандартної молярної ентальпії переносу аналітів із мобільної в нерухому фазу

Для розрахунку стандартної ентальпії переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну фазу використовуємо кутівий коефіцієнт m рівняння лінійної залежності (підрозд. 1.4).

Обчислення для 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону:

$$\Delta H = -1379,1 \cdot 8,31 = -11,46 \text{ кДж/моль}$$

Для морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату:

$$\Delta H = -1942,1 \cdot 8,31 = -16,14 \text{ кДж/моль}$$

Для піридин-4-гідразиду:

$$\Delta H = -725,71 \cdot 8,31 = -6,031 \text{ кДж/моль}$$

Спостерігаємо, що ентальпії переносу для усіх речовин (табл. 4.37) є негативними, що означає вивільнення теплоти при адсорбції на оберненофазовому сорбенті при даному складі елюента. Таким чином, перехід із рухомої в стаціонарну фазу переважає. Це відповідає тому, що ці речовини добре утримуються на оберненофазовому сорбенті.

Стандартні ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну

Сполука	Речовина	ΔH^0 , кДж/моль
2.12	5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-тріазол-3-тіон	-11,46
2.28	морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетат	-16,14
2.1	піридин-4-гідразид	-6,031

ВИСНОВКИ

1. Встановлено залежність коефіцієнта ємності k від вмісту ацетонітрилу для гідрозидів карбонових кислот та гідразінокарботіоамідів, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот, а також їх солей, низки потенційних лікарських речовин. Показано можливості вибору умов хроматографічного визначення цих сполук як окремо, так і в сумішах.

2. Досліджен зв'язок між $\lg D$ та коефіцієнтами ємності досліджуваних сполук при 15% вмісті ацетонітрилу в складі рухомої фази. Встановлено зв'язок між $\lg D$ та десятичними логарифмами коефіцієнтів ємності досліджуваних сполук при 15% вмісту ацетонітрилу, якій носить лінійний характер.

3. Отримані закономірності опрацьовані при розробці методик кількісного визначення досліджуваних 1,2,4-тріазол-3-тіонів разом з гідрозидами та карботіоамідами кислот як індивідуально, так і у вигляді домішок до АФІ відповідних солей 1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатних кислот.

4. Визначені умови хроматографічного розділення домішок та АФІ тіометризолу та тріфузолу. Запропоновано методики визначення вказаних домішок та АФІ. Розроблена методика визначення АФІ тріфузолу в 1%-му розчині для ін'єкцій. Отримані результати валідації методик свідчать, що вони є специфічними, відповідають критеріям лінійності, прецизійності та правильності. Результати визначення вмісту домішок в субстанції та лікарській

формі вказують на те, що методики можуть бути запропоновані для контролю якості лікарських речовин та препаратів.

5. Досліджено залежність утримування від температури, а також визначено термодинамічні характеристики переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну фазу для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та домішок до нього, а також для морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та домішок до нього.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [345, 346, 348, 349, 352].

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНОЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ СПОЛУК
ДЛЯ ВЕРХ-МС ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Даний розділ присвячений вивченню закономірностей фрагментації ряду гідразидів низки органічних кислот та їх відповідних гідрaziнокарботіоамідів, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, напівпродуктів в синтезі АФІ, ряду 1,2,4-тріазоліл-тіоацетатних кислот та їх солей в іонному джерелі електроспрей мас-спектрометричного детектора при різних значеннях напруги на фрагментаторі. Для ідентифікації та кількісного визначення досліджуваних сполук необхідно встановлення характеристичних іонів, які утворюються в результаті розпаду іонів в джерелі іонізації. Схеми фрагментації відображено в публікаціях [356-358].

5.1 Умови дослідження мас-спектрометричної фрагментації при іонізації в електроспреї

Умови виготовлення розчинів досліджуваних сполук описані в підрозд. 2.4.

ВЕРХ-МС дослідження проводили в ізократичних умовах з використанням елюенту складу H_2O (0,1% HCOOH) – CH_3CN (0,1% HCOOH) (50:50) на колонці Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм, 1,8 мкм при температурі колонки 40°C. Використання колонки допомагає відділити досліджувані сполуки від ймовірних домішок. Швидкість потоку елюенту складала 0,4 мл/хв. Використано джерело іонів – електроспрей в SCAN режим реєстрації іонів при діапазоні m/z 100-1000 для сполук **2.1-2.9**, **2.11**, **2.13-2.16**, **2.26-2.31**, але для сполук **2.10**, **2.12**, **2.17**, **2.32** режим SCAN: 160-1000. Сканування проводили в позитивної полярності, швидкість газу осушувача (азоту) дорівнювала 10 л/хв, напруга на капілярі 4000 В.

Оптимальна температура газа-осушувача, оптимальний тиск на небулайзері для кожної сполуки описані в підрозд. 3.3-3.5.

5.2 Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду при іонізації в електроспреї гідразидів ряду органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботіоамідів, напівпродуктів в синтезі АФІ

Піридин-4-карбогідрозид (2.1). Подібно мас-спектрам, отриманим в комірці зіткнення тройного квадруполю, було визначено мас-спектри іоніазиду в зоні дисоціації індукованої зіткненням. Мас-спектри мають аналогічний характер.

На мас-спектрі іоніазиду при напрузі на фрагментаторі 100 В спостерігається піки з m/z 138,1 (основний – квазімолекулярний, протонувана молекула MH^+) та 139,1 (слабкий – ізотопний). При напрузі 200 В утворюється фрагментний іон з m/z 121,1 (основний) та 122,1 (ізотопний) (рис. 5.1). Ймовірна реакцію фрагментації іоніазиду наведено на рис. 5.2. При гетеролітичному розриві зв'язку N-N позитивний заряд залишається на амідному атомі Нітрогену (вакантна орбіталь), який може створити ковалентний зв'язок за донорно-акцепторним механізмом з атомом Оксигену карбонілу, що містить неподілену електронну пару. Негативний заряд, що залишається на атомі Нітрогену, який відривається, дозволяє утворити молекулу аміаку за реакцією з протоном.

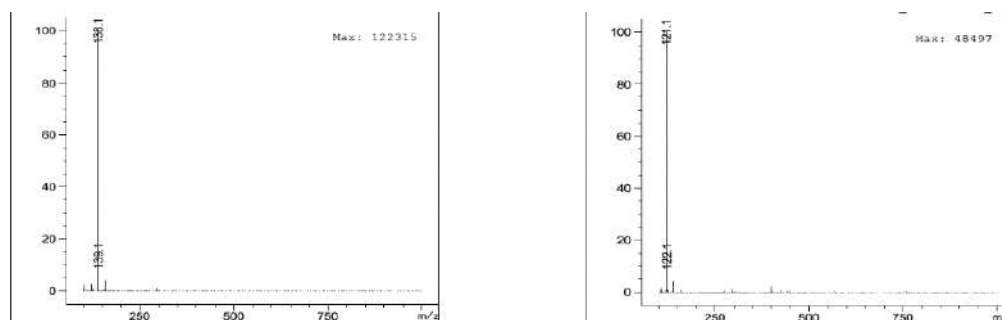


Рис. 5.1. Мас-спектри іоніазиду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

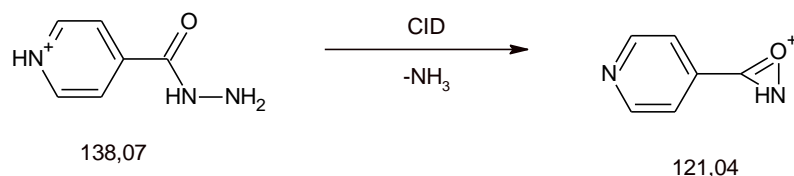


Рис. 5.2. Фрагментація ізоніазиду та моноізотопні маси іонів

Фуран-2-карбогідрозид (2.2). При напрузі на фрагментаторі 100 В утворюється квазімолекулярний (протонована молекула) іон з m/z 127,1 та іон з m/z 128,1 (ізотопний) (рис. 5.3-5.4). При збільшенні напруги на фрагментаторі від 100 до 200 В інтенсивність сигналу зніжується близько в 60 разів, тому можливо припустити, що квазімолекулярний іон значно руйнується та при цьому інтерпретувати мас-спектр не уявляється доцільним

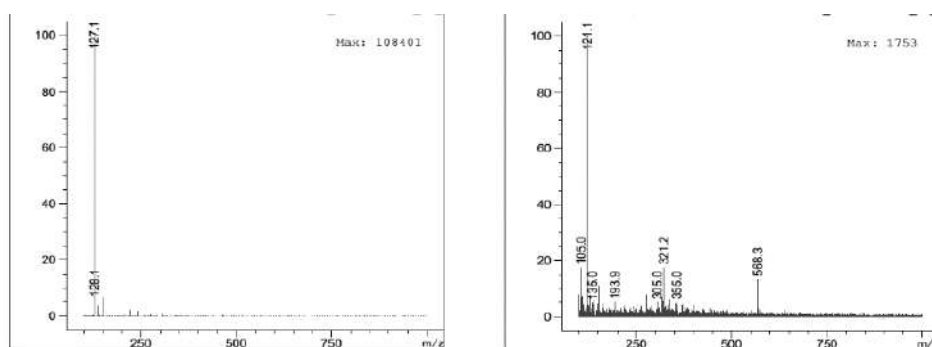


Рис. 5.3. Мас-спектри фуран-2-карбогідрозиду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

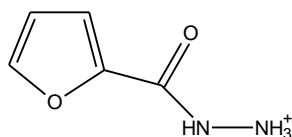


Рис. 5.4. Структура та моноізотопна маса квазімолекулярного іону фуран-2-карбогідрозиду

При 200 В спостерігається руйнування фуранового циклу фуран-2-карбогідрозиду на відміну від піридинового циклу ізоніазиду, це можна пояснити тим, що енергія зв'язків фуранового циклу значно менша.

2-Морфоліноацетогідразид (2.3). В мас-спектрі при напрузі на фрагментаторі 100 В спостерігається основний іон з m/z 160,1 (квазімолекулярний іон – протонувана молекула). При напрузі на фрагментаторі 200 В цей пик значно зменшується, але утворюється фрагментований іон з m/z 100,2 (основний) та іон із незначною інтенсивністю з m/z 101,1 (ізотопний) (рис. 5.5). Таким чином відбувається руйнування зв'язку між карбонільним та метиленовим атомами Карбону. На метиленовому атомі Карбону залишається вільна орбіталь, тому він може створити ковалентний зв'язок із гетероциклічним атомом Оксигену завдяки неподіленій парі електронів за рахунок донорно-акцепторного механізму (рис. 5.6).

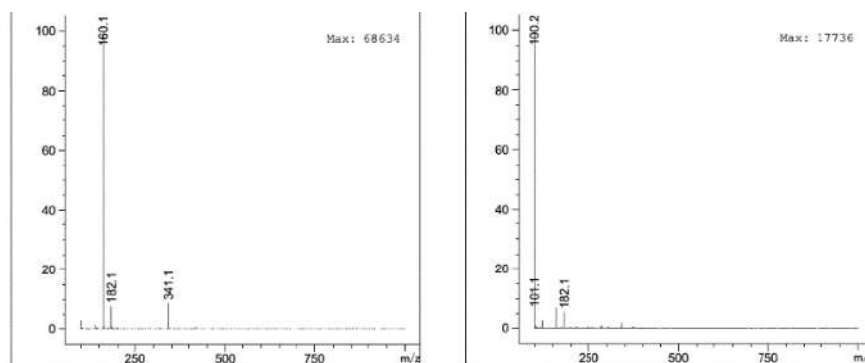


Рис. 5.5. Мас-спектри 2-морфоліноацетогідразида при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

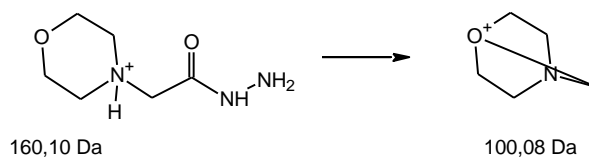


Рис. 5.6. Фрагментація 2-морфоліноацетогідразида та моноізотопні маси іонів

2-Метоксибензогідразид (2.4). На мас-спектрі при напрузі 100 В присутній квазімолекулярний іон MH^+ з m/z 167,1, а також іон з m/z 153,1, що утворюється при деметилюванні квазімолекулярного іону. При напрузі 200 В квазімолекулярний іон повністю руйнується, що призводить до втрати

гідразидної групи та утворення іону з m/z 135,1, якій в свою чергу при деметилюванні утворює іон з m/z 105,1 (рис. 5.7-5.8).

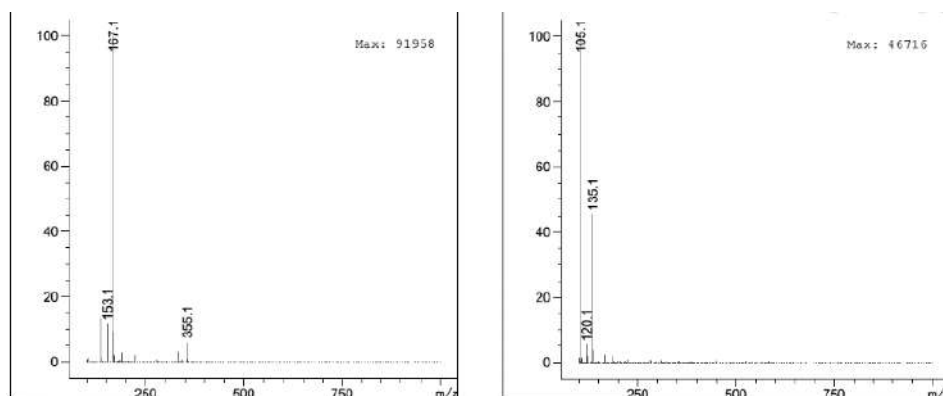


Рис. 5.7. Мас-спектри 2-метоксибензогідразида при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

Бензольний цикл повинен стабілізуватись за рахунок мезомерного ефекту π -електронної хмари (рис. 5.8).

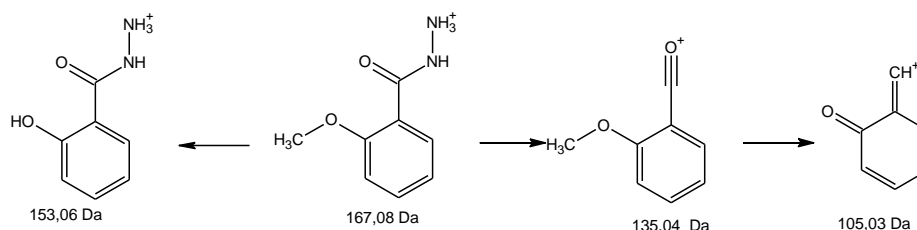


Рис. 5.8. Фрагментація 2-метоксибензогідразида та моноізотопні маси іонів

2-Ізонікотіноіл-N-(2-метоксіфеніл)гідразин-1-карботіоамід (2.5). При напрузі на фрагментаторі 100 В спостерігається квазімолекулярний іон з m/z 303,1 самої сполуки, а також квазімолекулярний іон 4-(2-метоксіфенілу)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону, який утворюється в іонному джерелі в результаті циклізації карботіоаміду, з m/z 285,1. Крім того спостерігається пік димерного іону з m/z 605,1. При напрузі 200 В з'являються декілька іонів. Пара іонів створюється при розриві зв'язку N-N з m/z 121,1

(утворення такого іона пояснено при описі фрагментації ізоніазиду) та з m/z 180,0. При розриві зв'язку між атомом Нітрогену та атомом Карбону тіоамідної групи утворюється іон з m/z 138,1 – квазімолекулярний іон, протонована молекула ізоніазиду. Із 1,2,4-тріазол-3-тіону утворюється іон з m/z 269,0 в результаті деметилування, втрати гідрид-іону атомом Сульфуру та можливого утворення циклу за рахунок донорно-акцепторного зв'язування Сульфуру та Нітрогену (рис. 5.9-5.10).

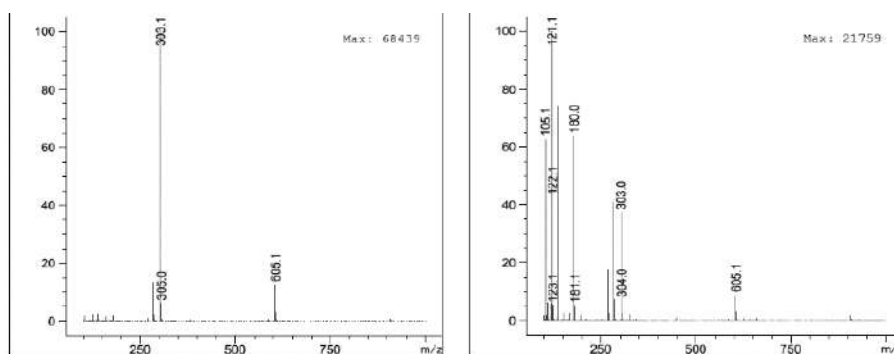


Рис. 5.9. Мас-спектри 2-ізонікотиноіл-*N*-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоаміду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

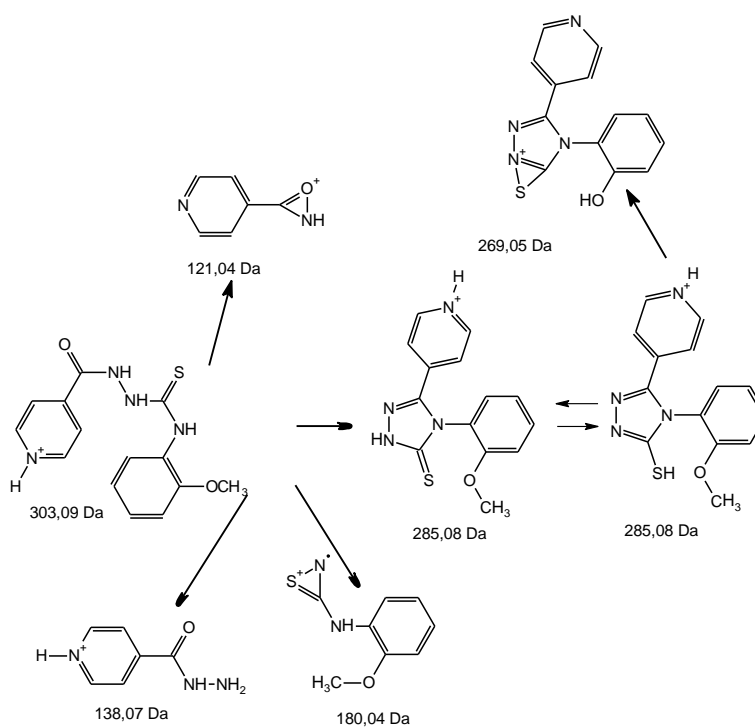


Рис. 5.10. Фрагментація 2-ізонікотиноіл-*N*-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоаміду та моноізотопні маси іонів

2-(Фуран-2-карбоніл)-N-фенілгідрозин-1-карботіоамі (2.6). При 100 В спостерігаються квазімолекулярний іон з m/z 262,1 та іон з m/z 127,1 (протонована молекула фуран-2-карбогідразида), який утворюється в результаті розриву зв'язку між Нітрогеном та тіоамідним Карбоном. Також утворюється димерний іон з m/z 523,1. При 200 В спостерігається продукт фрагментації з m/z 136,0. Крім того з'являється тримерний іон з m/z 784,1 (рис. 5.11-5.12).

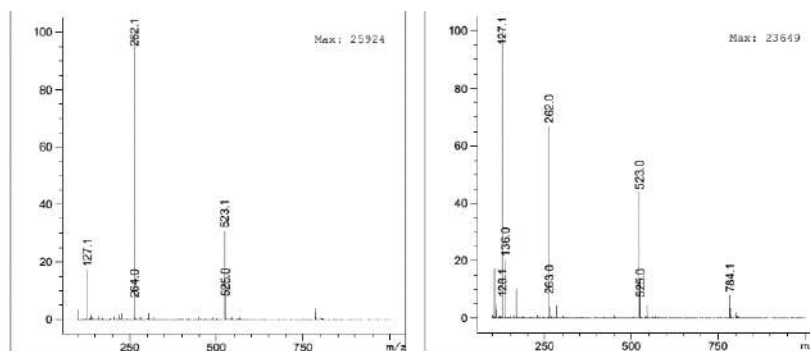


Рис. 5.11. Мас-спектри *2-(фуран-2-карбоніл)-N-фенілгідрозин-1-карботіоамі* у різних умовах фрагментації (100, 200 В)

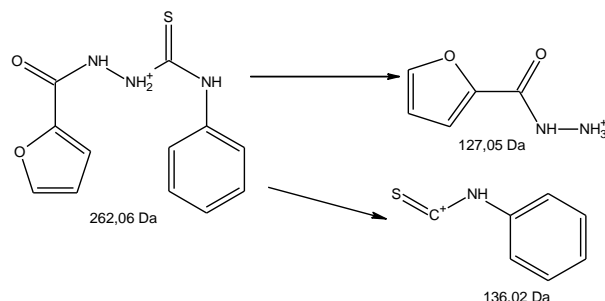


Рис. 5.12. Фрагментація *2-(фуран-2-карбоніл)-N-фенілгідрозин-1-карботіоамі* та моноізотопні маси іонів

2-(2-Морфоліноацетил)-N-фенілгідрозин-1-карботіоамід (2.7). При 100 В утворюється квазімолекулярний іон речовини MH^+ з m/z 295,1, а також квазімолекулярний іон 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дігідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіона, продукту циклізації речовини в іонному джерелі. Крім того створюється димерний іон з m/z 589,2. При 200 В з'являються продукти розпаду квазімолекулярного іону. При розриві зв'язку між фениламідним

Нітрогеном та атомом Сульфуру створюється іон з m/z 202,1. При розриві зв'язку між гідрозидним Нітрогеном та атомом Сульфуру формується іон з m/z 160,1 (квазімолекулярний іон 2-морфоліноацетогідрозида), який частково руйнується зі створенням m/z 100,1 (рис. 5.13-5.14) (утворення такого іона пояснено при описі фрагментації 2-морфоліноацетогідрозиду).

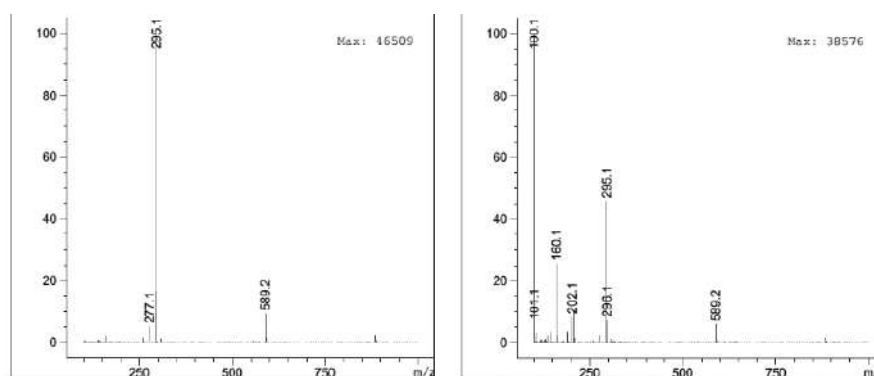


Рис. 5.13. Мас-спектри 2-(2-морфоліноацетил)-*N*-фенилгідрзин-1-карботіоаміду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

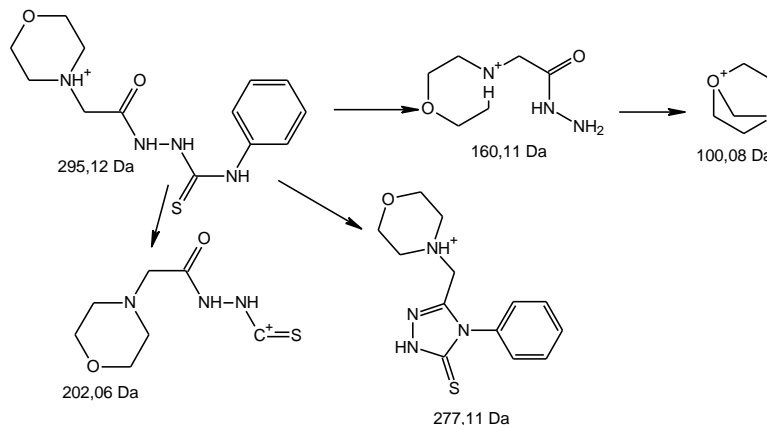


Рис. 5.14. Фрагментація 2-(2-морфоліноацетил)-*N*-фенилгідрзин-1-карботіоаміду та моноізотопні маси іонів

N-Метил-2-(2-морфоліноацетил)гідрозин-1-карботіоамід (2.8). При напрузі 100 В спостерігається пік з m/z 233,1 (квазімолекулярний іон MH^+). Цей іон створює квазімолекулярний іон 2-морфоліноацетогідрозида з m/z 160,1, який при 200 В утворює іон з m/z 100,1 (рис. 5.15-5.16) (утворення такого іона розглянуто при поясненні фрагментації 2-морфоліноацетогідрозиду).

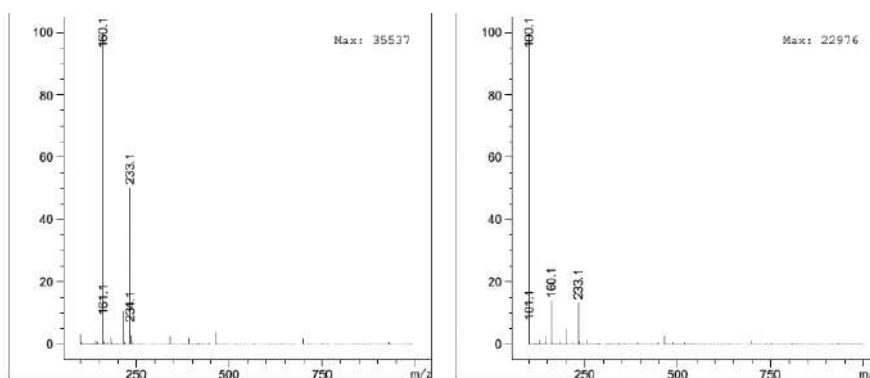


Рис. 5.15. Мас-спектри *N*-метил-2-(2-морфоліноацетил)гідразин-1-карботіоаміду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

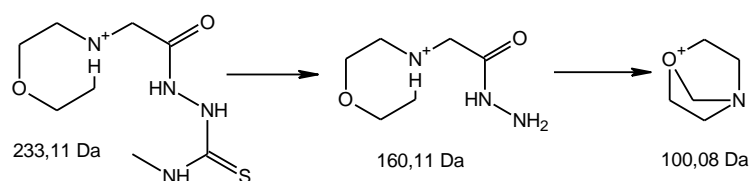


Рис. 5.16. Фрагментація *N*-метил-2-(2-морфоліноацетил)гідразин-1-карботіоаміду та моноізотопні маси іонів

2-(2-Метоксибензоїл)гідразин-1-карботіоамід (**2.9**) (рис. 5.17-5.18). При напрузі 100 В спостерігається квазімолекулярний іон MH^+ з m/z 226,1, який утворює іон з m/z 134,9 в результаті розриву зв'язку між карбонільним атомом карбону та гідразидним нітрогеном. Іон з m/z 267,0 вважаємо аддуктом протонованої молекули з ацетонітрилом. Крім того утворюється димерний іон з m/z 451,1, а також тримерний іон з m/z 678,0. При напрузі 200 В зникає іон аддукту з ацетонітрилом, але утворюється тримерний іон з m/z 676,1.

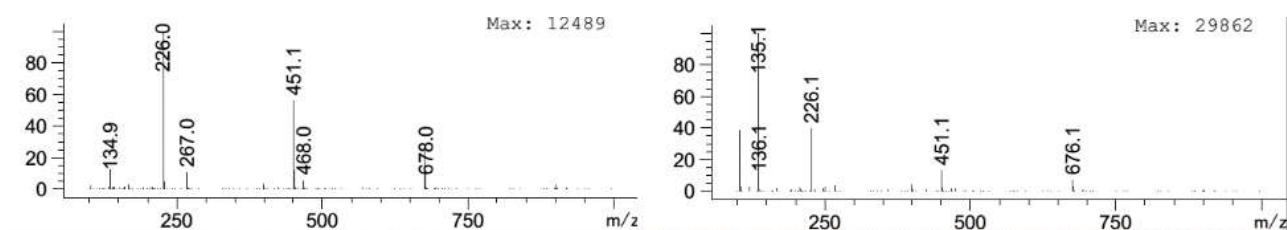


Рис. 5.17. Мас-спектри 2-(2-метоксибензоїл)гідразин-1-карботіоаміду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

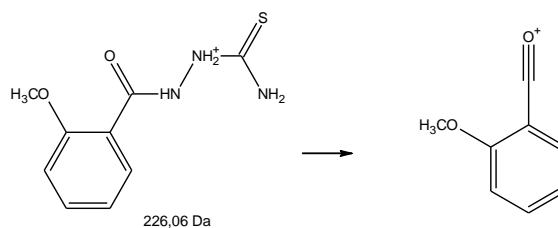


Рис. 5.18. Фрагментація 2-(2-метоксибензоил)гідразин-1-карботіоаміду

Зв'язки бензольного циклу стабілізуються за рахунок π -електронного супряження.

5.3 Вивчення закономірностей фрагментації при іонізації в електроспреї ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів, проміжних сполук в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів

Мас-спектри показані в графічному та табличному вигляді із найбільш інтенсивними піками, починаючи із 1%. Надані максимальні піки із групи ізотопних піків. Усі речовини можуть існувати в тійній або тіольній формі. Проаналізовано мас-спектри та запропоновані можливі шляхи фрагментації вказаних сполук.

4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.10). При напрузі 0 В, 100 В, 200 В в мас-спектрі присутній іон з m/z 285,0, який відповідає протонваному квазімолекулярному іону даної сполуки, також присутні ізотопні піки (рис. 5.19). На мас-спектрі при напрузі 100 В та 200 В спостерігається іон з m/z 253,1, який утворюється внаслідок гетеролітичного розриву зв'язку між карбоном фенільного радикалу та киснем метоксифенільної групи (рис. 5.20-5.21, табл. 5.1). Також наведено альтернативну структуру, що створена внаслідок відщеплення сульфгідрильної групи від квазімолекулярного іона протонованої сполуки.

Пропонуємо структуру для катіона з m/z 275,1, що з'являється в мас-спектрі тільки при напрузі 100 В (рис. 5.20).

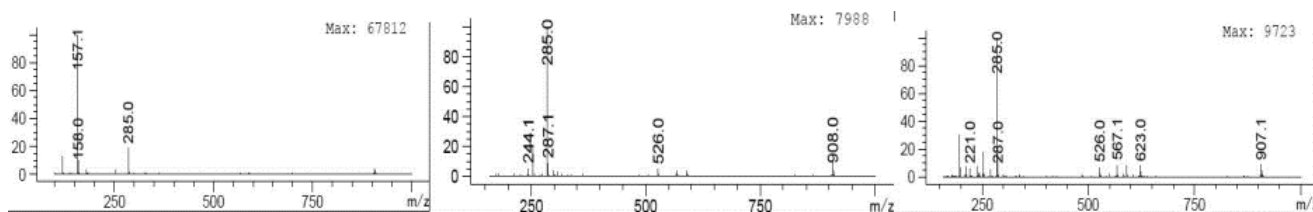


Рис. 5.19. Мас-спектри 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (0, 100, 200 В)

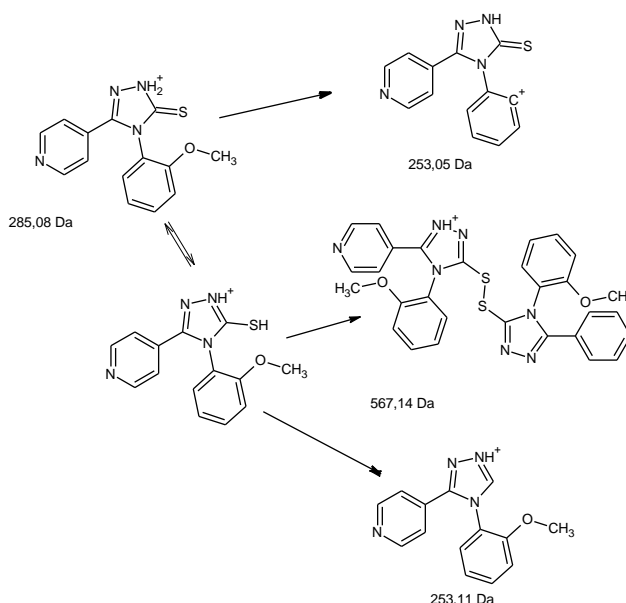


Рис. 5.20. Шляхи фрагментації 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

Відбувалось відщеплення метокси групи та відновлення тріазольного циклу. Катіон з m/z 567,1 є протонованим квазімолекулярним іоном димера даної сполуки, який існує при напругах 0 В, 100 В та 200 В. Напруга 200 В викликає створення катіона з m/z 237,1 (рис. 5.21). Вважаємо, що він виникає внаслідок часкового руйнування метоксифенільного циклу. Пропонуємо декілька структур катіону з m/z 221,0. Перша – при відщепленні Сульфуру та оксиметильної групи створюється відповідне похідне фенілій карбокатиону, друга – внаслідок руйнування піридінового циклу утворюється відповідний катіон-радикал, третя – внаслідок руйнування метоксифенільного циклу. Іон з m/z 271,0 виникає при відриві метильної групи від квазімолекулярного іона протонованої сполуки. Можливо також руйнування тріазольного циклу з

утворенням наступних іонів: катіон-радикалу з m/z 212,1, а також катіона з m/z 197,1.

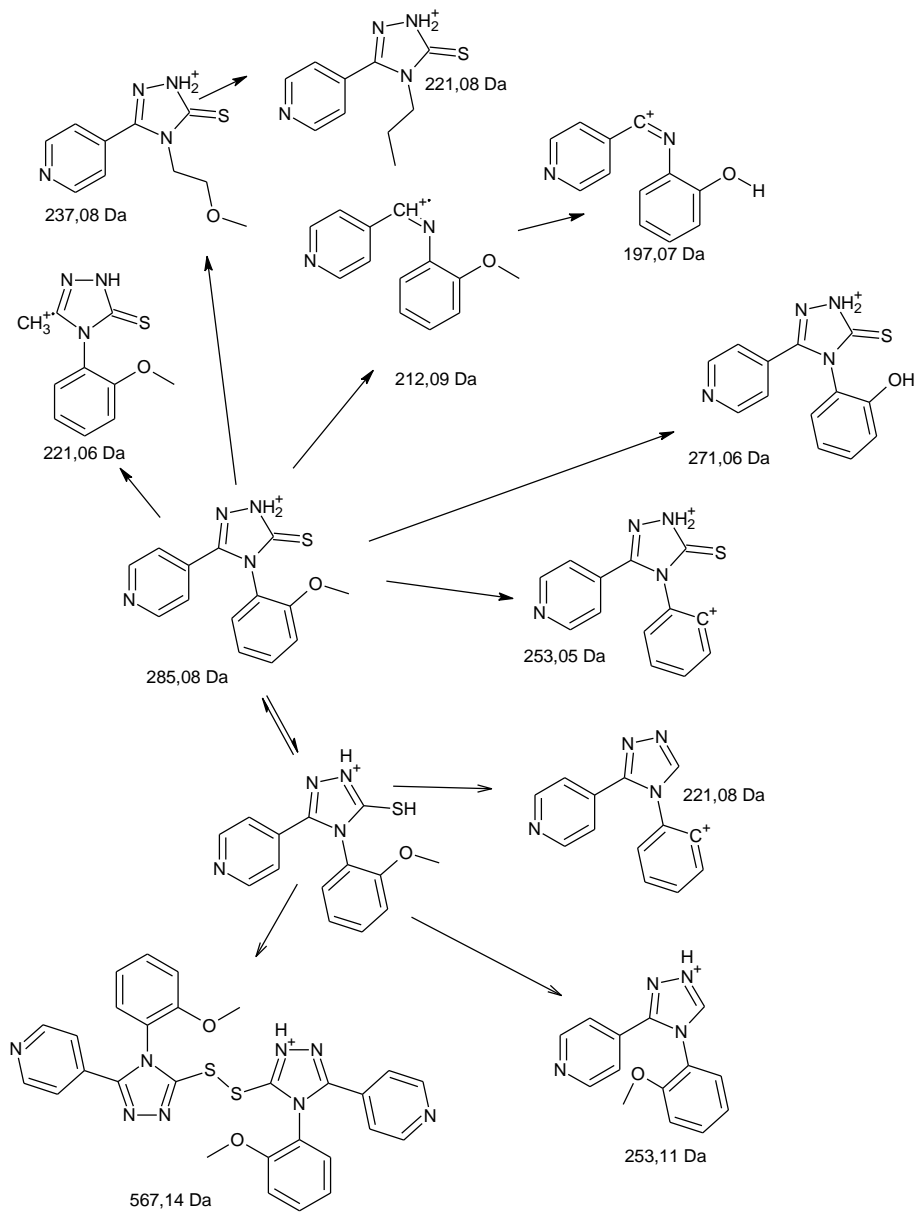


Рис. 5.21. Шляхи фрагментації 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В.

Значення m/z іонів 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону та відносні інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
253,1	14,7	169,2	1,0
275,1	0,9	184,0	1,2
285,0	100,0	197,1	29,6
567,0	1,5	212,1	6,7
—	—	221,0	4,8
—	—	237,1	6,6
—	—	253,1	16,1
—	—	269,9	4,8
—	—	271,0	1,1
—	—	285,0	100,0
—	—	567,1	3,4

5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіон (2.11). При напрузі на фрагментаторі 100 В утворюється квазімолекулярний (протонована молекула) іон з m/z 244,1, димерний катіон з m/z 485,0 (рис. 5.22, табл. 5.2).

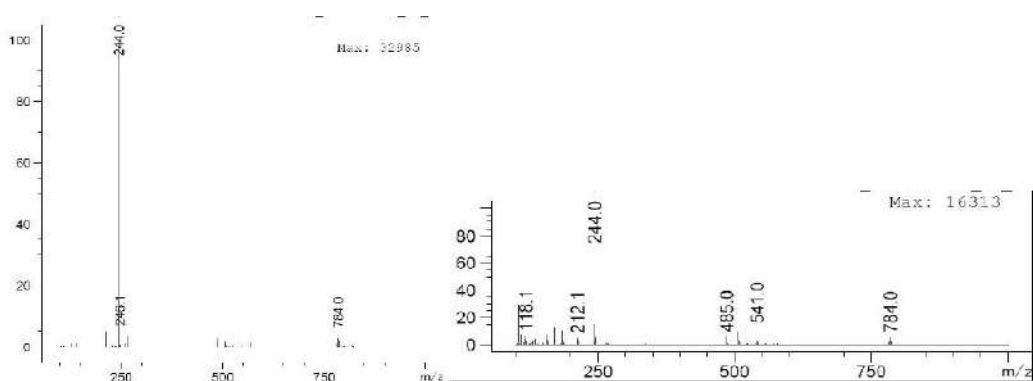


Рис. 5.22. Мас-спектри *5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону* при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

Значення m/z іонів 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносні інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
212,0	2,0	105,1	27,6
244,1	100,0	109,1	7,9
485,0	1,7	115,1	1,4
–	–	118,1	5,8
–	–	130,0	3,1
–	–	151,0	1,5
–	–	157,0	7,2
–	–	170,1	12,1
–	–	185,1	10,6
–	–	212,1	2,3
–	–	216,0	3,0
–	–	244,1	100,0
–	–	265,0	1,0
–	–	485,0	3,6
–	–	485,0	1,7

Також присутній іон з m/z 212,1, що створюється внаслідок відривання Сульфору від квазімолекулярного іону (рис. 5.23). При збільшенні напруги на фрагментаторі від 100 В до 200 В з'являється більше 10 нових іонів (табл. 5.2, рис. 5.24).

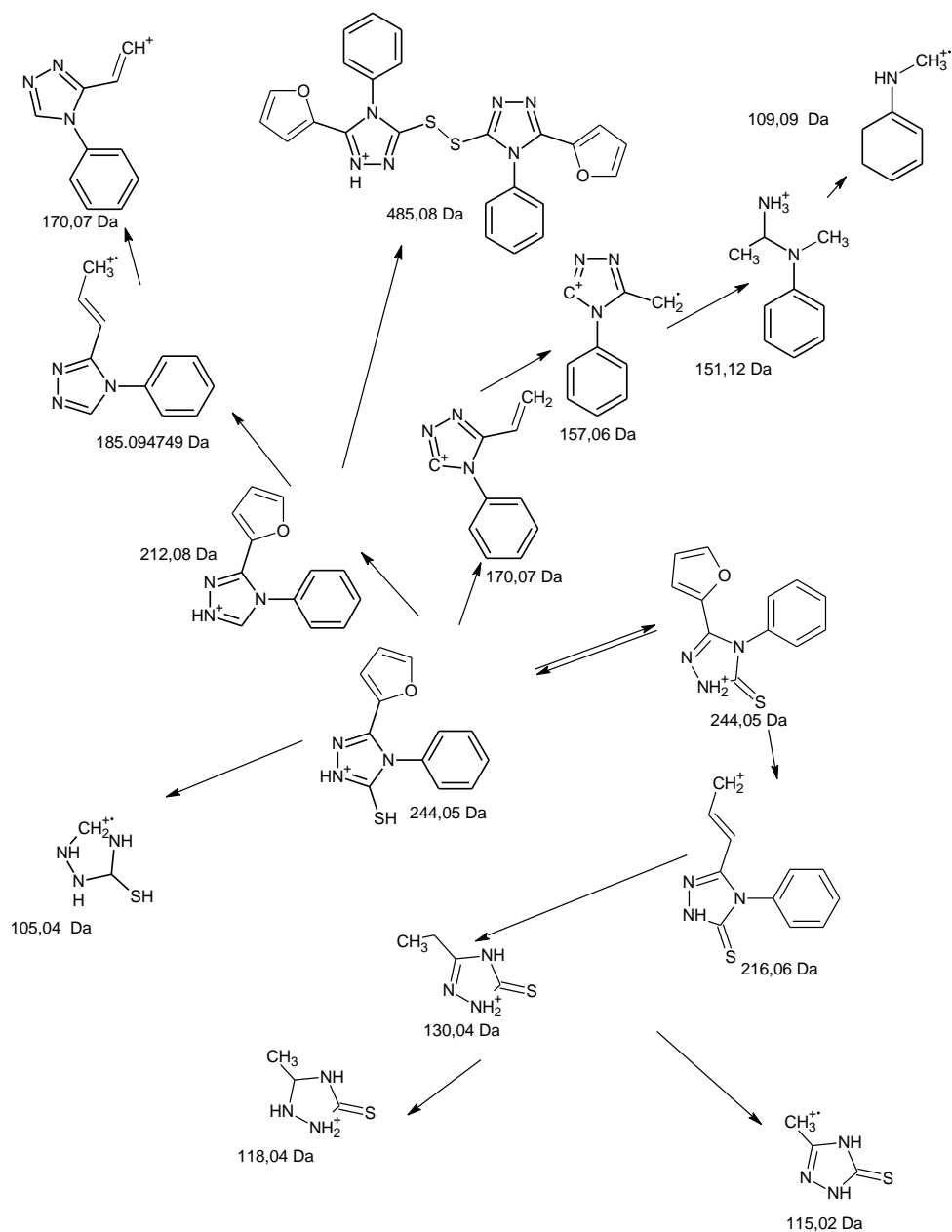


Рис. 5.23. Шляхи фрагментації 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В

Іон з m/z 212,1 також присутній при напрузі 200 В. Катіон-радикал з m/z 185,1 створюється при відщепленні CO від іону з m/z 212,1. При додатковому відщепленні метильної групи створюється катіон з m/z 170,1. Альтернативна структура катіону з m/z 170,1 може з'явитися з квазімолекулярного іону при руйнуванні фуранового циклу та відриву SH-групи. При подальшому відщепленні метиленової групи створюється катіон-радикал з m/z 157,0. При руйнуванні триазольного циклу поперше з'являється катіон з m/z 151,0, потім

катион-радикал з m/z 109,1. При безпосередньому відриві фуранового і бензольного кілець від тіольної форми квазімолекулярного іону з відновленням тріазольного циклу можливо створення катион-радикала з m/z 105,1. При відщепленні CO від квазімолекулярного іону можливо утворення катіона з m/z 216,1, який перетворюється в іон з m/z 130,0 при відриві метильної групи та бензольного кільця. При відновленні тріазольного циклу можливо створення іона з m/z 118,0. При відриві CH_2 від іона з m/z 130,0 можливо утворення катион-радикала з m/z 115,1.

5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (**2.12**). В мас-спектрах при напругах 0, 100, 200, 300 В спостерігається квазімолекулярний катион протонованої сполуки з m/z 179,0, також утворюється димерний катион с m/z 355,0 та частково гідрирований димерний катион з m/z 357,0 (рис. 5.24-5.25, табл. 5.3).

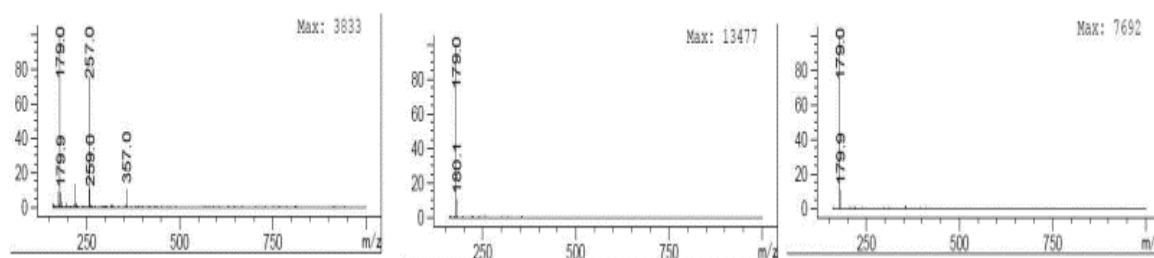


Рис. 5.24. Мас-спектри 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (0, 100, 200 В)

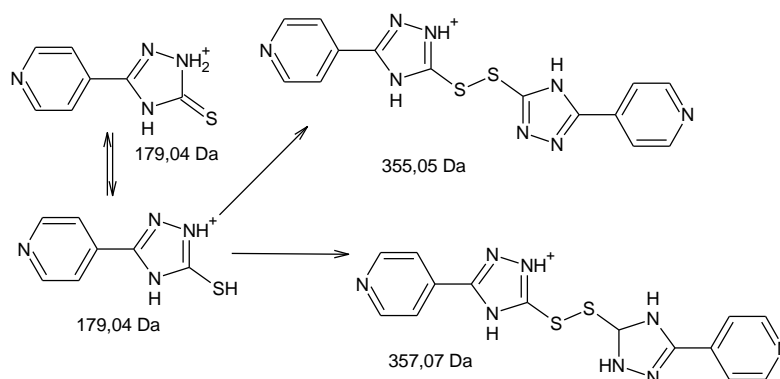


Рис. 5.25. Шляхи фрагментації 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів

Значення m/z іонів 5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносні інтенсивності при 0 В, 100 В, 200 В

0 В		100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
172,0	0,8	179,0	100,0	179,0	100,0
179,0	100,0	355,0	0,6	354,8	1,1
257,0	71,9	357,0	0,5	357,0	0,5
355,1	5,0	–	–	–	–
357,0	10,2	–	–	–	–

При 0 В існує аддукт квазімолекулярного іона протонованої сполуки із диметилсульфоксидом з m/z 257,0. Сполуку, що вивчали, розчиняли в диметилсульфоксиді. Інтервал 160-1000 m/z використано для щоби максимально видалити іони-продукти перетворення диметилсульфоксиду в іонному джерелі, однак повністю це не вдається. Іони-продукти фрагментації сполуки, що вивчається мають дуже низьку інтенсивність (менше 1% від інтенсивності основного піку), тому інтерпретація їх вважається недоцільною.

5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.13). При напрузі 100 В присутній квазімолекулярний іон MH^+ з m/z 277,1, а також іон з m/z 245,1 (рис. 5.26, табл. 5.4).

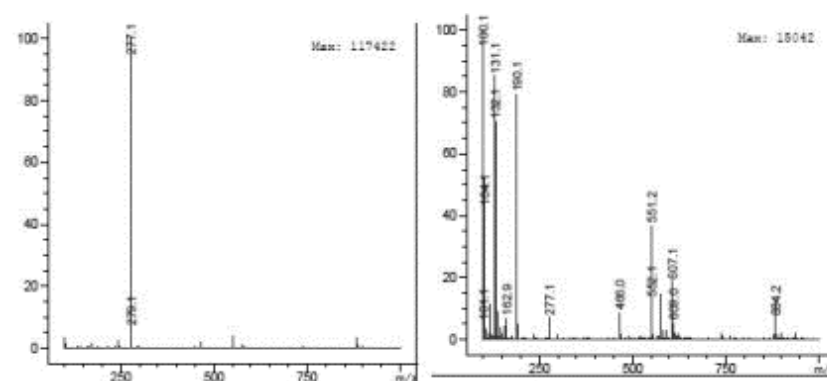


Рис. 5.26. Мас-спектри 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

Таблиця 5.4

Значення m/z іонів 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносні інтенсивності 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
100,15	3,3	100,1	100,0
102,15	1,1	105,1	52,8
173,1	1,1	117,1	12,1
245,05	2,2	131,10	89,5
277,1	100,0	136,0	9,5
551,15	3,5	143,0	1,0
—	—	148,0	4,0
—	—	157,1	5,5
—	—	163,0	7,3
—	—	190,0	83,4
—	—	277,1	8,1
—	—	551,2	30,7

Іон з m/z 245,1, що створюється при відриві атому Сульфуру від квазімолекулярного іону, при наступному відщепленні фенільного радикалу та відновленні триазольного циклу утворює катіон з m/z 173,1. При відриві триазольного циклу з'являються катіони з m/z 102,1 та 100,1 (рис. 5.27).

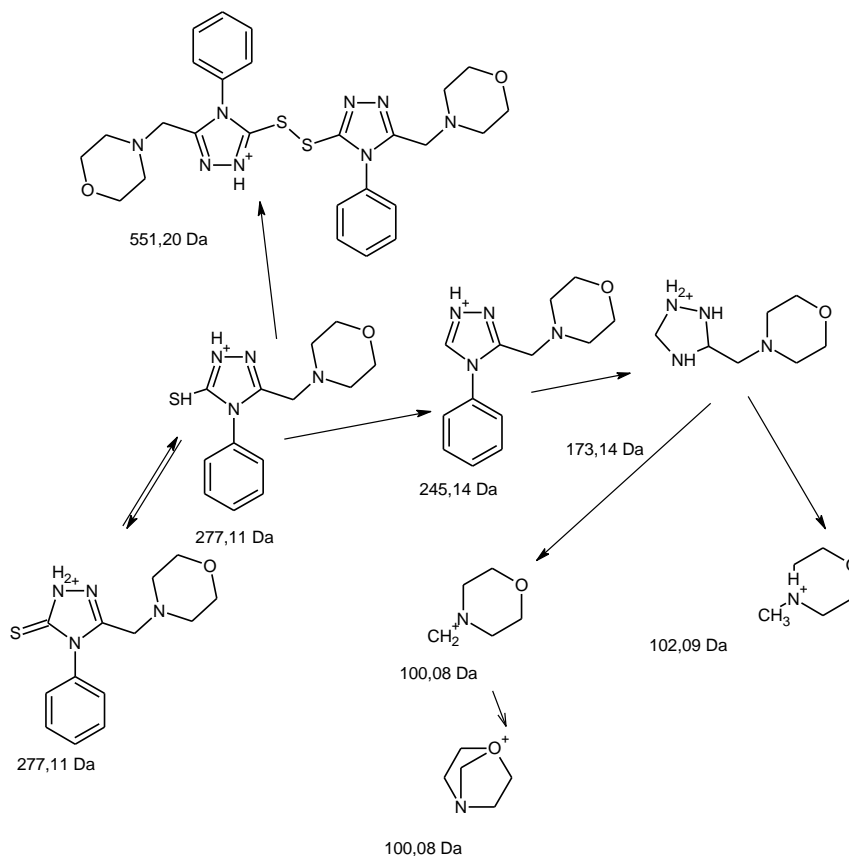


Рис. 5.27. Шляхи фрагментації 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

При напрузі 200 В (табл. 5.4, рис. 5.28) квазімолекулярний іон може руйнуватися декількома шляхами. По-перше, при відриві Сульфуру, відновленні триазольного циклу та відділення морфолінового фрагменту з'являється катіон-радикал з m/z 163,0, а потім при відриві метиленового фрагменту утворюється катіон з m/z 148,0. Можлива структура іону з m/z 148,0 відповідає катіону, що утворюється при видаленні Сульфуру, морфолінометиленового фрагменту та частковому відновленні триазольного циклу. При відщепленні Сульфуру, морфолінометиленового фрагменту та частковому руйнуванні триазольного циклу з'являється катіон з m/z 136,0.

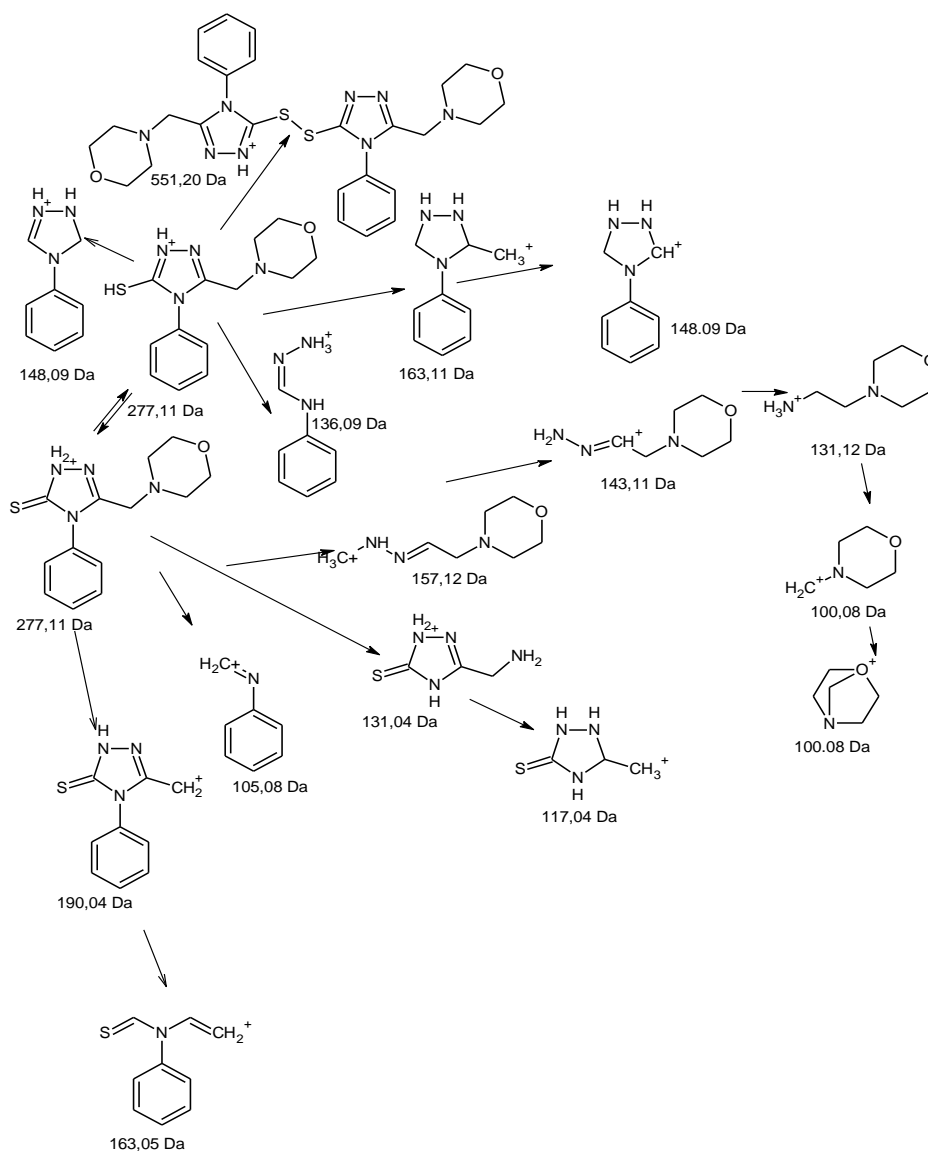


Рис. 5.28. Шляхи фрагментації 5-(морфолін-4-ілметил)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В

При відриві морфолінового фрагменту від квазімолекулярного іону утворюється іон з m/z 190,0. Альтернативна структура катіон-радикала з m/z 163,0 може бути створена при руйнуванні тріазольного циклу. Відрив Сульфуру та морфолінметильного фрагменту, руйнування тріазольного циклу приведе до створення катіон-радикала з m/z 105,1. При відриві Сульфуру, фенільного радикалу, руйнуванні тріазольного циклу створюється катіон-радикал з m/z 157,1, який послідовно перетворюється в катіон з m/z 143,0, 131,1, 100,1 (пропонуємо 2 структури, одну з них надано в підрозд. 3.7). При відщепленні фенільного фрагменту та руйнуванні морфолінового циклу

можливо утворення альтернативної структури катіона з m/z 131,1, який потім створює катіон з m/z 117,1. Як при напрузі 100 В, так і при напрузі 200 В з'являється протонований катіон димеру вказаної сполуки з m/z 551,2 (рис. 5.27-5.28).

4-метіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.14). При напрузі на фрагментаторі 100 В спостерігається квазімолекулярний іон з m/z 215,1 самої сполуки, а також іон димеру сполуки, з відновленням одного із тріазолових циклів. При відщепленні Сульфуру від квазімолекулярного іону виникає катіон з m/z 183,1. Утворення катіону з m/z 100,1 можливо при руйнуванні тріазольного циклу, подібно до вищеописаних морфолінометіленових похідних (рис. 5.29-5.30, табл. 5.5).

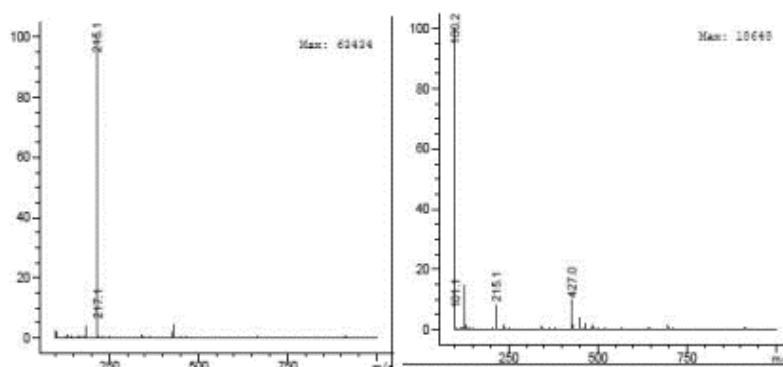


Рис. 5.29. Мас-спектр 4-метіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

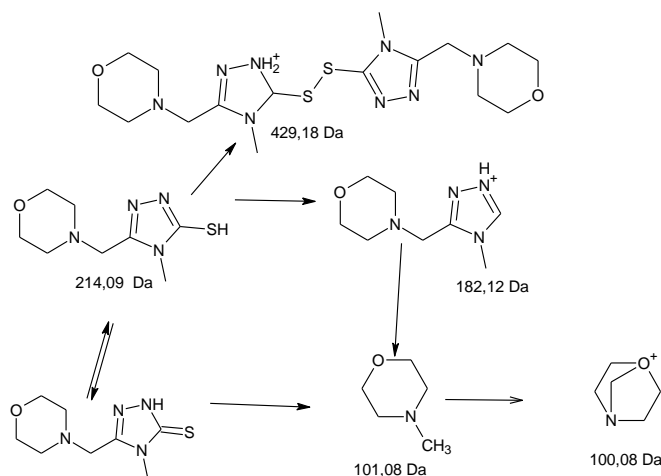


Рис. 5.30. Шляхи фрагментації 4-метіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

Значення m/z іонів 4-метіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону відносна інтенсивність при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
100,1	1,6	100,1	100,0
183,1	1,0	128,1	15,7
215,1	100,0	215,1	9,5
429,1	4,9	427,1	1,9

Напруга 200 В призводить до створення квазімолекулярного іона з m/z 215,1 та димерного іона з m/z 427,1. При відщепленні атому Сульфуру та частковому руйнуванні морфолінового циклу утворюється катіон-радикал з m/z 128,1. При руйнуванні тріазольного циклу з'являється морфолінометиленовий катіон з m/z 100,1 (рис. 5.31, табл. 5.5).

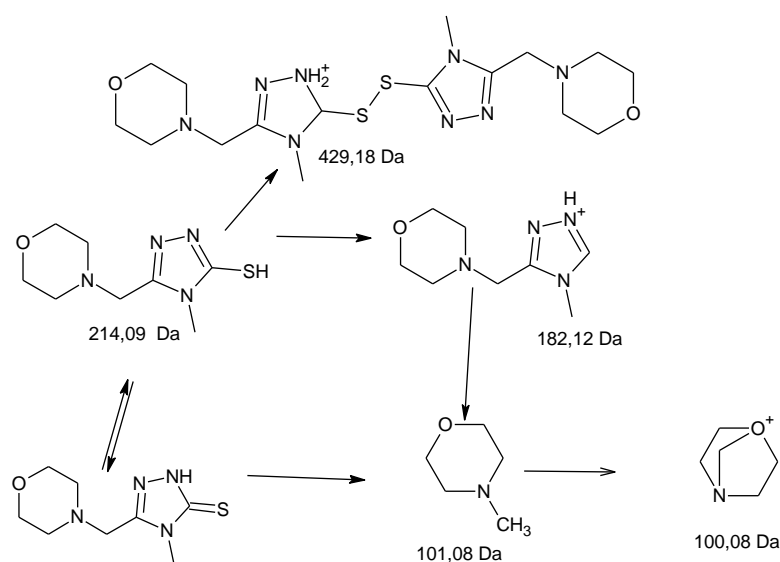


Рис. 5.31. Шляхи фрагментації 4-метіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В

4-етіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.15).

При 100 В спостерігаються квазімолекулярний іон з m/z 229,1, також спостерігається димерний іон з m/z 457,2, з частковим відновленням одного із тріазолових циклів. Втрата Сульфуру призводить до виникнення катіону з m/z 197,1 (рис. 5.32-5.33, табл. 5.6).

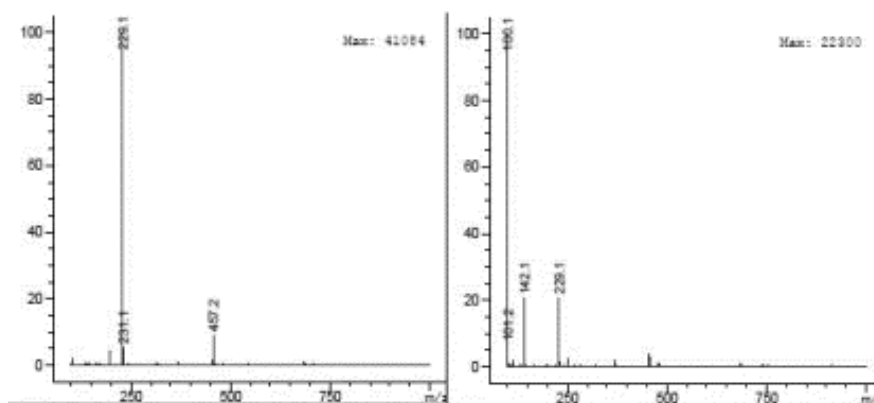


Рис. 5.32. Мас-спектри 4-етіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

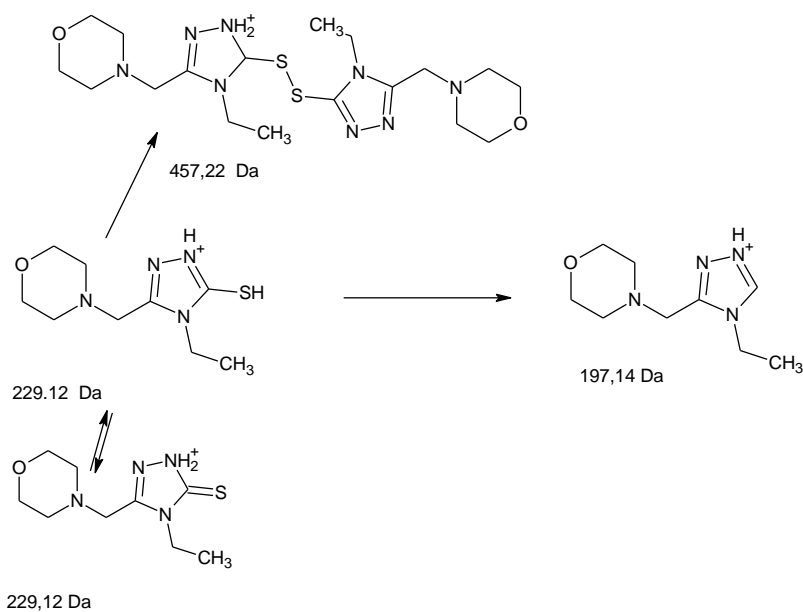


Рис. 5.33. Шляхи фрагментації 4-етіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

Таблиця 5.6

Значення m/z іонів 4-етіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносна інтенсивність при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
197,1	1,5	100,1	100,0
229,1	100,0	114,0	3,0
457,2	10,6	142,0	20,9
–	–	229,1	17,7
–	–	455,0	1,2
–	–	457,1	1,4

Напруга 200 В викликає утворення квазімолекулярного іону 4-етіл-5-(морфолін-4-ілметіл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону. При цьому спостерігається утворення димерного катіона з m/z 455,0, а також катіона з m/z 457,2, процентний вміст якого зменшується майже у 8 разів у порівнянні з напругою 100 В (рис. 5.34, табл. 5.6).

При відриві атому Сульфуру, частковому руйнуванні морфолінового циклу та частковому відновленні тріазольного циклу виникає катіон-радикал з m/z 142,0. Який при відриві метиламіно групи може перетворюватись на катіон з m/z 114,0. Утворення катіона з m/z 100,1 відбувається внаслідок руйнування тріазольного циклу, як описано вище.

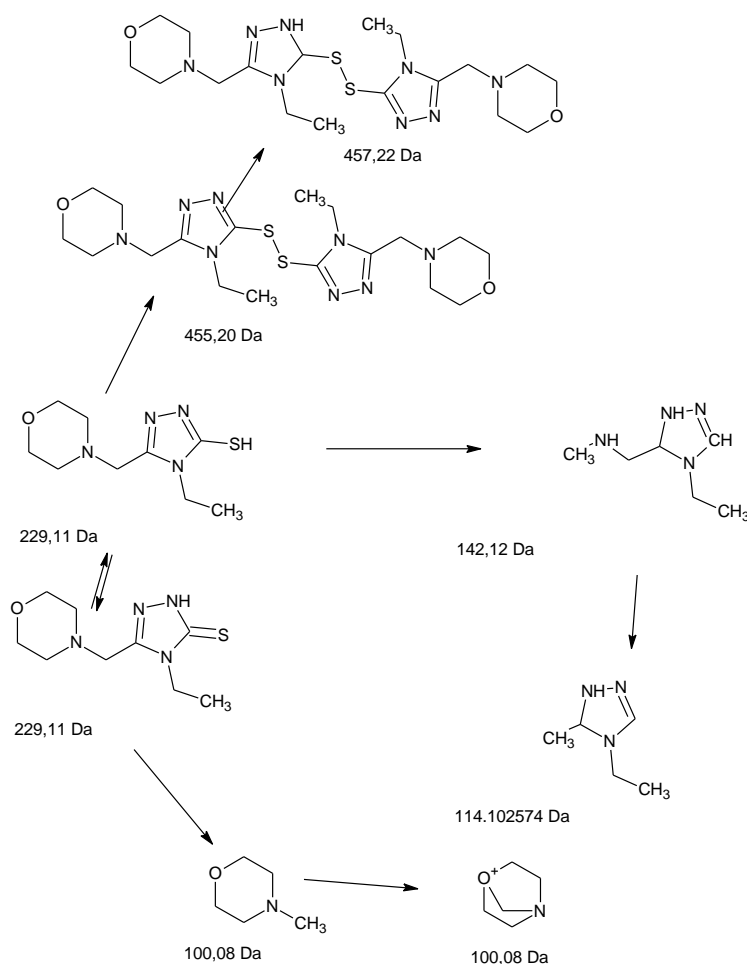


Рис. 5.34. Шляхи фрагментації 4-етіл-5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В

5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону (**2.16**). При 100 В утворюється квазімолекулярний іон речовини MH^+ з m/z 201,0. Крім того створюється димерний іон з m/z 399,1 (рис. 5.35-5.36, табл. 5.7).

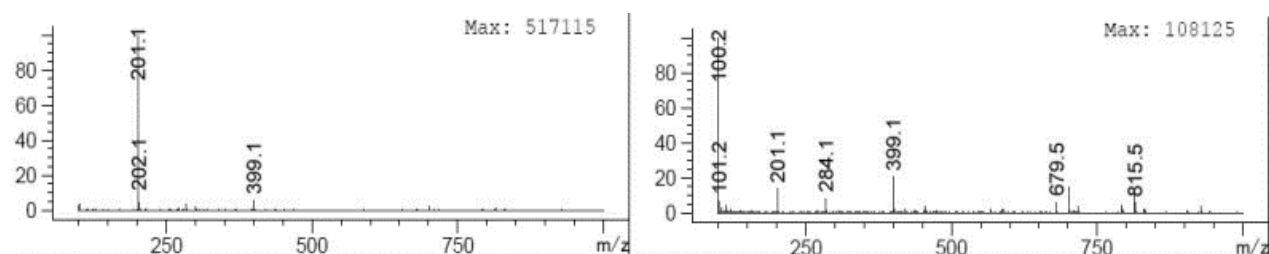


Рис. 5.35. Мас-спектри 5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

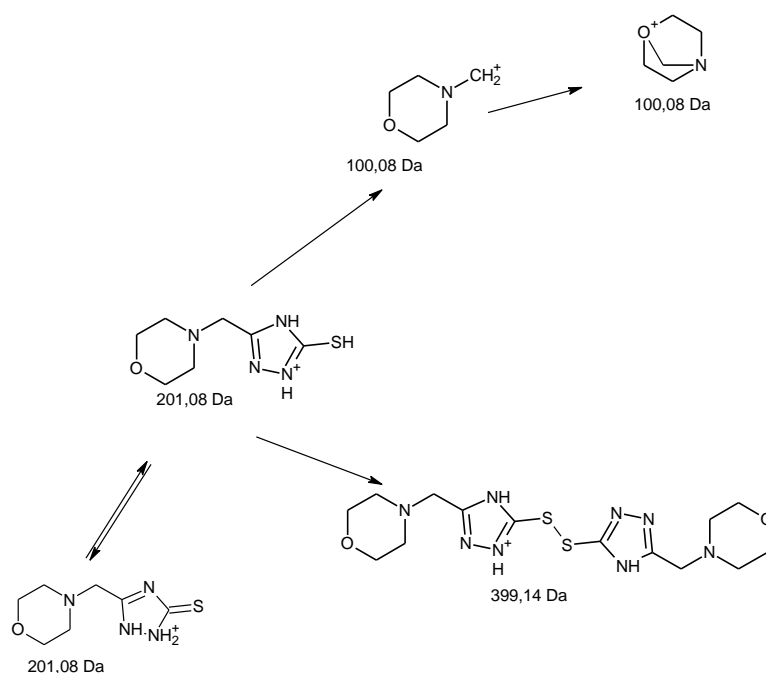


Рис. 5.36. Шляхи фрагментації 5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

Таблиця 5.7

Значення m/z іонів 5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносні інтенсивності 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
100,2	2,2	100,1	100,0
201,0	100,0	114,1	4,6
399,1	7,2	157,1	1,0
—	—	201,1	16,8
—	—	284,1	6,6
—	—	312,1	1,0
—	—	399,1	19,9

Також при відриві тріазольного фрагменту залишається метиленморфолінієвий катіон з m/z 100,1. При 200 В з'являються продукти

розпаду квазімолекулярного іону. Так, при розриві зв'язків тριαзольного циклу утворюється катіон з m/z 157,1. При відриві морфолінієвого фрагменту утворюється катіон з m/z 114,1 (рис. 5.37, табл. 5.6).

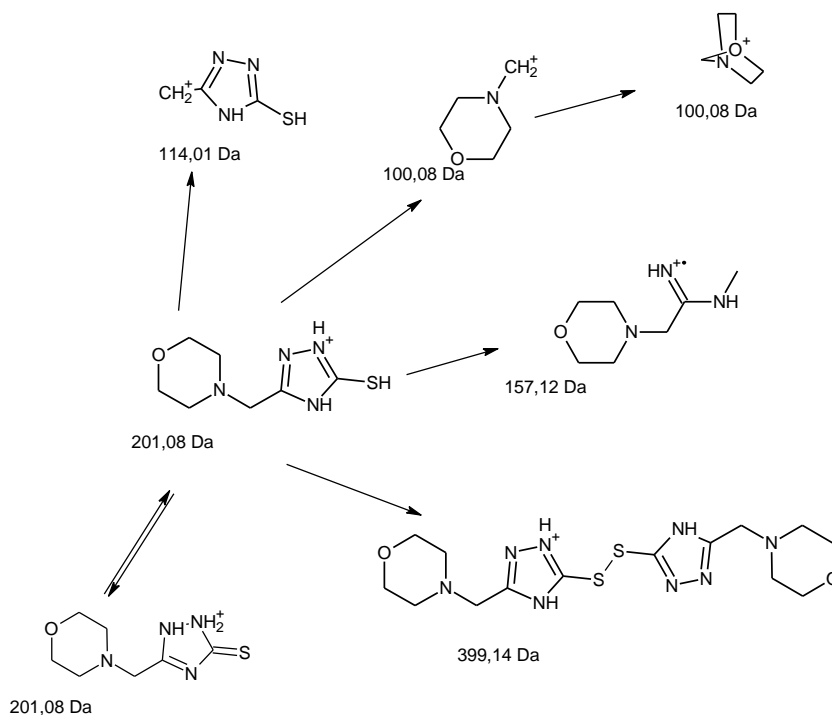


Рис. 5.37. Шляхи фрагментації 5-(морфолін-4-ілметил)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 200 В

5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон (2.17). При напрузі 100 В спостерігається пік з m/z 208,0 (квазімолекулярний іон MH^+). Цей іон створює димерний іон даної сполуки с m/z 413,0 (рис. 5.38-5.39, табл. 5.8).

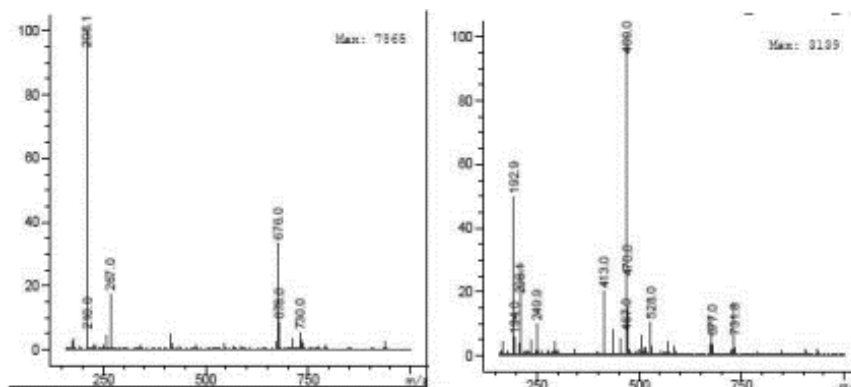


Рис. 5.38. Мас-спектри 5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

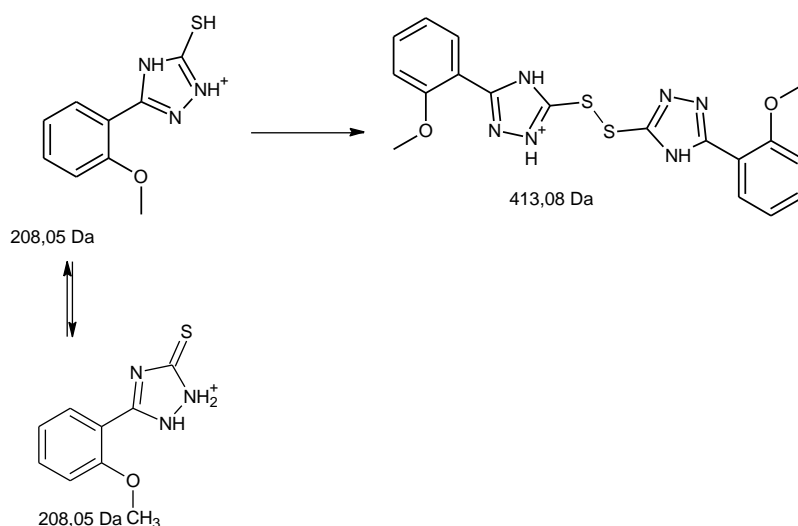


Рис. 5.39. Шляхи фрагментації 5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноізотопні маси іонів при 100 В

Таблиця 5.8

Значення m/z іонів 5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону та відносні інтенсивності 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
208,0	100,0	165,1	5,2
413,0	6,2	176,0	1,1
—	—	193,0	55,6
—	—	208,1	41,2
—	—	413,0	23,2

При 200 В крім вищезазначених іонів спостерігаються фрагментні іони. Так, при відщепленні Сульфуру з'являється катіон з m/z 176,0, при наступному відщепленні метильної групи та відновленні тріазольного циклу утворюється катіон-радикал з m/z 165,1. При відриві метильного фрагменту від квазімолекулярного іону створюється катіон-радикал з m/z 193,0. При видаленні атому Оксигену та відщепленні протону можливий альтернативний варіант структури іона з m/z 176,0 (рис. 5.40, табл. 5.8).

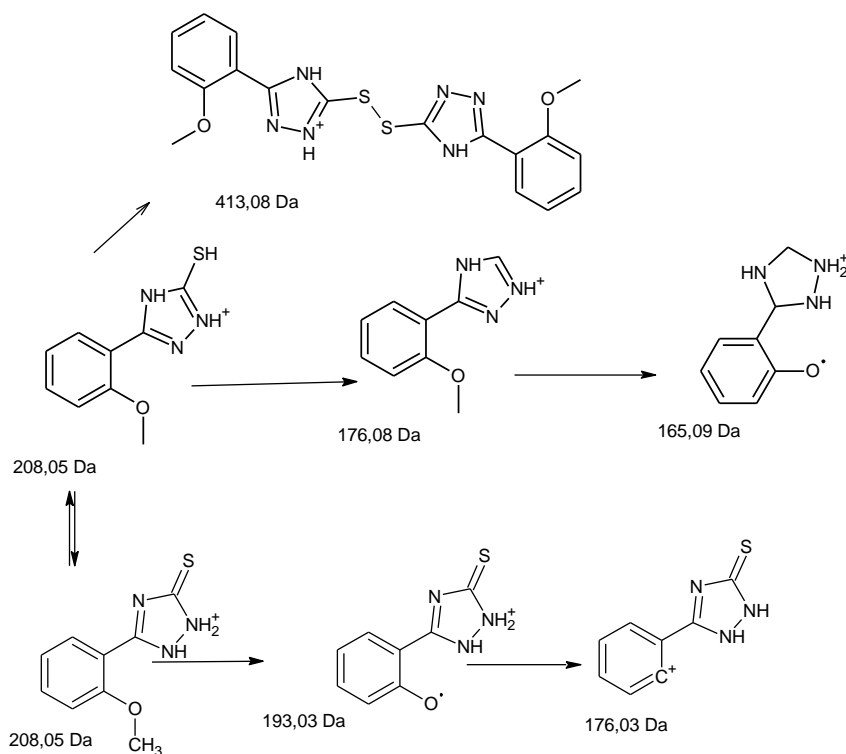


Рис. 5.40. Шляхи фрагментації 5-(2-метоксифеніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону та моноіотопні маси іонів при 200 В

5.4 Вивчення закономірностей фрагментації при іонізації в електроспреї низки солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот, потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів

Мас-спектри подані в табличній формі, із представленням найбільш інтенсивних піків починаючи із 1%. Показані максимальні піки із іотопної послідовності. Проаналізовані мас-спектри та запропоновані можливі шляхи фрагментації сполук.

*Морфолін-4-ий 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (2.26)*. Мас-спектри наведені на рис. 5.41 та в табл. 5.9. В кислотному середовищі елюєнту сольова форма активного фармацевтичного інгредієнту перетворюється в протоновану кислотну форму із утворенням квазімолекулярного катіона з m/z 343 (рис. 5.42). Катіон з m/z 313 з'являється із виділенням оксиметильної групи від квазімолекулярного катіона у випадку 100 В та 200 В. Також в цих умовах із квазімолекулярного катіона при

відщепленні карбону діоксиду утворюється катіон із m/z 299. При розщепленні зв'язку між атомами Сульфуру та Карбону тріазольного циклу при 200 В утворювався катіон із m/z 251. Із послідуочим вивільненням оксиметильного фрагменту з'являвся катіон із m/z 223. Відокремлення гідразінового фрагменту від тріазольного циклу приводило до утворення катіона із m/z 197. Катіон із m/z 105 з'явився після вивільнення піридінового циклу та метиленової групи. Структура катіона із m/z 105 може бути пояснена як наслідок відщеплення бензолового циклу та метиленової групи. Два катіона (m/z 149 та 132) утворювались після вивільнення тіоацетатного фрагменту, який зв'язаний із тріазоловим циклом.

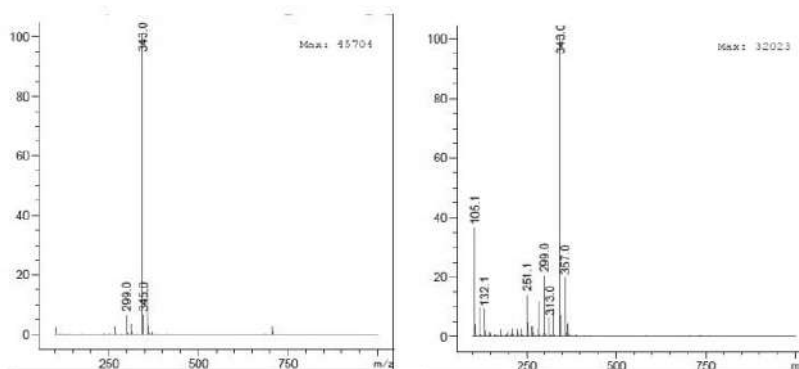


Рис. 5.41. Мас-спектри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл) тіо)ацетату при 100 та 200 В

Таблиця 5.9

Значення m/z іонів морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл) тіо) ацетату та їх відносна інтенсивність при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
1	2	3	4
299,1	2,8	105,1	34,7
313,0	2,6	119,1	2,7
343,0	100,0	132,1	9,7

Продовж. табл. 5.9

1	2	3	4
344,1	19,0	149,1	1,6
357,0	3,7	178,0	1,7
358,0	1,0	195,0	1,0
–	–	211,0	1,4
–	–	223,1	4,5
–	–	237,1	1,3
–	–	251,1	12,6
–	–	265,0	1,4
–	–	269,1	2,2
–	–	283,0	2,1
–	–	285,0	11,3
–	–	297,0	1,0
–	–	299,1	9,5
–	–	343,0	100,0
–	–	357,0	4,4
–	–	363,0	1,0
–	–	365,0	3,5
–	–		

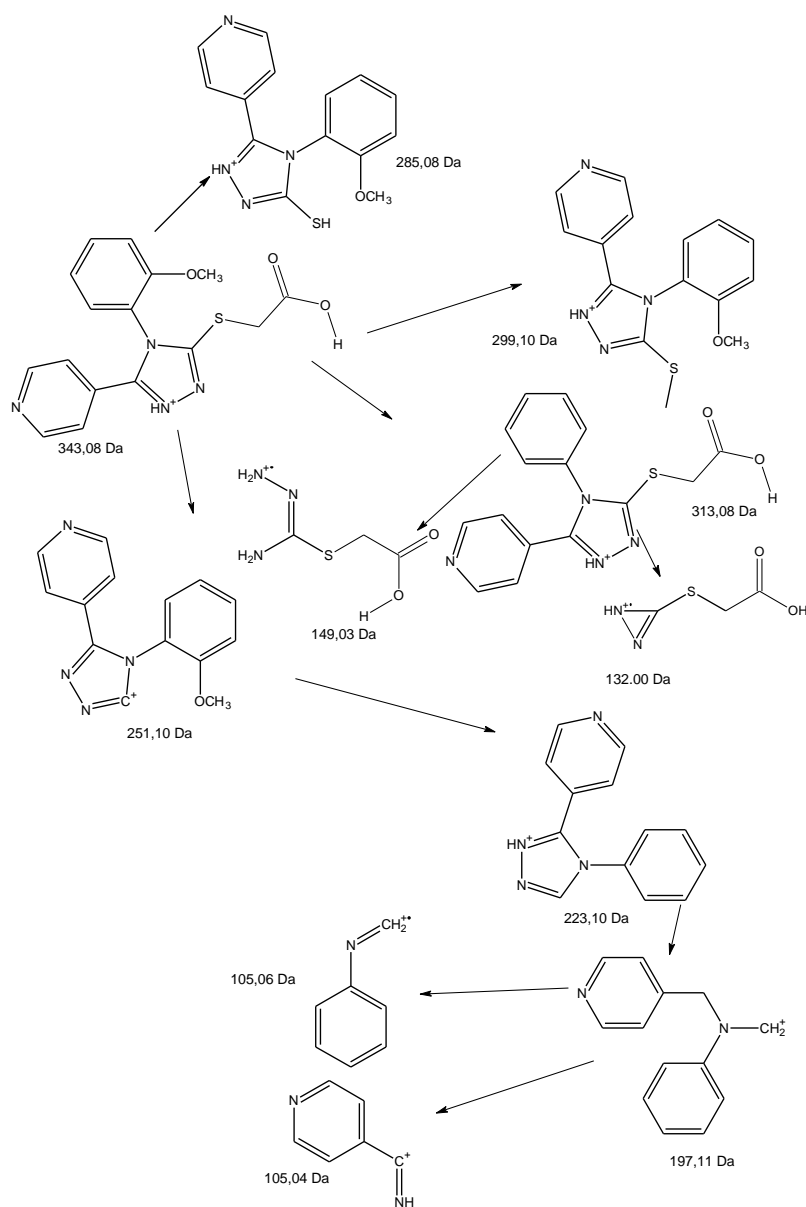


Рис. 5.42. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(пірідиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

Піперідинію 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.27). Фрагментація цієї сполуки описана на підставі мас-спектрів, що наведені на рис. 5.43 та в табл. 5.10.

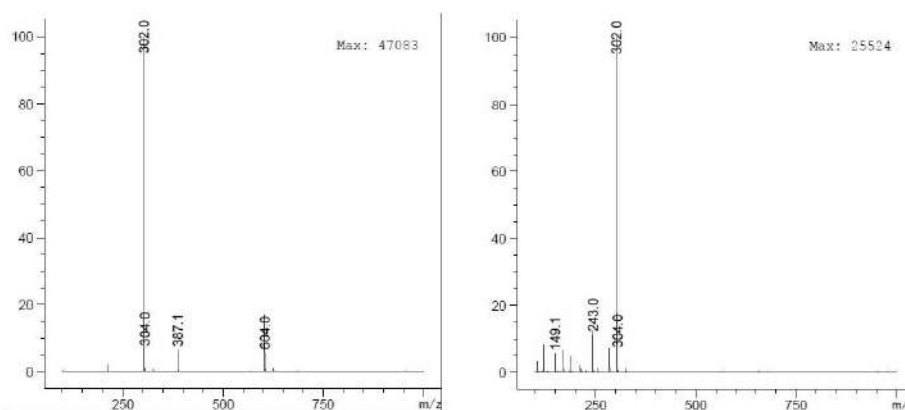


Рис. 5.43. Мас-спектр піперидиній 2-((5-(фураніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 да 200 В

Таблиця 5.10

Значення m/z піперидиній 2-((5-(фураніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату асета та відності інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
302,0	100,0	105,1	3,4
304,0	6,8	121,1	8,0
387,1	3,3	149,0	5,0
603,0	27,1	170,1	7,7
—	—	189,0	4,9
—	—	214,0	1,2
—	—	242,0	11,9
—	—	256,0	1,3
—	—	284,0	7,7
—	—	302,0	100,0

Піки квазімолекулярного іона в кислотній формі, що протонувана за тріазоловим нітрогеном спостерігалися при 100 та 200 В і мали m/z 302 (рис. 5.44-5.45). Піки протонуваної піперидинієвої солі з m/z 387 було детектовано

при 100 В. Пік димерного іона з m/z 603 було детектовано в мас-спектрі при напрузі 100 В. Катіон із m/z 284 створився при вивільненні ОН-групи від квазімолекулярного іона кислотної форми активного фармацевтичного інгредієнту. Далі з'являється катіон із m/z 256 при подальшому відокремленні СО-фрагменту. Пропонуємо два варіанти структури катіона з m/z 242 при подальшому вивільненню метиленової групи та циклізації. Після відділення атома Сульфуру та часткового відновлення тріазольного циклу було утворено катіон з m/z 214. Із частковою дезінтеграцією тріазольного циклу з'являється катіон з m/z 189 та перетворюється в катіон з m/z 170 при подальшому відщепленні амоніаку. При розпаді фуранового циклу та частковому руйнуванні тріазольного циклу послідовно утворюються катіони із m/z 149 та 121.

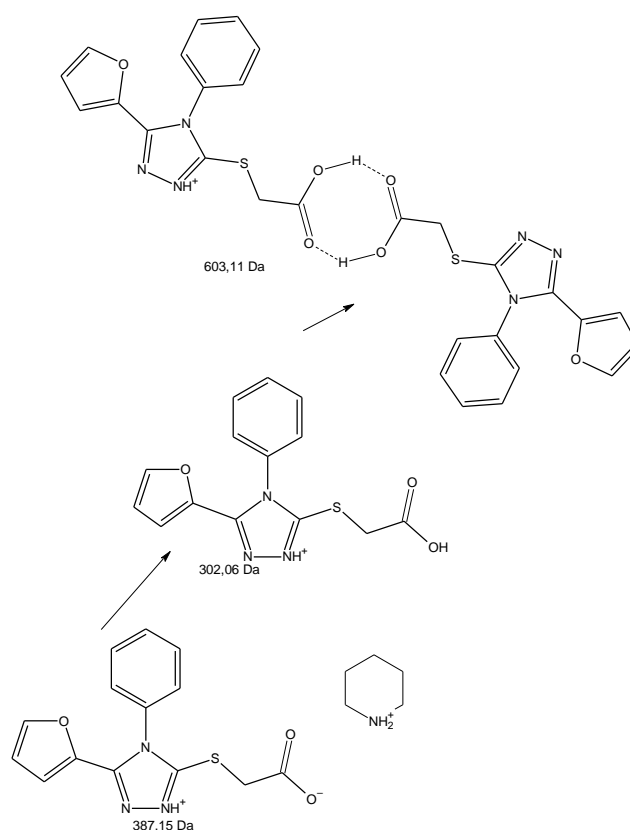


Рис. 5.44. Схема фрагментації піперидиній 2-((5-(фураніл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В

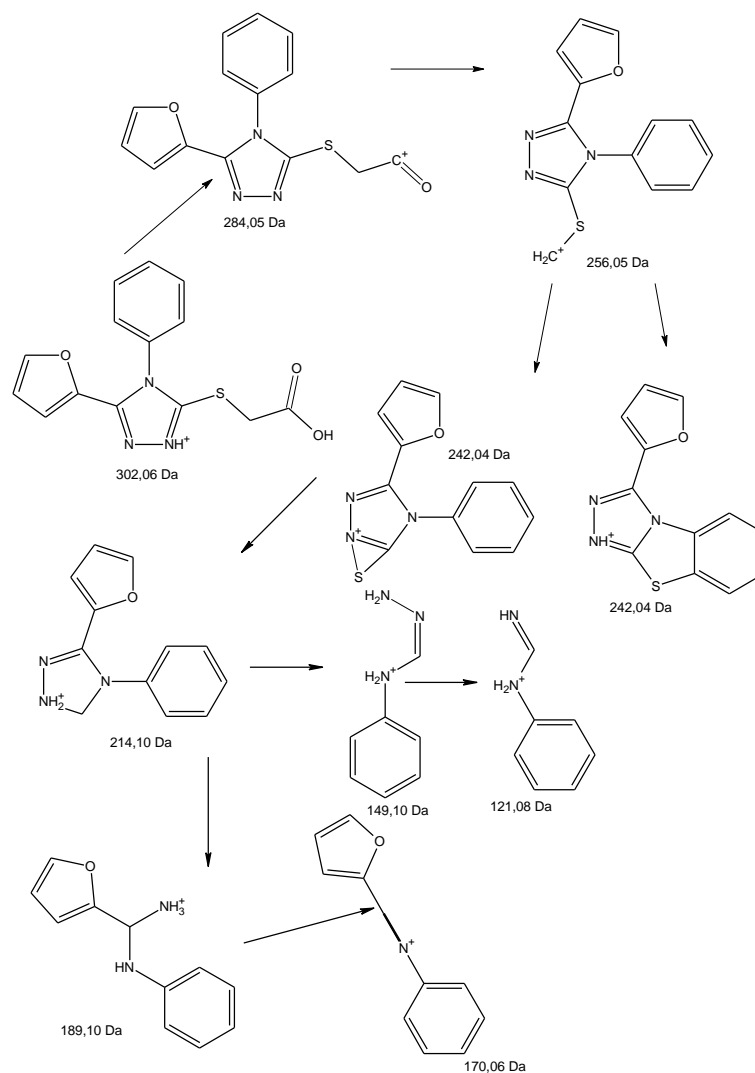


Рис. 5.45. Схема фрагментації піперидиній 2-((5-(фураніл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та теоретичні моноізотопні маси іонів при 200 В

Морфоліній 2-((5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (2.28). Згідно до мас-спектрів (рис. 5.46 та табл. 5.11) в кислотному середовищі елюєнту морфолінієва сіль перетворюється у відповідну кислоту, яка утворює катіон із m/z 237 при приєднанні протону. При 100 В відщеплюється карбон оксид (IV), що призводить до утворення позитивного іона із m/z 193 (рис. 5.47). Відокремлення піридинового циклу та метильної групи приводить до створення катіона з m/z 102, одночасно часткова деструкція тріазольного циклу утворює катіон з m/z 134. Утворення катіона з m/z 219 відбувається при відщепленні OH групи від квазімолекулярного іона при 200 В (рис. 5.48). Після подальшого

відщеплення CO утворюється катіон з m/z 193. При наступному дегідруванні він створює катіон з m/z 191. Катіон з m/z 118 утворювався при виділенні піридинового циклу. Також утворюється катіонний радикал із m/z 119.

Потім з'являються катіон-радикали з m/z 103 і 105 після виділення метильної групи. Видалення метиленової групи із катіона m/z 191 призводить до утворення катіона з m/z 179. Далі утворився катіон-радикал з m/z 178, який може мати дві резонансні форми. Вивільнення SH та повне або часткове відновлення тріазольного циклу утворює катіон-радикал з m/z 150 та m/z 149 відповідно.

Далі часткове руйнування тріазольного циклу призводить до катіонного радикала з m/z 123. Видалення піридинового циклу з катіону з m/z 191, часткове і повне відновлення тріазольного циклу призводить до утворення двох катіонів з m/z 118 і 119. Вивільнення метильної групи утворює катіони з m/z 103 та 105 відповідно.

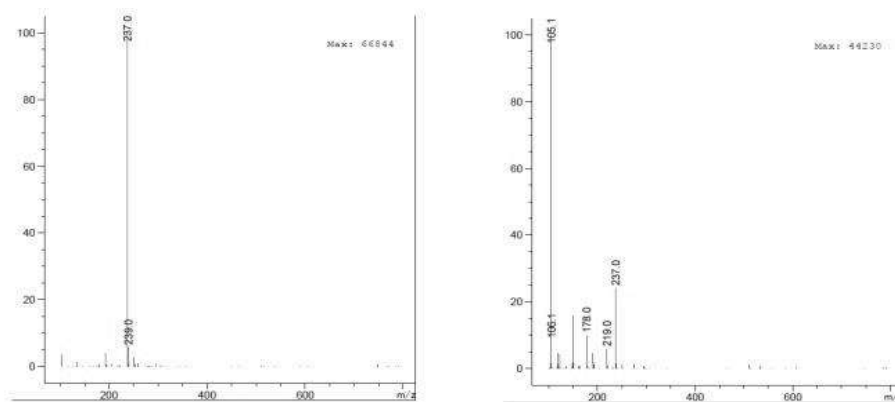


Рис. 5.46. Мас-спектр морфолінію 2-((5-(пірідиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат при 100 та 200 В

Значення m/z іонів для морфолінію 2-((5-(пірідиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та відносни інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
102,2	2,6	103,0	1,7
134,0	1,2	105,1	100,0
193,0	3,1	118,1	3,8
237,0	100,0	123,0	4,6
–	–	149,0	1,7
–	–	150,0	16,6
–	–	178,0	10,2
–	–	191,0	4,4
–	–	193,0	1,8
–	–	219,0	6,0
–	–	237,0	24,2
–	–	238,0	3,0
–	–	239,0	1,6
–	–	274,8	1,5
–	–	510,9	1,2
–	–	532,9	1,0

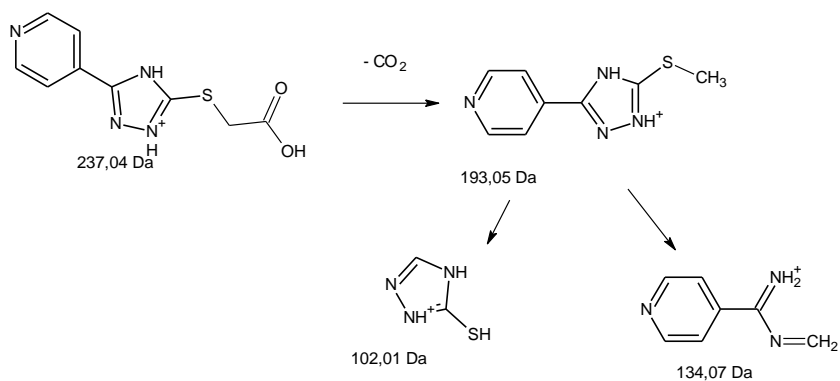


Рис. 5.47. Схема фрагментації морфолінію 2-((5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В

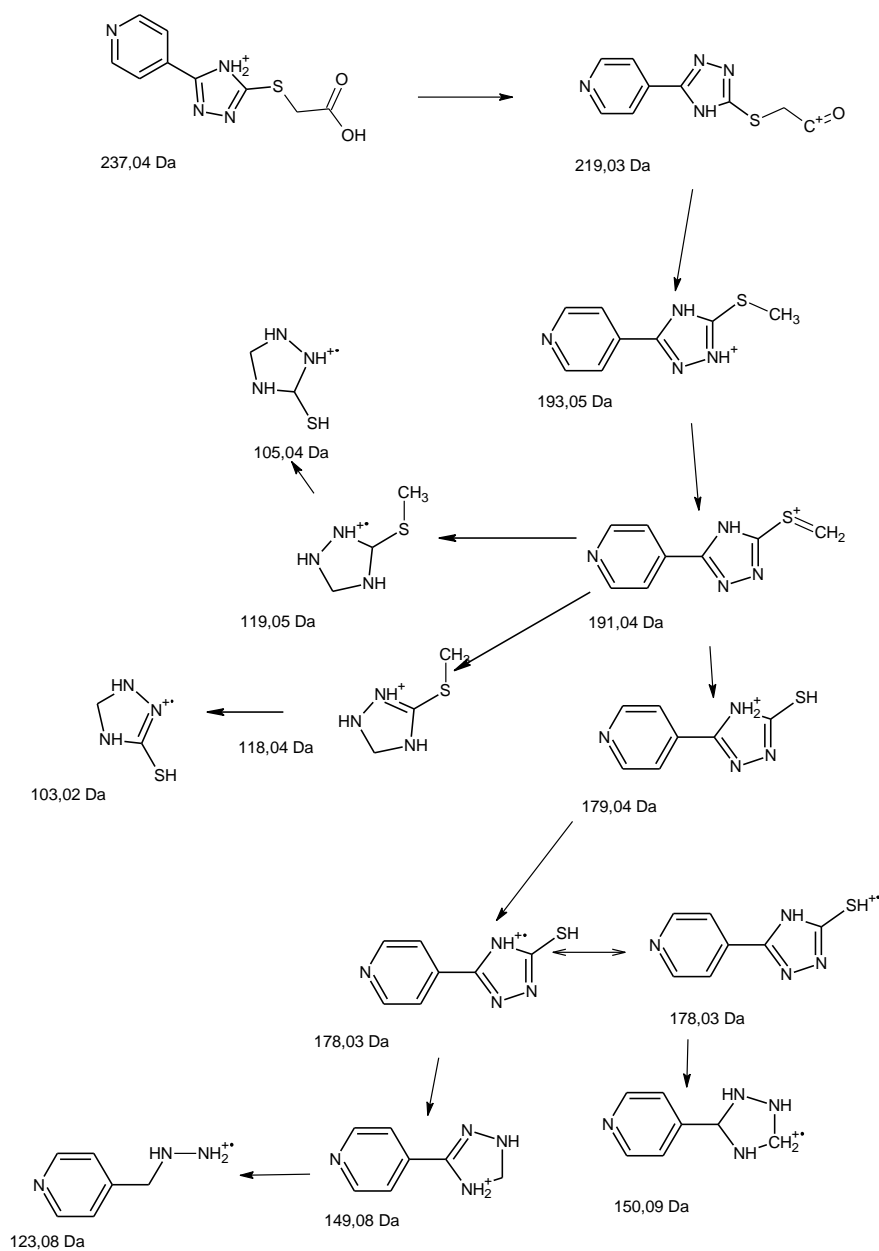


Рис. 5.48. Схема фрагментації морфолінію 2-((5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

Морфоліній 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-ацетат (2.29). Мас-спектри показані на рис. 5.49 і в табл. 5.12. При 100 В спостерігався пік квазімолекулярного іона протонованої кислотної форми активного фармацевтичного інгредієнта з m/z 335 (рис. 5.50). Крім того, існував іон з m/z 669, який був димерним. При приєднанні до нього іона Калію виникає іон з m/z 707.

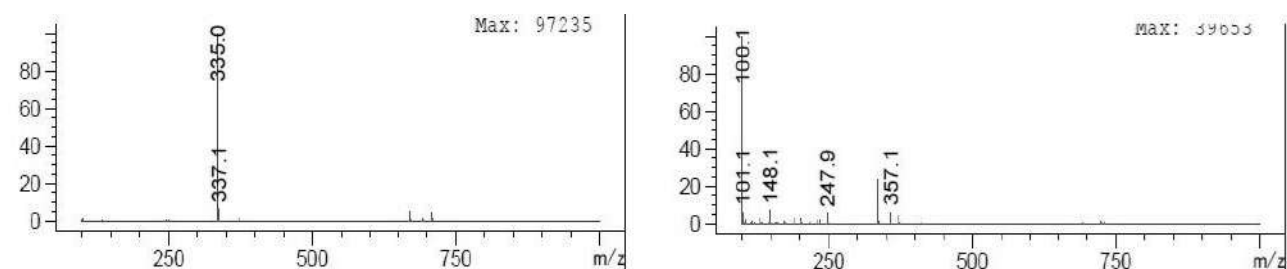


Рис. 5.49. Мас-спектри морфоліній 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл) тіо)ацетату при 100 і 200 В

Таблиця 5.12

Значення m/z іонів морфолінію 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та відносни інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
1	2	3	4
335,1	100,0	100,1	100,0
669,1	5,9	101,1	6,0
670,1	2,1	105,1	2,0
707,1	3,1	117,1	1,5
–	–	131,0	3,3
–	–	148,1	7,1
–	–	173,0	1,7
–	–	174,0	1,7
–	–	188,9	3,0

1	2	3	4
—	—	190,0	1,2
—	—	202,1	3,2
—	—	230,1	2,1
—	—	236,0	2,0
—	—	248,0	5,7
—	—	335,1	25,1
—	—	357,1	3,4
—	—	373,0	3,4

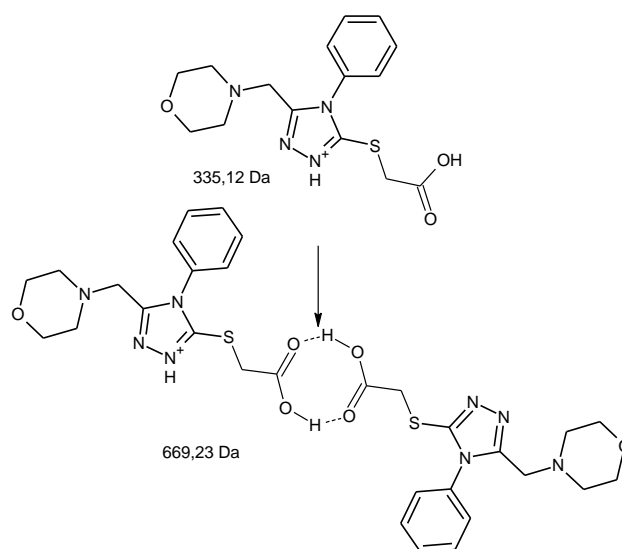


Рис. 5.50. Схема фрагментації морфоліній 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл) тіо) ацетату при 100 В

При 200 В спостерігали іони з m/z 357 і 373 в мас-спектрі, вони відповідають аддукту кислій форми речовини з катіонами Натрію $[M + Na]^+$ і Калію $[M + K]^+$, відповідно (рис. 5.51). Відокремлення морфолінового циклу від квазімолекулярного іона призводить до утворення катіона з m/z 236. Після подальшого вивільнення карбон (IV) оксиду та циклізації утворився катіонний радикал з m/z 189. З вивільненням фенільного фрагменту та частковим

руйнуванням морфолінового фрагменту утворився катіон із m/z 173, який було отримано із квазімолекулярного катіона. З подальшим вивільненням ацетатного фрагменту з'являється катіон з m/z 131. Катіон-радикал з m/z 248 виникає від квазімолекулярного іона при порушенні зв'язку між атомами Сульфуру та Карбону 1,2,4-тріазолу, а також із відновленням циклу тріазолу. З подальшим вивільненням метиленової групи та кисню морфолінового циклу з'являється катіон радикал з m/z 202, тоді як при руйнуванні 1,2,4-тріазольного циклу може утворюватися морфолінметиленовий катіон з m/z 100. Із повним руйнуванням морфолін-метиленового радикалу наступним утворився катіон із m/z 117. З подальшим вивільненням метильної групи та відновленням циклу тріазолу з'явився катіон з m/z 105.

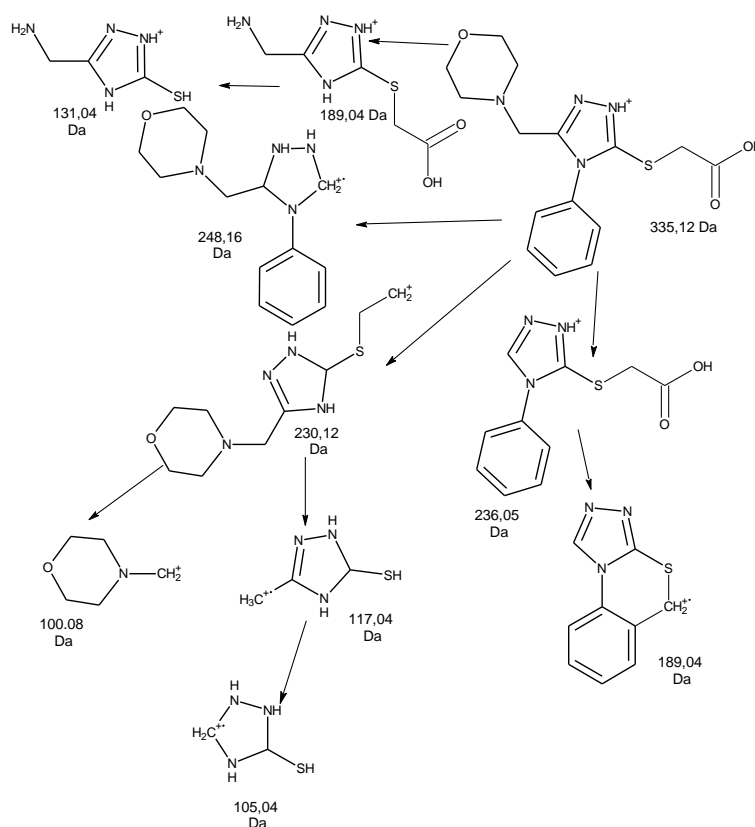


Рис. 5.51. Схема фрагментації морфоліній 2-((5-(морфолінометил)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат при 200 В

Морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-ацетат (**2.30**). Мас-спектри наведені на рис. 5.52 та в табл. 5.13. При 100 В

спостерігався пік квазімолекулярного іона кислотної форми активного фармацевтичного інгредієнту із m/z 287 (рис. 5.53). Крім того, димерний іон із m/z 573, а також аддукти димерного іона із Натрієм (m/z 595) та Калієм (m/z 611). Квазімолекулярний іон приступний також при 200 В. Спостерігалися іони з m/z 309 та 325, які є аддуктами кислотної форми із Натрієм $[M+Na]^+$ та Калієм $[M+K]^+$ відповідно (рис. 5.54). Із руйнуванням 1,2,4-тріазольного циклу квазімолекулярного іона утворився метиленморфоліновий катіон із m/z 100. При відділенні морфолінового фрагменту від квазімолекулярного іону з'являється катіон із m/z 200. При подальшому відділенні метиленової групи спостерігався іон із m/z 188. Відокремлення ОН-груп приводило к утворенню катіона з m/z 170. При відщепленні СО з'являвся катіон із m/z 142. Наступне вивільнення етильної групи приводить до іону із m/z 114.

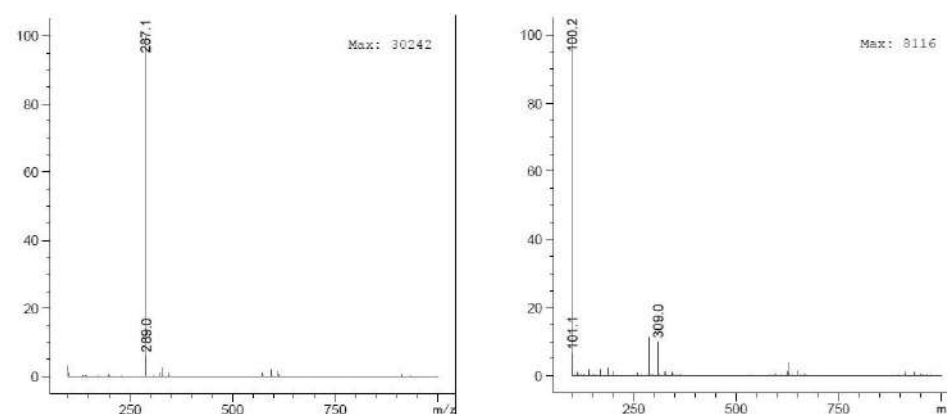


Рис. 5.52. Мас-спектри морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при різних значеннях напруги на фрагментаторі при 100 В та 200 В

Значення m/z іонів морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та відносні інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
100,1	3,6	100,1	100,0
287,0	100,0	101,0	6,0
573,2	1,4	170,0	2,3
595,1	1,5	188,0	2,1
611,1	1,2	199,9	1,7
—	—	287,0	11,1
—	—	309,0	7,6
—	—	325,0	0,9

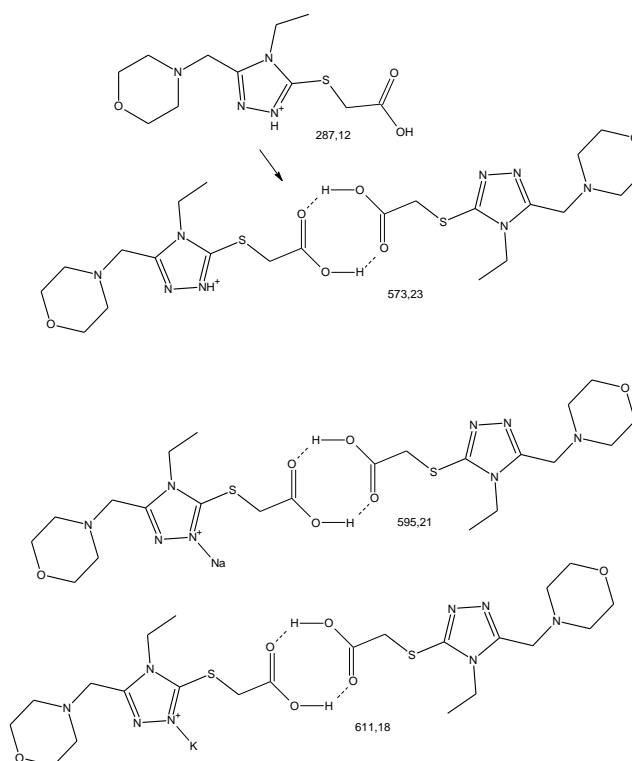


Рис. 5.53. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В

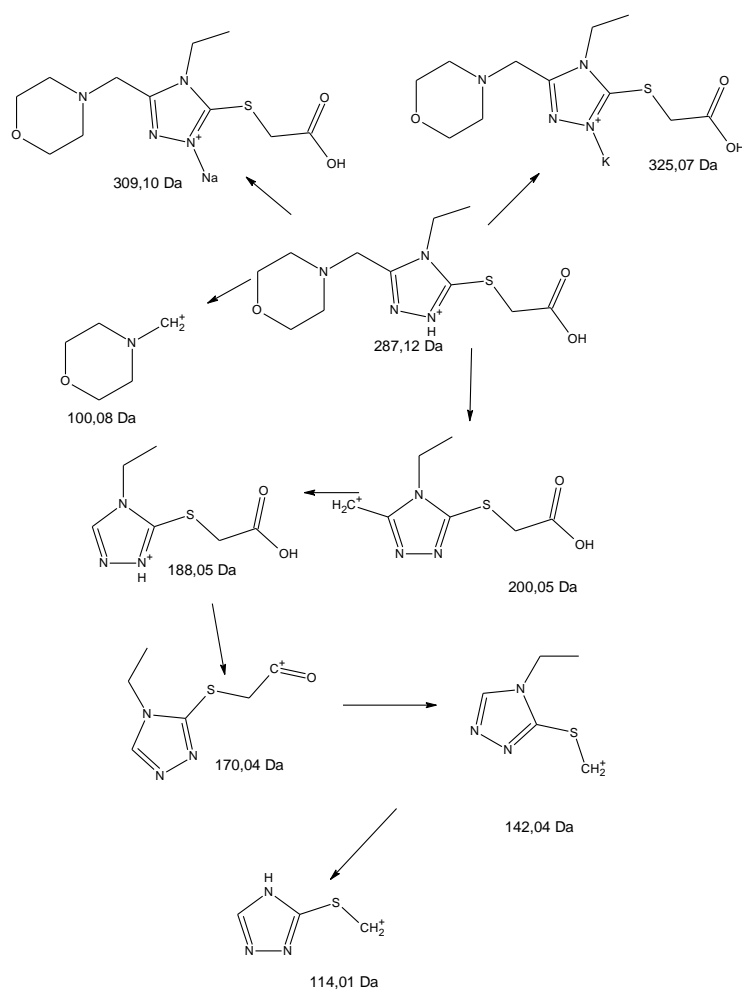


Рис. 5.54. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-етил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

Морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-ацетат (**2.31**). Мас-спектр даної речовини при напрузі 100 В на фрагментаторі (рис. 5.55 та табл. 5.14) показує пік квазімолекулярного іона кислотної форми із m/z 273, в той же час пік аддукту із катіоном Калію ($[M + K]^+$) m/z 311, димерний катіон ($[2M]^+$) із m/z 545, а також аддукт димерного катіона із Калієм m/z 583 ($[2M + K]^+$).

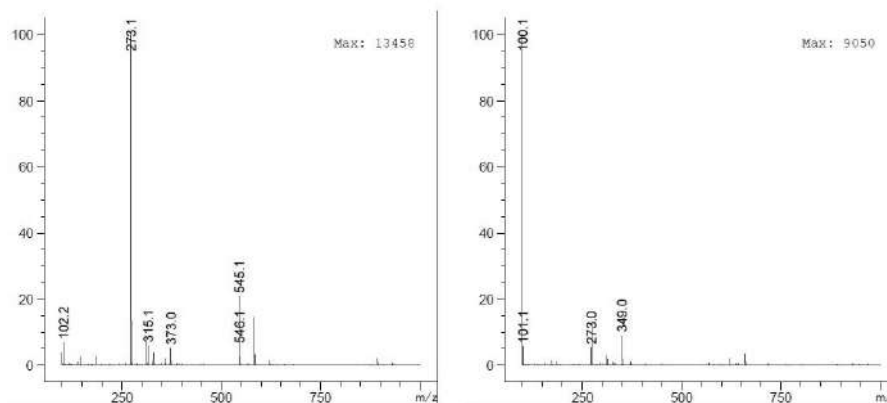


Рис. 5.55. Мас-спектри морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при різних напругах на фрагментаторі (100, 200 В)

Таблиця 5.14

Значення m/z іонів морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та та відносни інтенсивності при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
100,2	2,3	100,2	100,0
273,1	100,0	174,1	1,3
311,0	9,9	186,1	1,9
545,1	19,1	273,1	17,9
583,1	2,5	—	—

Також спостерігалися аддукти із іонами Натрію, але інтенсивність менш ніж 1. При фрагментації квазімолекулярного іона утворився морфолінметиленовий катіон із m/z 100 (рис. 5.56).

При напрузі на фрагментаторі 200 В (рис. 5.57) спостерігався квазімолекулярний іон кислотної форми сполуки, який утворював морфолінметиленовий катіон із m/z 100 при руйнуванні 1,2,4-тріазольного циклу. Вивільнення морфолінового фрагменту приводило до появи катіона із m/z 186. Потім відділяється Карбон та утворився катіон із m/z 174.

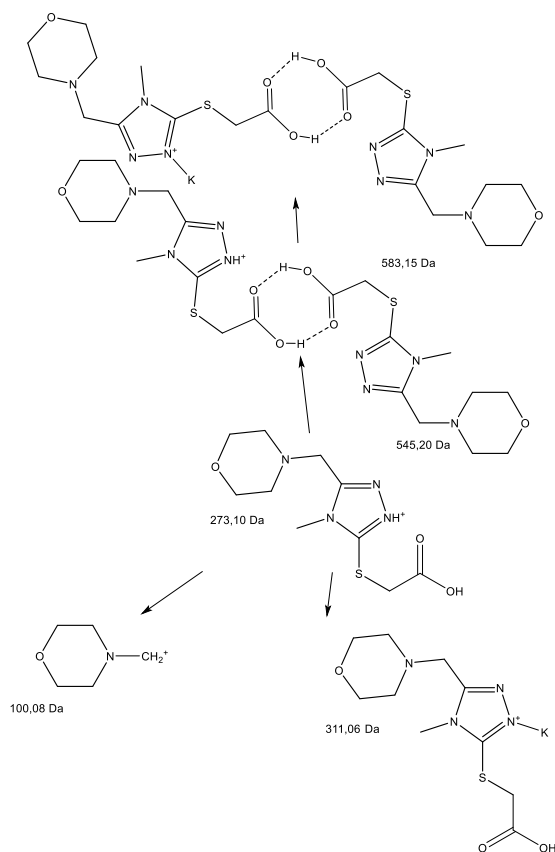


Рис. 5.56. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В

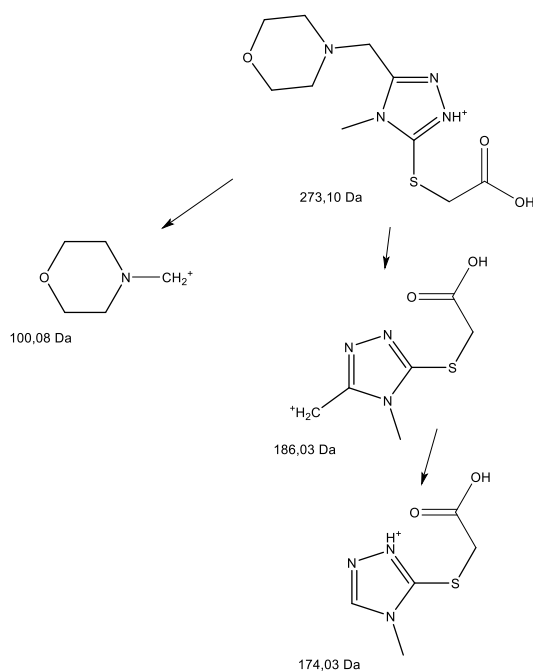


Рис. 5.57. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-метил-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

Цинк 2-((5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (2.32).

Мас-спектри даної сполуки наведені на рис. 5.58 та в табл. 5.15. При напрузі на фрагментаторі 100 В спостерігався катіон із m/z 266, який відповідав квазімолекулярному іону кислотної форми активного фармацевтичного інгредієнту (рис. 5.59). Утворився аддукт із катіоном натрію із m/z 288 ($[M + Na]^+$). При виділенні карбон (IV) оксиду з'явився катіон із m/z 220. Такий саме катіон утворився при 200 В (рис. 5.60). Крім того, при фрагментації квазімолекулярного іона із видокремленням тіооцтової групи від тріазольного фрагменту та метильного радикалу від метоксигрупи утворився катіон-радикал із m/z 161. Після подальшого вивільнення ОН утворився катіон із m/z 144. Катіон із m/z 144 міг також утворитись при відщепленні метоксифенільного радикалу та гідроксигрупи від квазімолекулярного іона. При руйнуванні 1,2,4-тріазолілтїооцтового радикалу утворився метоксифенілкатіон із m/z 107. Із вивільненням метоксифенільного радикалу та карбон (IV) оксиду з'явився іон із m/z 130. Відокремлення ОН-групи від квазімолекулярного іона приводить до створення катіона із m/z 248, який перетворився на іон із m/z 220 при відщепленні СО. Із наступним відділенням двох метиленових груп з'являється катіон із m/z 193. Подальша циклізація та відокремлення атома Гідрогену приводить до утворення катіон-радикалу із m/z 191. При відділенні СН групи від катіона із m/z 220, утворився катіон із m/z 207, який перетворюється на катіон-радикал із $m/z=205$ при циклізації.

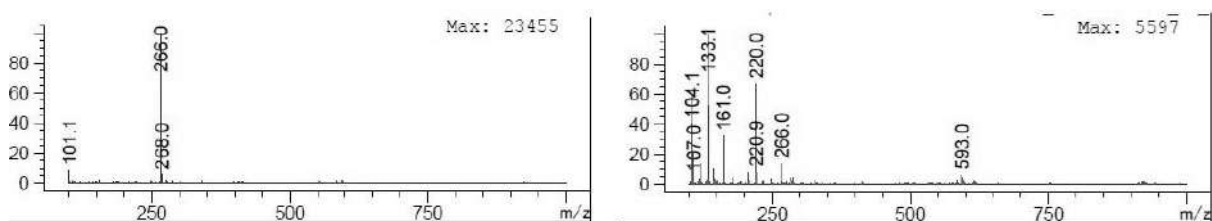


Рис. 5.58. Мас-спектр цинку 2-((5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при різних напругах на фрагментаторі (100 В та 200 В)

Значення m/z цинку 2-((5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В та 200 В

100 В		200 В	
m/z	інтенсивність, %	m/z	інтенсивність, %
157,0	0,9	101,9	1,5
220,0	1,1	103,0	12,1
266,0	100,0	104,1	39,2
277,0	1,1	117,0	1,8
288,0	1,4	118,1	2,6
290,2	0,1	130,0	3,0
—	—	132,1	18,8
—	—	133,1	100,0
—	—	144,1	9,8
—	—	149,0	1,8
—	—	151,0	1,0
—	—	161,0	32,2
—	—	177,0	6,0
—	—	191,0	1,8
—	—	192,9	1,2
—	—	205,0	8,2
—	—	220,1	64,7
—	—	248,0	5,5
—	—	266,0	11,3
—	—	271,0	0,3
—	—	288,0	2,3

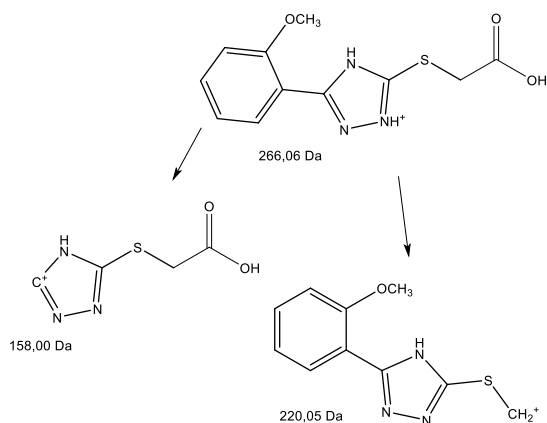


Рис. 5.59. Схема фрагментації цинку 2-((5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 В

При фрагментації квазімолекулярного іона відбувається часткова деструкція тріазольного циклу із утворенням тричленних діазогетероциклічних іонів із m/z 151 та 149. Із відщепленням одного атома Нітрогену він перетворюється на катіон-радикал із m/z 133, який має дві резонансні форми. Частка тріазольного циклу із тіоацетатним залишком із квазімолекулярного іону утворює катіон-радикал із тричленним діазогетероциклом із m/z 132. Потім із відокремленням одного атома Нітрогену з'являється новий катіон радикал із m/z 119. При відокремленні іншого атома Нітрогену, з'являється катіон із m/z 105. Далі він трансформується в катіон-радикал із m/z 104 при відщепленні ще одного атома Гідрогену. Наступний іон із m/z 103 утворюється при відриванні додаткового атома Гідрогену.

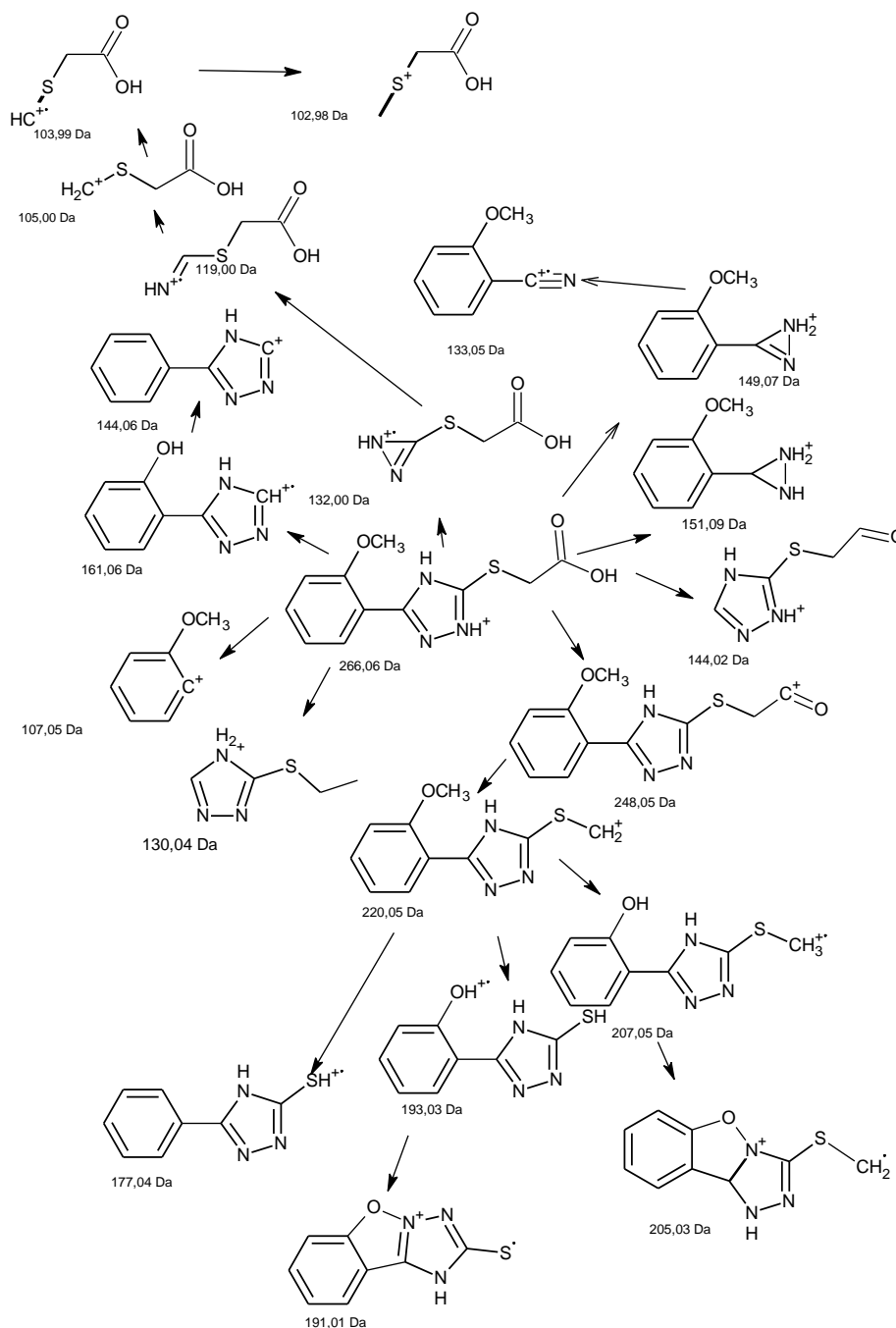


Рис. 5.60. Схема фрагментації цинку 2-((5-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

ВИСНОВКИ

1. Вперше інтерпретовані мас-спектри ЕСІ низки гідразидів та карботіоамідів кислот, проміжних речовин в синтезі субстанцій потенційних лікарських засобів з 1,2,4-тріазоловим фрагментом. Встановлені загальні та

характерні шляхи дисоціації розглянутих сполук, запропоновані та обговоренні реакції утворення характеристичних іонів.

2. Вперше інтерпретовані мас-спектри ЕСІ низки 1,2,4-тріазолтіонів, попередників в синтезі субстанцій потенційних лікарських засобів з 1,2,4-тріазоловим фрагментом. Запропоновані шляхи фрагментації ряду 1,2,4-тріазолтіонів в джерелі іонів при іонізації електроспиленням, запропоновані та обговоренні реакції утворення характеристичних іонів.

3. Досліджена ЕСІ-МС фрагментація солей 1,2,4-тріазолтіооцтових кислот як перспективних активних фармацевтичних інгредієнтів фармацевтичних препаратів при різній напрузі на фрагментаторі. Надані мас-спектри солей низки 1,2,4-тріазолтіооцтових кислот.

4. Отримані результати по дослідженню фрагментації вказаних речовин може використовуватись для детектування цих речовин, а також для підтвердження структури нових сполук за мас-спектрами на підставі вивчених закономірностей.

За матеріалами розділу опубліковані роботи [333, 337, 338].

РОЗДІЛ 6

ОБГРУНТУВАННЯ РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ
ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ АФІ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

6.1 Визначення АФІ авестиму в яйцях птиці

В даному підрозділі описана розробка та валідація ВЕРХ-МС методики, яка дозволяє контролювати залишкові кількості морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату в яйцях птиці, які можуть бути присутні внаслідок лікування або профілактики вказаним препаратом [360].

6.1.1 Методика визначення АФІ авестиму в яйцях птахів

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Обладнання. Хроматограф (дегазатор, бінарний насос, автосамплер). Одноквадрупольний мас-спектрометр (іонізація ESI).

Умови хроматографування. Колонка – 4,6 x 30 мм, з відповідною предколонкою – 4,6 x 5 мм, сорбент Zorbax SB C18, 1,8 мкм (Agilent Technologies). Температура колонки 40°C. Елюент А – 0,1% (об./об.) HCOOH в H₂O. Елюент В – 0,1% (об./об.) HCOOH в CH₃CN. Швидкість рухомої фази – 400 мкл/хв. Режим елюювання – ізократичний, 5% В. Обсяг інжекції – 5 мкл. Загальний час хроматографування – 5 хв.

Умови мас-спектрометричного детектування. Режим селективного моніторингу іонів (SIM), сканування в діапазоні m/z 237,0. Позитивна полярність. Газ-осушувач – азот (швидкість 10 л/хв). Напруга на капілярі – 4000 В. Температура газу-осушувача – 300°C. Напруга на фрагментаторі – 144 В. Тиск на небулайзері – 50 psi.

Процедура пробопідготовки. Процедура пробопідготовки наведена на рис. 6.1.



Рис. 6.1. Процедура пробопідготовки досліджуваних зразків

Досліджувані зразки яєць гомогенізують за допомогою міксера. До 200 мг яєчного гомогената (точна наважка) додають 100 мкл води, перемішують протягом 15 хв на ультразвуковій бані, додають 1,00 мл диметилсульфоксиду (ДМСО), перемішують і екстрагують протягом 15 хв на ультразвуковій бані, центрифугують при 15000g протягом 10 хв і фільтрують через нейлоновий шприцевий фільтр (внутрішній діаметр 13 мм, розмір пір 0,2 мкм).

Приготування розчинів і зразків. Розчин А: 0,01000 г морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату перенесли в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в невеликій кількості води і доводили об'єм розчину цим же розчинником до мітки (концентрація 100 мкг/мл).

Розчин В: 10,00 мл розчину А перенесли в мірну колбу ємністю 100,0 мл і доводили об'єм розчину водою до мітки (концентрація 10 мкг/мл). Для приготування модельних сумішей отримували гомогенат яєць за допомогою міксера. Для перевірки специфічності/селективності готували 5 бланк-зразків: 100 мкл води додавали за допомогою піпет-дозатора до 200 мг яєчного гомогената і зважували. Виконували аналіз бланк-зразків у відповідності до рис. 6.1, починаючи з етапу 3.

Для перевірки лінійності готували 6 калібрувальних зразків: 10 мкл, 20 мкл, 40 мкл, 50 мкл, 80 мкл або 100 мкл розчину В, додавали за допомогою піпет-дозатора до 200 мкл яєчного гомогената і зважували, потім до цих сумішей додавали 90 мкл, 80 мкл, 60 мкл, 50 мкл, 20 мкл або 0 мкл води відповідно. Виконували аналіз калібрувальних зразків відповідно до рис. 6.1, починаючи з етапу 3.

6.1.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату (АФІ авестиму). Отримання протоненої форми аналіту дозволяє збільшити час його утримування. Для отримання позитивно заряджених іонів в електроспреї і для пригнічення іонізації силанольних груп нерухомої фази необхідне уведення кислоти до складу рухомої фази, в іншому разі вони взаємодіють з атомами азоту тріазольного циклу. Як кислотний агент обрана мурашина кислота, оскільки вона є леткою і підходить для режиму іонізації в електроспреї.

Залежність коефіцієнта ємності аналіту від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі вивчена в розді. 4 – вміст ацетонітрилу в кількості 5% для АФІ авестиму відповідає часу аналізу 5 хв.

При виборі умов МС-детектування враховано, що аналіт елюється і детектується в протоненої формі, тому величина m/z в SIM-режимі прийнята рівною 237,0, що відповідає відносній молекулярній масі відповідної протоненої форми кислоти (2.20). Температура газу-осушувача, тиск на небулайзері і напруга на фрагментаторі запропоновані в розд. 3.

Пік досліджуваного аналіту – морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетату на хроматограмах модельних розчинів в запропонованих умовах аналізу характеризується часом утримування в діапазоні 2,3-2,6 хв при загальному часі хроматографування 5 хв. Селективність МС-детектування АФІ щодо домішок забезпечується використанням SIM-режиму при величині m/z , відповідної специфічній характеристиці аналіту – моноізотопної маси

квасимолекулярного іона, отриманого приєднанням протона до молекули аналіту. Для осадження білків і екстракції аналіту був обраний ДМСО.

6.1.3 Вивчення селективності, чутливості, лінійності методики визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату (АФІ авестиму) в яйцях птиці

Специфічність методики відповідно до [321, 322] підтверджували шляхом аналізу бланк-зразків. В ході аналізу бланк-зразків показано відсутність на хроматограмах додаткових піків в діапазоні часу утримування 2,1-2,9 хв, що підтверджує специфічність методики щодо компонентів біологічної матриці.

Чутливість. Для визначення нижньої межі кількісного визначення (НМКВ) методики був обраний методологічний підхід, заснований на співвідношенні «сигнал/шум». НМКВ відповідає змісту аналіту в модельній суміші, яке забезпечує 5-кратне співвідношення «сигнал/шум». При цьому правильність і прецизійність даного визначення не повинні перевищувати 20% [321, 322].

В ході досліджень показано, що НМКВ становить < 0,1 мкг аналіту в зразку, що відповідає вмісту АФІ в гомогенаті < 0,4 мкг/г. Типова хроматограма досліджуваного зразка із зазначеним вмістом аналіту приведена на рис. 6.3. У даних умовах співвідношення «сигнал/шум» становить 5,3, що відповідає заявленим вимогам [321, 322].

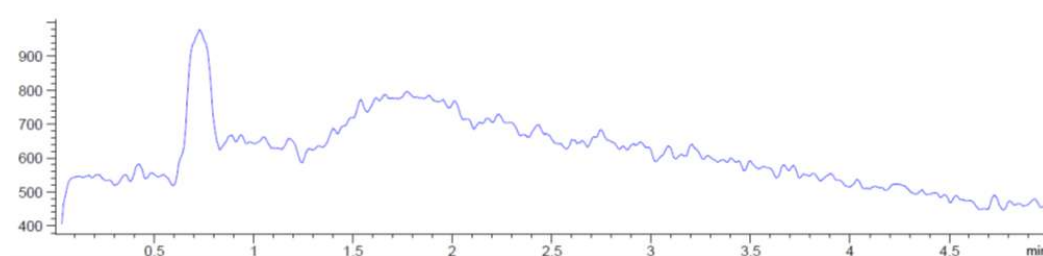


Рис. 6.2. Бланк-зразок

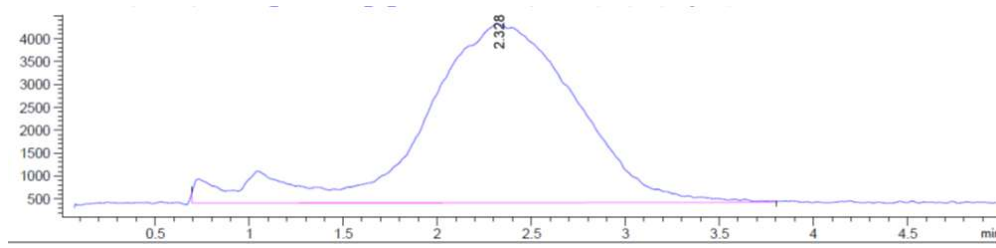


Рис. 6.3. Модельні зразки з вмістом АФІ на рівнях НМКВ

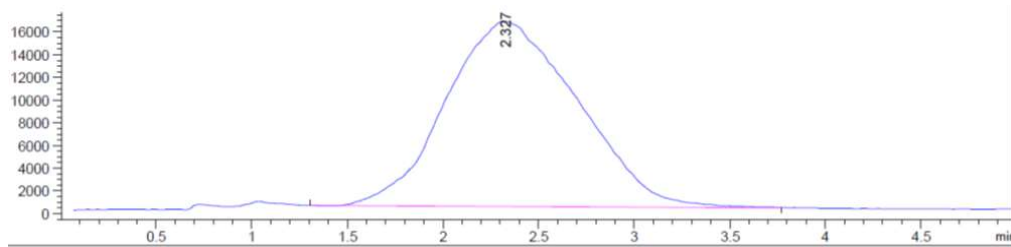


Рис. 6.4. Модельні зразки з вмістом АФІ на рівнях ВМКВ

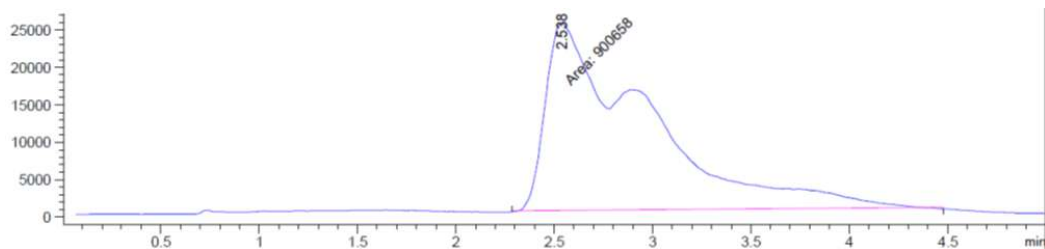


Рис. 6.5. Досліджувані зразки (10 год)

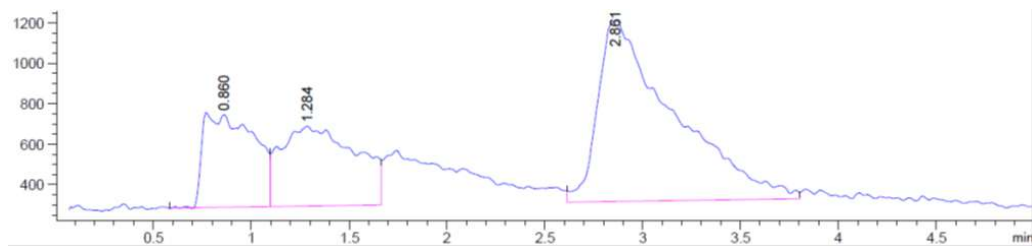


Рис. 6.6. Досліджувані зразки (24 год)

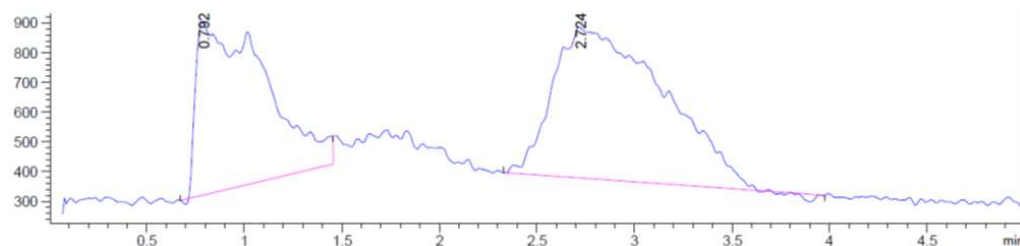


Рис. 6.7. Досліджувані зразки (48 год)

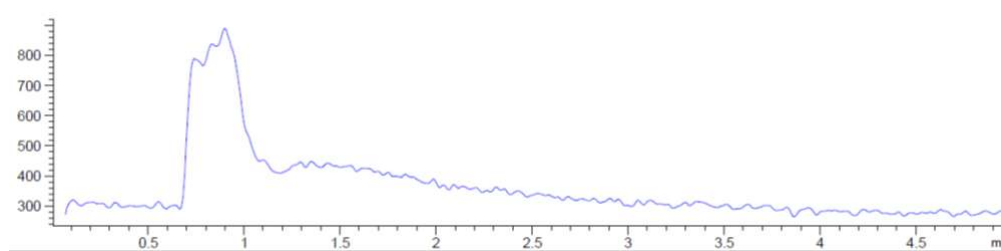


Рис. 6.8. Досліджувані зразки (60 год)

Лінійність. Як діапазон застосування методики обраний один порядок концентрацій, при цьому вміст аналіту в нижньому калібрувальному зразку відповідає НМКВ.

У заданому діапазоні проведені вимірювання для 6 калібрувальних зразків з вмістом аналіту, відмінним від нуля, що відповідає вимогам [321, 322]. На підставі експериментальних даних, отриманих в запропонованих умовах, будували калібрувальну криву залежності відгуку МС-детектора від вмісту аналіту в зразку або гомогенаті відповідно.

На рис. 6.9-6.10 наведені отримані калібрувальні криві, в табл. 6.1 вказані їх метрологічні параметри, отримані в ході обробки експериментальних даних методом найменших квадратів.

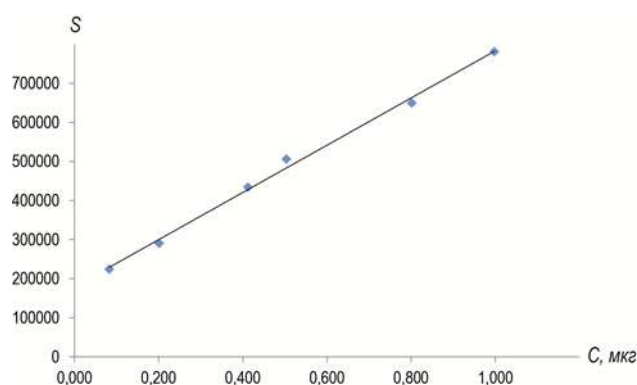


Рис. 6.9. Графік залежності площі піку від вмісту аналіту в зразку

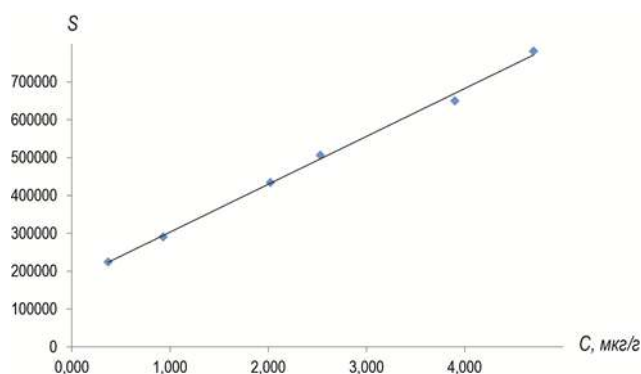


Рис. 6.10. Графік залежності площі піку від вмісту аналіту в наважці гомогената

Таблиця 6.1

Результати визначення лінійності для запропонованої методики визначення АФІ авестиму в яйцях птиці

Крива	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

Таким чином, методика є лінійною в діапазоні концентрацій 0,07-1,00 мкг в пробі (0,35-5,00 мкг/г в зразку). Типова хроматограма досліджуваного зразка з вмістом аналіту на рівні верхньої межі кількісного визначення (ВМКВ) приведена на рис. 6.4.

6.1.4 Визначення прецизійності та правильності методики визначення морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату (АФІ авестиму) в яйцях птиці. Прецизійність і правильність методики визначали шляхом аналізу модельних зразків на 4-х концентраційних рівнях – НМКВ, в межах трикратного НМКВ (нижній зразок), приблизно 50% діапазону калібрувальної кривої (середній зразок), не менше 75% верхньої межі калібрувальної кривої (верхній зразок). Дослідження проводили в рамках 5 аналітичних послідовностей.

Розрахунок концентрації АФІ в модельних зразках проводили за рівнянням калібрувального графіка, побудованого за результатами аналізу калібрувальних зразків. За отриманими результатами розраховували величину довірчого інтервалу і систематичної помилки. Результати визначення правильності і прецизійності методики наведені в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Результати визначення правильності, прецизійності і ступеня ізолювання для запропонованої методики визначення АФІ авестиму в яйцях птиці

Рівні	Уведено, $\bar{X}_{теор}$	Знайдено, $\bar{X}_{практ}$	Прецизійність <i>RSD</i> , %	Правильність $\frac{ \bar{X}_{теор} - \bar{X}_{практ} }{\bar{X}_{теор}} \cdot 100$, %	Ступінь ізолю- вання <i>R</i> , %
НПКО	0,109 мкг	0,105 мкг	$18,97 \leq 20\%$	$3,63 \leq 20\%$	97
	0,530 мкг/г	0,521 мкг/г	$18,29 \leq 20\%$	$1,65 \leq 20\%$	
Нижній зразок	0,203 мкг	0,196 мкг	$8,59 \leq 15\%$	$3,43 \leq 15\%$	99
	0,991 мкг/г	0,954 мкг/г	$8,43 \leq 15\%$	$3,74 \leq 15\%$	
Середній зразок	0,490 мкг	0,441 мкг	$5,12 \leq 15\%$	$10,08 \leq 15\%$	96
	2,442 мкг/г	2,126 мкг/г	$5,07 \leq 15\%$	$12,94 \leq 15\%$	
Верхній зразок	0,797 мкг	0,714 мкг	$10,93 \leq 15\%$	$10,44 \leq 15\%$	95
	3,808 мкг/г	3,434 мкг/г	$10,87 \leq 15\%$	$9,81 \leq 15\%$	

Ступінь вилучення визначали шляхом порівняння середніх результатів аналізу модельних зразків з відповідними результатами, отриманими для модельних розчинів в рамках однієї аналітичної послідовності. Дані про величини ступеня вилучення наведені в табл. 6.2.

Таким чином, запропонована методика є прецизійною, правильною, специфічною і чутливою і може бути застосована для визначення залишкових кількостей АФІ авестиму в яйцях птиці.

6.1.5 Результати кількісного визначення вмісту морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо) ацетату в яйцях птиці. Для проведення досліджень використовували не менше 7 яєць для кожного терміну, що пройшов після впоювання птиці. Розрахунок концентрації АФІ в досліджуваних зразках проводили за рівнянням калібрувального графіка, побудованого за результатами аналізу калібрувальних зразків. Результати визначення вмісту аналіту наведені в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Результати визначення АФІ авестиму в контрольних групах яєць

Час, що минув після впоювання птиці	Вміст аналіту в зразку, мкг	Вміст аналіту в гомогенаті, мкг / г
10 г	0,071	0,355
24 г	виявлено	виявлено
48 г	виявлено	виявлено
60 г	не виявлено	не виявлено

Таким чином, АФІ авестиму кількісно визначається в гомогенаті яєць птиці тільки через 10 год після впоювання курей (рис. 6.5). Через 2 і 4 доби АФІ вдалося виявити в досліджуваних зразках, але його вміст був нижче НМКВ (рис. 6.6-6.7). Через 5 діб аналіт у гомогенаті яєць птахів не виявлено (рис. 6.8). Розроблена методика пропонується до використання в токсикологічних лабораторіях і лабораторіях ветеринарних інспекцій.

6.2 Визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату в яйцях птиці

Наведений розділ присвячений розробці та валідації ВЕРХ-МС методики, визначенню залишкових кількостей піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-

1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в яйцях птиці, які можуть потрапляти в яйця несучок після профілактичного або лікувального призначення препарату [361].

6.2.1 Методика визначення АФІ тріфузолу в яйцях птиці

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Прилади: ДМД ВЕРХ-МС система: Agilent 1260 Infinity (дегазатор, бінарний насос, автосамплер), одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї; програмний пакет OpenLAB CDS .

Мас-спектрометричні умови для кількісного аналізу піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Режим селективного моніторингу іонів (SIM) (АФІ тріфузолу), позитивна полярність, швидкість осушуючого газу (азоту) 10 л/хв, напруга капіляру 4000 В, температура осушуючого газу 247°C, напруга на фрагментаторі 149 В, тиск небулайзеру склав 46 psi.

Хроматографічні умови. Аналітична колонка Agilent ZORBAX SB-C18 (30 мм х 4,6 мм; 1,8 мкм, корпорація Agilent) з відповідною захисною колонкою. Температура колонки 40°C, об'єм вколу становив 1 мл. Швидкість рухомої фази дорівнювала 0,4 мл/хв в ізократичному режимі. Рухома фаза складалась з води (мурашина кислота 0,1%)/ацетонітрилу (мурашина кислота 0,1%) (70:30). Загальний час склав 5 хв.

Пробопідготовка стандартних розчинів, калібрувальних розчинів та розчинів ЗКЯ. Стандартні стокові розчини АФІ тріфузолу (0,1 мг/л) (розчин А) приготовлені у мірній колбі на 100,0 мл, шляхом розчинення 0,01000 г цієї речовини у води та доведення розчину до мітки.

Фінальні стандартні розчини АФІ тріфузолу (0,1 мг/л) (розчин В) приготовлені шляхом перенесення 10,00 мл розчину А у мірну колбу на 100,0 мл та доведення розчину до мітки з водою.

Модельний розчин було приготовлено шляхом приготування яєчного гомогенату міксером.

Для перевірки лінійності було виготовлено сім модельних розчинів. До яєчного гомогенату вагою 0,2000 г було додано за допомогою піпет-дозатора 0 мкл, 10 мкл, 20 мкл, 40 мкл, 50 мкл, 80 мкл, 100 мкл розчину В та зважено. Потім до цих сумішей було додано 100 мкл, 90 мкл, 80 мкл, 60 мкл, 50 мкл, 20 мкл, 0 мкл води відповідно. Пізніше діяли відповідно до процедури у схемі, починаючи з пункту 3 (рис. 6.11).



Рис 6.11. Процес пробопідготовки зразку

Для перевірки прецизійності та точності було приготовлено двадцять модельних розчинів, а саме 5 розчинів з чотирьма рівнями концентрації. Різні кількості розчину додавали до 200 мг яєчного гомогенату, нижня межа кількісного визначення для розчину В – 10 мкл. Триразова нижня межа кількісного визначення (нижній ЗКЯ) – 20 мкл розчину В. Близько 50% діапазону калібрувальної кривої (середній ЗКЯ) було 50 мкл та не менше ніж 75% нижнього діапазону калібрувальної кривої (вищий ЗКЯ) було 80 мкл розчину В, суміші було зважено. Потім було додано 90, 80, 50 та 20 мкл води. Після цього діяли згідно з процедурою у схемі, починаючи з пункту 3 (рис. 6.11).

Не екстраговані розчини АФІ тріфузолу на чотирьох рівнях концентрації було приготовлено для перевірки ступеня вилучення. Це було досягнуто шляхом додавання 10 мкл, 20 мкл, 50 мкл та 80 мкл розчину В, а також 90 мкл, 80 мкл, 50 мкл та 20 мкл води відповідно, потім 1 мл диметилсульфоксиду.

Усі стандартні розчини зберігали за температури 5°C. Вони стабільні протягом валідаційного експерименту.

Екстрагування зразку. Зразки яєць було гомогенізовано міксером. 100 мкл води було додано до 0,2000 г (точні наважки) гомогенізованих яєць. Вони перебували під дією ультразвуку протягом 15 хв на ультразвуковій бані. Потім було додано 1,00 мл диметилсульфоксиду. Зразки перебували під дією ультразвуку протягом 15 хв на ультразвуковій бані, відцентрифуговані при 15000 об./хв, 10 хв та відфільтровані крізь нейлоновий шприц-фільтр (13 мм внутрішній діаметр, розмір пор 0,2 мкм).

Застосування аналітичної методики для реальних зразків яєць. 1 мл 1% розчину препарату було додано до 1 л води. Фінальна концентрація препарату становила 10 мг/л. Під час годування одна курка отримала препарат у кількості 5 мг/кг. Виявлення залишкових кількостей препарату було проведено згідно з процедурою (рис. 6.11), порівнюючи з гомогенізованими калібрувальними зразками. Яйця взяті випадковим чином від різних курей.

Розрахунок концентрації. Було проведено шляхом побудови калібрувальної кривої, яка має бути перевірена кожного разу під час дослідження.

6.2.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) при визначенні в яйцях птиці. Мас-спектрометричні умови оптимізовані для максимального відгуку, а саме ЕСІ-МС умови, такі як температура газу осушувача, напруга на фрагментаторі, тиск небулайзера було запропоновано в розд. 3. Була виявлена протонувана кисла форма аналіту. Значення m/z SIM режиму дорівнювало

302,1, що збігається з молекулярною масою протонованої молекули відповідної кислоти.

Хроматографічна поведінка АФІ тріфузолу показана раніше. Додавання кислоти до елюенту необхідно для формування позитивних іонів для іонного джерела та для пригнічення сіланольних груп стаціонарної фази аби уникнути їх взаємодію з Нітрогеном тріазольного циклу аналіту. Формування кислотної форми також збільшує час утримування. Мурашина кислота вибрана як кислотний агент через те, що вона летка та сумісна з ЕСІ-МС детектором. Залежність фактора ємності k від концентрації ацетонітрилу досліджена у попередньо. Вміст ацетонітрилу 30% для АФІ тріфузолу відповідає фактору ємності 2,6 та часу проведення 5 хв, що є задовільним для розділення від домішок.

Диметилсульфоксид був використаний як екстракційний та депротейнізуючого агент у пробопідготовці зразку.

6.2.3 Вивчення селективності, лінійності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-ацетату (АФІ тріфузолу) в яйцях птиці

Селективність було підтверджено шляхом аналізу бланків для того, щоб виявити відсутність інтерференції з аналітом. Пік АФІ тріфузолу ідентифікувався при 302 SIM хроматограмі та модельна суміш на нижчої межі кількісного визначення мала час утримування 3,4-3,5. Селективність було підтверджено присутністю інтерференцій з домішками (рис 6.13). Загальний час хромаграфічного аналізу склав 5 хв. Селективність прийнятна, тому що детекція проводилась у режимі SIM при m/z 302,1 та відповідала значенню специфічної моноізотопної маси квазімолекулярного іона, отриманого приєднанням протону до відповідної кислоти АФІ тріфузолу.

Лінійність. Калібрувальна крива побудована базуючись на відгуку детектору при 302,1 m/z , що залежала від вмісту речовин у гомогенаті. Калібрування було проведено зовнішнім стандартом. Калібрувальна крива лінійна в межах 0,12-1,07 мкг у зразку зваженого гомогенату чи 0,61-3,6 мкг/г

гомогенату. Крива лінійності описана рівнянням: $y = 93332x + 3205,4$; $R^2 = 0,9988$, $R = 0,9994$ (рис. 6.12).

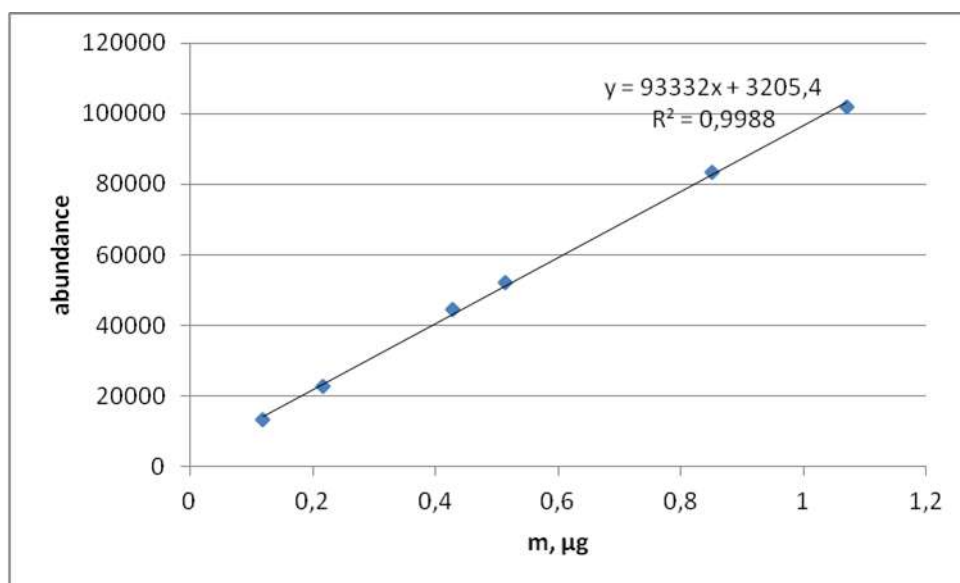


Рис 6.12. Калібрувальна крива АФІ тріфузолу у зразку яєчного гомогенату

6.2.4 Вивчення чутливості, прецизійності та правильності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в яйцях птиці

Чутливість. Нижню межу кількісного визначення було виявлено шляхом модельного змішування, що забезпечує 5-кратне відношення сигнал/шум. Відносні стандартні відхилення не повинні перевищувати 20%. Розраховані значення мають бути в межах 20% від точної кількості аналізу, що було уведено до модельного розчину. Нижчий калібрувальний стандартний розчин було встановлено як нижча межа кількісного визначення [321, 322].

Прецизійність та правильність було визначено шляхом вивчення розчинів для перевірки якості.

Ступінь вилучення було виявлено шляхом порівняння екстрагованих стандартних зразків з чотирма рівнями концентрацій для зразків, що приготовані без етапу екстракції.

Вміст АФІ тріфузолу в контрольному розчині було виявлено, використовуючи рівняння калібрувальної кривої. Прецизійність та правильність виявлена для контрольного зразку АФІ. Хроматограми контрольних розчинів на рівні нижчої межі кількісного визначення та вищої межі кількісного визначення (як мінімум 75% верхнього діапазону калібрувальної кривої) показані на рис. 6.13-6.14.

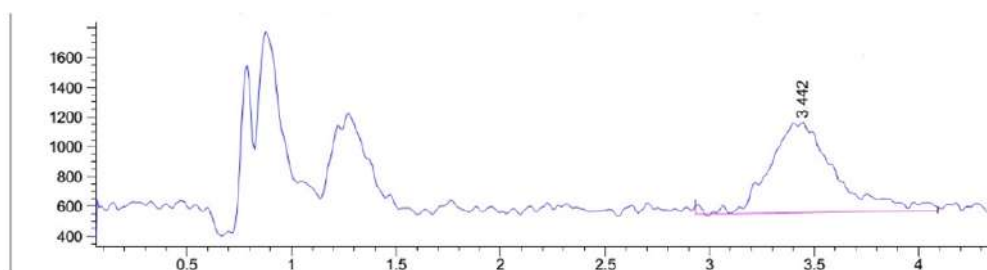


Рис 6.13. Хроматограма гомогенізованого екстракту, змішаного з АФІ тріфузолу на нижній межі кількісного визначення

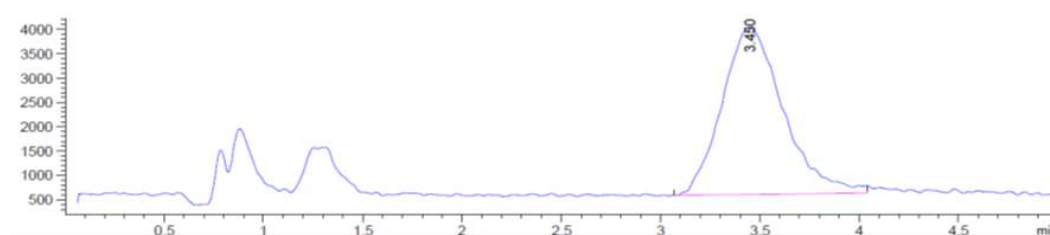


Рис 6.14. Хроматограма при верхній межі кількісного визначення в яєчному гомогенаті з АФІ тріфузолу

Правильність виявлена розрахованими значеннями відхилень від номінальних значень контрольного розчину як відсоток до номінальних значень (відносна похибка). Ступінь вилучення було виявлено для розчинів для контролю якості.

Методика застосована для виявлення залишків АФІ тріфузолу у гомогенізованих зразках яєць після використання препарату на курях. Ця методика правильна та прецизійна, вона може бути використана для виявлення залишкових кількостей АФІ тріфузолу. Кожного дня було перевірено як мінімум 6 яєць.

Прецизійність та правильність прийнятні та відповідають вимогам. Відносні стандартні відхилення не перевищували 15% для контрольних розчинів. Середня концентрація знаходилась в межах 15% від номінальних значень для контрольних розчинів (табл. 6.4).

Таблиця 6.4

**Прецизійність та правильність виявлення АФІ тріфузолу (n = 5)
на 4 рівнях концентрації**

Рівні	\bar{x} , мкг	$\bar{x} \pm SD$, мкг	Прецизійність RSD, У %	Правильність RE*, у %	Ступінь ізолювання, у %
1	0,1095	0,1146 \pm 0,05505	4,804 \leq 20%	4,585 \leq 20%	96,13
2	0,2112	0,1960 \pm 0,03242	1,654	7,204	80,57
3	0,5312	0,5127 \pm 0,08020	1,564	3,493	82,94
4	0,8456	0,8430 \pm 0,04753	5,638	0,2887	97,52

6.2.5 Результати кількісного визначення вмісту АФІ тріфузолу в яйцях птиці. Розрахунки вмісту проведені використовуючи рівняння калібрувальної кривої. Результати вмісту в мкг та мкг/г наведено в табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Результати виявлення АФІ тріфузолу

День	Виміряна вага (середня) m, мкг	Виміряна концентрація (середня) C, мкг/г
1	0,6872	3,227
2	0,3648	1,679
3	—	—

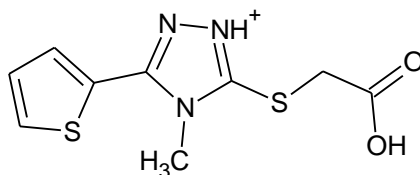
Застосування методики на реальних зразках показує, що АФІ тріфузолу не виявляється на третій день після закінчення годування препаратом (табл. 6.5).

6.3 Визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці

В даному розділі наведено дослідження з розробки методики визначення залишкових кількостей піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці, які можуть залишатись після годування птиці з метою лікування та профілактики [362].

6.3.1 Методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці

Хімічні речовини та реактиви. Натрій ((4-метил-5-(2-тієніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (внутрішній стандарт, ВС (**6.1**)), близький за хімічною формулою до діючої речовини препарату тріфузол синтезували на кафедрі природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії ЗДМУ (зав. каф. д. фарм. н., професор Панасенко О. І.). Структура квазімолекулярного іона ВС показана на рис. 6.15.



m/z 256,02

Рис. 6.15. Молекулярна структура та m/z для квазімолекулярного іона внутрішнього стандарту

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Прилади. ДМД ВЕРХ-МС система: Agilent 1260 Infinity (дегазатор, бінарний насос, автосамплер), одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї; програмний пакет OpenLAB CDS.

Хроматографічні умови. Аналітична колонка Agilent ZORBAX SB-C18 (30 мм x 4,6 мм; 1,8 мкм, корпорація Agilent) з захисною колонкою. Температура колонки 40° С, об'єм вколу становив 2 мкл. Швидкість потоку

рухомої фази $0,4 \text{ мл/хв}^{-1}$ з ізократичним елююванням складалася з $0,1\%$ (об./об.) Як рухому фазу зі швидкістю потоку $0,4 \text{ мл/хв}^{-1}$ з ізократичним елююванням використали $0,1\%$ (об./об.) мурашиної кислоти у воді (А), ацетонітрил, що містить $0,1\%$ (об./об.) мурашиної кислоти (В). Склад рухомий фази 70% А/ 30% В (об./об.). Загальний час роботи становить 5 хв. Довжина хвилі детектора 276 нм .

Мас-спектрометричні умови детектування АФІ трифузолу та ВС. Режим сканування для ідентифікації піків m/z від 250 до 310, позитивна полярність. Швидкість газу осушувача (азот) 10 л/хв . Напруга на капілярі 4000 В , температура газу осушувача $247 \text{ }^\circ\text{С}$, напруга на фрагментаторі 149 В , тиск на небулайзері 46 psi .

Процедура пробопідготовки досліджуваних зразків

Рідинна екстракція зразку. Гомогенізували 30 г м'яса, додавали 240 мкл 1% ВС, змішували. Через 2 год додавали 40 мл 40% CH_3CN з $0,1\%$ HCOOH і перемішували. Через 2 год екстракт фільтрували через скляний фільтр. Фільтрат центрифугували при 15000 г протягом 10 хв і фільтрували через нейлоновий шприц $\varnothing 13 \text{ мм}$, розмір пор $0,2 \text{ мкм}$ (рис. 6.15).

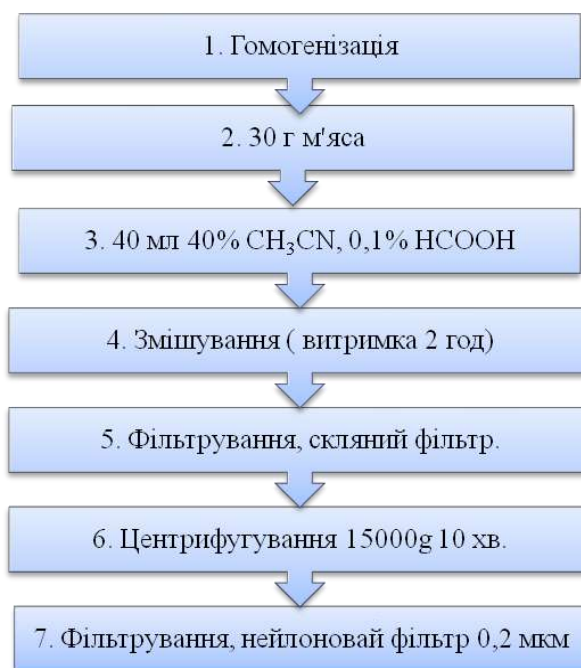


Рис. 6.15 Схема рідинної екстракції зразків м'яса птиці

Твердофазна екстракція. Процедура твердофазної екстракції показана на рис. 6.16. Картридж ТФЕ С18 (100 мг/1 мл) промивали 1 мл CH_3CN , потім 1 мл екстракту, отриманого відповідно до процедури (рис. 6.15), додавали в картридж ТФЕ.



Рис. 6.16 Схема твердо-фазної екстракції

Виготовлення стандартних розчинів, калібрувальних розчинів та розчинів для перевірки якості методики (QC):

1) Стандартні розчини АФІ тріфузолу (1 мг/мл) та внутрішнього стандарту (1 мг/мл) були виготовлені розчиненням відповідної наважки цих речовин в сумішах 0,1% HCOOH в CH_3CN та 0,1% HCOOH в H_2O – 30:70, 40:60 та 50:50 (за об'ємом) відповідно.

2) Стандартні розчини тріфузолу та внутрішнього стандарту для перевірки ступеня вилучення при твердофазній екстракції (ТФЕ) (0,05 м/мл), ВС (0,05 мг/мл) були виготовлені змішуванням 50 мкл розчинів з концентрацією 1 мг/мл з 950 мкл сумішью 0,1% HCOOH в CH_3CN та 0,1% HCOOH в H_2O – 30:70, 40:60 та 50:50 (за об'ємом) відповідно.

3) Неекстраговані стандартні розчини АФІ тріфузолу та внутрішнього стандарту для перевірки ступеня ізолювання при повній екстракції (ТФЕ та рідинна екстракція) (0,07 мг/мл), ВС (0,07 мг/мл) були виготовлені змішуванням 50 мкл розчинів з концентрацією 1 мг/мл з 950 мкл сумішью 0,1% HCOOH в CH_3CN та 0,1% HCOOH в H_2O – 30:70, 40:60 та 50:50 (по об'єму) відповідно.

4) Калібрувальні розчини трифузолу (1,2; 1,6; 2,0; 2,3; 2,5; 6,0; 14,3 мг/мл⁻¹) були виготовлені розчиненням відповідних наважок в 1 мл води.

Серії калібрувальних розчинів АФІ тріфузолу були виготовлені додаванням 1 мл стандартних розчинів до 30 г гомогенату курячого м'яса, та були проекстраговані за допомогою 40 мл суміші 0,1% HCOOH в CH₃CN та 0,1% HCOOH в H₂O – 40:60 (за об'ємом) згідно процедури екстракції (рис. 6.15-6.16).

Усі стандартні розчини зберігалися при 5°C були стабільні протягом валідаційного експерименту.

Розчини для перевірки якості методики (ЗКЯ) також були виготовлені аналогічним шляхом додаванням 1 мл стандартного розчину до 30 г гомогенату курячого м'яса та проекстраговані згідно з процедурами екстракції (рис. 6.15-6.16). Кінцеві концентрації АФІ тріфузолу були при нижній межі кількісного визначення (НМКВ), в межах триразового НМКВ (низький ЗКЯ), 30-50% від діапазону калібрувальної кривої (середній ЗКЯ) і не менше 75% верхнього діапазону калібрувальної кривої (високий ЗКЯ) [321, 322]. Остаточний вміст речовини тріфузолу в стандартних розчинах, що отримані із гомогенату, становило 40, 70, 195 і 390 мкг/мл. Всі стандартні розчини зберігались при 5°C, а саме розчини для побудови калібрувальної кривої та розчини для визначення якості (ЗКЯ) при валідації і під час визначень.

Валідація методики. Специфічність підтверджено аналізом бланкових зразків, щоб визначити відсутність інтерференції з аналітом. Аналітичний сигнал зразка при НМКВ повинен бути щонайменше 5 разів більше ніж сигнал бланкового зразка [321, 322].

Правильність та прецизійність методики визначення АФІ тріфузолу у межах визначення речовини визначали за зразками ЗКЯ, аналізуючи при чотирьох різних концентраціях: при НМКВ, нижній зразок (втричі більше НМКВ), середній зразок (близько 30-50% від діапазону градування кривої) і верхній зразок (на 75% від верхньої кривої діапазону калібрування) концентрації.

Застосування аналітичної методики. Визначення залишкових кількостей АФІ проводиться відповідно до процедури (рис. 6.15-6.16), за рівнянням калібрувальної кривої, яка отримана зі зразків гомогенату, які мистять стандартні розчини піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату.

Розрахунок концентрації. Рівняння калібрувальної кривої, яке слід перевіряти кожен раз в умовах дослідження, розраховано за допомогою методу найменших квадратів.

6.3.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу і МС-детектування АФІ тріфузолу піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці. Вибрано умови мас-спектрометричної детекції відповідно до максимального відгуку. Оптимізація умов іонного джерела проведено в підрозд. 3.5. Іони для аналітів контролювали за m/z : тріфузол 302,1, ВС 256,0.

Обґрунтування вибіру форматної кислоти як підкислювача наведено в розд. 4. Довжина хвилі виявлення ДМД вибрана відповідно до максимальної адсорбції і дорівнює 276 нм. УФ-спектри АФІ тріфузолу та ВС наведено на рис. 6.17-6.18.

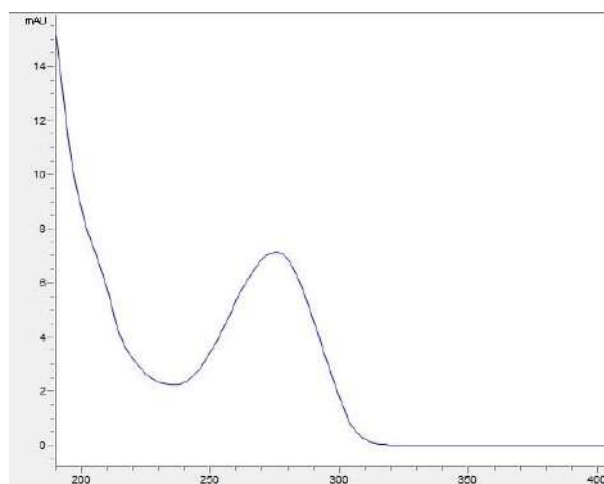


Рис. 6.17. УФ-спектр АФІ тріфузолу в елюенті

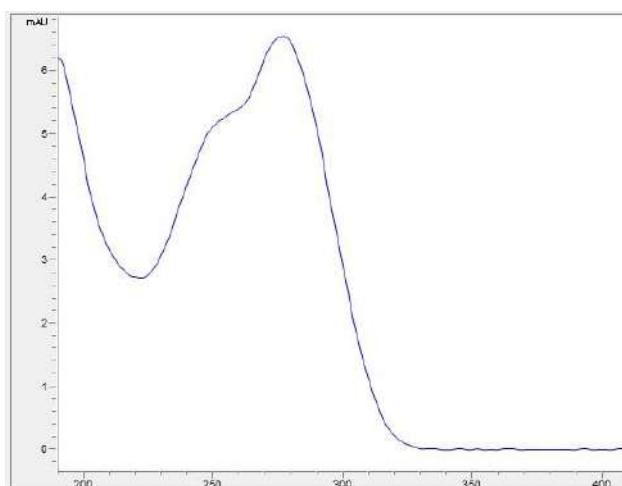


Рис. 6.18. УФ-спектр ВС

Іонізація ESI – це м'який спосіб, при якому легко отримувати квазімолекулярні іони без фрагментації. Аналіт та ВС найкраще детектуються при позитивній іонізації, тому протоновані молекулярні іони $[M + H]^+$ присутні як основні піки для сполук. Мас-спектри протонованих молекул при скануванні від 250 до 310 m/z наведені на рис. 6.19-6.20.

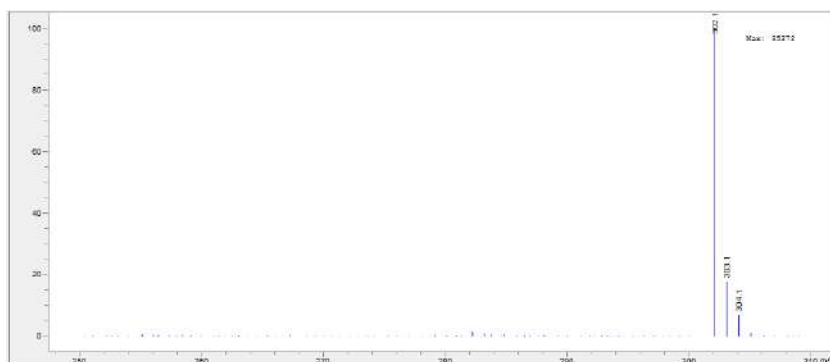


Рис. 6.19. Мас-спектр АФІ тріфузолу

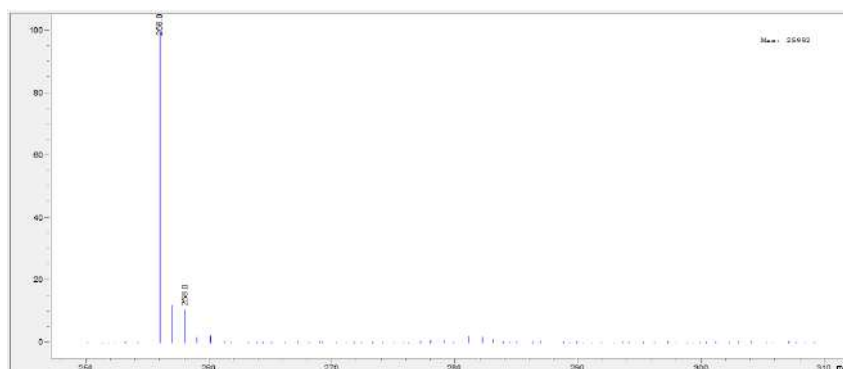


Рис. 6.20. Мас-спектр ВС

Наявність молекул може бути підтверджена УФ і МС спектрами. Склад рухомої фази є важливим чинником, що впливає на процеси іонізації в ESI. Високий вміст органічного модифікатору в мобільній фазі необхідний, щоб зменшити подавлення сигналу. Але високий відсоток ацетонітрилу різко знижує час утримування, а також вибірковість визначень, тому вибрали 30% CH_3CN . Цього достатньо для інтенсивності сигналу, селективності і час аналізу становить лише 5 хв в ізократичних умовах.

Розробка умов твердофазної екстракції. Через високе значення LogD кислотної форми АФІ тріфузолу $3,48 \pm 0,66$ (було розраховано за допомогою програмного забезпечення ACD labs 6.0). Вирішено, що молекула кислотної форми АФІ тріфузолу повинна мати гарне утримування на неполярній фазі, тому обрали картридж C18 SPE для адекватного утримування. Максимальний LogD існує в кислому середовищі від рН 2 до рН 3. Таким чином, вибрали 0,1% HCOOH як кислотний агент: (рН $\sim 2,7$), LogD дорівнює 3,34. Вилучення АФІ тріфузолу із зразків м'яса проводили за допомогою суміші ацетонітрил-вода з 0,1% HCOOH . Виготовлено три стандартних розчину АФІ тріфузолу (0,05 мг/мл) з різною концентрацією ацетонітрилу: 30%, 40%, 50% з 0,1% HCOOH . Використали воду для промивання через невелику здатність до елюювання. Ацетонітрил використовується для елюювання аналіту через сильну силу елюції. Максимальна ступінь ізолювання становила при 30% CH_3CN (табл. 6.6).

Таблиця 6.6

Ступінь ізолювання залежно від вмісту ацетонітрилу для ТФЕ дослідження АФІ тріфузолу в м'ясі

Вміст ацетонітрилу	30% CH_3CN	40% CH_3CN	50% CH_3CN
Ступінь ізолювання, %	58,8%	10,3%	8,57%

Рідинна екстракція зразків. Вибрано суміш ацетонітрил-вода з 0,1% HCOOH як екстрагент АФІ тріфузолу з м'яса для руйнування зв'язування з білками. До гомогенізованого м'яса (100 г) було додано 1 мл 1% розчину АФІ

тріфузолу, 1 мл 1% ВС. Гомогенізатор поділено на 3 проби приблизно 30 г. Кожний зразок містив приблизно 3 мг АФІ тріфузолу. Зразки піддавали екстракції по 45 мл суміш'ю ацетонітріл-вода з 0,1% НСООН. Вміст ацетонітрилу становив відповідно 30%, 40%, 50%. Остаточна концентрація АФІ тріфузолу та ВС в екстракті складала приблизно 0,07 мг/мл. Вивчали 30%, 40%, 50% ацетонітріл з 0,1% НСООН (табл. 6.7). Найбільше значення ступеня ізолювання було при 40% CH₃CN.

Таблиця 6.7

Залежність детектора сигналу від вмісту ацетонітрилу для повного циклу екстракції (рідинна екстракція та ТФЕ) АФІ тріфузолу і ВС

Вміст ацетонітрилу	30% CH ₃ CN	40% CH ₃ CN	50% CH ₃ CN
Ступінь ізолювання (Тріфузол), %	2,671	5,10	3,43
Ступінь ізолювання (ВС), %	8,11	17,89	5,598

6.3.3 Вивчення чутливості, лінійності методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі птиці

Чутливість. Визначення НМКВ. МВ (LOD) становить близько 18 мкг/г гомогенізатору м'яса (3·S/N). НМКВ (LLOQ) – 30 мкг/г гомогенізатору м'яса (5·S/N).

Селективність та специфічність. Діодно-матричне детектування при 276 нм достатньо селективно. Тріфузол та ВС було розділено хроматографічно з часом утримування 3,4 та 1,4 відповідно. Додатково селективність методу забезпечувалась визначенням мас-спектрів речовин. Загальний час хроматографування був 5 хв. Інтерференція з домішками відсутня (рис. 6.21).

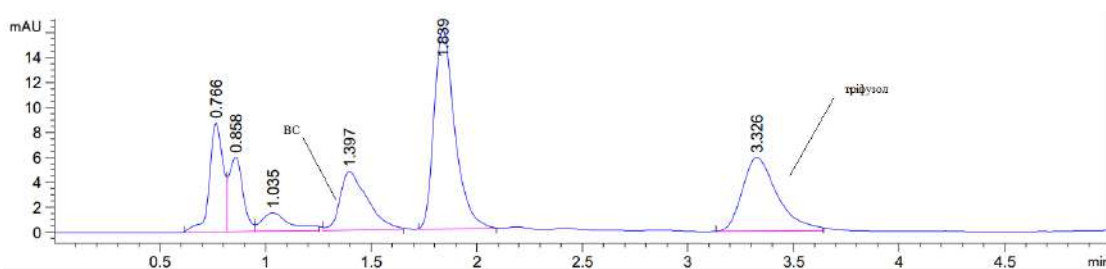


Рис. 6.21. Хромограми НМКВ з курячого м'яса, піки АФІ трифузолу та ВС

6.3.4 Вивчення лінійності, прецизійності та правильності методики визначення 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ трифузолу) в м'ясі птиці

Лінійність і НМКВ. Калібрувальний графік будували на підставі залежності відгуку діодно-матричного детектору при довжині хвилі 276 нм від вмісту трифузолу в м'ясі. Графік лінійний для 40-475 мкг/г речовини в гомогенаті. Отримана задовільна лінійність. Відповідну лінійність одержано рівняння: $y = 2,4198x - 57,92$; $R^2 = 0,997$.

Результати правильності та прецизійності. Вміст АФІ трифузолу в ЗКЯ визначали за допомогою калібрувального графіку. Прецизійність та правильність було визначено для розчинів для ЗКЯ трифузолу. Правильність та прецизійність даних наведена в табл. 6.8.

Таблиця 6.8

Правильність та прецизійність методу визначення АФІ трифузолу в гомогенаті (n = 5) на 4 рівнях концентрації

Аналіт	Номінальна концентрація, мкг/г	\bar{x}	Прецизійність RSD, у %	Правильність RE, у %
АФІ трифузолу	40	39,51	$18,37 \leq 20\%$	$13,82 \leq 20\%$
	70	70,65	$14,10 \leq 15\%$	$9,906 \leq 15\%$
	195	201,516	$11,23 \leq 15\%$	$13,61 \leq 15\%$
	390	391,392	$10,09 \leq 15\%$	$9,562 \leq 15\%$

Методика є відтворюваною, правильною та чутливою, і може бути успішно використана для визначення залишкових кількостей АФІ тріфузолу в гомогенаті м'яса птиці [321, 322].

6.3.5 Результати кількісного визначення вмісту АФІ тріфузолу в м'ясі птиці. Зразки птиці (30 г) обробляли відповідно до методу (рис. 6.15-6.16) і порівнювали з екстрактом із виготовленого стандартного зразка АФІ тріфузолу в м'ясі (рис. 6.22).

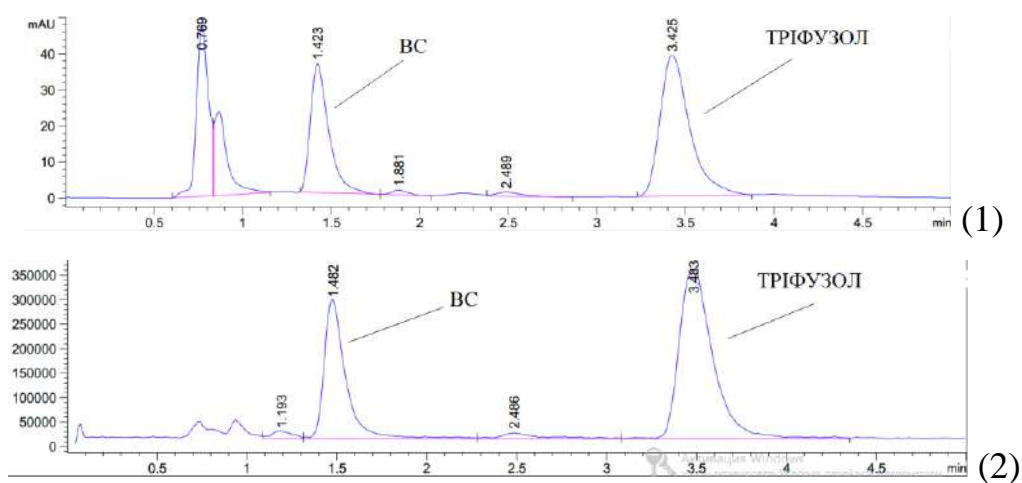


Рис. 6.22. Хроматограми екстрагованого стандарту м'яса на ДМД при 276 нм та MSD TIC

Діючу речовину препарату Тріфузол в досліджуваних зразках не було виявлено (рис. 6.23).

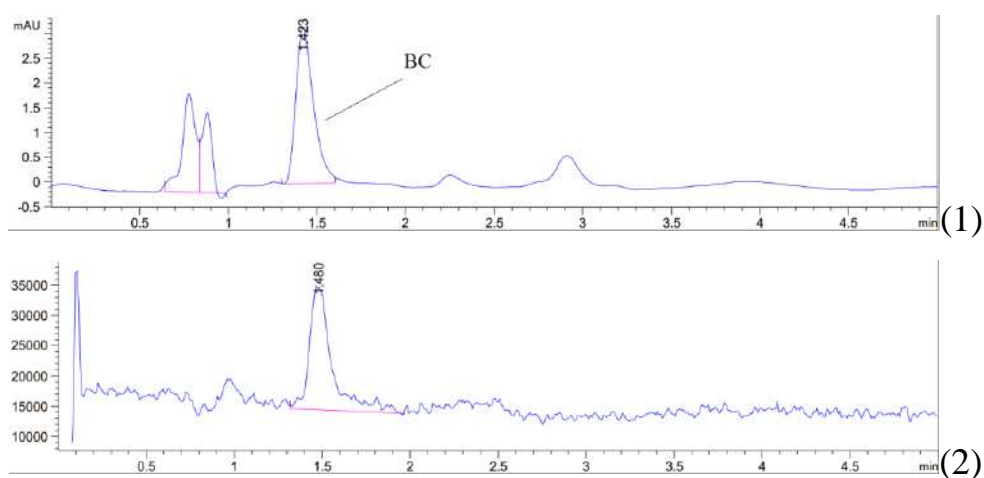


Рис. 6.23. Хроматограми екстрагованого зразка м'яса на ДМД 276 нм та MSD TIC

Розрахунок вмісту. У зв'язку з тим, що при визначеннях з використанням зовнішнього стандарту отримана більша відтворюваність результатів, розрахунки вмісту проводимо за допомогою калібрувального графіку зовнішнього стандарту. Внутрішній стандарт використовуємо тільки для контролю умов вилучення.

6.4 Дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в молоці корів

В наданому підрозділі описується особливості розробки методики визначення залишкових кількостей піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (**2.27**) в молоці. Вказаний АФІ може потрапляти в молоко корів при профілактичному або лікувальному застосуванні [363].

6.4.1 Методики визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у молоці корів

Обладнання. Рідинно-хроматографічна система (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор, одноквадрупольний мас-спектрометр з іонізацією в електроспреї (ESI). Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм.

Хроматографічні умови. Температура колонки дорівнювала 40°C. Рухома фаза складалась із 0,1 % HCOOH (в H₂O) та 0,1 % HCOOH (в CH₃CN) (70:30), швидкість потоку – 400 мкл/хв, ізократичний режим елюювання, об'єм інжекції – 10 мкл. Мас-спектрометричні умови. Напруга на фрагментаторі становила 149 В. Швидкість газу осушувача – 10 л/хв, тиск на небулайзері – 46 psi, температура газу осушувача – 247°C.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Пробопідготовка. На рис. 6.24 надана послідовність вилучення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат із зразків молока.



Рис. 6.24. Схема пробопідготовки зразків молока при визначенні залишкових кількостей піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

6.4.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу і МС-детектування піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ трифузолу) в молоці корів. Хромато-мас-спектрометричні умови визначення активного фармацевтичного інгредієнта піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату наведені в розд. 3-4.

6.4.3 Вибір умов пробоопідготовки, селективність, чутливість та побудова калібрувальної кривої при визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в молоці корів

Пробопідготовку здійснювали осадженням білків. Було перевірено три різні системи для осадження білків (рис. 6.25): 1) 50 мкл НСООН на 10 г молока, 2) 50 мкл НСООН та 3 г NaCl на 10 г молока, 3) 10 мл CH₃CN на 10 г молока. Найбільша площа піку спостерігалась для третього осаджувача, але в цьому випадку на хроматограмі спостерігались компоненти, які заважали

визначенню. Тому пробопідготовку було проведено за допомогою мурашиної кислоти без натрій хлориду.

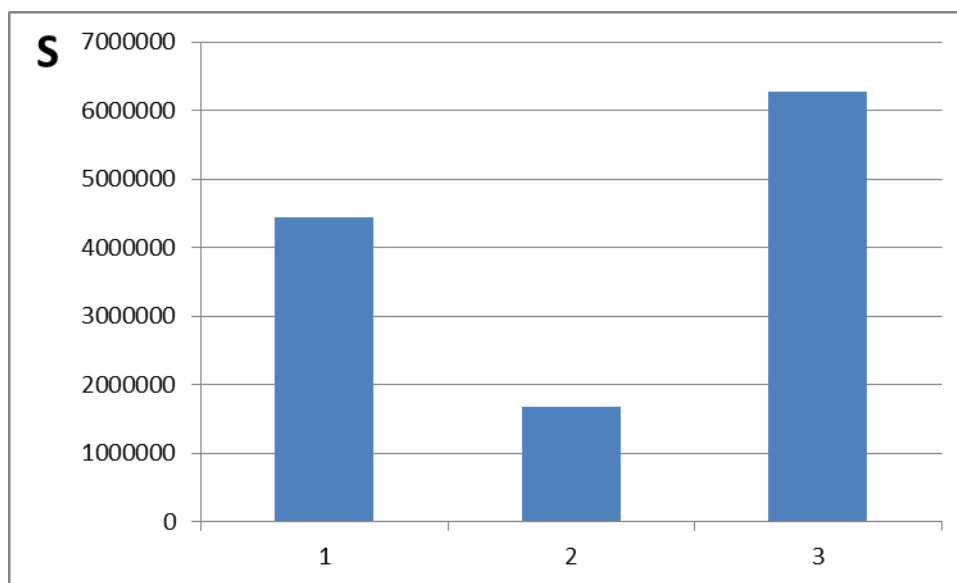


Рис. 6.25. Гістограма площі піку для різних методик осадження білків

Селективність методики було підтверджено за допомогою дослідження зразків «бланк матриці» молока згідно з вимогами керівництв [321, 322]. Зразки було оброблено згідно з вибраними умовами пробопідготовки (рис. 6.25).

На хроматограмі в межах відповідних до піку АФІ немає компонентів, що заважають (рис. 6.26).

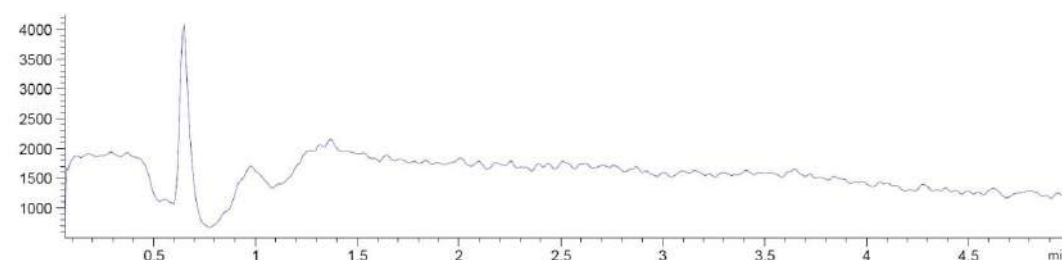


Рис. 6.26. Хроматограма зразка молока без АФІ («бланк матриці»)

Калібрувальний графік. Калібрувальний графік було побудовано з використанням 6 розчинів (рис. 6.27-6.28). Рівняння калібрувального графіка було розраховано методом найменших квадратів.

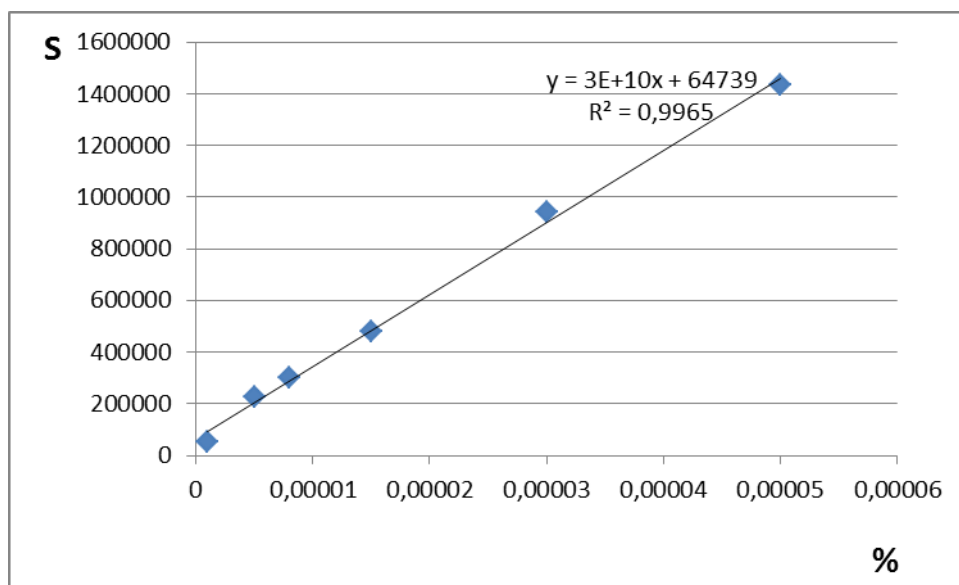


Рис. 6.27. Калібрувальна крива для визначення вмісту АФІ (у %) в молоці

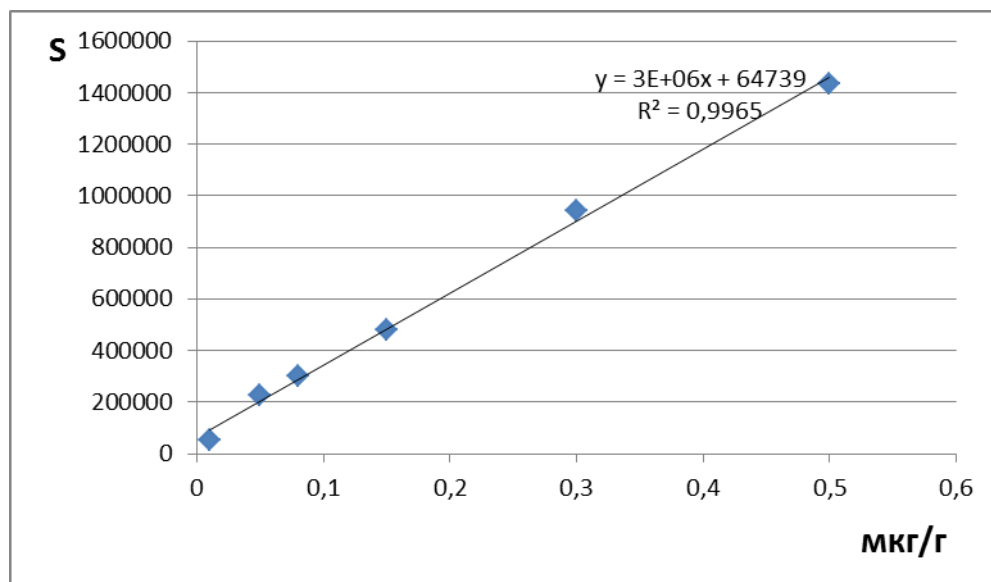


Рис. 6.28. Калібрувальна крива для визначення вмісту АФІ (в мкг/г) в молоці

Значення площ піків наведено в табл. 6.9.

Мінімальна концентрація стандарту калібрувального графіка 0,01 мкг/г. Хроматограма цього розчину наведена на рис. 6.29.

Хроматограма розчину із максимальним значенням концентрації стандарту калібрувальної кривої (0,5 мкг/г) представлена на рис. 6.30.

Значення площ піків для побудови калібрувальної кривої

Концентрація, мкг/г	Концентрація, %	Площа піка		Середня площа піка
0,01	0,000001	57411,8	45225,9	51318,85
0,05	0,000005	230880	217743	224311,5
0,08	0,000008	309411	288035	298723
0,15	0,000015	470955	484783	477869
0,3	0,00003	986791	898446	942618,5
0,5	0,00005	1469770	1394730	1432250

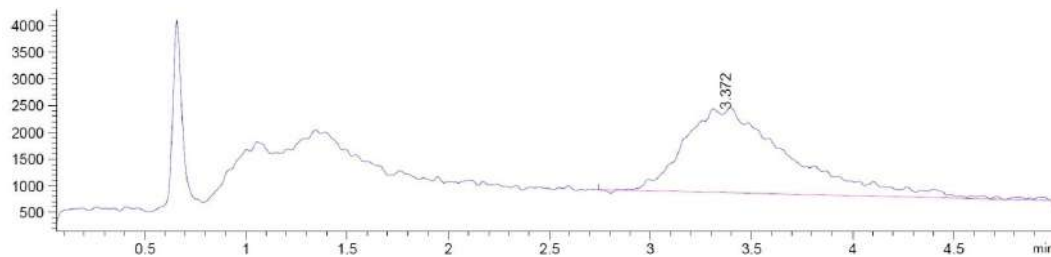


Рис. 6.29. Хроматограма із мінімальною концентрацією калібрувальної кривої

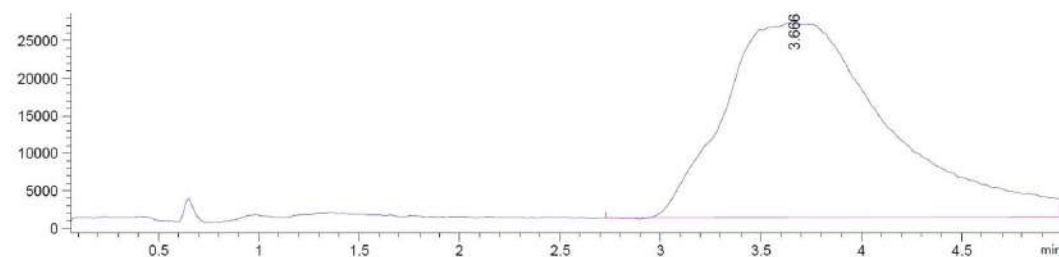


Рис. 6.30. Хроматограма із максимальною концентрацією калібрувальної кривої

Значення часу утримування піку відповідного АФІ знаходиться в межах $3,56 \pm 0,15$ хв.

Розрахунок чутливості методики. Отримали значення сигнал/шум для розчину із 0,01 мкг/г (0,000001%), хроматограма якого наведена на рис. 6.29:

$S/N = 6,9$. Тому межа кількісного визначення (LOQ) дорівнювала $0,014$ мкг/г ($0,0000014\%$).

6.4.4 Визначення вмісту АФІ тріфузолу в зразку молока корови через 12 год після отримання ін'єкційного розчину. Хроматограма, що отримана із досліджуваного зразка молока, наведена на рис. 6.31.

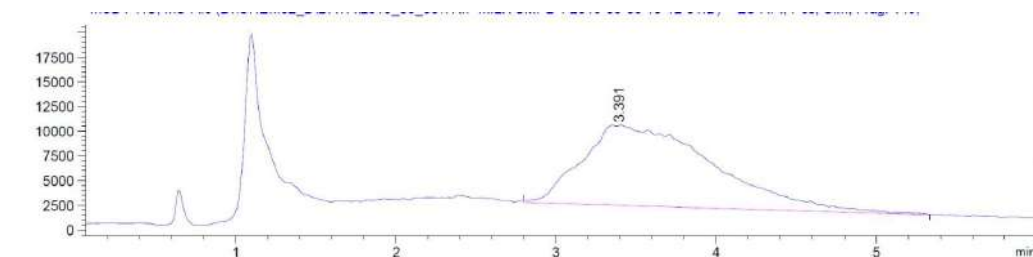


Рис. 6.31. Хроматограма екстрагованого зразка молока

Вміст АФІ у зразку молока корови було розраховано на підставі рівняння калібрувального графіка. Відтворюваність результатів при повторному інжектванні зразка наведено в табл. 6.10.

Таблиця 6.10

Відтворюваність результатів при повторному інжектванні зразка

Дослід	Площа піків	Вміст АФІ у зразку, мкг/г	Метрологічні характеристики
1	468371	0,1345	$\bar{X}=0,1289$ $S=0,004971$ $RSD\%=3,855\%$ $\Delta\bar{X}= 0,005216$ $\varepsilon=0,04045$
2	453758	0,1297	
3	439709	0,1250	
4	441107	0,1254	
5	470154	0,1351	
6	436422	0,1239	

Вміст АФІ в молоці дорівнювало $0,00001289\%$ або $0,1289$ мкг/г.

6.5 Розробка і валідація методіки визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі порося

В наданому розділі описана методика визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (2.27) в м'ясі порося та її розробка. Залишкові кількості можуть спостерігатись внаслідок профілактичного або лікувального застосування АФІ.

6.5.1 Методіка визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі порося. М'ясо та органи було піддано хіміко-токсикологічному аналізу згідно вимог [321, 322].

Речовини та реагенти: ацетонітрил кваліфікації «HPLC Super Gradient» (Avantor Performance Materials Poland S.A., Poland). Надвисокочиста вода (18 MΩ at 25°C) була отримана за допомогою системи для очищення води Direct Q 3UV Millipore (Molsheim, France). Мурашина кислота 100% (AppliChem GmbH, Germany).

Інструменти: ВЕРХ-ДМД-МС система: Agilent 1260 Infinity (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, одноквадрупольний мас-спектрометричний детектор Agilent 6120 з іонізацією в електроспреї API-ES); програмний комплекс OpenLAB CDS.

Хроматографічні умови. Використована аналітична колонка Agilent ZORBAX SB-C18 (30 мм x 4,6 мм; 1,8 мкм, Agilent Corporation) з відповідною передколонкою. Температура колонки 40°C, об'єм інжекції 1 мкл. Швидкість рухомої фази дорівнює 0,4 мл/хв в ізократичних умовах. Склад рухомої фази: 0,1% (за об'ємом) мурашина кислота у воді (А), ацетонітрил, який містить 0,1% (за об'ємом) форматної кислоти (В). Склад рухомої фази 70% А/30% В (за об'ємом). Загальний час 5 хв.

Мас-спектрометричні умови виявленні для кількісного визначення АФІ тріфузолу. Мас-спектрометричні умови були оптимізовані для отримання максимального відгуку: 1) режим селективного моніторингу іонів (SIM) з m/z 302,1 (АФІ тріфузолу); 2) позитивна полярність; 3) швидкість газу осушувача

(азоту) – 10 л/хв; 4) напруга на капілярі 4000 В; 5) температура газу осушувача 247°C, напруга на фрагментаторі 149 В, тиск на небулайзері 46 psi.

Виготовлення стандартних розчинів, калібрувальних розчинів та розчинів для перевірки якості методики (QC зразки):

1) Вихідний стандартний розчин піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (0,1 мг/мл) (розчин А) було виготовлено в мірній колбі на 100,0 мл розчиненням наважки (0,01000 г) цієї речовини в воді та доведенням цього розчину водою до мітки.

2) Проміжний стандартний розчин піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (0,01 мг/мл) (розчин В) було виготовлено перенесенням 10,00 мл розчину А в мірну колбу місткістю 100,0 мл та доведенням цього розчину водою до мітки.

3) Фінальний стандартний розчин піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (0,001 мг/мл) (розчин С) було виготовлено перенесенням 10,00 мл розчину А в мірну колбу місткістю 100,0 мл та доведенням цього розчину водою до мітки.

4) Для виготовлення модельних сумішей було виготовлено гомогенат яєць за допомогою міксеру.

5) Для перевірки лінійності було виготовлено 7 модельних розчинів – 0 мкл, 10 мкл, 20 мкл, 40 мкл, 50 мкл, 80 мкл, 100 мкл додавали за допомогою піпет-дозатору до 0,1000 г гомогенату м'яса або органа та зважували, потім до цих сумішей розчинів додавали 100 мкл, 90 мкл, 80 мкл, 60 мкл, 50 мкл, 20 мкл, 0 мкл води відповідно, потім поступали згідно процедури, наведеної на схемі починаючи з пункту 3 (рис. 6.32).

6) Для перевірки прецизійності та правильності було виготовлено 20 модельних розчинів, а саме 5 розчинів по 4 рівням концентрацій. Для цього додавали різні кількості розчину С до 100 мг гомогенату, а саме на рівні LLOQ – 10 мкл; в межах триразового LLOQ (низький QC зразок) – 20 мкл, приблизно 50% від діапазону калібрувальної кривої (середній QC) – 50 мкл і, не менш 75% верхнього діапазону калібрувальної кривої (високий QC) – 80 мкл, та

зважували, потім до цих сумішей додавали 90, 80, 50 та 20 мкл води, потім поступали згідно процедури, наведеної на схемі, починаючи з пункту 3 (рис. 6.32).



Рис. 6.32. Процедура підготовки зразків м'яса поросся при визначенні піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

7) Для перевірки ступеня вилучення речовин готували неекстраговані розчині піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату по 4 рівням концентрацій шляхом змішування 10 мкл, 20 мкл, 50 мкл та 80 мкл розчину з 90 мкл, 80 мкл, 50 мкл та 20 мкл води відповідно та 1 мл метанолу.

Усі стандартні розчини зберігалися при 5°C були стабільні протягом валідаційного експерименту.

Рідинна екстракція зразка

1) Досліджувані зразки яєць гомогенізувались за допомогою міксеру. До 0,1000 грам гомогенату (точна наважка) додавали 100 мкл води, змішували 15 хв на ультразвуковій бані, додавали 1,00 мл діметилсульфоксиду, змішували, центрифугували, змішували 15 хв на ультразвуковій бані, центрифугували при 15000 g, 10 хв та відфільтровували через нейлоновий шприцевий фільтр

(внутрішній діаметр 13 мм, розмір пор 0,2 мкм). Процедура підготовки зразків наведена на схемі (рис. 6.32).

Валідація методики

Специфічність була підтверджена за допомогою аналізу бланк зразків без додавання ВС, щоб визначити відсутність інтерференції з аналітом.

Нижню межу кількісного визначення (LLOQ) визначали за модельною сумішшю, яка забезпечувала 5-кратне відношення сигнал/шум, також прецизійність визначення цього не перевищувала 20%, розраховане значення не перевищувало більш ніж на 20 % значення від фактичної кількості аналіту, що було уведено в модельну суміш.

Нижній калібрувальний стандарт встановлювався за нижньою межею кількісного визначення (LLOQ) [321, 322].

Прецизійність і правильність визначалась дослідженням стандартних зразків, що були виготовлені згідно п. 5 «Виготовлення стандартних розчинів, калібрувальних розчинів та розчинів для перевірки якості методики (QC зразкі)».

Ступінь вилучення визначалась шляхом порівняння екстрагованих стандартних зразків по 4 рівням концентрації (п. 5) зі зразками, які були виготовлені згідно п. 6 «Виготовлення стандартних розчинів, калібрувальних розчинів та розчинів для перевірки якості методики (QC зразкі)».

Застосування аналітичної методики. Визначення залишкових кількостей субстанції препарату було проведено згідно процедури (рис. 6.32), порівнюючи із калібрувальними зразками гомогенату, підготовленими в аналогічних умовах згідно процедури (рис. 6.32) з додаванням стандартного розчину АФІ препарату тріфузол.

Розрахунок концентрації. Розрахунок концентрації проводиться за рівнянням калібрувального графіку, який необхідно будувати кожного разу в умовах дослідження.

6.5.2 Вибір умов ВЕРХ-аналізу, МС-детектування та пробопідготовки піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) при визначенні в м'ясі порося. В розд. 3 мас-спектрометричні умови були обрані для отримання максимального відгуку сигналу. Вибір хроматографічних умов обґрунтовано в розд. 4.

6.5.3 Вивчення чутливості та селективності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі порося

Чутливість. Встановлення нижньої межі визначення (LLOQ). Хроматограма зразку гомогенату м'яса, який не містив піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (бланк матриці), наведена на рис. 6.33.

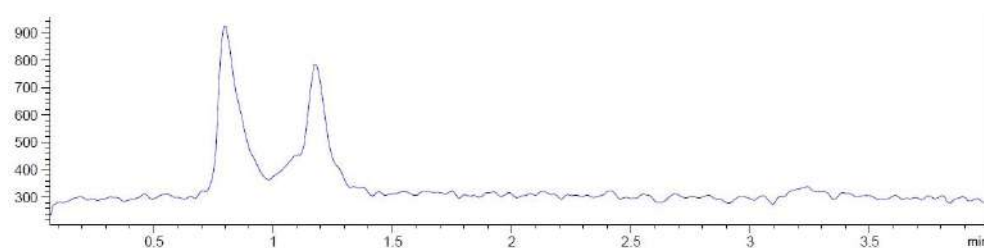


Рис. 6.33. Хроматограма екстракту гомогенату без піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату (бланк матриці)

Відношення сигнал/шум для QC зразку при LLOQ (рис. 6.34) склало 17,2, що відповідає вимогам [321, 322] (повинно бути ≥ 5). LLOQ склав 0,01 мкг в наважці або 0,1 мкг/г (0,1 ppm) гомогенату.

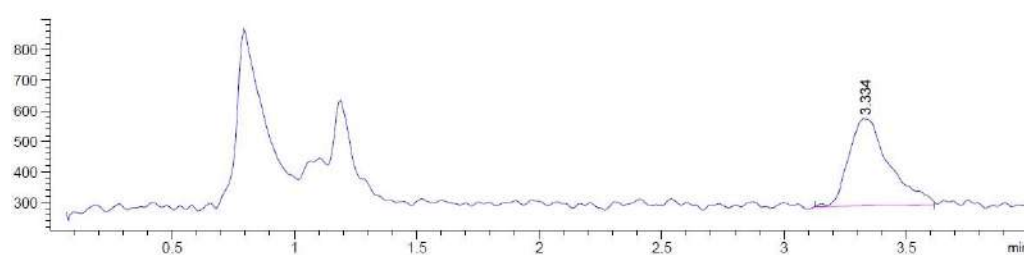


Рис. 6.34. Хроматограма екстракту гомогенату з додаванням піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату при LLOQ (нижня межа кількісного визначення)

Ідентифікація піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та селективність. Пік, що відповідає піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату спостерігався на хроматограмах модельної суміші при LLOQ і мав час утримування 3,3-3,5. Мас-спектрометричне детектування проводилось в SIM режимі при m/z 302,1 і було селективним завдяки тому, що це значення відповідало специфічній характеристиці – моноізотопній масі квазімолекулярного іона, отриманого приєднанням протона до молекули піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату. Інтерференція з домішками відсутня (рис. 6.33). Загальний час хроматографування був 4 хв.

6.5.4 Вивчення лінійності, прецизійності та правильності методики визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (АФІ тріфузолу) в м'ясі порося

Лінійність калібрувального графіку. Калібрувальний графік будували на підставі залежності відгуку мас-спектрометричного детектору при m/z 302,1 від вмісту субстанції в гомогенаті, тобто калібрування проводили методом зовнішнього стандарту. Калібрувальний графік був лінійним при 0,012-0,105 мкг в наважці, або 0,105-0,5 мкг/г гомогенату. Була отримана задовільна лінійність, відповідне рівняння: $y = 3E + 11x + 742,76$, $R^2 = 0,9921$, $R = 0,9960$ (рис. 6.35-6.36).

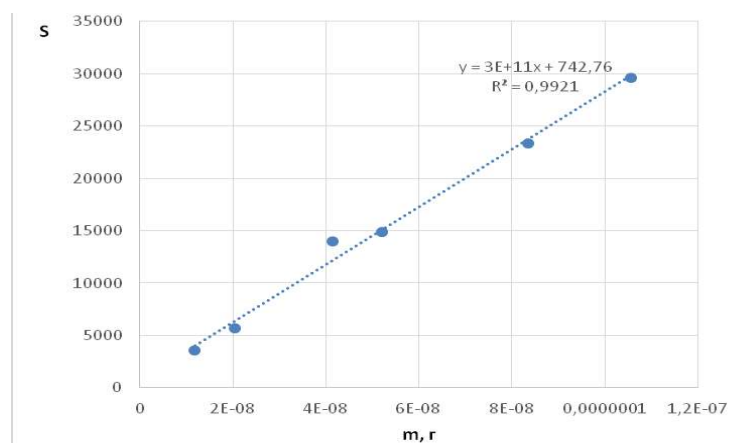


Рис. 6.35. Калібрувальна крива залежності площі піку від маси аналіту в наважці гомогенату (г)

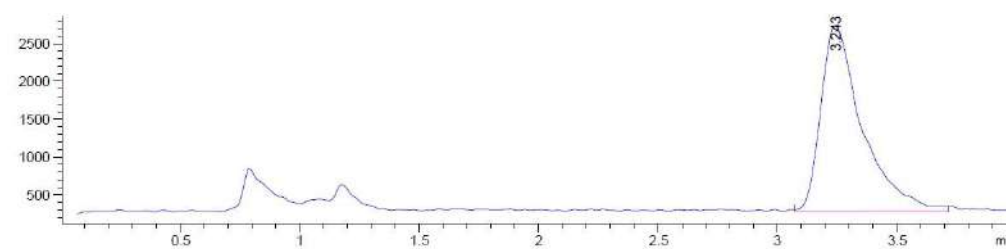


Рис. 6.36. Хроматограма екстракту гомогенату з додаванням АФІ трифузолу при ULOQ (верхня межа кількісного визначення)

Прецизійність та правильність визначень. Вміст піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в QC зразках було визначено за допомогою рівняння калібрувального графіка. Прецизійність та правильність було визначено для розчинів та перевірки якості методики (QC) для субстанції. Правильність та прецизійність даних наведена в табл. 6.11.

Таблиця 6.11

**Правильність та прецизійність при визначенні АФІ піперидиний
2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату
(*n* = 5) по 4 рівням концентрацій**

Рівні	$\bar{x} \cdot 10^{-8}$, г уведено	$\bar{x} \cdot 10^{-8}$, г знайдено	Прецизійність RSD, %	Правильність RE, %	Ступінь ізолювання, %
1	0,87776	0,79481	16,745	-9,4502	78,82
2	2,1486	2,1764	7,2380	1,2925	97,49
3	4,9937	5,3769	5,5620	7,6720	96,99
4	7,9851	7,1055	14,480	-11,015	94,11

Ступінь ізолювання було визначено для в перевірки якості методики (QC) порівняно до неекстрагованих розчинів порівняння, що мистили відповідну кількість АФІ. Значення ступеня вилучення наведені в табл. 6.11.

6.5.5 Застосування аналітичної методики для визначення залишкової кількості піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у гомогенаті (рис. 6.37-6.50). Даний спосіб виявився відтворюваним, правильним і чутливим, і може успішно застосовуватись для визначення залишкових кількостей піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Зразки м'яса або органів (близько 0,1 г) обробляють у відповідності з методикою (рис. 6.32) та розраховують вміст АФІ згідно з рівнянням калібрувального графіку.

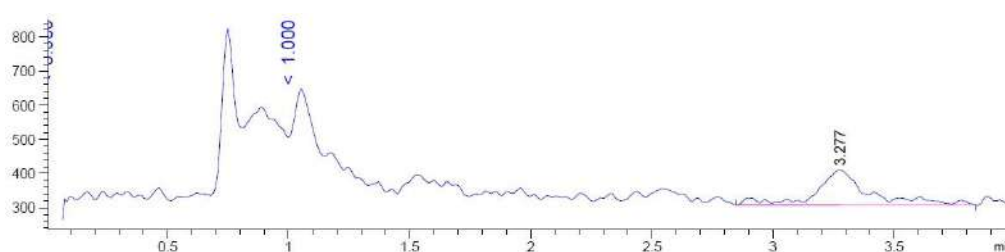


Рис. 6.37. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената печінки (48 год)

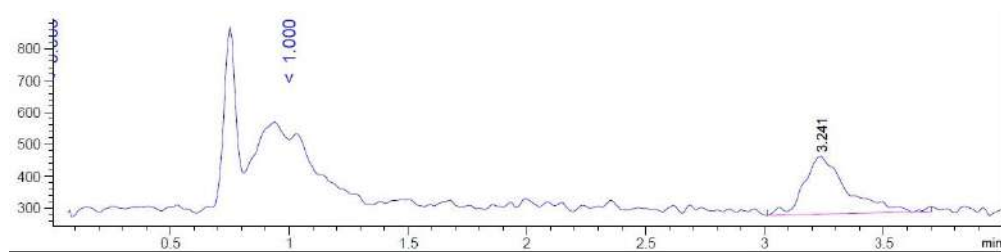


Рис. 6.38. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената селезінки (48 год)

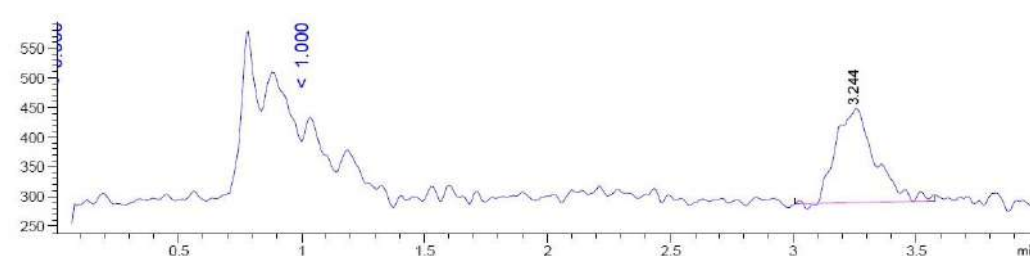


Рис. 6.39. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената жирової тканини (48 год)

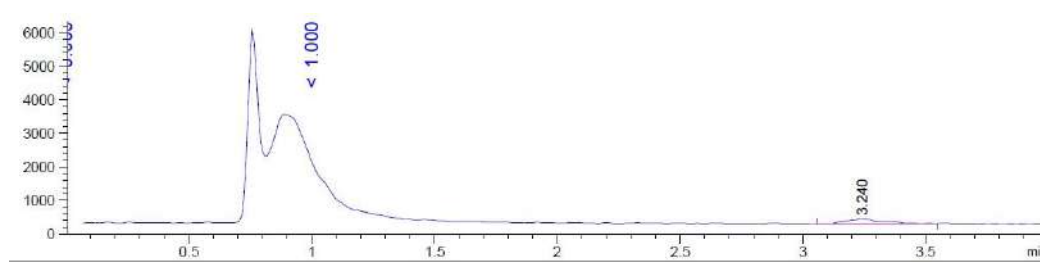


Рис. 6.40. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената нирки (48 год)

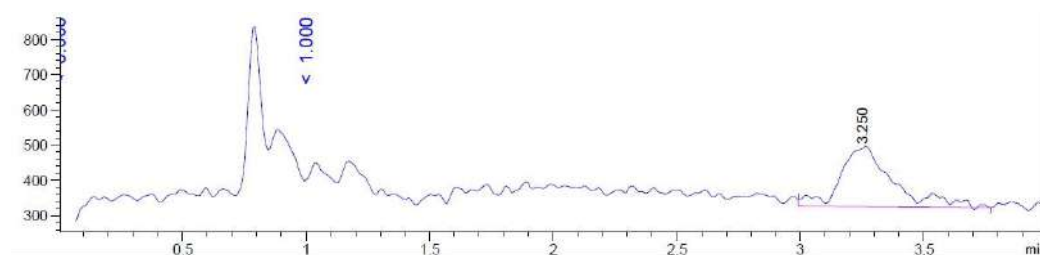


Рис. 6.41. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената стегнових м'яз (48 год)

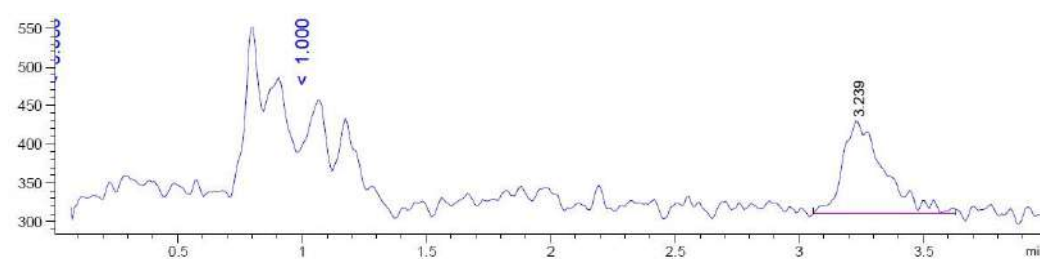


Рис. 6.42. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената м'язів лопатки (48 год)

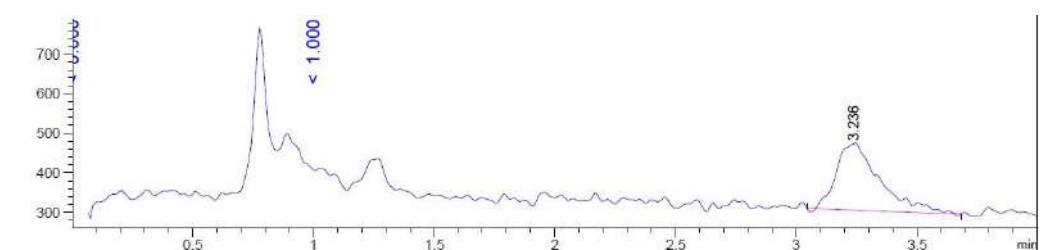


Рис. 6.43. Хроматограма екстракту досліджуваного зразка гомогената репродуктивних органів (48 год)

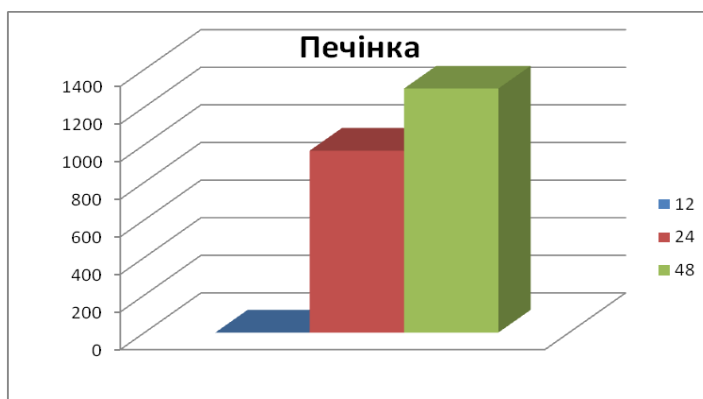


Рис. 6.44. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків печінки при 12, 24 та 48 год

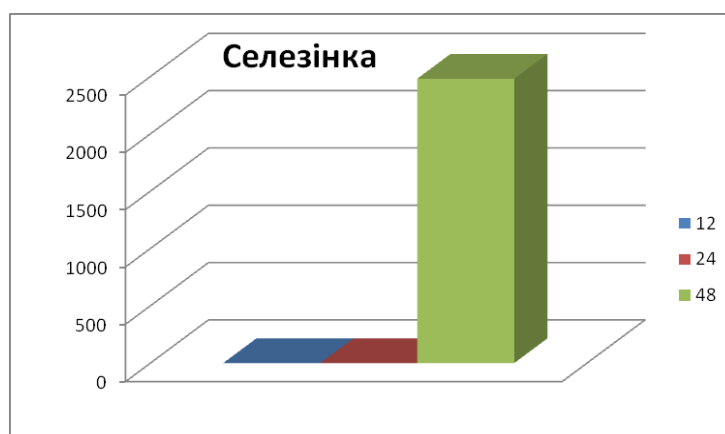


Рис. 6.45. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків селезінки при 12, 24 та 48 год



Рис. 6.46. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків жирової тканини при 12, 24 та 48 год

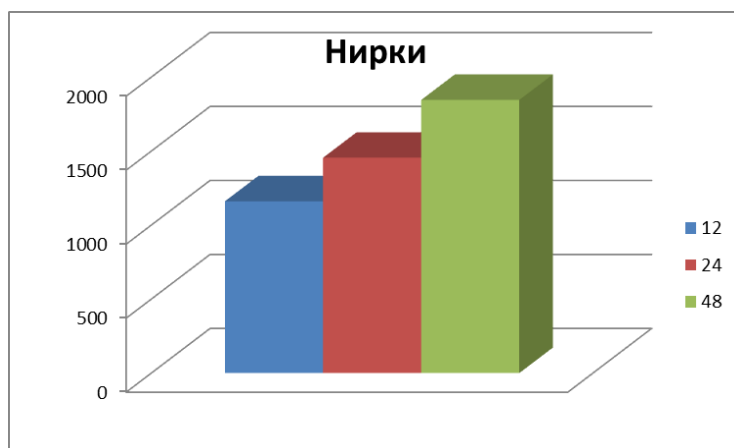


Рис. 6.47. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків нирок при 12, 24 та 48 год

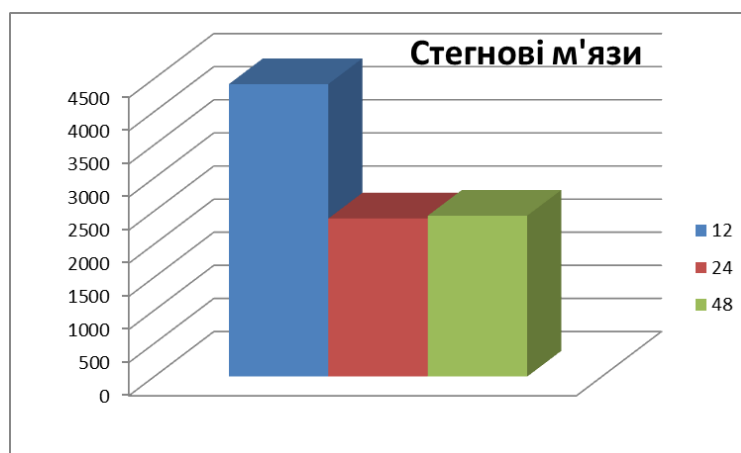


Рис. 6.48. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків стегнових м'язів при 12, 24 та 48 год

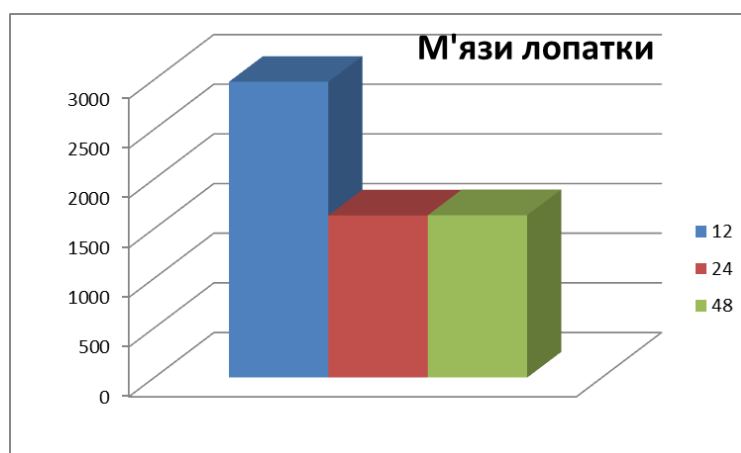


Рис. 6.49. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків м'язів лопатки при 12, 24 та 48 год

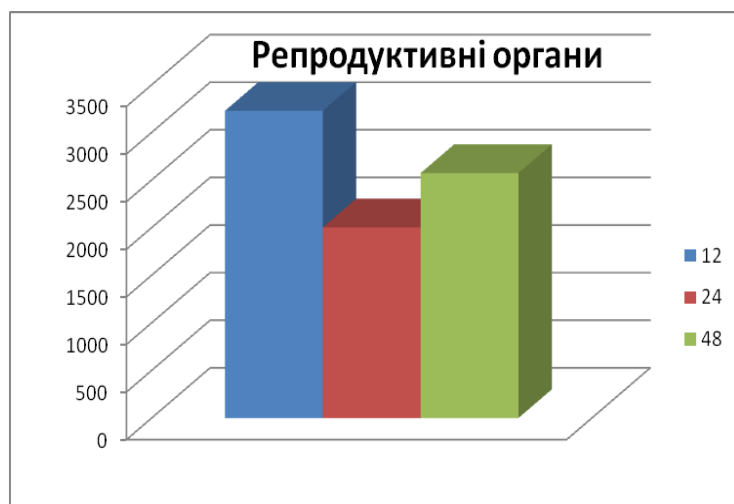


Рис. 6.50. Гістограма величини сигналу мас-детектору при SIM m/z 302,1 щодо зразків репродуктивних органів при 12, 24 та 48 год

Розрахунок вмісту. Розрахунки вмісту проводили за допомогою рівняння калібрувального графіку. Результати вмісту в мкг в наважці та мкг/г наведені в табл. 6.12.

Таблиця 6.12

Результати визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в контрольних групах яєць

Зразок		Години		
		12	24	48
1		2	3	4
Печінка	т, мкг	не виявлено**	виявлено*	виявлено*
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»
Селезінка	т, мкг	«-/-»	не виявлено**	«-/-»
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»
Жирова тканина	т, мкг	виявлено*	виявлено*	«-/-»
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»
Нирки	т, мкг	«-/-»	«-/-»	«-/-»
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»

1		2	3	4
Стегнові м'язи	т, мкг	0,01224	«-/-»	«-/-»
	С, мкг/г	0,1045	«-/-»	«-/-»
Лопатка	т, мкг	виявлено*	«-/-»	«-/-»
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»
Репродуктивні органи	т, мкг	«-/-»	«-/-»	«-/-»
	С, мкг/г	«-/-»	«-/-»	«-/-»

Примітка. * – виявлено, але вміст нижче нижньої межі кількісного визначення (нижче 0,1 мкг/г, тобто нижче 0,1 ppm); ** – не детектується

ВИСНОВКИ

1. Розроблена ВЕРХ-МС-методика визначення АФІ препаратів авестім – морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та тріфузол – піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в яйцях птиці, обгрунтовані умови хроматографування і ЕСІ-МС-детектування, підібрана процедура пробопідготовки.

2. Запропоновані умови пробопідготовки зразків молока для визначення піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, які оптимально підходять до рідинно-хроматографічної системи.

3. Вперше розроблена методика, що дозволяє контролювати залишкову кількість піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі та органах поросля.

4. Проведена валідація розроблених методик відповідно до сучасних міжнародних вимог і підтверджена її прийнятність за такими параметрами, як специфічність/селективність, лінійність, правильність, прецизійність і ступінь ізолювання.

5. Визначено залишкові кількості морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл) -1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетату, піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в яйцях птиці, визначено вміст піперидиний 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в зразку молока корів через 12 год після ін'єкції 1% розчину.

6. Досліджено залишкові кількості піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі та органах поросся.

7. Методики пропонуються як для дослідних, так і для контролюючих лабораторій. Вони можуть бути використані в токсикохімічних дослідженнях, а також в лабораторіях ветеринарних інспекцій.

За матеріалами розділу опубліковані роботи [347, 357, 358, 360-363].

РОЗДІЛ 7

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИСКОРЕНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ

Аналіз наукових публікацій, а також керівництва міжнародної комісії з гармонізації темничних вимог до лікарських засобів для людини свідчить, що дослідження прискореної деградації активних фармацевтичних інгредієнтів у субстанціях і лікарських формах є важливим при розробці методик контролю якості лікарських речовин. Це необхідно для підтвердження селективності методик аналізу в присутності продуктів деградації і для розробки методики визначення стійкості. Також це дослідження дозволяє прогнозувати вплив середовища на лікарську речовину і пропонувати умови зберігання. Даний розділ присвячений дослідженню стресової деградації АФІ тіометризолу та АФІ тріфузолу.

7.1 Дослідження стресової деградації морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

7.1.1 Методика дослідження стресової деградації морфолінію 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Реактиви. Ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Аналітичні прилади. Agilent 1260 Infinity (дегазатор, бінарний насос, автопробовідбірник, стовпчастий термостат, діодний матричний детектор) OpenLAB CDS Software. Одноквадропольний LC/MS 6120 з джерелом іонів електросприску (ESI).

Умови хроматографії. Хроматографічне дослідження проводили ізократичним елююванням водно-ацетонітрильною сумішшю (84:16) з додаванням 0,1% мурашиної кислоти. Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм,

1,8 мм. Температура колонки становила 40°C. Швидкість потоку становила 0,400 мл/хв.

Умови мас-спектрометрії. Температура газу осушувача становила 138°C. Швидкість газу осушувача (азоту) становив 10 л/хв. Тиск небулайзуючого газу (N₂) становив 55 psi. Мас-спектри були отримані при m/z 100-2000. Фрагментацію молекулярних іонів вивчали при напрузі фрагмента: 100 В, 150 В, 200 В, позитивна полярність.

Умови примусової деградації. Зразки збирали щодня, готували до інжекцій та вводили в систему ВЕРХ. Об'єм інжекції для 0,1% розчину становив 2 мкл, для 1% розчину – 0,5 мкл. Вміст (%) було взято із звіту програмного забезпечення OpenLab CDS. Сигнал ДМД-детектора був отриманий при 272 нм.

Деградація в лабораторних умовах. Речовину та розчини (0,1%, 1%) зберігали при кімнатній температурі в лабораторних умовах.

Термічна деградація. Температурний вплив досліджували в термостаті при 60°C для 0,1%, 1% розчинів та речовини.

Окиснювальна деградація. Для дослідження впливу окисника використовували 3% гідроген пероксид. Близько 0,001 г АФІ розчиняли в 1 мл 3% гідрогену пероксиду.

Ультрафіолетова (УФ) деградація. Опромінення здійснювалося за допомогою люмінесцентної УФ-лампи YF UV-9W 365 нм, яка випромінює в діапазоні довгохвильового ультрафіолету з максимальним випромінюванням 365 нм. Освітленість вимірювалася люксометром і становила 2000 люкс. Було вивчено субстанцію та розчини з концентрацією 0,1%, 1%.

Кислотний гідроліз. Вивчено вплив кислоти. Близько 0,001 г АФІ змішували з 1 мл 0,1 моль/л НСІ.

Лужний гідроліз. Близько 0,001 г АФІ змішували з 0,1 моль/л розчином натрій гідроксиду.

Приготування розчинів для дослідження деградації лабораторних умов, дослідження термічного розкладання, ультрафіолетового дослідження.

Розчин з концентрацією 0,1% готували розчиненням 0,001 г АФІ в 1 мл води. Розчин з концентрацією 1% готували згідно з фармацевтичним препаратом «1% розчин для ін'єкцій», а саме 0,01 г АФІ розчиняли в 1 мл води, додавали 0,0069 г натрій хлориду для ізотонічності.

При вивченні субстанції, 0,001 г розчиняли в 1 мл води і 2 мкл розчину вводили в ВЕРХ. Період впливу факторів стресу становив чотири дні.

7.1.2 Результати дослідження стресової деградації морфолінію 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацета-ту. Елюювання АФІ за допомогою водно-ацетонітрилової суміші (84:16) з додаванням 0,1% мурашиної кислоти призводить до утворення 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтової кислоти. Тому безпосередньо на детекторі відбувається виявлення кислоти. АФІ визначали у формі кислоти. Результати дослідження примусової деградації наведені в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Зміна вмісту АФІ під час дослідження примусової деградації

Умови розкладання	Дні				
	0	1	2	3	4
Лабораторні умови, 0,1% розчин	99,33	97,92	98,33	98,05	98,32
Лабораторні умови, 1% розчин	98,46	98,46	98,59	98,55	98,69
HCl, 0,1 М розчин	99,33	99,30	99,23	99,23	98,92
NaOH, 0,1 М розчин	99,33	100	99,36	100	100
3% H ₂ O ₂	99,33	71,68	66,98	62,48	56,66
Термічний ефект, 60°C, розчин 0,1%	99,33	99,20	99,23	99,22	99,21
Термічний ефект, 60°C, розчин 1%	98,21	98,24	98,18	98,18	98,13
Термічний ефект, 60°C, речовина	99,33	98,98	99,30	98,39	99,38
Опромінення УФ-світлом, розчин 0,1%	99,33	96,66	92,82	89,57	76,14
Опромінення УФ-світлом, розчин 1%	98,21	94,30	82,45	76,59	63,48
Опромінення УФ-світлом, речовина	99,33	100,0	100,0	100,0	100,0

Масовий баланс (вміст основної речовини, % плюс вміст продуктів розпаду та домішок, %) у всіх випадках дорівнював 100%. При зберіганні 0,1% еталонного розчину АФІ в лабораторних умовах вміст основного компонента зменшувалося приблизно на 0,1% протягом чотирьох днів. Вміст АФІ в 1% розчині за цих умов протягом чотирьох днів не змінювався.

Вміст АФІ не змінювався протягом чотирьох днів під дією 0,1 М розчину хлоридної кислоти. Вміст основного компонента не змінювався під час дії 0,1 М розчину натрій гідроксиду протягом чотирьох днів. Вплив 3% гідроген пероксиду протягом чотирьох днів призводить до зниження концентрації АФІ більше ніж на 40% (рис. 7.1).

Термічний вплив (60°C) на 0,1% та 1% розчин АФІ призводить до його деградації приблизно на 0,1% протягом чотирьох днів. Вміст АФІ під час термічного впливу на субстанцію не змінювався.

Ультрафіолетове випромінювання викликає деградацію 0,1% розчину протягом чотирьох днів до більш ніж 20% (рис. 7.2). При цьому для 1% розчину концентрація зменшується приблизно на 40% (рис. 7.3). Вміст АФІ не змінювався під час опромінення субстанції протягом чотирьох днів.

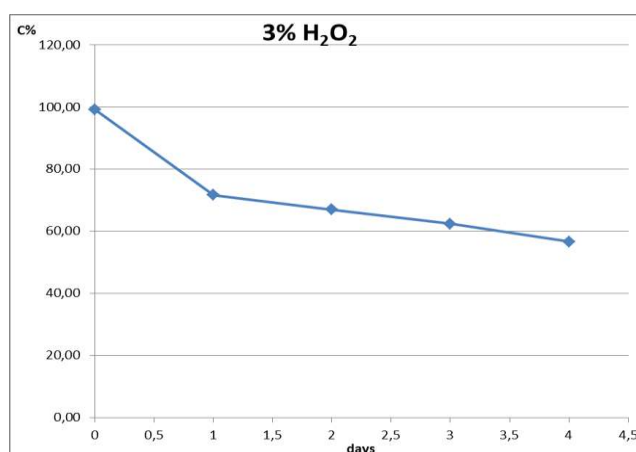


Рис. 7.1. Графік залежності вмісту АФІ (%) від кількості днів при окисненні H₂O₂

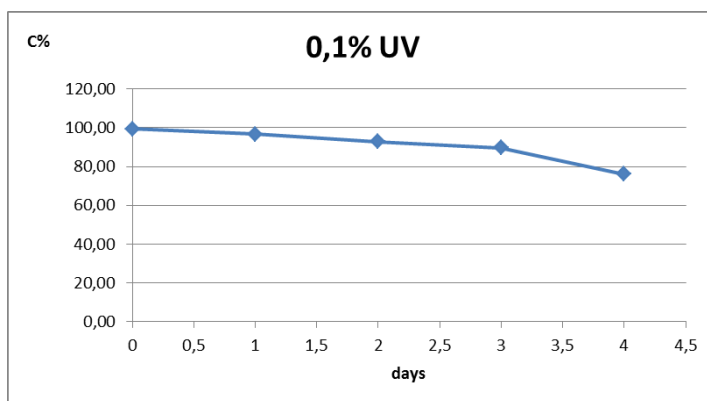


Рис. 7.2. Графік залежності вмісту АФІ (%) від кількості днів під впливом ультрафіолету на 0,1% розчин

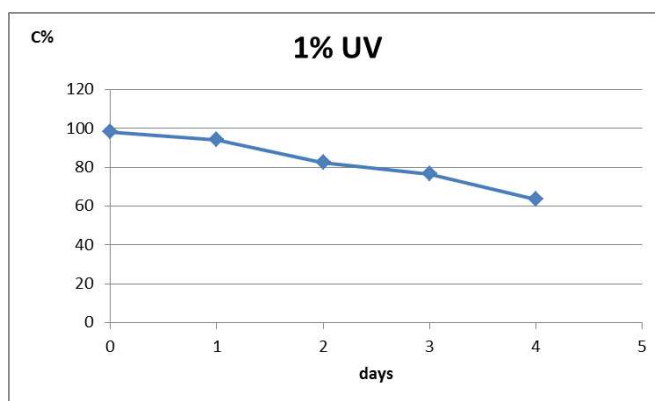


Рис. 7.3. Графік залежності вмісту АФІ (%) від кількості днів під впливом ультрафіолету на 1% розчин

Окиснення. Вплив 3% H₂O₂. Результати досліджень наведено на рис. 7.4-7.13.

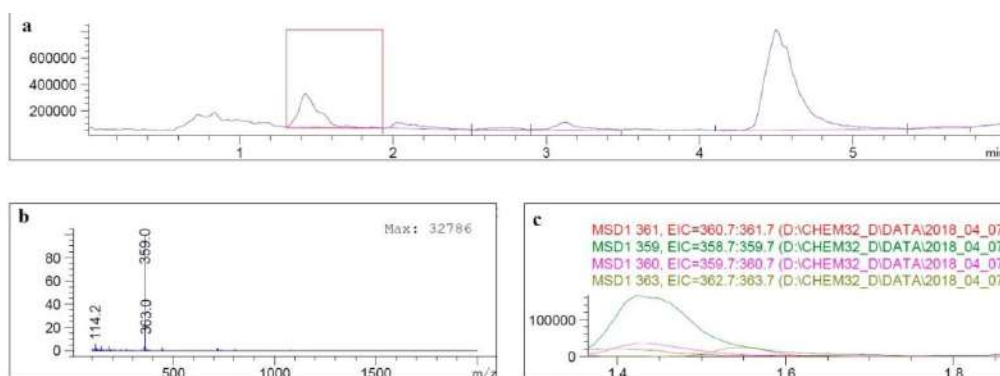


Рис. 7.4. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу 3% H₂O₂ при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку за 1,435 хв (б). ЕІС-хроматограми: основний пік при m/z 359

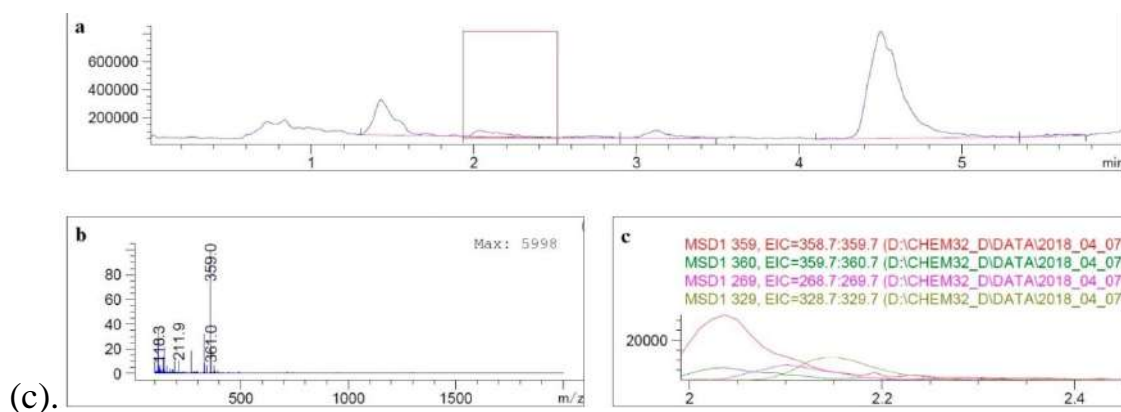


Рис. 7.5. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу 3% H_2O_2 при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку при 2,044 хв (б). ЕІС-хроматограми: основний пік при m/z 359 (с)

Пікі із часом утримування 1,4 хв та 2,0 хв відповідали квазімолекулярним іонам з m/z 359, що відповідає ізомерним сполукам. Вірогідна структура одного із ізомерів запропонована на рис. 7.6. Загальновідомо, що сульфіді реагують з H_2O_2 із створенням сульфоксидів [364].

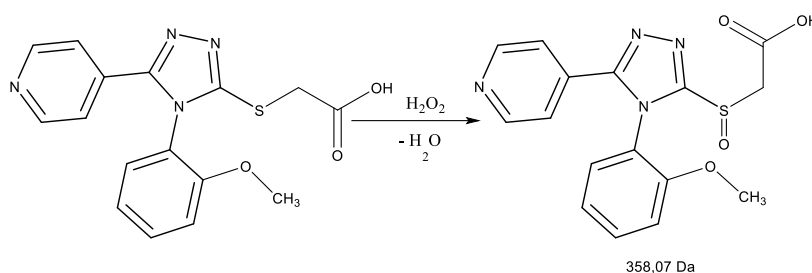


Рис. 7.6. Окиснення АФІ за допомогою 3% H_2O_2 з утворенням сульфоксиду

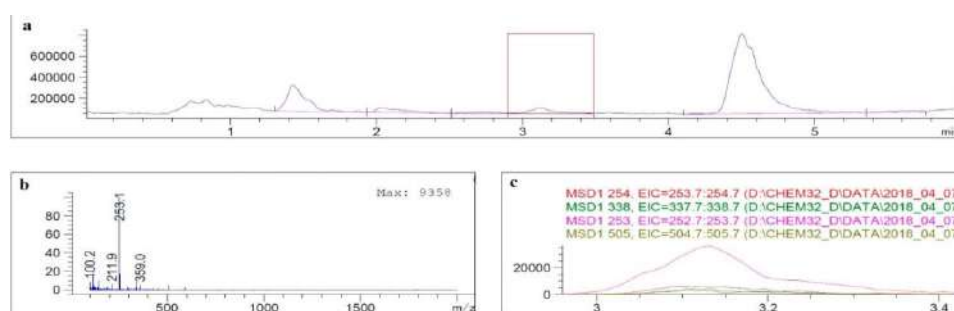


Рис. 7.7. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу 3% H_2O_2 при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку при 3,122 хв (б). ЕІС-хроматограми: основний пік при m/z 253 (с)

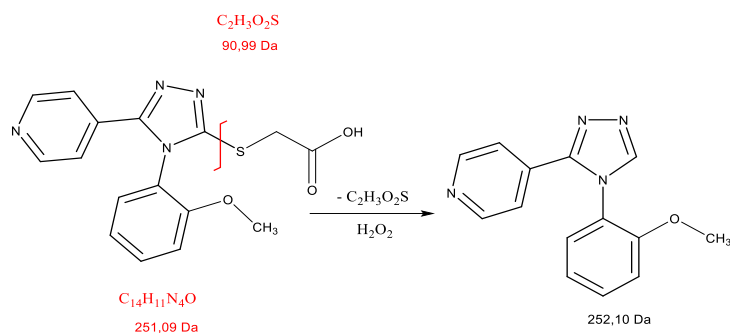


Рис. 7.8. Можлива реакція вилучення фрагмента тіоацетату з АФІ під дією 3% H_2O_2

Сполука, яка відповідає квазімолекулярному іону з m/z 253 (час утримування 3,1 хв), утворилась під час розщеплення хімічного зв'язку між циклом сульфуру та триазолу. Слідовий елемент з m/z 375 був виявлений у продуктах із часом утримування близько 2 хв. Він відповідає сульфону. Тож реакція утворення сульфону протікає незначно (рис. 7.9).

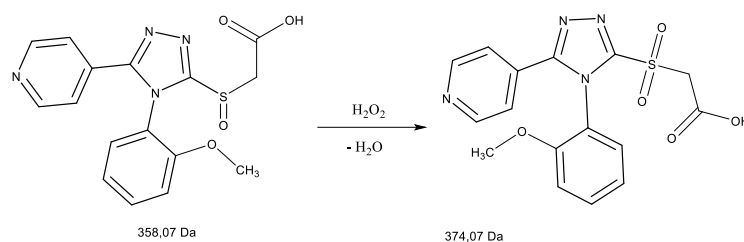


Рис. 7.9. Утворення сульфону в реакції окиснення АФІ за допомогою 3% H_2O_2

У продуктах окиснення виявлено сліди в результаті декарбоксілювання АФІ. Вони виявляються як іон з m/z 299 і часом утримування близько 5,5 хв (рис. 7.10).

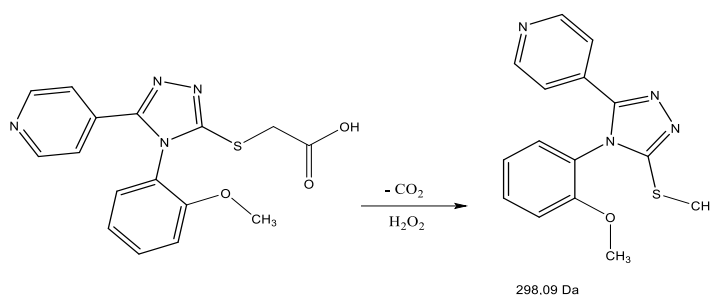


Рис. 7.10. Декарбоксілювання АФІ за допомогою 3% H_2O_2 (чотири дні впливу)

Перевірка чистоти піку (рис. 7.11) показує, що пік АФІ був чистим після чотирьох днів обробки. Це підтверджувало, що продукти деградації не перешкоджають визначенню АФІ, тож метод визначення АФІ, представлений раніше, є вибіркоким [345, 346].

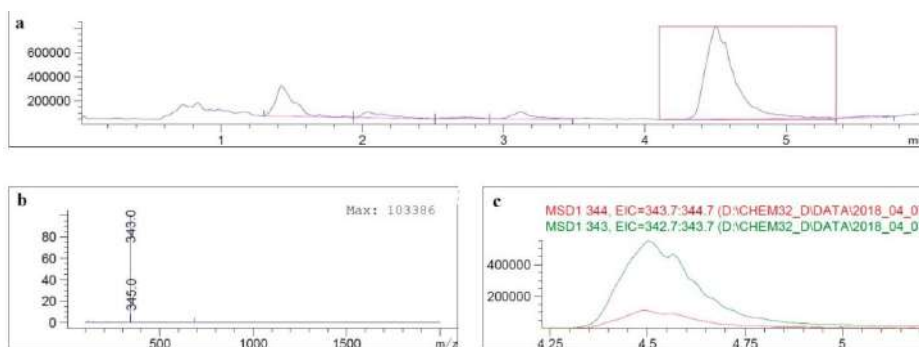


Рис. 7.11. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу 3% H_2O_2 (а). Мас-спектр для піку АФІ (б). ЕІС-хроматограма: основний пік при m/z 343 (с)

Вплив УФ-опромінення. Піки продуктів розпаду значно чітко визнаються після чотирьох днів опромінення. Пік m/z 359 і час утримування приблизно 2 хв (рис. 7.12) такий же, як пік, який представлений у продуктах деструкції, що з'явилися під дією 3% H_2O_2 (рис. 7.5-7.6). У цьому випадку можливим продуктом деградації АФІ є сульфоксид.

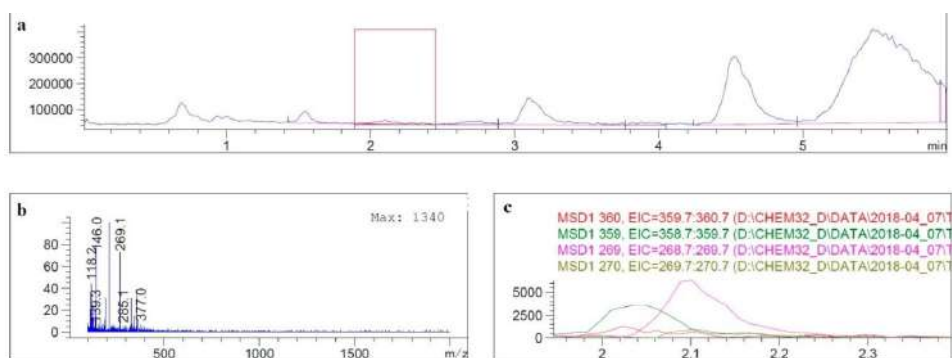


Рис. 7.12. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу УФ при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку за 2,101 хв (б). ЕІС-хроматограма: основні піки становлять m/z 359 і m/z 269 (с)

Виявлено речовину (m/z 253,1), яка елюювалася за 3,1 хв (рис. 7.13). Він має таку ж структуру, що і продукт окиснення H_2O_2 (рис. 7.7-7.8). Утворення димерного іона в джерелі ESI з m/z 505,1 є додатковим підтвердженням (рис. 7.14-7.15).

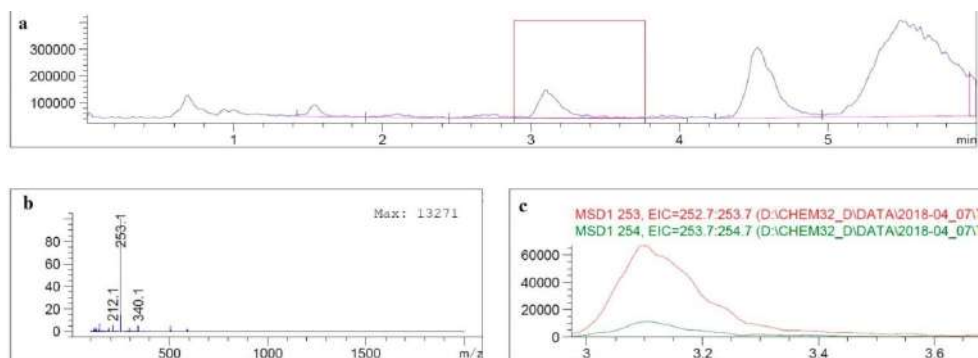


Рис. 7.13. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу УФ при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку при 3,100 хв (б). ЕІС-хроматограма: основний пік при m/z 253, пік димерного іона m/z 505,1 (с)

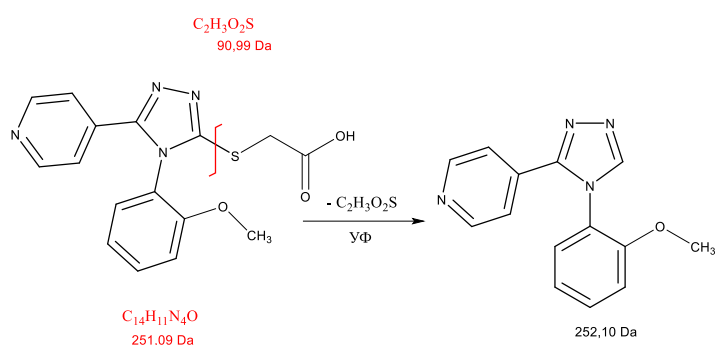


Рис. 7.14. Відщеплення тiaoацетату від АФІ при впливі УФ

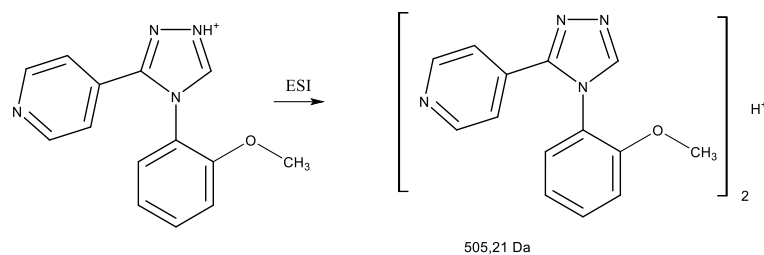


Рис. 7.15. Дімеризація в ESI іона з m/z 253.1

УФ-опромінення було причиною декарбоксілювання АФІ для отримання метилтіосполуки із часом утримування приблизно 5,5 (рис. 7.16-7.17). У спектрах цієї сполуки представлені квазімолекулярні іони ($[M + H]^+$) з m/z 299,1 і димерним іоном ($[2M + H]^+$) з m/z 597. Вони підтвердили, що молекулярна маса цього продукту деградації 298,1.

Під час УФ-опромінення також утворювалися інші продукти деградації.

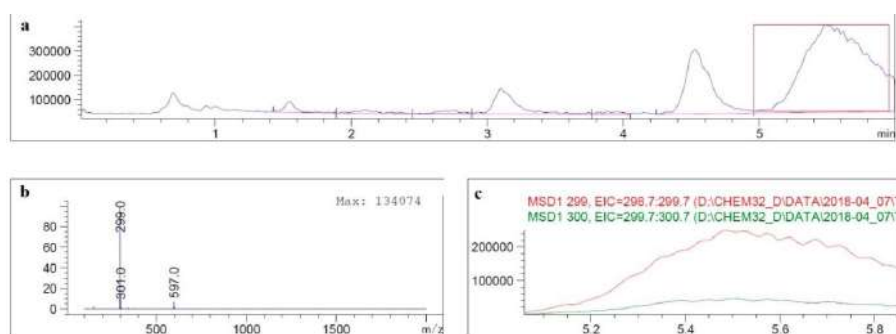


Рис. 7.16. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу УФ при фрагментації 100 В (а). Мас-спектр для піку на 5,504 хв (б). ЕІС-хроматограма: основний пік при m/z 299 (с)

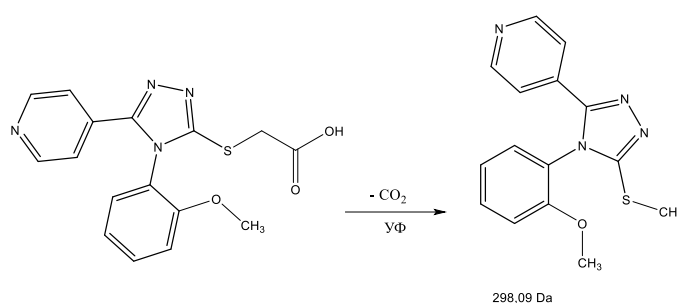


Рис. 7.17. Продукт ультрафіолетового декарбоксілювання АФІ, що відповідає піку за 5,504 хв (чотири дні УФ-опромінення)

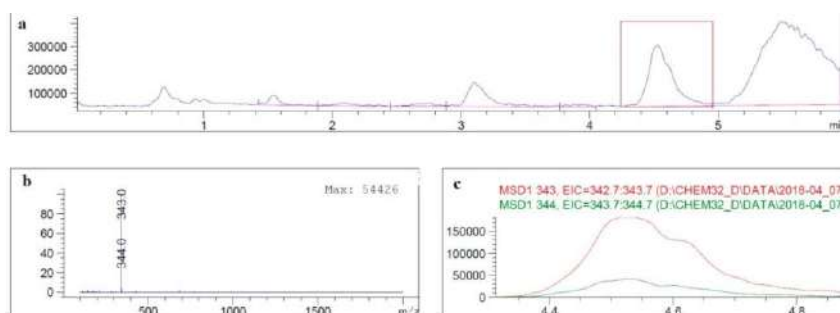


Рис. 7.18. Хроматограма ТІС через чотири дні впливу УФ (а). Мас-спектр для піку АФІ (б). ЕІС-хроматограма: основний пік при m/z 343 (с)

Чистота піку після чотирьох днів УФ-опромінення представлена на рис. 7.18. Було показано, що пік АФІ був чистим. Продукти ультрафіолетової деградації не заважають визначенню АФІ. Це додаткове підтвердження вибірковості методу, який було представлено раніше [345, 346].

Домішки, які утворилися в стресових умовах, наведені в табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Домішки, які утворилися в стресових умовах

Сполука	3% H ₂ O ₂	УФ	Час утриму- вання, хв	m/z, квазімоле- кулярний іон	Моноізо- топна молекулярна маса
АФІ			4.5	343	342
5-((Карбоксиметил)сульфі- ніл)-4-(2-метоксифеніл)-3- (піридиніл)-4H-1,2,4- тріазол-1-ій	+	+	1.4	359	358
4-(2-Метоксифеніл)-3- (піридиніл)-4H-1,2,4- тріазол-1-ій	+	+	3.1	253	252
5-((Карбоксиметил)сульф- фоніл)-4-(2-метокси- феніл) -3-(піридиніл)-4H- 1,2,4-тріазол-1-ій	traces	-**	~2	375	374
4- (2-Метоксифеніл)-5- (метилтіо)-3-(піридиніл)- 4H-1,2,4-тріазол-1-ій	traces	+	5.5	299	298

Примітка. * – речовина виявлена в продуктах деградації; ** – речовина відсутня в продуктах деградації

7.2 Дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату

7.2.1 Методика дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату

Реактиви. Ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода.

Аналітичне обладнання. ВЕРХ система (дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор). Одноквадрупольний мас-спектрометричний детектор із іонізацією в електроспреї (ESI).

Хроматографічні умови. Хроматографічні дослідження проводились при елююванні сумішью вода-ацетонітрил (70:30) із додаванням 0,1% мурашиної кислоти. Колонка Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм, 1,8 мкм. Температура колонки 40°C. Швидкість потоку 0,400 мл/хв.

Умови мас-спектрометричного детектування. Температура газу осушувача склала 100°C. Швидкість потоку газу осушувача (азоту) склала 10 л/хв. Тиск газу небулайзера (азот) склав 53 psi. Мас-спектри було отримано при m/z 100-2000. Фрагментацію квазімолекулярних іонів було досліджено при напрузі на фрагментаторі: 100, 150, 200 В, позитивної полярності.

Умови прискореної деградації. Зразки відбиралися кожного дня, готувалися для уведення і вводилися в ВЕРХ систему. Об'єм інжекції для 0,1% розчину склав 5 мкл, для 1% розчину склав 0,5 мкл. Вміст (%) було взято із звіту програми OpenLab CDS за сигналом діодно-матричного детектора при 276 нм.

Деградація за лабораторними умовами. Речовина та розчини (0,1%, 1%) знаходились при кімнатній температурі в лабораторних умовах.

Термічна деградація. Вплив температури було досліджено в термостаті при 66°C для 0,1%, 1% розчинів та речовини. Зразки витримували при 66°C протягом 5 днів.

Окиснювальна деградація. Розчин гідроген пероксиду (3%) було використано для дослідження впливу окиснювального агенту. Приблизно 0,001 г АФІ було розчинено в 1 мл 3% гідроген пероксиду.

Ультрафіолетова (УФ) деградація. Опромінення було проведено за допомогою люмінісцентної УФ лампи, YF UV-9W 365 нм, якій випромінює в діапазоні довгохвильового ультрафіолету із максимумом випромінення 365 нм. Освітленість вимірювали за допомогою люксметра, вона дорівнювала 2000 люкс. Було досліджено тверду речовину та розчини із концентрацією 0,1%, 1%. Максимальний період опромінювання було 4 дня.

Кислотний гідроліз. Вивчено вплив кислоти. Приблизно 0,001 г АФІ було змішано із 1 мл 0,1 М НСІ.

Лужний гідроліз. Приблизно 0,001 г АФІ було змішано із 0,1 М розчином натрій гідроксиду.

Приготування розчинів для дослідження лабораторних умов деградації, дослідження термічного розкладання, ультрафіолетової деградації. Розчин із концентрацією 0,1% виготовлено із 0,001 г АФІ в 1 мл води. Розчин із концентрацією 1% виготовлено згідно складу фармацевтичного препарату «1% розчин для ін'єкцій», тобто 0,01 г АФІ було розчинено в 1 мл води, 0,0059 г натрій хлориду. При дослідженні твердої речовини, 0,001 г було розчинено в 1 мл води та 5 мкл отриманого розчину уведено в ВЕРХ.

7.2.2 Результати дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату. 2-((5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол)-3-іл ацетатна кислота утворювалась в потоці розчинника із АФІ (піпередінієва сіль). Таким чином, детектор ідентифікував кислоту. Таким чином, АФІ визначався в формі кислоти.

Результати дослідження розкладення речовини наведено в табл. 7.3. Масовий баланс (вміст основної речовини, % плюс вміст усіх продуктів деградації та домішок, %), при всіх випадках він дорівнював 100%.

Кількісний вміст 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол)-3-іл) ацетата

Умови розкладання	Дні						
	0	1	2	3	4	5	6
Лабораторні умови, 0,1% розчин	99,64	99,54	99,53	99,47	99,47	99,46	99,48
Лабораторні умови, 1% розчин	99,97	99,97	99,97	99,94	99,94	99,93	–
Лужний гідроліз, 0,1 М розчин NaOH	99,64	99,58	99,66	99,64	99,64	99,61	99,66
3% H ₂ O ₂	99,63	79,10	73,20	69,54	65,44	61,57	55,49
Термічний ефект 66°C, 0,1% розчин	99,64	99,53	99,35	99,25	99,25	99,24	–
Термічний ефект 66°C, 1% розчин	99,97	99,94	99,92	99,87	99,85	99,85	–
Тепловий ефект 66°C, речовина	99,64	99,80	99,72	99,90	99,80	99,81	–
Опромінення УФ- світлом, розчин 0,1%	99,64	97,41	89,31	77,61	56,25	–	–
Опромінення УФ-світлом, розчин 1%	99,97	97,29	93,36	89,68	80,03	–	–
Опромінення УФ-світлом, речовина	99,64	99,80	99,76	99,23	99,76	–	–

Деградація в лабораторних умовах. Під час зберігання 0,1% еталонного розчину АФІ в лабораторних умовах відсоток речовини зменшувався приблизно на 0,1% протягом 6 днів. Рівень речовини в 1% розчині за цих умов протягом 5 днів не змінювався.

Термічна деградація. Тепловий вплив (66°C) на 0,1% розчин АФІ призводить до його розкладання приблизно на 0,4% протягом 5 днів (рис. 6.3). Однак істотні продукти деградації не визначені.

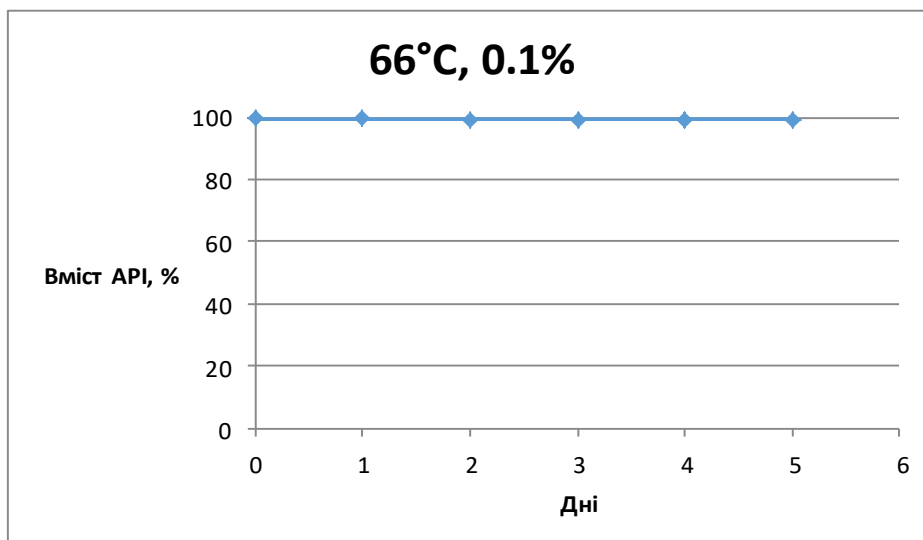


Рис. 7.19. Крива деградації АФІ в 0,1% розчині при температурі 66°C

У той же час під впливом температури (66°C) на 1% розчин відбувається розпад лише близько 0,1% (рис. 7.20). Під час дослідження теплового впливу (66°C) на тверду речовину (АФІ) вміст АФІ в речовині не змінювався.

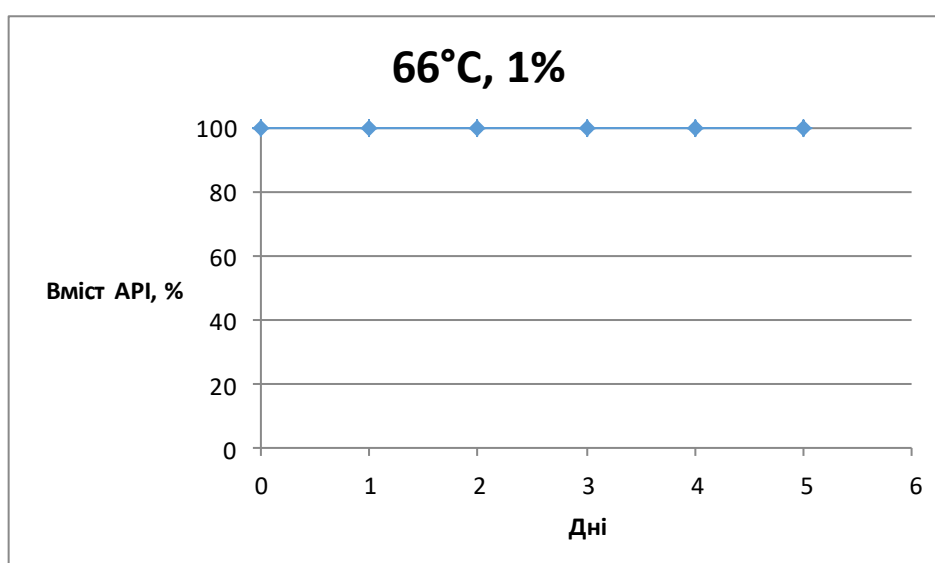


Рис. 7.20. Крива деградації АФІ в 1% модельному розчині для ін'єкцій при температурі 66°C

Окиснювальна деградація. Вплив 3% гідроген пероксиду протягом 6 днів призводить до зниження концентрації АФІ приблизно в 2 рази (рис. 7.21).

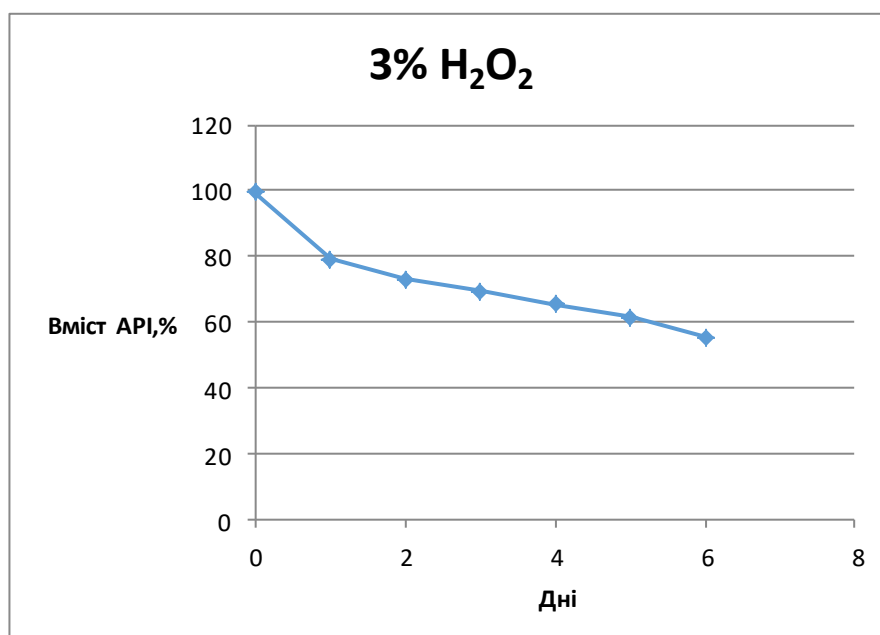


Рис. 7.21. Крива деградації АФІ під дією 3% H₂O₂

Ультрафіолетова (УФ) деградація. Ультрафіолетове випромінювання спричиняє розпад 0,1% розчину протягом чотирьох днів більш ніж на 40% (рис. 7.22).

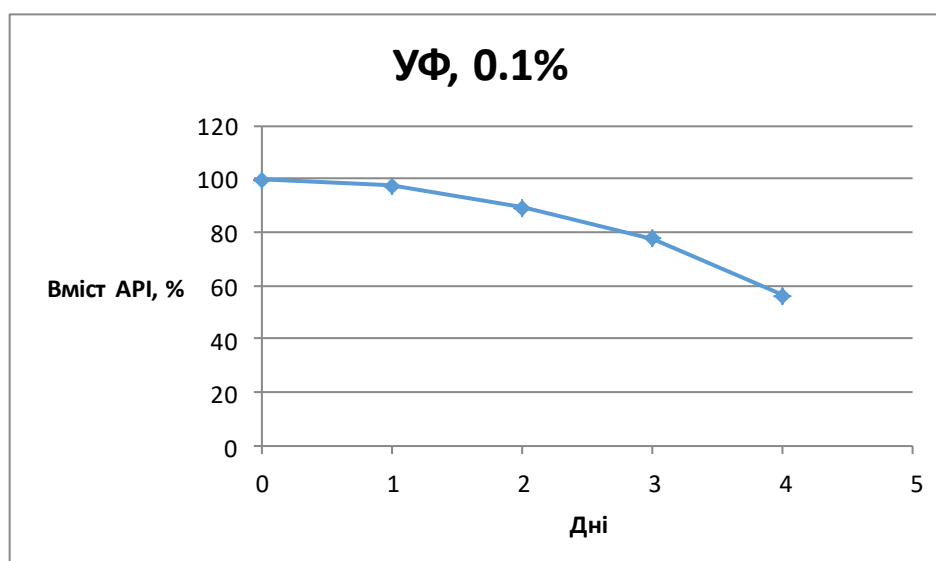


Рис. 7.22. Крива деградації АФІ в 0,1% розчині

У той же час для 1% розчину концентрація знижувалася приблизно на 20% (рис. 7.23). Вміст АФІ не змінювався під час опромінення сухої речовини протягом 4 днів.

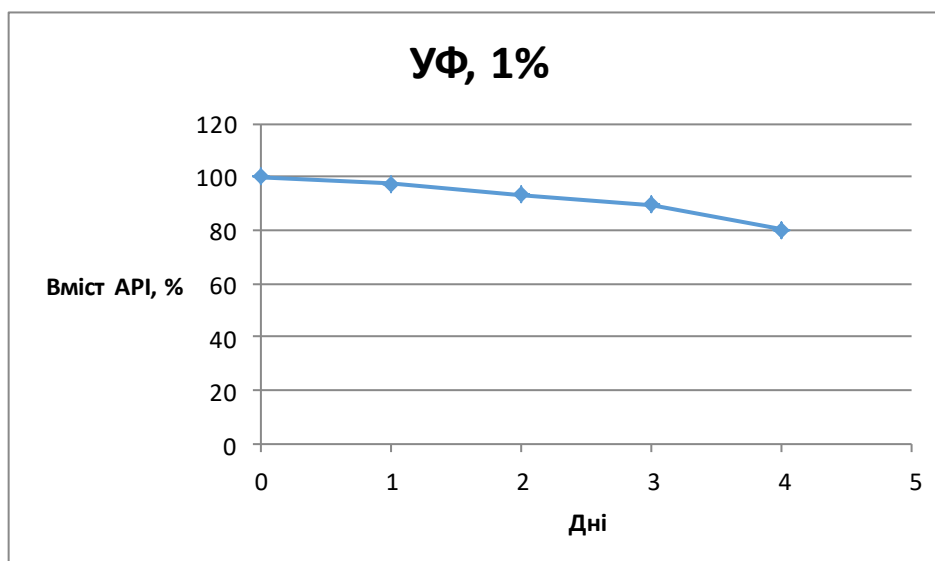


Рис. 7.23. Крива розкладання АФІ в 1% розчині для ін'єкцій

Кислотний гідроліз. Під дією 0,1 М розчину хлоридної кислоти АФІ негайно розкладається з утворенням 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)оцтової кислоти, яка нерозчинна у воді. Тож дослідження впливу 0,1 М хлоридної кислоти було закінчено на цьому етапі.

Лужний гідроліз. Під дією 0,1 М розчину натрій гідроксиду вміст АФІ не змінювався протягом 6 днів.

7.2.3 Визначення структури продуктів деструкції. Можливі структури сполук, що утворюються в результаті деградації АФІ в умовах стресу, запропоновані після дослідження мас-спектрів відповідних піків хроматографії.

Визначення структури продуктів розпаду АФІ, утворених дією 3% гідроген пероксиду. На хроматограмі продуктів розпаду після дії 3% H_2O_2 , спостерігаються два піки (рис. 7.24). Перший пік (за 1,219 хв) був не чистим. Найбільш інтенсивний пік вилученої іонної хроматограми (ЕІС) мав m/z 318. Він відповідав сульфоксиду (рис. 7.25). Відома реакція утворення сульфоксиду

з органічних сполук сульфуру з валентністю два під впливом розчину H_2O_2 [364].

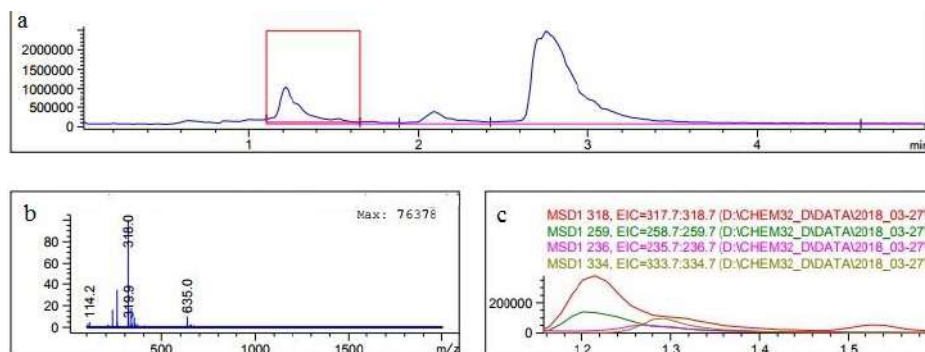


Рис. 7.24. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених дією 3% H_2O_2 при 150 В (а). Мас-спектр піку при 1,221 хв (b). ЕІС-хроматограма (с)

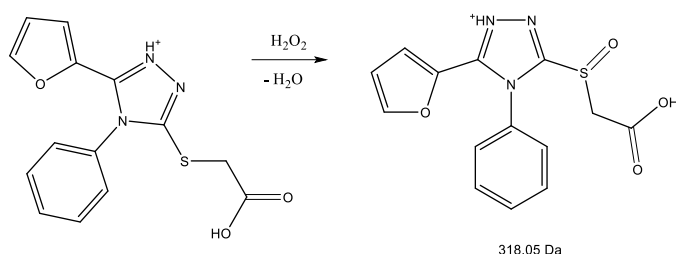


Рис. 7.25. Утворення 3-[(карбоксиметил)сульфініл]-5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-1-ій катіон (m/z 318)

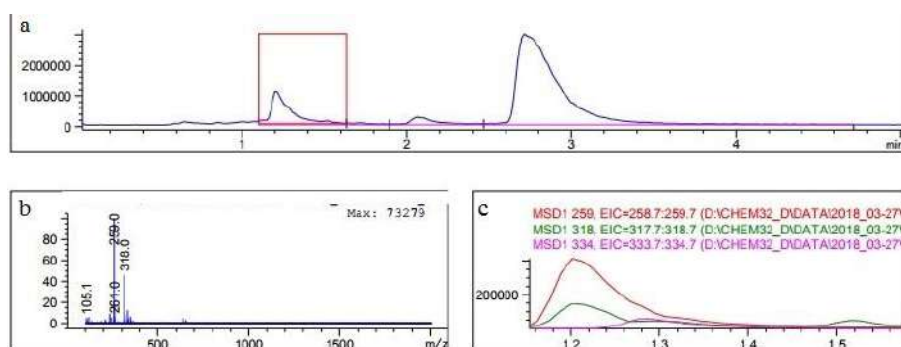


Рис. 7.26. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених дією 3% H_2O_2 при 200 В (а). Мас-спектр піку при 1,217 хв (b). ЕІС-хроматограма (с)

При збільшенні напруги фрагментації до 200 В з'явився іон з m/z 259 в мас-спектрах першого піку (рис. 7.26). Можлива структура цього іона представлена на рис. 7.27.

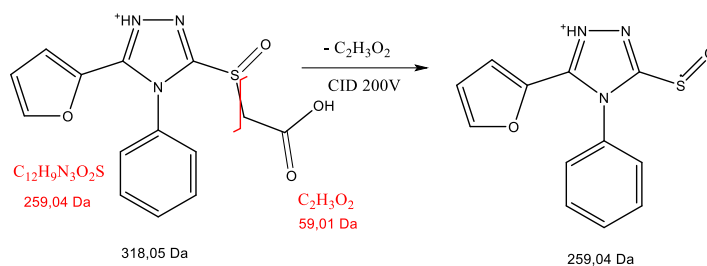


Рис. 7.27. Трансформація катіона з m/z 318 під час фрагментації в CID при 200 В

Другий пік продукту деструкції був за 2,140 хв (рис. 7.28).

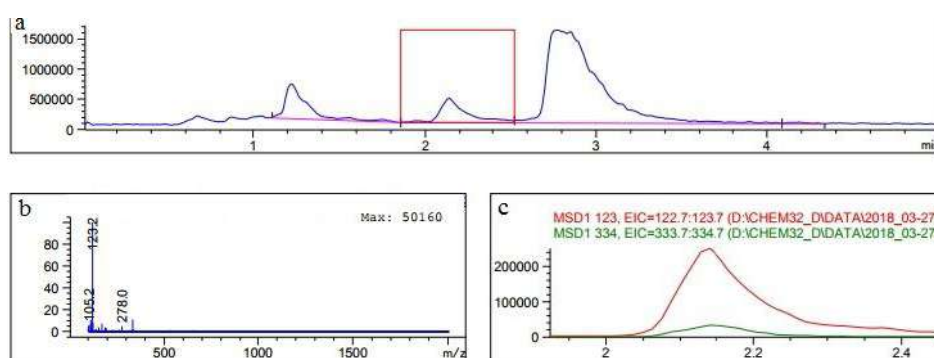


Рис. 7.28. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених дією 3% H_2O_2 при 100 В (а). Мас-спектр піку при 2,140 хв (b). ЕІС-хроматограма (с)

Квазімолекулярний іон з m/z 334 відповідає сульфону, який утворився на другому етапі окислення H_2O_2 (рис. 7.29). Це добре відома реакція [364].

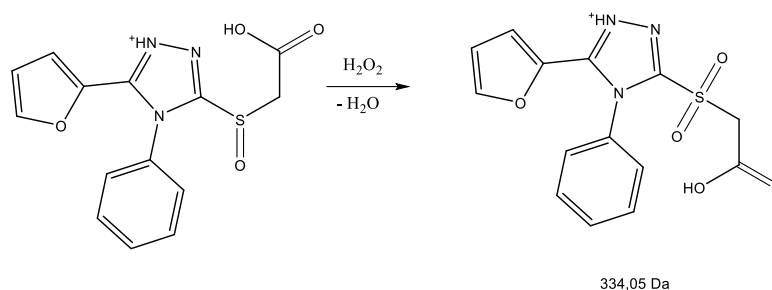


Рис. 7.29. Утворення катіона 3-[(карбоксиметил) сульфоніл]-5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазолію (m/z 334)

У мас-спектрах другого піку при 100 В (m/z 278,0 і m/z 123,2) присутні два іона фрагмента. Можлива структура першого іона, присутня на рис. 7.30.

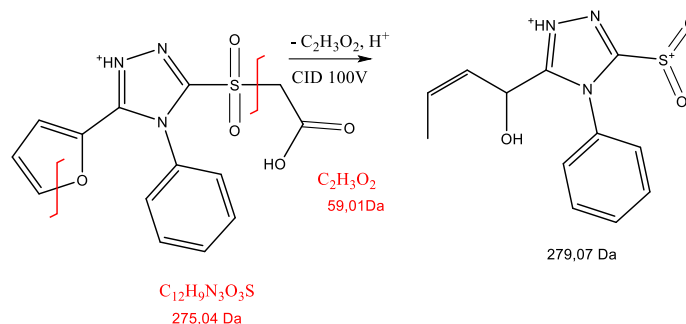


Рис. 7.30. Перетворення катіона з m/z 334 під час фрагментації в СІД при 100 В до отримання катіона з m/z 278

Реакція утворення іона з m/z 123 присутня на рис. 7.31.

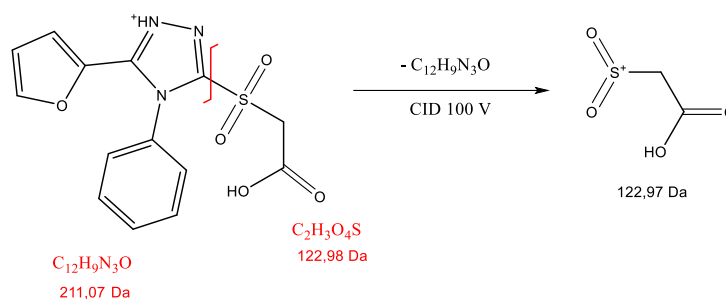


Рис. 7.31. Перетворення катіона з m/z 344 під час фрагментації в СІД при 100 В до отримання катіона з m/z 123.

Визначення структури продуктів розпаду АФІ, утворених під впливом УФ-випромінювання на 0,1% розчин. Перший пік не був ідентифікований (рис. 7.33). Моноізотопна маса m/z 285,2 та m/z 207,2 у мас-спектрі неідентифікованого піку (1) спостерігалась (рис. 7.32-7.33).

Сульфоксид також спостерігався при 150 В у продуктах розпаду АФІ, утворених під дією УФ-випромінювання. Час утримування був близьким до 1,2 (пік 2), m/z 318 (рис. 7.34).

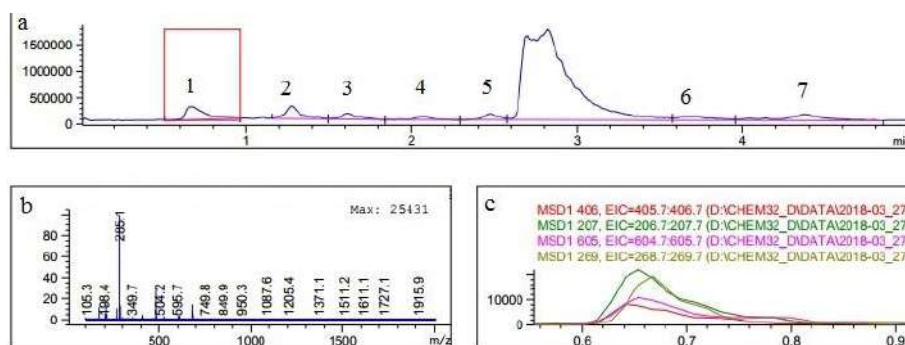


Рис. 7.32. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених УФ-випромінюванням (напруга фрагментації 100В) (а). Мас-спектр піку (1) при 0,675 хв (b). ЕІС-хроматограма (c)

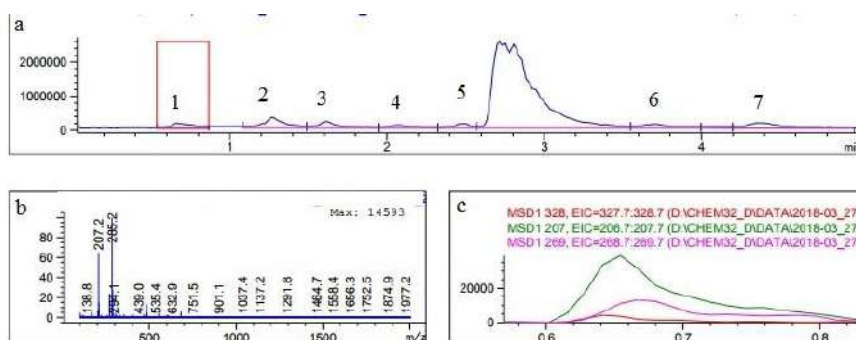


Рис. 7.33. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених УФ-випромінюванням (напруга фрагментації 150В) (а). Мас спектр піку (1) при 0,670 хв (b). ЕІС-хроматограма (c)

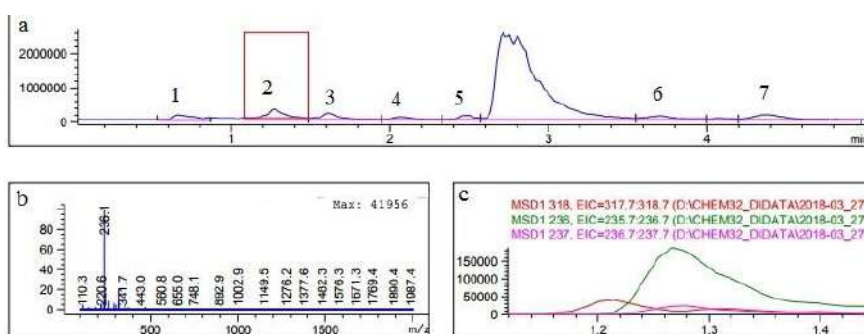


Рис. 7.34. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, що утворюється під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 150В) (а). Мас спектр піку (2) при 1,275 хв (b). ЕІС-хроматограма (c)

Іон з m/z 236,1, відповідав домішці, яка утворювалася під дією УФ з розщепленням циклу фурану АФІ (рис. 7.35). На другий день опромінення спотерігався пік димерного іона з m/z 471, що підтверджує, що квазімолекулярний іон має масу 236.

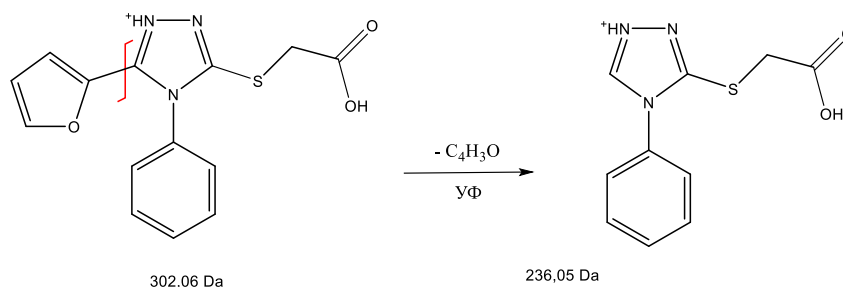


Рис. 7.35. Можливий спосіб деградації АФІ при впливі УФ-випромінювання з розщепленням фуранового кільця

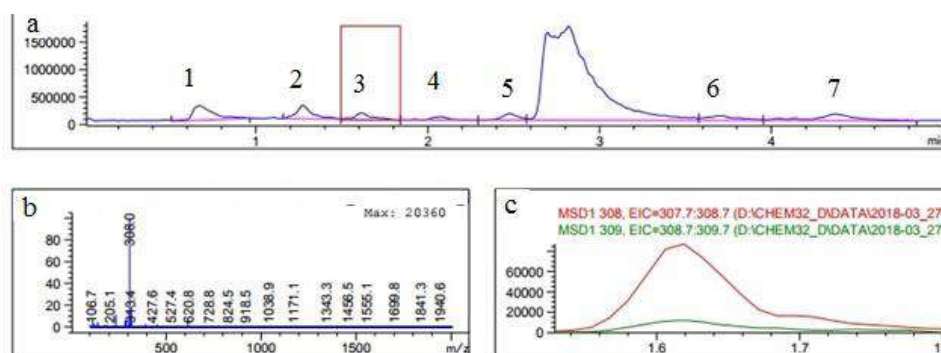


Рис. 7.35. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 100 В) (а). Мас спектр піку (3) при 1.616 хв (b). ЕІС-хроматограма (с)

Іон з m/z 308 наведений на рис. 7.35 ($[M + H]^+$), він утворюється в елюенті в присутності мурашиної кислоти із продукта розкриття фуранового циклу під дією УФ. Можливі структури цього продукта запропоновані на рис. 7.36. Вони утворюються в результаті відкриття циклу фурану. Димерний іон з m/z 615 ($[2M + H]^+$) був виявлений в мас-спектрі на другий день опромінення. Наявність відповідного димерного іона підтверджує, що іон з m/z 308 є

квасімолекулярним іоном. Також у продуктах фотодеградації є сульфон, m/z 334, час утримування якого становить 2,1 хв (рис. 7.37).

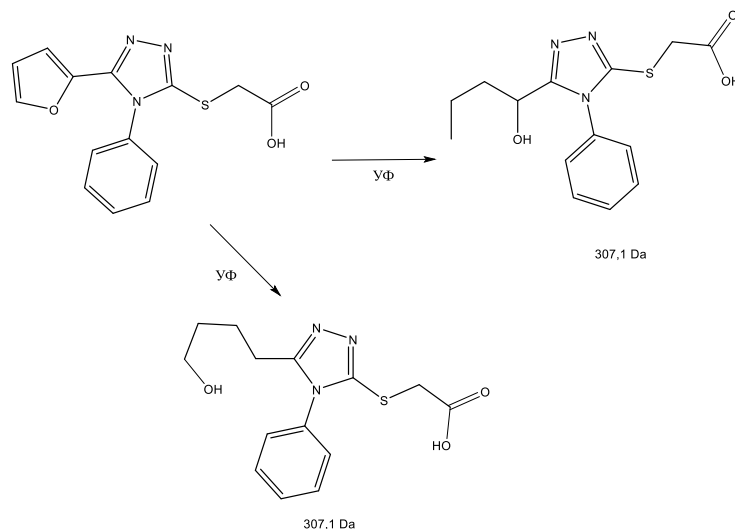


Рис. 7.36. Можливий шлях фотодеградації АФІ з утворенням продукту з молекулярною масою 308,1

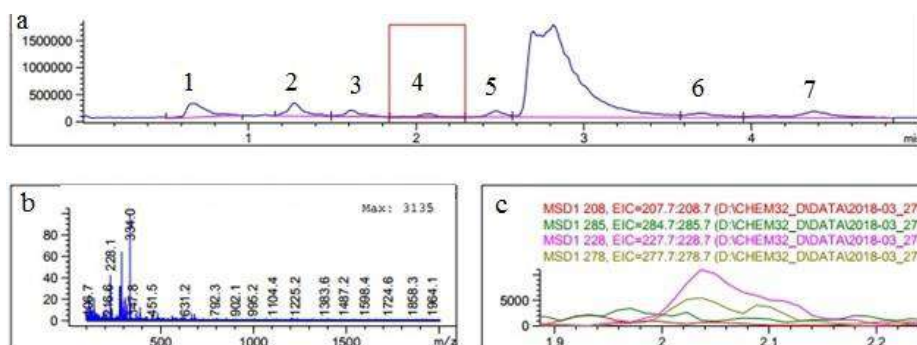


Рис. 7.37. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, що утворюється під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 100В) (а). Мас спектр піку (4) при 2,070 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

Спостерігали домішки із часом утримування приблизно 2,5 хв та m/z 192 (рис. 7.38). Це продукт відщеплення циклу фурану, а також діоксиду карбону (декарбосилування) з 2-(((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазолу)-3-іл)ацетатної кислоти (рис. 7.39).

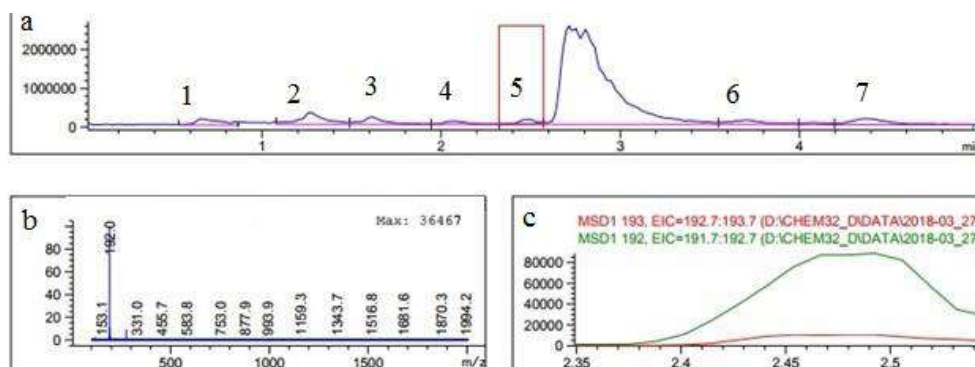


Рис. 7.38. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, що утворюється під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 150В) (а). Мас-спектр піку (5) на 2,447 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

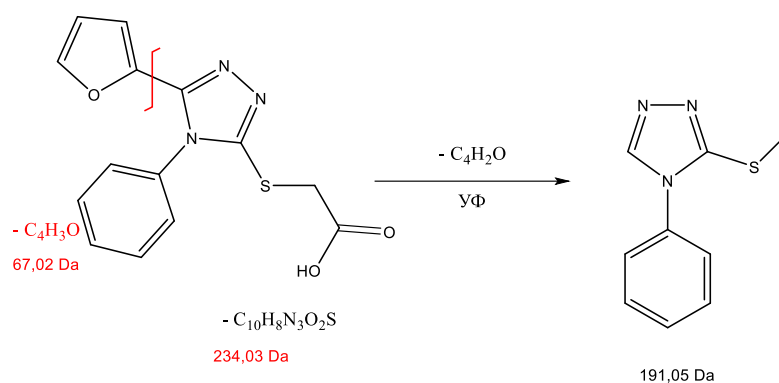


Рис. 7.39. Схема відщеплення циклу фурану та декарбоксилювання кислоти АФІ

Спостерігалось утворення тіону під впливом УФ-випромінювання. 5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіон є попередником синтезу вказаного АФІ [327]. Це було підтверджено часом утримування та m/z відповідно до розд. 3 та 4. Час утримування відповідає часу утримування хроматографії стандартного розчину відповідного тіону (3,7 хв), m/z квазімолекулярного іона дорівнює 244, що відповідає молекулярній масі протонованої сполуки (рис. 7.40-7.41).

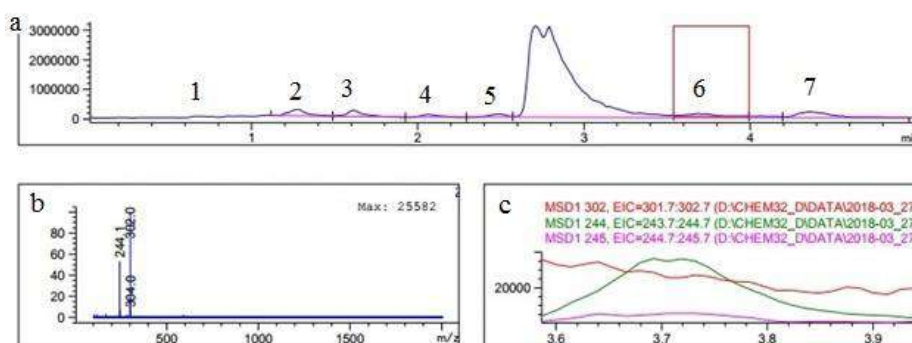


Рис. 7.40. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, що утворюються під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 200В) (а). Мас-спектр піку (б) за 3,695 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

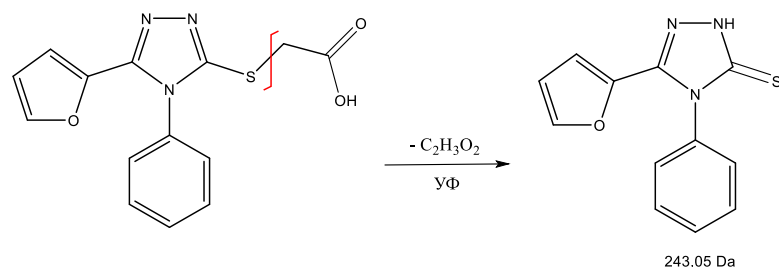


Рис. 7.41. Схема утворення 5-(фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3H-1,2,4-тріазол-3-тіону

Аніон з m/z 290,0 утворився в джерелі іонів ($[M+H]^+$), а також димерний іон з m/z 579,0 ($[2M+H]^+$), що підтверджує, що іон з m/z 290 – квазімолекулярний іон (рис. 7.42).

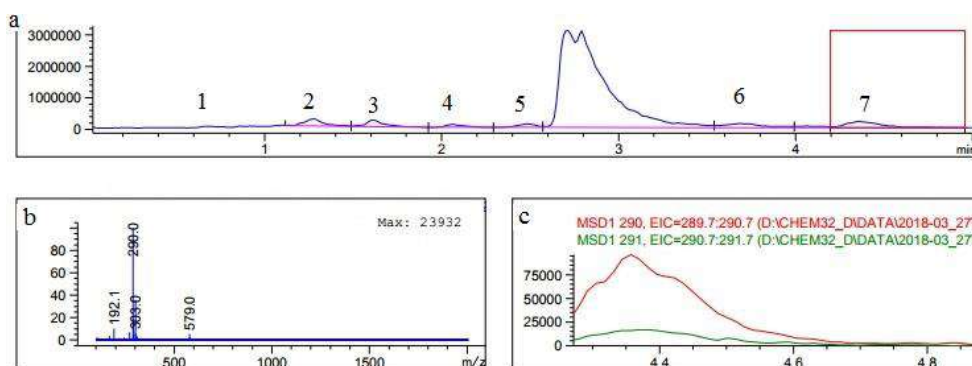


Рис. 7.42. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, що утворюється під дією УФ-випромінювання (напруга фрагментації 200В) (а). Мас-спектр піку (7) за 4 363 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

Вилучався діоксид карбону, а атом сірка окиснювалась під дією УФ-світла з утворенням метилсульфону з моноізотопною масою 289,0 (рис. 7.43).

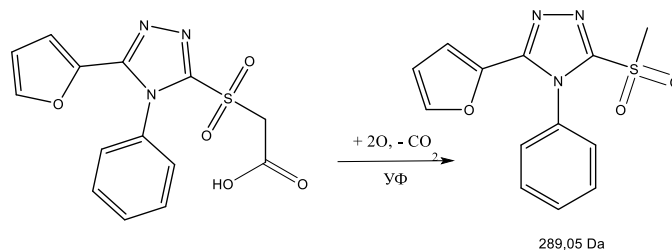


Рис. 7.43. Схема утворення декарбоксілизованого сульфону

Домішки, що утворювались в стресових умовах, наведено в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Домішки утворювались в стресових умовах

Сполука	3% H ₂ O ₂	УФ	Час утриму- вання	m/z квазі- молекуляр- ного іона	Моно- ізотопна молекулярна маса
1	2	3	4	5	6
АФІ			2,8	302	301
2-((5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)сульфініл)ацетат	+*	+	1,2	318	317
2-((5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)сульфоніл)ацетат	+	+	2,1	334	333
2-((4-Феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат	-**	+	1,3	236	235

1	2	3	4	5	6
2-((5-(1-Гідроксибутил)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, 2-((5-(4-гідроксибутил)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат	–	+	1,6	308	307
3-(Метилтіо)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол	–	+	2,5	192	191
5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон	–	+	3,7	244	243
3-(Фуран-2-іл)-5-(метилсульфоніл)-4-феніл-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол	–	+	4,4	290	289

Примітка. * – речовина була виявлена в продуктах деградації; ** – речовина відсутня в продуктах деградації

ВИСНОВКИ

Досліджено вплив таких факторів, як кислота, луг, H_2O_2 , температура, УФ-випромінювання на морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат, а також піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетат в субстанції, 0,1% розчині та 1% «розчині для ін'єкцій». Досліджено залежність вмісту АФІ від кількості днів впливу факторів.

1. Вивчено вплив натрій гідроксиду, хлоридної кислоти, 3% H_2O_2 , температури, УФ-випромінювання на субстанцію, 0,1% розчин та 1% розчин для ін'єкцій.

2. Встановлено, що найбільш руйнівну дію мають H_2O_2 та УФ-випромінювання.

3. Запропонована структура продуктів деградації.

За матеріалами розділу опубліковані робота [349].

РОЗДІЛ 8

ОБГРУНТУВАННЯ РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИКИ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ
 ФАРМАКОКІНЕТИКИ І МЕТАБОЛІЗМУ
 МОРФОЛІНІЙ 2-((4-(2-МЕТОКСИФЕНІЛ)-5-ПІРИДИНІЛ)-4H-1,2,4-ТРИАЗОЛ-
 3-ІЛ)ТІО)АЦЕТАТУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ

8.1 Дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів

Поточний підрозділ присвячений встановленню фармакокінетичних параметрів морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів [365]. Розраховано фармакокінетичні параметри:

1) площа під фармакокінетичною кривою «концентрація-час» (AUC), яка є фармакокінетичним параметром, що характеризує біодоступність лікарського засобу розраховано за формулою:

$$AUC = \frac{c_1}{2} * \Delta t_1 + \frac{c_1+c_2}{2} * \Delta t_2 + \frac{c_2+c_3}{2} * \Delta t_3 + \dots + AUC_{rem}, \text{ (мг}\cdot\text{год)}$$

2) Загальний кліренс (CL) відповідає об'єму плазми, із якого речовина повністю видаляється за одиницю часу, де (D) – доза:

$$CL = \frac{D}{AUC}, \text{ (мл/год)}$$

3) константа швидкості елімінації (K), що характеризує зниження концентрації речовини наприкінці фармакокінетичної кривої, де C_{max} та T_{max} – максимальна концентрація та відповідний час, C_{rem} та T_{rem} – поточна концентрація та відповідний час:

$$K = \frac{\ln \frac{C_{max}}{C_{rem}}}{T_{rem} - T_{max}}, \text{ (год}^{-1}\text{)},$$

4) об'єм розподілення (V_T), що є теоретичним об'ємом, який необхідний, щоб містити загальну кількість уведеного препарату в тій же концентрації, в якій він спостерігається у плазмі крові:

$$V_T = \frac{CL}{K}, \text{ (мл)}$$

5) біологічний період напіввиведення ($t_{1/2}$), показує час, протягом якого концентрація досліджуваної речовини в крові зменшується вдвічі:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}, \text{ (год)}$$

8.1.1 Методика дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Хроматографічні умови. Хроматографічне розділення проводили за допомогою хроматографічної системи Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Germany), яка складалася з дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостата колонки, діодно-матричного детектора. Колонка ZORBAX RX-Sil (50 × 4,6, 1,8 мкм). Температура колонки дорівнювала 40°C. Рухома фаза складалась з 80% ацетонітрилу (із 0,1% HCOOH) та 20% води (із 100 мМ HCOONH₄). Швидкість потоку 0,400 мл/хв. Хроматограми було записано та оброблено за допомогою Open LAB CDS програмного забезпечення. Об'єм інжектування складав 1 мкл.

Умови мас-спектрометричної детекції. Швидкість газу осушувача (азоту) 12 л/хв. Температура газу осушувача 350°C, тиск на нейзері 35 psi. Напруга на фрагментаторі 150 В. Визначення проводили в SIM (селективного моніторингу іонів) при m/z 343.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода. Амоній ацетат в кваліфікації «х.ч.» ≥ 98% (Китай)

Підготовка зразків плазми крові. До зразків плазми об'ємом 100 мкл додавали 150 мкл води та 1 мл метанолу, 20 мкл 60% кислоти хлорної, струшували на вортекс-міксері 1 хв, 3 хв на ультразвуковій бані, 10 хв центрифугували при 10000 об/хв (рис. 8.1).



Рис. 8.1. Процедура підготовки зразків плазми крові при визначенні морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Виготовлення калібрувальних розчинів. Для цього було приготовлено два вихідних розчини морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату із концентрацією 0,00001 г/мл (розчин А) та 0,00002 г/мл (розчин Б), відповідно. Калібрувальні розчини готували наступним чином. Для виготовлення першого калібрувального розчину брали 10 мкл розчину А та додавали до 100 мкл плазми, наступні калібрувальні розчини готували із розчину Б: відповідно 20, 50, 80, 100, 150 мкл розчину Б додавали до 100 мкл плазми (змішували за допомогою ультразвуку 15 хв), додавали відповідно 140, 130, 100, 70, 50, 0 мкл води, 1 мл метанолу, 20 мкл 60% кислоти хлорної, струшували на вортекс-міксері 1 хв, потім 3 хв витримували на ультразвуковій бані, 10 хв центрифугували при 10000 об/хв. Таким чином отримано шість

калібрувальних розчинів із концентраціями відповідно 1; 4; 10; 16; 18; 30 мкг/мл.

8.1.2 Результати дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Для кількісного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів було адаптовані хромато-мас-спектрометричні умови та умови пробопідготовки, що було застосовано для дослідження метаболізму вказаної речовини. Для вивчення фармакокінетики і метаболізму в плазмі крові при внутрішньоочеревинному уведенні засобу було запропоновано використовувати гідрофільну хроматографію, так як метаболіти зазвичай мають більш гідрофільну природу ніж вихідні речовини, і в такому разі вони повинні краще утримуватись в гідрофільному режимі хроматографії і легше будуть відділені від основної сполуки. Для цього було використано силікагельну колонку Zorbax Rx-Sil. Як елюент застосовували суміш 0,1% HCOOH в ацетонітрилі з додаванням 100 ммоль/л HCOONH₄. У цьому випадку на відміну від зворотньофазової хроматографії в утримуванні аналітів можуть мати важливу роль сіланольні групи і, таким чином, полярні аналіти можуть краще утримуватись на колонці за рахунок іон-діпольних, діполь-діпольних або водневих зв'язків.

Оптимізація умов пробопідготовки. Для підготовки зразків плазми крові для аналізу за допомогою рідинної хроматографії із мас-спектрометричним детектуванням найчастіше використовують осадження білків [169]. Як осаджувач тестували чотири різних розчинника: ацетонітрил, метанол, пропан-2-ол та диметилсульфоксид. Як критерій їх ефективності використовували ступінь екстракції. Для розрахунку ступеня екстракції проводили визначення площ піків як екстрагованих речовин, так і неекстрагованих зразків. Ступінь екстракції розраховували за формулою:

$$R\% = \frac{S_{ex}}{S_{nex}} * 100\%$$

де S_{ex} – площа піку екстрагованого зразка;

S_{nex} – площа піку неекстрагованого зразка.

Діаграму ступенів вилучення для різних екстрагентів наведено на рис. 8.2, при цьому з аналізу даних можна зробити висновок, що найбільший ступінь вилучення показує метанол, який було обрано для осадження білків. Для підвищення ступеня осадження білків також було додано 20 мкл 60% кислоти хлорної.

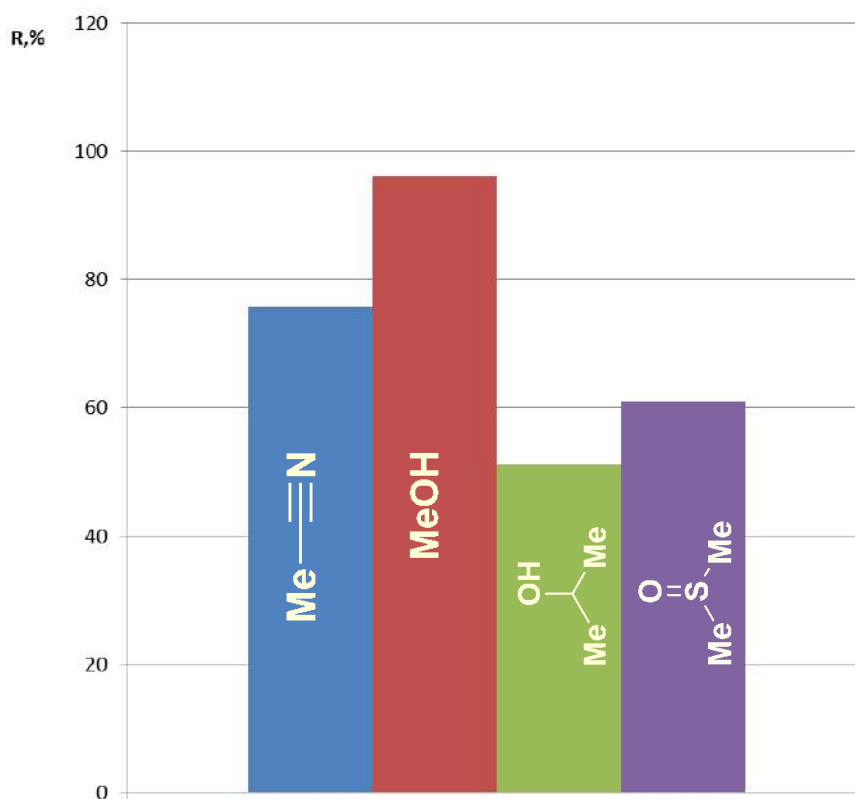


Рис. 8.2. Діаграма ступеня вилучення АФІ із зразків плазми крові для різних осаджувальних розчинників

Визначення фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Концентрацію морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату визначали протягом 7,5 год. При цьому використано логарифмічну шкалу для визначення інтервалів часу взяття зразків плазми крові, при цьому застосовано

однакові логарифмічні інтервали часу: 0,5 (табл. 8.1). Раніше таку послідовність часу було запропоновано в роботах [366, 367].

Таблиця. 8.1

**Розрахунок часу отримання зразків плазми після уведення морфоліній
2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату**

$\log_{10}(\text{години})$	0,9	0,4	-0,1	-0,6	-1,1
$10^{\log_{10}(\text{години})}, \text{ години}$	7,5	2,5	0,75	0,25	0,08

Хроматографували кожний зразок плазми крові тричі через 5, 15, 45 хв, 2,5, 7,5 год після уведення. Хроматограми наведені на рис. рис. 8.3-8.7.

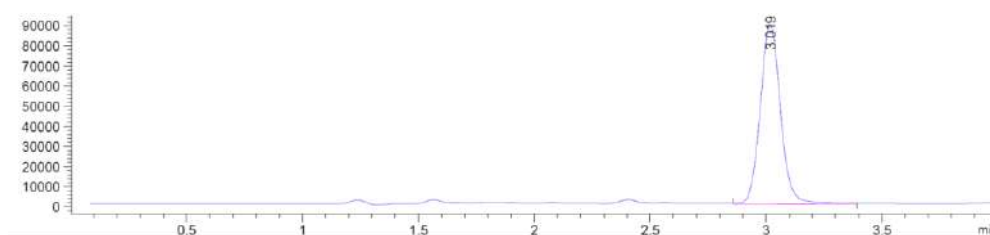


Рис. 8.3. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 5 хв

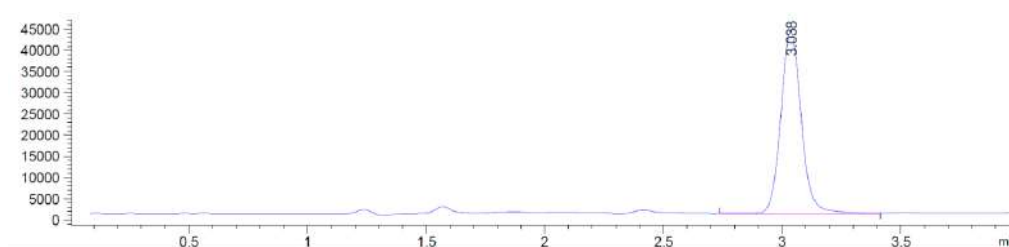


Рис. 8.4. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 15 хв

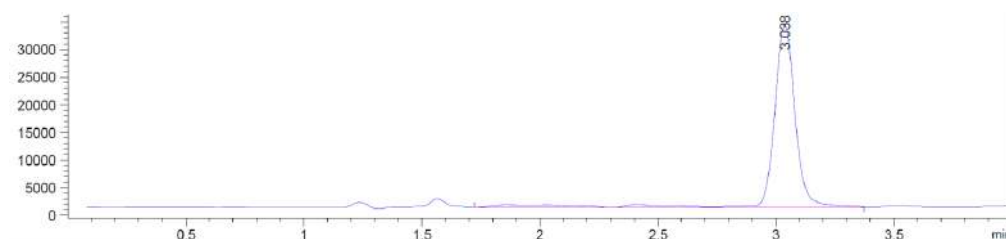


Рис. 8.5. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 45 хв

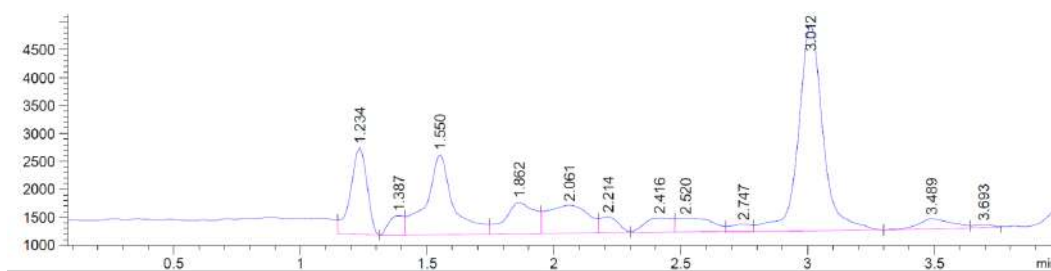


Рис. 8.6. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 2,5 год

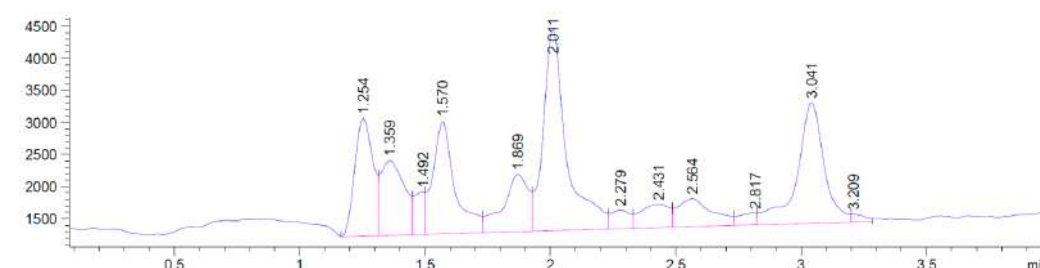


Рис. 8.7. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 7,5 год

Концентрацію морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові (табл. 8.2) розраховували за рівняння калібрувального графіку (рис. 8.8).

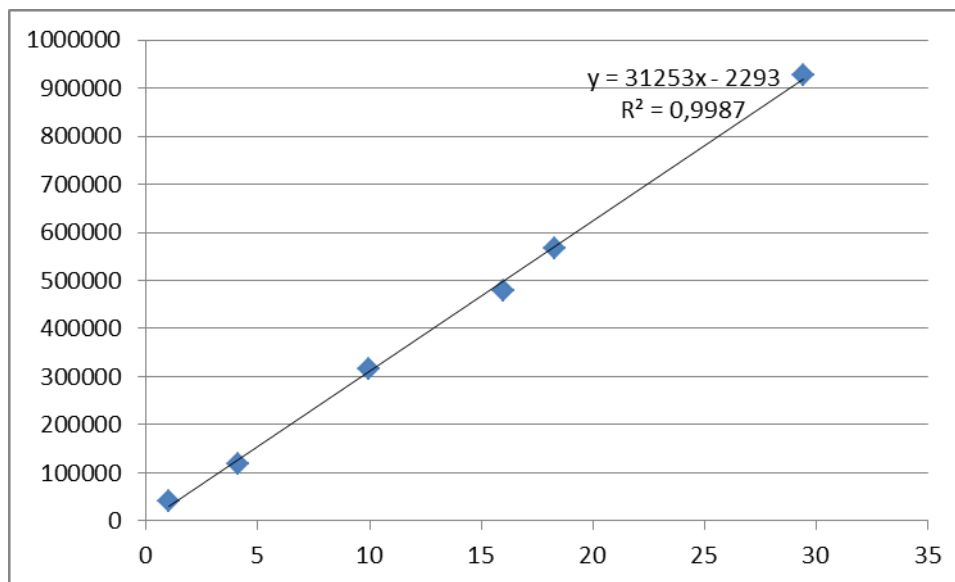


Рис. 8.8. Калібрувальна крива

Хроматограму нижнього калібрувального розчину наведено на рис. 8.9.

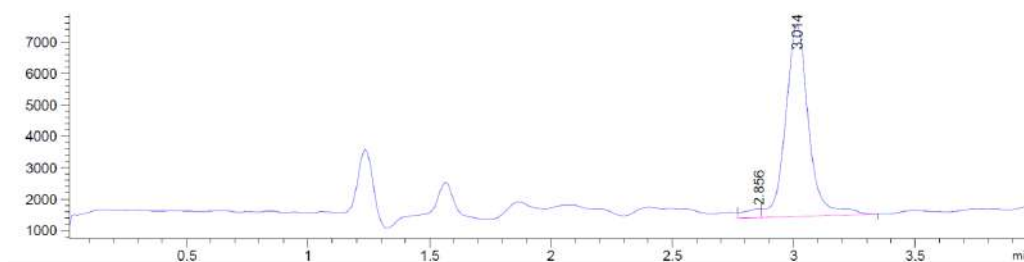


Рис. 8.9. Хроматограма нижнього калібрувального розчину

Таблиця. 8.2

Концентрації морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові, мкг/мл

С, мкг/мл	19,97	15,38	8,103	0,934	0,4252
Δt, год	0,08	0,25	0,75	2,5	7,5

Результати розрахунку фармакокінетичних параметрів наведено в табл. 8.3.

Таблиця. 8.3

Фармакокінетичні параметри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Показник	Значення
AUC (мкг·год/мл)	21,80
К (год ⁻¹)	0,5188
t _{1/2} (год)	1,336
Cl (л/(год/кг))	7,523
V _d (л/кг)	14,50

Фармакокінетичну криву, що побудована в координатах час-концентрація, морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату надано на рис. 8.10.

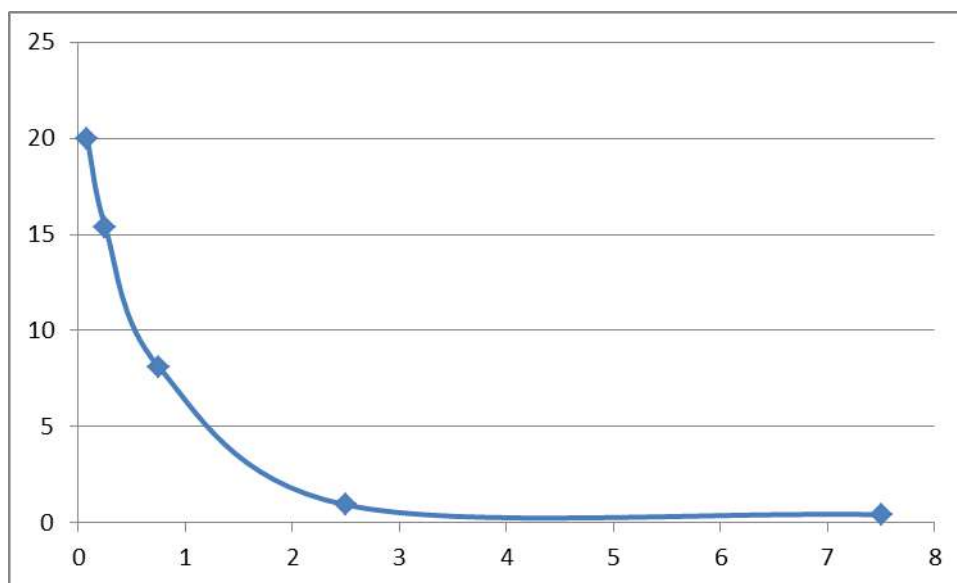


Рис. 8.10. Фармакокінетична крива залежності концентрації АФІ в плазмі крові від часу

8.2 Дослідження метаболізму морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Даний розділ присвячений встановленню складу метаболітів морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові щурів.

8.2.1 Методика дослідження метаболізму морфоліній 2-(4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

Обладнання. Система рідинної хроматографії Agilent 1260 Infinity, що складається з дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостата колонки, діодно-матричного детектора, мас-спектрометричного детектора (одно-квадрупольний Agilent 6120).

Умови рідинної хроматографії. Колонка Agilent Zorbax RX-SIL (4,6 × 50 мм, 1,8 мкм). Елюент складався з 0,1% HCOOH в ацетонітрилі та 100 мМ HCOONH₄ у воді (80:20). Ізократичний режим 0,4 мл/хв. Об'єм інжекції 1 мкл.

Умови виявлення мас-спектрометрії. Швидкість потоку газу-осушувача (азоту) становила 12 л/хв. Температура газу-осушувача становила 347°C, тиск

на небулайзері 35 psi. Напруга фрагмента становила 150 В. Діапазон сканування m/z становив 100-1000.

Реактиви: ацетонітрил «ВЕРХ» («HPLC»), кислота мурашина «х.ч.», високоочищена вода. Амоній ацетат в кваліфікації «х.ч.» $\geq 98\%$ (Китай).

8.2.2 Визначення складу основного метаболіту за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією. Вивчили метаболізм АФІ методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією. Пік, що відповідає АФІ, був виявлений за 2,855 хв (рис. 8.11). Квазімолекулярний іон мав m/z 343.

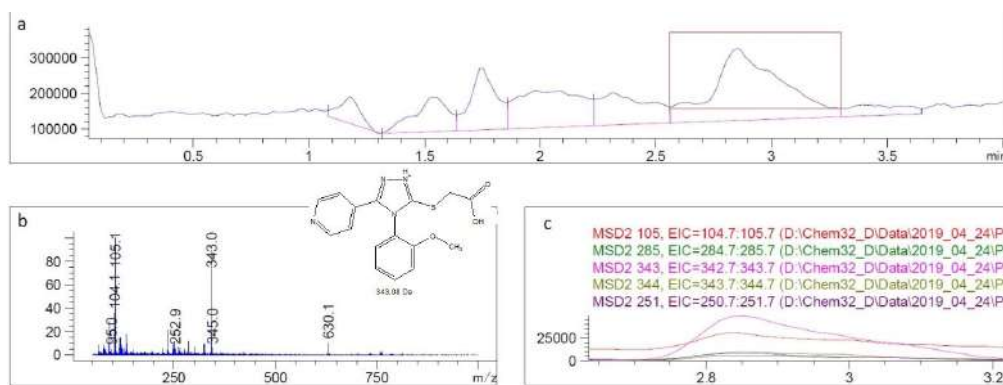


Рис. 8.11. Хроматограма ТІС продуктів метаболізму АФІ (а). Мас-спектр піку із часом утримування 2,855 хв при напрузі фрагмента 200 В (б). ЕІС-хроматограма (с)

Пік основного метаболіту був виявлений під час утримування 1,753 хв (рис. 8.12). Основний квазімолекулярний іон утворився з m/z 357. Моноізотопна маса 357 дорівнює сумі моноізотопної маси квазімолекулярного іона, що відповідала діючому фармацевтичному інгредієнту (343) та 14 а.о.м ($343 + 14 = 357$). Це можна пояснити тим, що при метилюванні 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату утворюється 5-((карбоксиметил)тіо)-4-(2-метоксифеніл)-1-метил-3-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-1-ій катіон як метаболіт. Він має відносну молекулярну масу 357. У посібнику [368] наведено інформацію в табл. 17.1 на сторінці 312: коли під час

утворення метаболіту було додано 14 а.о.м., це означає метилювання діючої речовини (рис. 8.12).

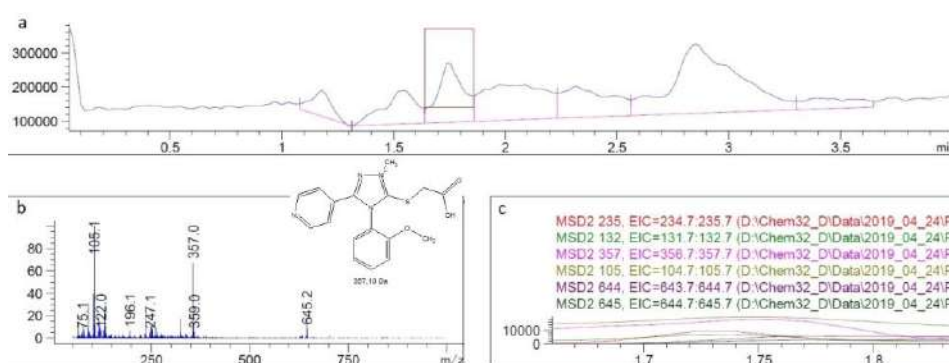


Рис. 8.12. Хроматограма ТІС продуктів метаболізму АФІ (а). Мас-спектр піку з часом утримування 1,775 хв при напрузі фрагмента 200 В (б). ЕІС-хроматограма (с)

Раніше автори [369] вивчали метаболізм цього АФІ за допомогою газової хроматографії з мас-спектрометричною детекцією. Вони вважали, що продуктом метаболізму є відповідний тіон. Пропонуємо нове тлумачення мас-спектру (рис. 8.13-8.14).

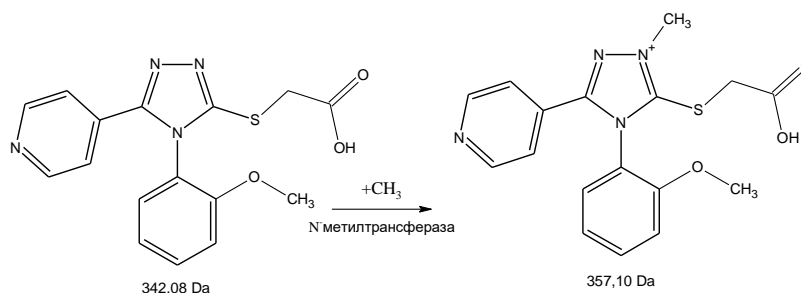


Рис. 8.13. Метилювання кислоти АФІ в організмі

Молекулярний іон з m/z 356 відповідає метилозаміщеному метаболіту (рис. 8.14). Іон з m/z 341 утворюється при відщепленні $-CH_3$. З'явився ацилій катіон з m/z 325 при подальшому розщепленні $-OH$. Як відомо, ацилій катіон стійкий завдяки резонансній стабілізації і утворюється з карбонових кислот та їх похідних (аліфатичних та ароматичних) [370-372]. Також зазвичай ацилій катіон для коротких аліфатичних кислот є більш стійким, ніж молекулярний

іон, який спостерігається в масовому спектрі. Досліджувана молекула являє собою коротку аліфатичну кислоту. При розщепленні $-CH_3$ з метоксигрупи утворюється катіон з m/z 311. Оскільки для дериватизації в дослідженні газової хроматографії використовували тетраметилхлорсилан, то в мас-спектрі з'явився катіон тетраметилсилілу з m/z 73.

Цей результат відповідає експериментам, проведеним за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією.

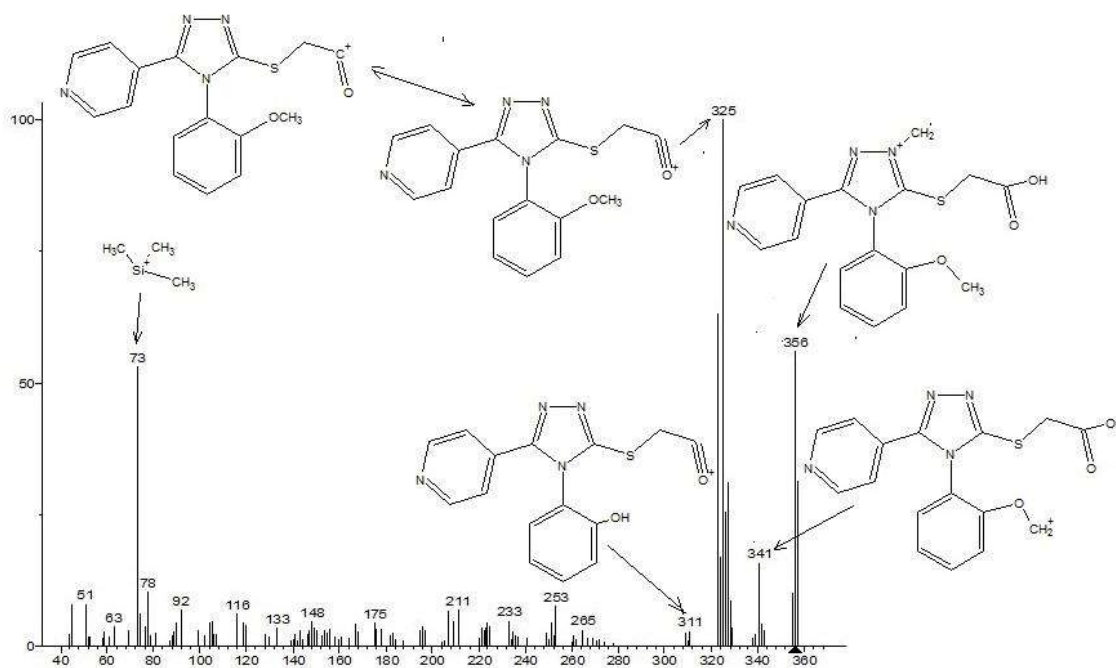


Рис. 8.14. Фрагментація мас-спектрометрії. Мас-спектр електронної іонізації

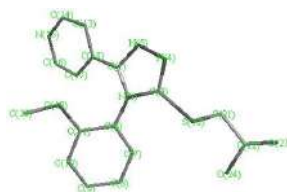
8.2.3 Механізм утворення основного метаболіту. Відомо [368], що метильна група переноситься на нуклеофільний акцепторний субстрат, який містить атоми з надлишковою електронною густиною, такі як Оксиген, Нітроген, Сульфур. Але метилювання на O (Оксиген) зазвичай відбувається у молекулах фенолів або катехолів, на S (Сульфур) для сульфгідрильних груп, на N (Нітроген) для аліфатичних, ароматичних, N-гетероциклічних сполук [368, 373, 374]. Випробувана сполука не є фенолом або катехолом, не має сульфгідрильної групи. Але вона відноситься до N-гетероциклічних сполук.

Тому молекула була метильована *N*-метилтрансферазою. Фермент *N*-метилтрансфераза – фермент другої фази метаболізму деяких ксенобіотиків. Він також трансформує ендогенні речовини, такі як серотонін [368].

Метильовання має відбуватися за атомом, що має найвищу електронну густину. Розрахунки проводилися в ChemBioOffice 12 за методом Хюккеля. Він показав, що найбільш негативний заряд мав атом азоту в положенні N (4) за нумерацією ChemBioOffice (табл. 8.4), тобто в положенні 2 за нумерацією IUPAC. Так утворилося *N*-метильне похідне (рис. 8.13). Запропоновану схему метаболізму можна перевірити на наявність у інших 1,2,4-тріазольних сполук.

Таблиця. 8.4

Заряди атомів, обчислений за методом Хюкеля



Атом	Заряд
1	2
C(1)	0,0963014
N(2)	0,538035
C(3)	0,134131
N(4)	-0,319124
N(5)	-0,298193
C(6)	0,108039
C(7)	-0,112527
C(8)	-0,0822295
C(9)	-0,0770588
C(10)	-0,123938
C(11)	0,208192
S(12)	0,0839514
C(13)	-0,127292

Продовж. табл. 8.4

1	2
C(14)	0,114743
N(15)	-0,238815
C(16)	0,11503
C(17)	-0,12208
C(18)	0,080811
O(19)	-0,218597
C(20)	0,0746731
C(21)	-0,122282
C(22)	0,607658
O(23)	-0,642595
O(24)	-0,193182

Динаміка зміни площі піку метаболіту з часом показана на рис. 8.15.

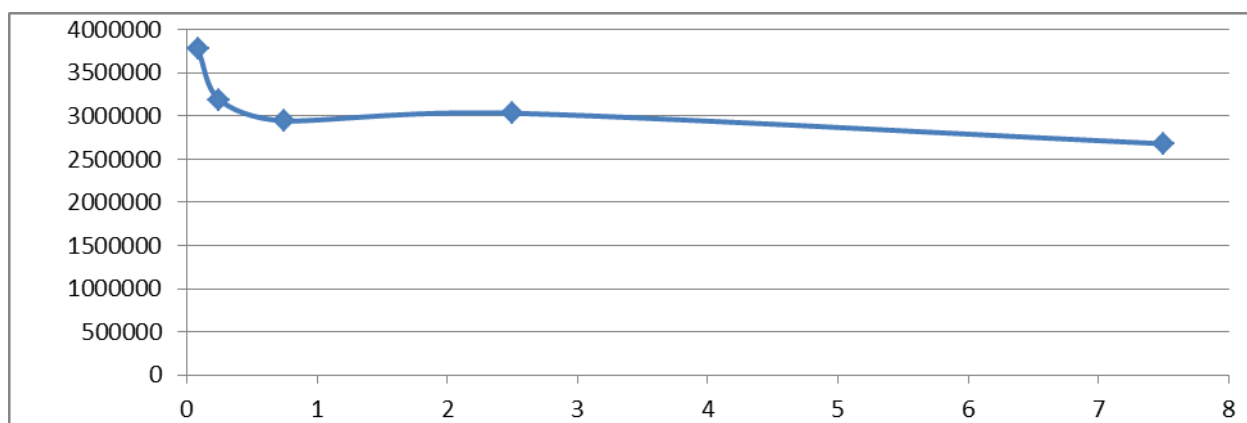


Рис. 8.15. Зміна вмісту метильованого метаболіту з часом. Залежність площі піку від часу

Максимальна концентрація метаболіту спостерігалася через 5 хв. За 7,5 год вміст метаболіту зменшується приблизно на 30%.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено швидку, селективну та чутливу ВЕРХ-МС методику визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для дослідження метаболізму та кількісного визначення даного АФІ в плазмі крові.

2. Визначені оптимальні умови осадження білків при визначенні морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові.

3. Проведено дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові, а саме побудовано фармакокінетичну криву та розраховані фармакокінетичні параметри.

4. Проведено дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. Запропоновано структуру метаболіту та механізм реакції утворення метаболіту. Схему метаболізму можна перевірити на наявність у інших 1,2,4-тріазольних сполук.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [354, 362].

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі, у відповідності до актуальних світових тенденцій, висвітлено вирішення важливої проблеми сучасної фармації, що полягає в теоретичному обґрунтуванні та практичному створенні і впровадженні в роботу дослідних та контролюючих лабораторій прогресивних підходів із застосуванням ВЕРХ-ДМД-МС методів, які є «золотим стандартом» у фармацевтичному аналізі, розробці на підставі цих підходів нескладних у виконанні, валідних аналітичних та біоаналітичних методик визначення активних фармацевтичних інгредієнтів, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, зокрема зареєстрованих та таких, що знаходяться на етапі впровадження лікарських засобів трифузолу, авесстиму і тіометрізолу, можливих домішок до них, продуктів їх деградації та метаболізму.

1. Встановлено оптимальні умови мас-спектрометричного детектування для ВЕРХ-ЕСІ-МС низки гідразидів і карботіоамідів, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей. Виявлено взаємозв'язок оптимальних умов роботи іонного джерела мас-спектрометра електроспрею із структурою аналізованих речовин.

2. Встановлено залежність коефіцієнта ємності k від вмісту ацетонітрилу для гідразидів карбонових кислот та відповідних гідразинокарботіоамідів, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, напівпродуктів у синтезі низки солей 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот, кінцевих продуктів у синтезі ряду потенційних та вже зареєстрованих лікарських засобів. Показано можливості вибору умов хроматографічного визначення цих сполук як окремо, так і в сумішах.

3. Вперше інтерпретовані мас-спектри ЕСІ ряду гідразидів та карботіоамідів кислот, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, проміжних речовин в синтезі субстанцій потенційних лікарських засобів з 1,2,4-тріазоловим фрагментом, а також кінцевих продуктів: 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот та їх солей. В результаті мас-спектрометричних досліджень встановлені загальні та характерні шляхи дисоціації розглянутих сполук, запропоновані та обговоренні

реакції утворення характеристичних іонів. Визначено співвідношення мас-спектрів вивчених сполук з їх будовою. Описано взаємозв'язок між енергіями зв'язків сполук і характером їх розпаду в джерелі іонізації.

4. Визначені умови хроматографічного розділення домішок та АФІ тіометризолу та тріфузолу. Запропоновано методики визначення вказаних домішок та АФІ. Розроблена методика визначення АФІ тріфузолу в 1%-му розчині для ін'єкцій. Отримані результати валідації методик свідчать, що вони є специфічними, відповідають критеріям лінійності, прецизійності та правильності. Результати визначення вмісту АФІ та домішок в субстанціях та лікарських формах вказують на те, що методики придатні для контролю якості лікарських речовин та препаратів.

5. Досліджено залежності утримування АФІ на хроматографічних сорбентах від температури для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (тіометризолу), а також для морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату (авесстиму) і відповідних домішок до них, визначено термодинамічні характеристики переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну.

6. Розроблено, провалідовано та перевірено на реальних зразках ВЕРХ-МС-методики визначення АФІ препарату авесстим (морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату) та АФІ тріфузолу (піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату) в яйцях птиці, обґрунтовані умови хроматографування і ЕСІ-МС-детектування, підібрана процедура пробопідготовки.

7. Запропоновано умови пробопідготовки зразків молока для визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (тріфузолу), які оптимально підходять до рідинно-хроматографічної системи. Розроблено та впроваджено в практику методики, що дозволяють контролювати залишкову кількість піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в м'ясі птиці, в м'ясі та органах тварин.

8. В ході проведення вивчення поведінки АФІ тіометризолу та трифузолу в умовах прискореної деградації визначено залежність впливу різних факторів, таких як температура, УФ-випромінювання, дія кислот, лугів та окиснювачів на концентрацію аналітів.

9. Розроблено швидку, селективну та чутливу ВЕРХ-МС методику визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату для дослідження метаболізму та кількісного визначення даного АФІ в плазмі крові для визначення фармакокінетики. Проведено дослідження метаболізму та фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (тіометризолу).

10. Розроблено та впроваджено Фармакопейний стандартний зразок АФІ 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату тіометризолу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Каплаушенко А. Г. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості S-похідних 5-(2-,3-,4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіонів : дис. ... канд. фарм. наук. К., 2006. 98 с.
2. Каплаушенко А. Г. Методи синтезу та біологічна активність 1,2,4-тріазол-3-тіонів. *Укр. біофармац. журн.* 2009. № 4 (4). С. 48–56.
3. Каплаушенко А. Г. Синтез, будова і біологічна активність похідних 4-моно- та 4,5-дизаміщених 1,2,4-тріазол-3-тіону : дис. д-ра фарм. наук. Запоріжжя, 2012. 420 с.
4. Recent approaches for impurity profiling of pharmaceuticals / M. S. Charde, J. Kumar, A. S. Welankiwar, R. D. Chakole. *Int. J. Adv. Pharm.* 2013. Vol. 2 (3). P. 25–33.
5. Георгіївський Г. В. Розробка комплексу фізико-хімічних методик, які забезпечують створення і контроль якості оригінальних вітчизняних препаратів, похідних 1, 2, 4-тріазола. *Запорозж. мед. журн.* 2011. Т. 13, № 1. С. 58–69.
6. Георгієвський Г. В. Аналітичне забезпечення синтезу, стандартизації та організації виробництва похідних 1,2,4-тріазолу та їхніх лікарських форм : дис. ... д-ра фарм. наук. Х., 2013. 420 с.
7. Георгиевский Г. В., Куликов А. Ю. Определение примесей в отечественных субстанциях – производных 1,2,4-триазола – методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. *ФАРМАКОМ.* 2009. № 2. С. 87–98.
8. Оптимізація методики визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну / Л. І. Кучеренко та ін. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2013. № 1. С. 49–53.
9. Фармакокінетичні параметри ін'єкційної форми нового метаболітоетропного препарату «Ангіолін» / О. О. Нагорна та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2014. № 4-5. С. 60–66.

10. Щодо стандартизації таблеток L-лізиний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / О. С. Бідненко, Л. І. Кучеренко, І. А. Мазур, Г. І. Ткаченко. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2016. № 2 (21). С. 38–42.

11. Щодо проведення тесту «Розчинення» для таблеток Гіпертрин із використанням методу ВЕРХ / Л. І. Кучеренко та ін. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2019. № 1 (29). С. 42–46.

12. Щодо стандартизації L-аргініну та тіотриазоліну в модельній суміші методом високоефективної рідинної хроматографії / Л. І. Кучеренко, О. В. Хромильова, Д. Ю. Скорина, Г. І. Ткаченко. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2019. № 1 (29). С. 47–52.

13. Підбір оптимальних умов аналізу штучної суміші ізоніазиду та тіотриазоліну методом високоефективної рідинної хроматографії / Л. І. Кучеренко, О. В. Хромильова, З. Б. Моряк, Г. І. Ткаченко. *Запорозж. мед. журн.* 2014. № 2 (83). С. 118–120.

14. Isolation and Quantitative Determination of New Tuberculostatic 1,2,4 - Triazole Derivative in Urine and Plasma Samples / M. Tatarczak-Michalewska, J. Flieger, M. Wujec, M. Swatko-Ossor. *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2014. URL : <http://www.omicsonline.org/open-access/determination-of-new-tuberculostatic-1-2-4-triazole-derivative-in-urine-and-plasma-samples-2155-9872.1000206.php?aid=31169>.

15. RP-HPLC analysis and in vitro identification of antimycobacterial activity of novel thiosemicarbazides and 1,2,4-triazole derivatives / J. Flieger et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2015. Vol. 107. P. 501–511.

16. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Three Triazole Antifungals in Human Plasma / M. Zhang, G. A. Moore, M. L. Barclay, E. J. Begg. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. № 1. P. 484–489.

17. Sadasivudu P., Shastri N., Sadanandam M. Development and validation of RP-HPLC and UV methods of analysis for fluconazole in pharmaceutical solid dosage form. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2009. № 4. P. 1131–1136.

18. Development, Validation, and Routine Application of a High-Performance Liquid Chromatography Method Coupled with a Single Mass Detector for Quantification of Itraconazole, Voriconazole, and Posaconazole in Human Plasma / L. Baietto et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. № 8. P. 3408–3413.

19. Method for therapeutic drug monitoring of azole antifungal drugs in human serum using LC/MS/MS / J. W. Alffenaar et al. *J. Chromatography B.* 2010. Vol. 878. P. 39–44.

20. Tang P. H. Quantification of Antifungal Drug Voriconazole in Serum and Plasma by HPLC-UV. *Drug Metab. Toxicol.* 2013. URL : <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7609.1000144>.

21. Multiplex Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification in Human Plasma of Fluconazole, Itraconazole, Hydroxyitraconazole, Posaconazole, Voriconazole, Voriconazole-N-Oxide, Anidulafungin, and Caspo / L. A. Decosterd et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. № 12. P. 5303–5315.

22. Bioassay for Determining Voriconazole Serum Levels in Patients Receiving Combination Therapy with Echinocandins / M. Siopi et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. № 60. P. 632–636.

23. Development and validation of a highly sensitive and robust LC–MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma: Application to a bioequivalence study / D. V. Bharathi et al. *J. Chromatography B.* 2008. Vol. 868. P. 70–76.

24. Microbiological Assay and HPLC Method for the Determination of Fluconazole in Pharmaceutical Injectable Formulations / F. Hurtado, M. Souza, J. Melo, C. Rolim. *Latin Am. J. Pharmacy.* 2008. Vol. 27. P. 224–228.

25. Wattananat T., Akarawut W. Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomed. Chromatography.* 2006. Vol. 20. P. 1–3.

26. Simple HPLC Method for Simultaneous Estimation of Fluconazole and Tinidazole in Combined Dose Tablet / D. B. Meshram et al. *J. Chromatographic Sci.* 2009. Vol. 47. P. 885–888.
27. Beste K. Y., Burkhardt O., Kaefer V. Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma. *Clin. Chim. Acta.* 2012. Vol. 413. P. 240–245.
28. Development and Validation of HPLC Method for Analysis of Impurities of Fosfluconazole in Pharmaceutical Product / Qiang Li et al. *Brit. J. Pharm. Res.* 2016. Vol. 13 (1). P. 1–9.
29. Validation of high-performance liquid chromatographic method for analysis of fluconazole in microemulsions and liquid crystals / H. Rocha e Silva et al. *Brazil. J. Pharm. Sci.* 2014. Vol. 50, № 2. P. 381–389.
30. Determination of 1-Bromo-3-Chloropropane, 1-(4-Nitrobenzyl)-1*H*-1,2,4-Triazole, and 1-(Bromomethyl)-4-Nitrobenzene in Rizatriptan Benzoate / N. V. V. S. S. Raman, A. V. S. S. Prasad, K. Ratnakar Reddy, K. Ramakrishna. *Chromatographia.* 2017. Vol. 80. P. 447–452.
31. Validation of an analytical method for 1,2,4-triazole in soil using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry and monitoring of propiconazole degradation in a batch study / A. Blondel, B. Krings, N. Ducat, O. Pigeon. *J. Chromatography A.* 2018. Vol. 1562. P. 123–127
32. Chiral HPLC Method for the Novel Triazole Antitubercular Compound MSDRT 12 / R. Shekar, B. N. Sinha, A. Mukhopadhyaya, M. S. Degani. *Chromatographia.* 2014. Vol. 77. P. 511–516.
33. Chromatographic Evaluation of the Lipophilic Properties of Some 1,2,4-Triazole with Potential Antitumour Activity / A. Pachuta-Stec et al. *J. Liquid Chromatography Relat. Technol.* 2015. Vol. 38, № 12. P. 1199–1206.
34. Development and validation of a useful HPLC-UV method for quantification of total and phosphorylated-ribavirin in blood and erythrocytes of HCV+ patients / A. D'Avolio et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2012. Vol. 66. P. 376–380.

35. Stereoselective separation and determination of the triazole fungicide propiconazole in water, soil and grape by normal phase HPLC / Y. Cheng et al. *Anal. Methods*. 2013. Vol. 5. P. 755–761.
36. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices / I. Timofeeva et al. *Talanta*. 2017. Vol. 167. P. 761–767.
37. Abd-Alrahman S. H., Almaz M. M., Ahmed N. S. Dissipation of Penconazole in Peach, Plum, Apricot, and Mango by HPLC-DAD. *Bull. Environ. Contaminat. Toxicol.* 2013. Vol. 90. P. 260–263.
38. Chernov'yants M. S., Aleshina N. V., Burykin I. V. Chromatographic and electrophoretic determination of thioamides based on thiazole, 1,3,4-thiadiazole, 1,2,4-triazole, and tetrazole. *J. Analyt. Chem.* 2011. Vol. 66, № 3. P. 280–284.
39. Stability-Indicating HPLC–DAD Determination of Ribavirin in Capsules and Plasma / R. S. Haggag, S. F. Belal, I. I. Hewala, O. A. El Rouby. *J. Chromatographic Sci.* 2014. Vol. 52, № 6. P. 493–500.
40. Aydoğmuş Z. Spectrofluorometric and HPLC Determinations of Ribavirin in Capsules Based on Fluorescence Derivatization of the Sugar Moiety. *Analyt. Sci.* 2011. Vol. 27. P. 277–282.
41. HPLC separation of nitrogen-containing compounds on silica gel modified with gold nanoparticles stabilized by chitosan / E. N. Shapovalova et al. *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2012. Vol. 67. P. 72–77.
42. Micellar HPLC and Derivative Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Fluconazole and Tinidazole in Pharmaceuticals and Biological Fluids / F. Belal, M. K. Sharaf El-Din, M. I. Eid, R. M. El-Gamal. *J. Chromatogr. Sci.* 2014. Vol. 52, № 4. P. 298–309.
43. Pushkareva T. I., Zenkevich I. G. HPLC-MS identification of products of difenoconazole electrochemical oxidation in solutions. *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2019. Vol. 74. P. 127–133.

44. Development and application of simple HPLC-UV method for fluconazole quantification in human plasma / K. B. Liew, G. O. K. Loh, Y. T. F. Tan, K. K. Peh. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2012. Vol. 4, № 4. P. 107–111.

45. Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Ribavirin, Sofosbuvir and Daclatasvir in Human Plasma: A Treatment Protocol Administered to HCV Patients in Egypt / A. A. Youssef, N. Magdy, L. A. Hussein, A. M. El-Kosasy. *J. Chromatogr. Sci.* 2019. Vol. 57, № 7. P. 636–643.

46. Chen Q., Zielinski D., Nowak S. A. Fast and sensitive method for the determination of trace 1,2,4-triazole and 4-amino-1,2,4-triazole by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in antifungal drug substance. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* 2018. Vol. 41, № 12. P. 770–779.

47. Usefulness of thin-layer chromatography for the prediction of high-performance liquid chromatographic retention behavior of new 1,2,4-triazole and thiosemicarbazide derivatives / M. Tatarczak, J. Flieger, M. Wujec, M. Pitucha. *J. Planar Chromatography.* 2015. Vol. 28, № 1. P. 24–29.

48. Development of HPLC method for quantitative determination of new perspective APhI with anti-ulcer activity of triazoprazol / N. Saidov et al. *ScienceRise: Pharm. Sci.* 2018. № 6 (16). P. 41–46.

49. Chromatographic and Calculation Methods for Analysis of the Lipophilicity of Newly Synthesized Thiosemicarbazides and their Cyclic Analogues 1,2,4-Triazol-3-thiones / A. M. Hawrył et al. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 26, № 8. P. 1617–1624.

50. Purity analysis method of 1-methyl-3,5-dinitro-1H-1,2,4-triazole / Jin Luo et al. *Chem. Heterocycl. Compounds.* 2017. Vol. 53. P. 1084–1089.

51. Determination of 5-(3-Chlorophenyl)-4-hexyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione in Mouse Brain Tissue by Microwave-Assisted Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection / J. Flieger, M. Pizoń, T. Plech, J. J. Łuszczki. *Analyt. Lett.* 2015. Vol. 48, № 2. P. 318–327.

52. Development and Validation of a Stability-Indicating RP-UPLC Method for Assay of 1-(4-Hydrozinophenyl)methyl-1,2,4-triazole Dihydrochloride and

Estimation of its Related Compounds / P. Srinivas et al. *Asian J. Res. Chem.* 2012. Vol. 5 (11). P. 1409–1412.

53. Synthesis of 3-(Piperidin-4-yl)-6,7-dihydro-5H-pyrrolo-[2,1-c][1,2,4]triazole and Theoretical Study of the Hydrazone-Hydrazine Tautomerism of the Intermediate Hydrazone Product / Q.-Z. Zhang et al. *Rus. J. Org. Chem.* 2019. Vol. 55. P. 1223–1230.

54. Characterization of Hydrazinium 3,5-Dinitroamine-1,2,4-triazole / Kejian Cui et al. *J. Energetic Materials.* 2014. Vol. 32, № 1. P. S60–S70.

55. Abacı G., Rollas S., Tatar E. Development of a New and Efficient Synthesis Method of 1,2,4-Triazole-5-Thione Derivatives. *Marmara Pharm. J.* 2013. Vol. 17. P. 181–186.

56. Combinatorial approach: identification of potential antifungals from triazole minilibraries / Manish Sudesh Bhatia et al. *Med. Chem. Res.* 2011. Vol. 20. P.116–120.

57. Sharonova T., Baykov S., Dorogov M. Synthesis of New 1,2,4-Triazoles Containing Oxadiazole Moiety: Potential Intermediates for Preparation of Ribavirin Analogues. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 2016. Vol. 10 (3). P. 1–5.

58. Synthesis and antimicrobial activity of derivatives of 4-amino-5-(4-tertbutylphenyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol / I. Aksenova, A. Panasenko, E. Knysh, N. Polishchuk. *Фармац. журн.* 2019. № 6. С. 62–68.

59. Telescoped continuous flow generation of a library of highly substituted 3-thio-1,2,4-triazoles / M. C. F. C. B. Damião et al. *React. Chem. Eng.* 2017. Vol. 2. P. 896–907.

60. Daryaei I. Trisubstituted-1,2,4-Triazoles: Novel Scaffolds for the Development of Somatostatin Subtype-4 Receptor (sst4) Ligands : PhD Thesis / Department of Chemistry in the Graduate School Southern Illinois University Edwardsville, 2011. 220 p.

61. Syrovaya A. O., Chalenko N. N., Demchenko A. M. The Synthesis of Potential Anti-Inflammatory Substances among 4-Amino-5-(Pyridin-4-yl)-1,2,4-

Triazole(4H)-3-yl-Thioacetamides and their Chemical Modification. *Der Pharma Chemica*. 2016. Vol. 8 (21). P. 17–21.

62. Hotsulia A. S., Knysh Ye. H. Synthesis, structure and properties of 7'-((4-amino-5-thio-1,2,4- triazole-3-yl)methyl)theophylline derivative. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2020. Т. 13, № 2 (33). С. 176–184.

63. Самелюк Ю. Г. Синтез та дослідження біологічно активних похідних 1,2,4-тріазол-3-тіону, що містять метоксифенільні замісники : дис. ... канд. фарм. наук. Запоріжжя, 2016. 235 с.

64. Сафонов А. А. Синтез, фізико-хімічні властивості похідних 2-((4-аміно-5-(тіофен2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетогідразидів. *Фармац. журн*. 2016. № 5. С. 31–36.

65. Safonov A. A., Panasenko O. I., Knysh Ye. G. Синтез, фізико-хімічні властивості солей 2-((4-(R-аміно)-5-(тіофен-2-ілметил)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетатних кислот. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2017. Т. 10, № 3 (25). С. 259–263.

66. Синтез і фізико-хімічні властивості 2-((4-R-3-(морфолінометил)-4H-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот / Р. О. Щербина, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, Б. О. Варинський. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2014. № 3 (16). С. 18–21.

67. Discovery of [1,2,4]Triazole Derivatives as New Metallo- β -Lactamase Inhibitors / Chen Yuan et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25 (56). P. 1–15.

68. 5-Амино-3-метилтіо-1,2,4-тріазол, как ключевой полупродукт в синтезе противовирусного препарата Триазавирин®: синтез в промышленном масштабе и количественное определение методом ВЭЖХ / А. А. Тумашов и др. *Бутлеровские сообщения*. 2015. Т. 43, № 7. С. 12–17.

69. Влияние природы сорбента на удерживание производных 1,2,4-триазола и 1,2,4-триазина в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / И. Н. Карасева, М. О. Карасев, О. Н. Нечаева, С. В. Курбато. *Журн. физич. химии*. 2019. Т. 93, № 1. С. 128–136.

70. Баклыков А. В. Методика определения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида 1-аргининия моногидрата – действующего вещества лекарственного препарата «триазид» – методом ВЭЖХ. *Разработка и регистрация лек. средств*. 2018. № 2. С. 78–83.

71. Pitucha M., Matysiak J., Senczyna B. Synthesis and RP HPLC studies of biologically active semicarbazides and their cyclic analogues 1,2,4-triazol-3-ones. *Monatsh. Chem.* 2012. Vol. 143. P. 657–667.

72. Determination of lipophilicity of some new 1,2,4-triazole derivatives by RP-HPLC and RP-TLC and calculated methods / A. M. Hawrył et al. *Curr. Chem. Lett.* 2015. Vol. 4. P. 101–110.

73. Bollmann U. E., Badawi N. A fast and simple SPE-LC-MS/MS procedure for extraction and quantitative analysis of 1,2,4-triazole, N,N-dimethylsulfamide, and other small polar organic compounds in groundwater. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2020. Vol. 412. P. 5683–5693.

74. Курнышева Ю. П., Рыжкин С. А., Курбатова С. В. Влияние строения производных 1,2,4-триазола на их сорбцию гиперкарбом в условиях ОФ ВЭЖХ. *Бутлеровские сообщения*. 2019. Т. 59, № 7. С. 76–84.

75. Mroczek T., Plech T., Wujec M. Novel Concept of Discrimination of 1,2,4-Triazole-3-thione and 3-Thiol Tautomers. *J. Chromatogr. Sci.* 2017. Vol. 55, № 2. P. 117–129.

76. Study on Quantitative Analysis Method by HPLC of 3-Amino-1,2,4-Triazole / Xiongxiang Wei et al. *Hans J. Chem. Engineer. Technol.* 2019. Vol. 9 (1). P. 32–36.

77. Розробка методів якісного та кількісного визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату / А. Г. Каплаушенко та ін. *Запорж. мед. журн.* 2009. № 1. С. 79–81.

78. Розробка методу кількісного аналізу основної речовини і можливих - домішок у субстанції морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію) ацетату / А. Г. Каплаушенко та ін. *Фармац. журн.* 2010. № 2. С. 49–53.

79. Каплаушенко А. Г. Вивчення фармакокінетики морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетату. *Фармац. журн.* 2013. № 6. С. 88–92.

80. Бушуєва І. В. Технологічні аспекти виробництва 1% ін'єкційного розчину «Авесстим». *ScienceRise: Pharm.Sci.* 2015. № 2. С. 101–103.

81. Визначення залишкових кількостей активної діючої речовини препарату «Авесстим» у сироватці крові, м'ясі та органах птиці / І. В. Бушуєва та ін. *Вісник Сумського нац. аграрного ун-ту.* 2014. № 1. С. 192–198.

82. Сравнительное фармакокинетическое исследование лекарственных форм с морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио] ацетатом / И. В. Бушуева, В. В. Гладышев, А. И. Панасенко, Е. Г. Кныш. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2014. № 3 (16). С. 56–59.

83. Якісне та кількісне визначення піперидиній 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1, 2, 4-тріазол-3-ілтіо] ацетату 1% та 2,5% розчинах / В. В. Парченко та ін. *Запорозж. мед. журн.* 2009. № 3. С. 111–112.

84. Розробка методики кількісного визначення піперидинію 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо] ацетату в субстанції / В. В. Парченко та ін. *Укр. біофармац. журн.* 2009. № 4. С. 44–45.

85. Spectrophotometric determination of a substance trifusol in a veterinary suppository / К. Н. Klosova et al. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2020. Т. 13, № 1 (32). С. 46–50.

86. Кількісне визначення трифузолу в 2,5% ін'єкційному розчині спектрофотометричним методом / Н. М. Борисенко та ін. *Фармац. журн.* 2020. Т. 75, № 1. С. 65–71.

87. Варинський Б. О. Застосування математичного планування експерименту для оптимізації умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС. *Фармац. журн.* 2014. № 6. С. 54–62.

88. Brereton R. G. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. West Sussex : John Wiley & Sons Inc., 2002. 489 p.

89. Хамханов К.М. Основы планирования эксперимента : метод. пособие. Улан-Удэ, 2001. 50 с.
90. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems / S. L. Ferreira et al. *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1158. P. 2–14.
91. Hibbert D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B*. 2012. Vol. 910. P. 2–13.
92. Шлементьева О. В., Слепченко Г. Б., Австриевских А. Н. Контроль содержания водорастворимых витаминов в биологически активных добавках, пищевых продуктах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Заводская лаборатория*. 2008. № 6. С. 6–9.
93. Chemometrically Assisted Development and Validation of LC-UV and LC-MS Methods for Simultaneous Determination of Torasemide and its Impurities / Z. Jovic et al. *J. Chromatogr. Sci.* 2012. Vol. 50. P. 324–334.
94. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH guideline Q2 (R1), ICH, 2005. URL : http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
95. Jia Ch.-P., Feng F. Optimization of the Separation and Determination of Nitidine and Chelerythrine in *Zanthoxylum nitidum* by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. Sci.* 2014. Vol. 52. P. 164–168.
96. Improvement of the Chromatographic Separation of Several 1,4-Dihydropyridines Calcium Channel Antagonist Drugs by Experimental Design / A. B. Baranda, N. Etxebarria, R. M. Jiménez, R. M. Alonso. *J. Chromatogr. Sci.* 2005. Vol. 43. P. 505–512.
97. Influence of sample and mobile phase composition on peptide retention behaviour and sensitivity in reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry / V. Houbart et al. *J. Chromatogr. A*. 2013. Vol. 1314. P. 199–207.

98. Experimental Design in Chromatographic Analysis of Pramipexole and its Impurities / B. Jančić, M. Medenica, D. Ivanovć, A. Malenović. *Acta Chim. Slov.* 2007. Vol. 54. P. 49–54.

99. Harang V., Karlsson A., Josefson M. Liquid chromatography method development and optimization by statistical experimental design and chromatogram simulations. *Chromatographia*. 2001. Vol. 54, № 11-12. P. 703–709.

100. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops / P. D. Kalariya, D. Namdev, R. Srinivas, S. Gananadhamu. *J. Saudi Chem. Soc.* 2014. Vol. 21, Sup.1. P. S373-S382.

101. Chemometrically Assisted Development and Validation of LC-UV and LC-MS Methods for Simultaneous Determination of Torasemide and its Impurities / Z. Jovic et al. *J. Chromatogr. Sci.* 2012. Vol. 50. P. 324–334.

102. Open-access liquid chromatography-mass spectrometry in a drug discovery environment / L. M. Mallis et al. *J. Mass Spectrom.* 2002. Vol. 37. P. 889–896.

103. Benayad Z., Gómez-Cordovés C., Es-Safi N. E. Characterization of Flavonoid Glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Crude Seeds by HPLC-DAD-ESI/MS Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. P. 20668–20685.

104. Determination of cefcapene acid by LC-MS and their application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers / H.-F. Duan et al. *J. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 3, № 2. P. 84–92.

105. LC-ESI-MS method for the determination of dexamethasone acetate in skin of nude mouse / L. Li et al. *J. Chromatogr. B.* 2013. Vol. 933. P. 44–49.

106. Cremin P., Kasim-Karakas S., Waterhouse A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J. Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49. P. 1747–1750.

107. Gratz S. R., Flurer Ch. L., Wolnik K. A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *J. Pharm. Biomed.* 2004. Vol. 36. P. 525–533.

108. Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS / Lan-Fang Huang et al. *J. Pharm. Biomed.* 2003. Vol. 33. P. 1155–1162.

109. LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*) / Long-Ze Lin et al. *J. Agric. Food Chem.* 2000. Vol. 48. P. 354–365.

110. Mohrhaus A. S., Gratz S. R. Identification and Determination of Carisoprodol in Tablets by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Microgram J.* 2004. Vol. 2, № 1/4. P. 36–41.

111. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages / Sh. A. Lazarus et al. *J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47. P. 3693–3701.

112. High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Study of Ginkgolic Acid in the leaves and Fruits of the Ginkgo Tree (*Ginkgo biloba*) / X.-g. He et al. *J. Chromatogr. Sci.* 2000. Vol. 38. P. 169–173.

113. Simultaneous determination of primaquine and carboxyprimaquine in plasma using solid phase extraction and LC-MS assay / M. Page-Sharpa et al. *J. Chromatogr. B.* 2012. Vol. 902. P. 142–146.

114. Pharmacokinetic Study of Guanfu Base G in Rats by LC-ESI-MS / R. Wang, X. Li, B. Wan, Y. Chu. *J. Chromatogr. Sci.* 2014. Vol. 52. P. 1016–1020.

115. Reversed-phase HPLC retention data in correlation studies with lipophilicity molecular descriptors of carotenoids / S. O. Podunavac-Kuzmanović, L. R. Jevrić, A. N. Tepić, Z. Šumić. *Hem. Ind.* 2013. Vol. 67, № 6. P. 933–940.

116. Nasal A., Kaliszan R. Progress in the use of HPLC for evaluation of lipophilicity. *Curr. Comp.-Aided Drug Design.* 2006. Vol. 2. P. 327–340.

117. Fast log P determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detections / Y. Henchoz et al. *Analit. Bioanalit. Chem.* 2009. Vol. 394, № 7. P. 1919–1930.

118. Lipophilicity determination of highly lipophilic compounds by liquid chromatography / A. Guillot et al. *Chem. Biodiversity.* 2009. Vol. 6, № 11. P. 1828–1836.

119. Perisic-Janjic N., Kaliszan R., Wiczling P. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with in silico molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8, № 2. P. 555–563.

120. Simultaneous determination of pKa and lipophilicity by gradient RP HPLC / P. Wiczling et al. *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78, № 1. P. 239–249.

121. Zheng B., West L. M. Estimating the Lipophilicity of Natural Products using a Polymeric Reversed Phase HPLC Method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2009. Vol. 33, № 1. P. 118–132.

122. ElogPoct: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery / F. Lombardo et al. *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43. P. 2922–2928.

123. Determination of Lipophilicity of New Thiosemicarbazide and 1,2,4-triazole-3-thione Derivatives Using Reversed-Phase HPLC Method and Theoretical Calculation / A. Hawrył et al. *J. Liq. Chrom. R. T.* 2015. Vol. 38. P. 430–437.

124. ElogDoct: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. 2. Basic and Neutral Compounds / F. Lombardo et al. *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44. P. 2490–2497.

125. Snyder L. R., Dolan J. W. High-Performance Gradient Elution The Practical Application Of The Linear-Solvent-Strength Model. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2007. 461 p.

126. Simultaneous Analysis of Xanthone Glycosides in *Halenia elliptica* by HPLC-DAD-ESI-MS / Xia Liu, Yong Liu, Juan Chen, Yan-Ping Shi. *J. Chrom. Sci.* 2010. Vol. 48. P. 76–80.

127. Approaches to model the retention and peak profile in linear gradient reversed-phase liquid chromatography / J. J. Baeza-Baeza, C. Ortiz-Bolsico, J. R. Torres-Lapasió, M. C. García-Álvarez-Coque. *J. Chrom. A*. 2013. Vol. 1284. P. 28–35.

128. Prediction of log k_w using MCIS and LSER methods for heterocyclic nitrogen compounds / Li Li et al. *J. Liq. Chrom R. T.* 1999. Vol. 22, N 6. P. 897–907.

129. Linford M. R., Teutenberg Th., Clark J. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part I: Benefits and Practical Considerations. *LCGC Europe*. 2013. Vol. 2, № 26. P. 78–85.

130. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part II: Basic Thermodynamics of Elevated Temperature LC, Including the van't Hoff Relationship / L M. Rinford, D. S. Jensen, Th. Teutenberg, J. Clark. *LCGC North Am.* 2012. Vol. 30, № 11. P. 992–998.

131. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part III: A Closer Look at the van't Hoff Equation / M. R. Linford, D. S. Jensen, Th. Teutenberg, J. Clark. *LCGC North Am.* 2012. Vol. 30, № 12. P. 1052–1057.

132. Enantiomeric Separation and Thermodynamic investigation of (R)-5-[1-(4-Nitrobenzylsulfonyloxy)-ethyl]-5-(pyridine-2-yl)-[1,3,4]-thiadiazole, a Key Intermediate of Nafithromycin / P. R. Vipul et al. *Analyt. Chem. Lett.* 2019. Vol. 9, № 5. P. 625–633.

133. Separation of atropisomers by chiral liquid chromatography and thermodynamic analysis of separation mechanism / Ling Zhang et al. *J. Pharm. Analysis*. 2017. Vol. 7. P. 156–162.

134. Study of the mechanism of enantioseparation Part VI: Thermodynamic study of HPLC separation of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a (S,S) Whelk-O 1 column / J. Dungelov et al. *J. Separation Sci.* 2004. Vol. 27, № 12. P. 983.

135. Sensitive liquid chromatography mass spectrometry determination of isoniazid: elimination of matrix effects / J. E. Agbokponto et al. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2014. № 8. P. 1228–1234.

136. A liquid chromatography/tandem mass-spectrometry method for the simultaneous quantification of isoniazid and ethambutol in human plasma / X. Chen, et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. Vol. 19. P. 2591–2596.

137. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of isoniazid in human plasma / L. Huang et al. *J. Chromatogr. B.* 2009. Vol. 877. P. 285–290.

138. Direct injection of solid-phase extraction eluents onto silica columns for the analysis of polar compounds isoniazid and cetirizine in plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry / A. C. Li et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 18. P. 2343–2350.

139. Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / S. H. Song et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. Vol. 21. P. 1331–1338.

140. Eswaran S., Adhikari A. V., Shetty N. S. Synthesis and antimicrobial activities of novel quinoline derivatives carrying 1,2,4-triazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 11. P. 4637–4647.

141. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsipi. *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 31. P. 5856–5867.

142. Salionov V. A., Varynskyi B. A., Parchenko V. V. Mass-spectrometric fragmentation of sodium 2-(4-methyl-5-(thiophene-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetate. *Запорож. мед. журн.* 2015. № 5. С. 93–96.

143. Identification of Alprazolam and its degradation products using LC-MS-MS / A. R. Gonsalves et al. *ARKIVOC.* 2010. № 5. P. 128–141.

144. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: Synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities / U. Salgın-Gökşen et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2007. Vol. 15. P. 5738–5751.

145. Synthesis of some novel thiourea derivatives obtained from 5-[(4-aminophenoxy)methyl]-4-alkyl/aryl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones

and evaluation as antiviral/anti-HIV and anti-tuberculosis agents / I. Küçükgül et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2008. Vol. 43. P. 381–392.

146. Synthesis and structure elucidation of some new thioether derivatives of 1,2,4-triazoline-3-thiones and their antimicrobial activities / N. N. Gülerman et al. *Il Farmaco*. 2001. Vol. 56. P. 953–958.

147. Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver / A. R. Shalabya et al. *Food Chem.* 2011. Vol. 124 (4). 1660–1666. DOI : 10.1016/j.foodchem.2010.07.048.

148. Determination of florfenicol residues in broiler meat and liver samples using RP-HPLC with UV-visible detection / A. Nasim et al. *J. Sci. Food Agric.* 2016. Vol. 96 (4). P. 1284–1288. DOI : 10.1002/jsfa.7220.

149. Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin / F. Tajabadi, M. Ghambarian, Y. Yamini, N. Yazdanfar. *Talanta*. 2016. Vol. 160. P. 400–409. DOI : 10.1016/j.talanta.2016.07.03.

150. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry / R. Draiscia et al. *J. Chromatogr. A*. 1997. Vol. 777. P. 201–211.

151. Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J. K. Finzi, J. L. Donato, M. Sucupira, G. De. Nucci. *J. Chromatogr. B*. 2005. Vol. 824. P. 30–35.

152. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens / N. Gorla et al. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1997. № 8. P. 253–256.

153. Chu P. S., Wang R. Ch., Chu H. V. Liquid Chromatographic Determination of Fluoroquinolones in Egg Albumen and Egg Yolk of Laying Hens Using Fluorometric Detection. *J. Agricult. Food Chem.* 2002. Vol. 50. P. 4452–4455.

154. Christodoulou E. A., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for

the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *J. Chromatogr. B.* 2007. Vol. 859. P. 246–255.

155. Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial / H. De Ruyck, H. De Ridder, R. Van Renterghem, F. Van Wambeke. *Food Additives Contaminants.* 1999. Vol. 16. P. 47–56.

156. Rokka M., Peltonen K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. *Food Additives Contaminants.* 2006. Vol. 23 (5). C. 470–478.

157. Development of a Rapid LC-MS-MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken / B. Shao et al. *Chromatographia.* 2009. Vol. 69 (9). P. 1083–1088.

158. 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. Vol. 529. P. 47–51.

159. Determination of benzimidazole residues and their metabolites in raw milk using high performance liquid chromatography-diode array detection / M. Denžić Lugomer, D. Pavliček, N. Bilandžić, D. Majnarić. *Mljekarstvo.* 2017. Vol. 31, № 3. P. 231–238. DOI : 10.15567/mljekarstvo.2017.0308.

160. Determination of phenolic and salicylanilide anthelmintics in liquid milk by high performance liquid chromatography / W. Wang et al. *Chinese J. Chromatogr.* 2013. Vol. 31, № 10. P. 1028. DOI : 10.3724/sp.j.1123.2013.03006.

161. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of 10 cephalosporins and desacetylcefapirin in milk / X. Hou et al. *J. Chromatogr. B.* 2013. Vol. 931. P. 6–11. DOI : 10.1016/j.jchromb.2013.05.006.

162. Determination of ten aminoglycoside residues in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Q. Gong et al. *Chinese J. Chromatogr.* 2013. Vol. 30, № 11. P. 1143–1147. DOI : 10.3724/sp.j.1123.2012.06024.

163. Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk / P. Moudgil et al. *Food Analytical Methods*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 338–346. DOI : 10.1007/ s12161-018-1365-0.

164. Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC / N. Al-Afy et al. *J. Chromatogr. B*. 2015. Vol. 1092. P. 480–488. DOI : 10.1016/j. jchromb.2018.06.049.

165. Sagirli O., Demirci S., Önal A. A very simple high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of gemifloxacin in human breast milk. *Luminescence*. 2015. Vol. 30, № 8. P. 1326–1329. DOI : 10.1002/bio.2901.

166. Rapid method for quantification of nine sulfonamides in bovine milk using HPLC/MS/MS and without using SPE / C. Nebot et al. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141, № 3. P. 2294–2299.

167. Mesoporous graphitic carbon nitride as an efficient sorbent for extraction of sulfonamides prior to HPLC analysis / J. Wenqi et al. *Microchimica Acta*. 2019. Vol. 186, № 5. P. 279.

168. Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines / N. Gissawong, S. Boonchiangma, S. Mukdasai, S. Srijaranai. *Talanta*. 2019. Vol. 200. P. 203–211.

169. Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. Методи ВЕРХ і ВЕРХ-МС в аналізі лікарських речовин в плазмі та сироватці крові : монографія. Запоріжжя : ЗДМУ, 2019. 300 с.

170. Simultaneous determination of isoniazid and pyrazinamide in plasma by high performance liquid chromatography / A. A. Mahjoub et al. *Tropical J. Pharm. Res*. 2016. Vol. 11. P. 2475–2481.

171. Yahdiana H., Baskara A., Harmita. Method Validation of Esomeprazole Analysis in Human Plasma using High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array. *J. Young Pharmacists*. 2017. № 9. P. s24–s28.

172. Simultaneous Analytical Method Development of 6-Mercaptopurine and 6-Methylmercaptopurine in Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array / H. Yahdiana, A. Nurul, A. Rizka, Supandi. *J. Young Pharmacists*. 2017. № 9. P. 29–34.

173. Determination of ibuprofen in human plasma with minimal sample pretreatment / M. Ganesan, K. Rauthan, Y. Pandey, P. Tripathi. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2010. № 5. P. 120–127.

174. Sataraddi S. R., Nandibewoor S. T. RP-HPLC method for the determination of 5-fluorouracil in pharmaceutical formulations and spiked human plasma. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2010. № 12. P. 164–169.

175. Validation and application of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for letrozole in human plasma / C. Joshi, S. Vishnubhatla, S. Chakkirala, S. Mannam. *Asian Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011. № 2. C. 107–112.

176. LC/MS/MS method for the simultaneous estimation of losartan potassium and irbesartan in rat plasma / S. Prasad et al. *Int. J. Pharmacy Pharm. Sci.* 2009. № 1. P. 206–215.

177. Simultaneous Determination of Celecoxib, Erlotinib, and its Metabolite Desmethyl-Erlotinib (OSI-420) in Rat Plasma by Liquid chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Positive/Negative Ion-Switching Electrospray Ionisation / S. R. Thappali et al. *Scientia Pharmaceutica*. 2012. Vol. 80 (3). P. 633–646.

178. Development and Validation of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Estimation of Amlodipine and Valsartan in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study / H. Jangala, P. Vats, A. Khuroo, T. Monif. *Scientia Pharmaceutica*. 2014. № 3. P. 585–600.

179. Simple and sensitive HPLC-UV method for determination of bexarotene in rat plasma. *J. Chromatography B*. 2017. Vol. 1040. P. 73–80.

180. Farnoudiyan-Habibi A., Jaymand M. Development and validation of a quantitative assay for the determination of cinacalcet and its main metabolites in human plasma using RP-HPLC method. *Microchem. J.* 2017. Vol. 130. P. 377–383.

181. A simple HPLC-UV method for the determination of ciprofloxacin in human plasma / J. Vella, F. Busuttill, N. S. Bartolo et al. *J. Chromatography B*. 2015. Vol. 989. P. 80–85.

182. A validated RP-HPLC method for the determination of rosuvastatin in presence of sacubitril/valsartan in rat plasma: Application to in vivo evaluation of OATP-mediated drug interaction potential between rosuvastatin and sacubitril/valsartan / B. Moussa, H. Hashem, M. Mahrouse, S. Mahmoud. *Microchem. J*. 2018. Vol. 143. P. 31–38.

183. Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step for the determination of sildenafil in human plasma / H. Al-Hroub, B. Alkhawaja, E. Alkhawaja, T. Arafat. *J. Chromatography B*. 2016. Vol. 1009. P. 1–6.

184. Ebeid K., Ho G. N., Salem A. HPLC-UV method for simultaneous determination of MK-1775 and AZD-7762 in both acetonitrile-aqueous solution and mouse plasma. *J. Chromatography B*. 2017. Vol. 1044. P. 70–76.

185. A simple and rapid RP-HPLC method for the simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in human plasma / J. Veillette, S. Winans, S. Forland, V. Maskiewicz. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2016. Vol. 131. P. 80–86.

186. Determination of trovafloxacin and marbofloxacin in sheep plasma samples by HPLC using UV detection / A. Mahmood et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2012. Vol. 62. P. 220–223.

187. Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient / S. Goutal et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2016. Vol. 123. P. 173–178.

188. Suneetha A., Sharmila D. Method development and validation for the estimation of idelalisib in rabbit plasma by HPLC. *Int. J. Pharm. Sci. Res*. 2016. Vol. 12. P. 4998–5005.

189. RP-HPLC method for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in combined tablet dosageform and in spiked human plasma / R. B.mardia, B. N. Suhagia, T. Y. Pasha, S. P. Chauhan. *Int. J. Pharm. Sci. Res*. 2014. № 8. P. 3443–3454.

190. Mathur M., Kusum Devi V. Design of experiment utilization to develop and validate high performance liquid chromatography technique for estimation of pure drug and marketed formulations of atorvastatin in spiked rat plasma samples. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2017. № 4. P. 1708–1716.

191. Pallerla S., Prabhakar B. Bio analytical method development and validation of temozolomide in rat plasma using RP-HPLC method. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2016. № 3. P. 1298–1301.

192. Optimization and validation of high performance liquid chromatography-ultra violet method for quantitation of metoprolol in rabbit plasma: application to pharmacokinetic studies / A. Yaqoob, M. Ahmad, R. S. Sarfraz, A. Mahmood. *Tropical J. Pharm. Res.* 2016. № 10. P. 2245–2252.

193. Elgawish M. S., Mostafa S. M., Elshanawane A. A. Simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone in spiked human plasma. *Saudi Pharm. J.* 2011. № 1. P. 43–49.

194. HPLC-UV method development for atorvastatin calcium micro-emulsion determination in rat plasma and its application to elucidate pharmacokinetic behavior after oral administration to rats / L. Hu, W. Song, H. Zhang, D. Gu. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2013. № 10. P. 3839–3844.

195. Validated High Performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Cefadroxil Monohydrate in Human Plasma / N. Rahim et al. *Tropical J. Pharm. Res.* 2014. № 6. P. 975–979.

196. High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Anethole in Rat Plasma / V. Fagundes et al. *Tropical J. Pharm. Res.* 2014. № 5. P. 793–799.

197. A Simple HPLC Bioanalytical Method for the Determination of Doxorubicin Hydrochloride in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Studies / S. Dharmalingam, S. Ramamurthy, K. Chidambaram, S. Nadaraju. *Tropical J. Pharm. Res.* 2014. № 3. P. 409–415.

198. Simultaneous quantitative determination of zidovudine and nevirapine in human plasma using isocratic, reverse phase high performance liquid

chromatography / V. Kabra, V. Agrahari, C. Karthikeyan, P. Trivedi. *Tropical J. Pharm. Res.* 2009. № 1. P. 79–86.

199. Development and validation of RP-HPLC-UV method for the determination of Glipizide in human plasma / M. Atif et al. *J. Young Pharm.* 2013. № 1. P. 26–29.

200. Muralidharan S., Jayaraja Kumar K., Parasuraman S. Simple and sensitive method for the analysis of ketorolac in human plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Young Pharm.* 2013. № 3. P. 98–101.

201. Development and validation of RP-HPLC method with ultraviolet detection for estimation of montelukast in rabbit plasma: Application to preclinical pharmacokinetics / O. Ranjan et al. *J. Young Pharm.* 2013. № 4. P. 133–138.

202. HPLC determination of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6' dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (ddb) and co-administered diuretics as an extemporaneous mixture in human plasma / E. Hassan et al. *Asian J. Pharm. Res. Health Care.* 2010. № 1. P. 33–41.

203. Soyinka J. O., Ademisoye A. A., Onyeji C. O. A rapid and sensitive HPLC method for the analysis of progunail and cycloguanil in plasma: application to single dose pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Res. Health Care.* 2009. N 1. P. 2–24.

204. Simple and rapid validated HPLC-fluorescence determination of perampanel in the plasma of patients with epilepsy / S. Mohamed, C. Candela, R. Riva, M. Contin. *Pract. Lab. Med.* 2018. № 10. P. 15–20.

205. Ultrasensitive determination of pyrroloquinoline quinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence detection using the redox cycle of quinone / M. Fukuda et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2017. Vol. 145. P. 814–820.

206. Determination of total and free ceftolozane and tazobactam in human plasma and interstitial fluid by HPLC-UV / A. Kratzer et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2017. Vol. 163. P. 34–38.

207. Legrand T., Rakotoson M., Galactéros F. Determination of hydroxyurea in human plasma by HPLC-UV using derivatization with xanthidrol. *J. Chromatography B.* 2017. Vol. 1064. P. 85–91.

208. Ragab G., Bahgat E. Development of bioanalytical HPLC method for simultaneous determination of the antialzheimer, donepezil hydrochloride and the antidepressant, citalopram hydrobromide in raw materials, spiked human plasma and tablets dosage form. *Annales Pharm. Françaises*. 2018. Vol. 585. P. 1–9.

209. Simultaneous HPLC determination of alfuzosin, tamsulosin and vardenafil in human plasma and pharmaceutical formulations using time programmed fluorescence detection / M. Walash et al. *Annales Pharm. Françaises*. 2018. Vol. 580. P. 1–10.

210. Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: validation and stability / D. Kim et al. *Asian J. Pharm. Sci*. 2016. Vol. 16. P. 1–27.

211. Simultaneous determination of doxorubicin and its dipeptide prodrug in mice plasma by HPLC with fluorescence detection / J. Han et al. *J. Pharm. Analysis*. 2015. Vol. 15. P. 1–17

212. Xie L., Li X., Jiang D. Determination and pharmacokinetic study of catechin in rat plasma by HPLC. *J. Pharm. Analysis*. 2011. № 1. P. 297–301.

213. Anderson G., Eighmie J. The determination of 5-methoxytryptophan in human plasma *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 17. P. 1–17.

214. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection / B. Martinc et al. *J. Chromatography B*. 2014. Vol. 962. P. 82–88.

215. Helmy S., Bedaiwy H. A new and simple HPLC method for determination of etamsylate in human plasma and its application to pharmacokinetic study in healthy adult male volunteers. *Saudi Pharm. J*. 2013. Vol. 21. P. 405–410.

216. Petteys B., Frank E. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clin. Chim. Acta*. 2011. Vol. 412. P. 38–43.

217. Curticapean A., Imre S. New validated method for piracetam HPLC determination in human plasma. *J. Biomed. Biophys. Methods*. 2007. Vol. 69. P. 273–281.

218. Optimization and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of dobutamine in rat plasma: Pharmacokinetic studies in healthy rat subjects / R. Thippani et al. *J. Pharm. Analysis*. 2013. Vol. 2013. P. 343–439.

219. Salunkhe N. H., Jadhav N. R., Bhinge S. D. Validated RP-HPLC method for quantification of felodipine in rabbit plasma: Application in a bioequivalence study. *Annales Pharm. Françaises*. 2019. Vol. 77. P. 15–27.

220. Haneef J., Gulati M., Chadha R. Development of green bioanalytical hplc method for estimation of irbesartan in rat plasma: Towards greener chromatographic science. *Sustainable Chem. Pharm.* 2018. Vol. 10. P. 84–88.

221. FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine / M. Locatell et al. *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 1095. P. 204–213.

222. Design of experiments-based RP - HPLC bioanalytical method development for estimation of Rufinamide in rat plasma and brain and its application in pharmacokinetic study / A. V. Dalvi, C. T. Uppuluri, E. P. Bommireddy, P. R. Ravi. *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 1102. P. 74–82.

223. Ishaq B., Babu D., Munna S. Quantification of tapentadol in rat plasma by HPLC with photo diode array detection: Development and validation of a new methodology. *Future J. Pharm. Sci.* 2017. № 3. P. 46–52.

224. HPLC-HG-AFS determination of arsenic species in acute promyelocytic leukemia (APL) plasma and blood cells / M. Guo, W. Wang, X. Hai, J. Zhou. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2017. Vol. 145. P. 356–363.

225. Development of an HPLC-UV assay method for the simultaneous quantification of nine antiretroviral agents in the plasma of HIV-infected patients / N. Charbe et al. *J. Pharm. Analysis*. 2016. № 6. P. 396–403.

226. Bioanalytical method development for quantification of ulifloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma by solid-phase extraction (SPE) and HPLC with PDA detection / V. Ferrone, M. Carlucci, P. Palumbo, G. Carlucci. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2016. Vol. 123. P. 205–212.

227. Investigation of anti-Hepatitis C virus, sofosbuvir and daclatasvir, in pure form, human plasma and human urine using micellar monolithic HPLC-UV method and application to pharmacokinetic study / D. Zidan, W. Hassan, M. Elmasry, A. Shalaby. *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 1086. P. 73–81.

228. Detection and quantification of the selective EP4 receptor antagonist CJ-023423 (grapiprant) in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection / V. Vito et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2016. Vol. 118. P. 251–258.

229. Jacobson G. A., Martinod S., Cunningham C. P. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2006. Vol. 40. P. 1249–1252.

230. Salama I. Simultaneous HPLC-UV analysis of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *Bull. Faculty Pharmacy*. 2011. Vol. 49. P. 19–24.

231. Sensitive inexpensive chromatographic determination of an antimicrobial combination in human plasma and its pharmacokinetic application / E. I. El-Kimary, E. F. Khamis, S. F. Belal, M. M. Abdel Moneim. *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 11097. P. 94–100.

232. Determination and pharmacokinetics of gastrodin in human plasma by HPLC coupled with photodiode array detector / X. Hai Ju et al. *J. Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 1982–1986.

233. Simultaneous analysis of amoxicillin and sulbactam in human plasma by HPLC-DAD for assessment of bioequivalence / Q. Pei et al. *J. Chromatography B*. 2000. Vol. 879. P. 2011.

234. Giorgi M., Meizler A., Mills P. Quantification of tapentadol in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection: Development and validation of a new methodology. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2012. Vol. 67. P. 148–153.

235. Highly sensitive HPLC method for assay of aliskiren in human plasma through derivatization with 1-naphthyl isocyanate using UV detection / F. Belal, M. Walash, N. El-Enany, S. Zayed. *J. Chromatography B*. 2013. Vol. 933. P. 24–29.

236. Validation of a method for the simultaneous quantification of chloroquine, desethylchloroquine and primaquine in plasma by HPLC-DAD / L. Zuluaga-Idárraga, N. Yepes-Jiménez, C. López-Córdoba, S. Blair-Trujillo. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2014. Vol. 95. P. 200–206.

237. Prakash K., Adiki S., Kalakuntla R. Development and Validation of a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Determination of Zileuton in Human Plasma. *Scientia Pharmaceutica*. 2014. № 3. P. 571–583.

238. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantitation of tofacitinib, cabozantinib and afatinib in human plasma and urine / A. A. Kadi et al. *Tropical J. Pharm. Res.* 2016. № 12. P. 2683–2692.

239. Siddiraju S., Presanth M. L.L., Sirisha T. A novel LC-MS/MS assay for methylprednisolone in human plasma and its pharmacokinetic application / S. Siddiraju, M. Lazar Lal Prasanth, T. Sirisha. *Asian J. Pharm. Sci.* 2016. № 11. P. 459–468.

240. Suneetha A., R. Rajeswari K. Estimation of teriflunomide along with concomitant drugs in different biological matrices USING LC-MS/MS. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015. № 6. P. 1915–1923.

241. Development and Validation of Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy Method for Quantitative Analysis of Naproxen in Human Plasma after Liquid-Liquid Extraction / N. Sahoo, M. Sahu, P. Rao, G. Ghosh. *Tropical J. Pharm. Res.* 2014. № 9. P. 1503–1510.

242. Wani T., Zargar S. New Highly-Sensitive Ultra-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Method for Quantification of Telmisartan in Human Plasma. *Tropical J. Pharm. Res.* 2015. № 3. P. 511–518.

243. Ammari W. Quantitation of Solifenacin in Human Plasma using a Specific and Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technique. *Tropical J. Pharm. Res.* 2015. № 5. P. 845–851.

244. Profiling and Identification of the Metabolites of Evodiamine in Rats using Ultra-Performance Liquid Chromatography with Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer / F. P. Wu et al. *Tropical J. Pharm. Res.* 2016. № 3. P. 623–629.

245. Kumar Dasari P., Rao Darapaneedi S. Picogram level quantification of varenicline in human plasma samples by LC-ESI-MS/MS. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2016. № 6. P. 2510–2517.

246. Rao T. N., Sankar G. G., Rani L. J. High throughput LC-MS/MS method for the quantitation of linagliptin in human plasma by solid phase extraction using 96 well plate format. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2016. № 3. P. 1321–1330.

247. Darwish H. W., Attwa M. W., Kadi A. A. Rapid validated liquid chromatographic method coupled with Tandem mass spectrometry for quantification of nintedanib in human plasma. *Tropical J. Pharm. Res.* 2016. № 11. P. 2467–2473.

248. Determination of tranexamic acid in human plasma by UHPLC coupled with tandem mass spectrometry targeting sub-microgram per milliliter levels / L. Barreiros et al. *Microchem. J.* 2019. Vol. 144. P. 144–150.

249. Quantitative determination of dobutamine in newborn pig plasma samples by HPLC-MS/MS / O. E. Albóniga et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2017. Vol. 145. P. 178–185.

250. Determination of fenticonazole in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetic studies / W. Mao et al. *J. Pharm. Analysis.* 2017. № 7. P. 63–70.

251. Simultaneous determination of Pyragrel, a novel anti-thrombotic agent, and its two primary metabolites in plasma by HPLC-MS/MS / G. Yang et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2018. Vol. 156. P. 199–205.

252. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma / J. Lagoutte-Renosi et al. *J. Chromatography B.* 2018. Vol. 1100–1101. P. 43–49.

253. Development of a HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nifedipine and lidocaine in human plasma / A. Grigoriev, A. Nikitina, I. Yaroshenko, A. Sidorova. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2016. Vol. 131. P. 13–19.

254. Nikitina A., Grigoriev A., Sidorova A. HPLC-MS/MS method for troventol determination in human plasma and its application to biological samples. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2017. Vol. 143. P. 237–240.

255. Determination of marbofloxacin in plasma and synovial fluid by ultrafiltration followed by HPLC-MS/MS / C. Montesano et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2015. Vol. 123. P. 31–36.

256. Determination of panduratin A in rat plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / M. Kim et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2017. Vol. 137. P. 151–154.

257. Quantitative determination of xanthorrhizol in rat plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / S. Choi et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2017. Vol. 132. P. 56–59.

258. A simple and sensitive HPLC-MS/MS method for quantification of eggmanone in rat plasma and its application to pharmacokinetics / C. Xie et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2015. Vol. 153. P. 37–43.

259. A simple UHPLC-MS/MS method for the determination of liensinine and isoliensinine in rat plasma / L. Peng et al. *J. Chromatography B*. 2015. Vol. 991. P. 29–33.

260. Quantification of hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine in human plasma by HPLC-MS/MS / A. A. Sanford et al. *J. Chromatography B*. 2018. Vol. 1095. P. 112–118.

261. Yang H., Li C., Chen Z. Determination of chidamide in rat plasma and cerebrospinal fluid. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 2018. Vol. 98. P. 24–30.

262. HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of MB07133 and its metabolites, cytarabine and arabinofuranosyluracil, in rat plasma / D. Wang et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2016. Vol. 120. P. 228–234.

263. Determination of deltonin in rat plasma by using HPLC-MS/MS and the application of this method in pharmacokinetic studies / D. Du et al. *J. Chromatography B*. 2013. Vol. 931. P. 1–5.

264. Sensitive determination of the peptide AP301 – A motif of TNF- α – From human plasma using HPLC-MS/MS / D. Mascher, W. Tscherwenka, H. Mascher, B. Fischer. *J. Chromatography B*. 2012. Vol. 908. P. 18–22.

265. Rapid and sensitive HPLC-MS/MS method for quantitative determination of lycorine from the plasma of rats / X. Liu et al. *J. Chromatography B*. 2015. Vol. 974. P. 96–100.

266. An HPLC tandem mass spectrometry for quantification of ET-26-HCl and its major metabolite in plasma and application to a pharmacokinetic study in rats / X. Chen et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2018. Vol. 149. P. 381–386.

267. HPLC-MS/MS analysis of ilimaquinone and its application in a pharmacokinetic study in rats / H. Son et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2019. 2019 Vol. 166. P. 291–294.

268. An HPLC-MS/MS method for quantitation of Gly-MCA in mouse plasma: Application to a pharmacokinetic study / J. Liu et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2017. Vol. 146. P. 53–58.

269. Highly sensitive determination of alendronate in human plasma and dialysate using metal-free HPLC-MS/MS / M. Yamada et al. *Legal Medicine*. 2018. Vol. 30. P. 14–20.

270. Quantitation of ligupurpurosides B and C in rat plasma using HPLC-MS/MS / Q. Chen et al. *Chinese J. Natural Med.* 2016. Vol. 14. P. 473–480.

271. A selective HPLC-MS/MS method for quantification of SND-117 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study / Bei-Hua Bao et al. *J. Chromatography B*. 2017. Vol. 1052. P. 60–65.

272. Simultaneous determination of leucine, isoleucine and valine in Beagle dog plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study / T. Wang et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2015. Vol. 114. P. 426–432.

273. A new quantitation method of protodioscin by HPLC-ESI-MS/MS in rat plasma and its application to the pharmacokinetic study / X. Zhang et al. *Steroids*. 2016. Vol. 106. P. 62–69.

274. Pharmacokinetic study of four flavones of Glycyrrhiza in rat plasma using HPLC-MS / Y. Wu, X. Meng, Y. Bao, S. Wang. *J. Ethnopharmacol.* 2013. Vol. 148. P. 266–270.

275. Man F., Choo C. HPLC-MS/MS method for bioavailability study of bruceines D & E in rat plasma. *J. Chromatography B.* 2017. Vol. 1063. P. 183–188.

276. Pharmacokinetics, tissue distribution, and plasma protein binding study of chicoric acid by HPLC-MS/MS / Y. Wang et al. *J. Chromatography B.* 2016. Vol. 1031. P. 139–145.

277. A validated HPLC-MS method for quantification of the CCR5 inhibitor maraviroc in HIV+ human plasma / M. Simiele et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2014. Vol. 94. P. 65–70.

278. Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study / Y. Li et al. *J. Chromatography B.* 2012. Vol. 907. P. 27–33.

279. Quantitative bioanalytical assay for the tropomyosin receptor kinase inhibitor larotrectinib in mouse plasma and tissue homogenates using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / R. W. Sparidans et al. *J. Chromatography B.* 2018. Vol. 1102. P. 167–172.

280. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of jaceosidin in rat plasma / W. Y. Song, N. J. Kim, S. Y. Kim, H. S. Lee. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2009. Vol. 49. P. 381–386.

281. Quantification of cabazitaxel in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry: A practical solution for non-specific binding / P. de Bruijn et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2012. Vol. 59. P. 117–122.

282. Validated bioanalytical method for the quantification of RGB-286638, a novel multi-targeted protein kinase inhibitor, in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry / P. de Bruijn et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2009. Vol. 50. P. 977–982.

283. Quantification of tamoxifen and three of its phase-I metabolites in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry / L. Binkhorst et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2011. Vol. 56. P. 1016–1023.

284. Bioanalytical method for the quantification of sunitinib and its n-desethyl metabolite SU12662 in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry / P. de Bruijn et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2010. Vol. 51. P. 934–941.

285. Effective on-line extraction of drugs from plasma using a restricted-access media column in column-switching HPLC equipped with a dilution system: Application to the simultaneous determination of ER-118585 and its metabolites in canine plasma / E. Yamamoto, T. Kato, N. Mano, N. Asakawa. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2009. Vol. 49. P. 1250–1255.

286. Simultaneous quantification of dextromethorphan and its metabolites dextrorphan, 3-methoxymorphinan and 3-hydroxymorphinan in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry / W. J. Loos et al. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2011. Vol. 54. P. 387–394.

287. Determination of cefadroxil in rat plasma and urine using LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic and urinary excretion studies / H. Jin et al. *J. Chromatography B*. 2014. Vol. 947. P. 103–110.

288. An LC-MS/MS method for quantification of the active abiraterone metabolite $\Delta(4)$ -abiraterone (D4A) in human plasma / M. van Nuland et al. *J. Chromatography B*. 2017. Vol. 1068. P. 119–124.

289. Determination of norelgestromin in rabbit plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of ORTHO EVRA® / X. Liu et al. *J. Chromatography B*. 2009. Vol. 877. P. 311–315.

290. Schwertner H. A. Liquid chromatographic mass spectrometric (LC/MS/MS) determination of plasma hydroxocobalamin and cyanocobalamin concentrations after hydroxocobalamin antidote treatment for cyanide poisoning /

H. A. Schwertner, S. Valtier, V. S. Bebart. *J. Chromatography B*. 2012. Vol. 905. P. 10–16.

291. Sillén H., Cook M., Davis P. Determination of unbound ticagrelor and its active metabolite (AR-C124910XX) in human plasma by equilibrium dialysis and LC-MS/MS. *J. Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P. 2315.

292. Simultaneous measurement of whole blood vitamin B1 and vitamin B6 using LC-ESI-MS/MS / R. Roelofsen-de Beer et al. *J. Chromatography B*. 2017. Vol. 1063. P. 67–73.

293. Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats / J. Xie et al. *J. Chromatography B*. 2008. Vol. 864. P. 87–94.

294. Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile / W. Li et al. *J. Chromatography B*. 2014. Vol. 963. P. 113–118.

295. LC-ESI-Q-TOF-MS for faster and accurate determination of microcystins and nodularins in serum / M. Neffling, L. Spoof, M. Quilliam, J. Meriluoto. *J. Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 2433–2441.

296. Potential bias and mitigations when using stable isotope labeled parent drug as internal standard for LC-MS/MS quantitation of metabolites / W. Jian et al. *J. Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 3267–3276.

297. Simultaneous UFLC-ESI-MS/MS determination of piperine and piperlonguminine in rat plasma after oral administration of alkaloids from *Piper longum* L.: Application to pharmacokinetic studies in rats / J. Liu, Y. Bi, R. Luo, X. Wu. *J. Chromatography B*. 2011. Vol. 879. P. 2885–2890.

298. Sehrawat R., Maithani M., Singh R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. *Chromatographia*. 2010. Vol. 72 (1/2). P. 1–6.

299. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review / M. Blessy et al. *J. Pharm. Analysis*. 2014. Vol. 4 (3). P. 159–165.

300. Stress Testing of Drug Substances and Drug Products / S. Klick et al. *Pharm. Technol.* 2005. Vol. 29 (2). P. 48–66.

301. Rawat T., Pandey I. P. Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products- Scientific and Regulatory Considerations. *J. Pharm. Sci. Res.* 2015. Vol. 7 (5). P. 238–241.

302. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies / D. W. Reynolds et al. *Pharm. Technol.* 2002. Vol. 26 (2). P. 48–66.

303. Chakravarthy V. A., Sailaja B. B. V., Kumar A. P. Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Enrofloxacin and Its Degradation Products in Tablet Dosage Forms. *J. Analyt. Methods Chem.* 2015. Vol. 2015. P. 1–11.

304. Stress degradation studies of dronedarone in pharmaceutical dosage form by a validated stability-indicating LC method / V. K. Ahirrao et al. *J. Chilean Chem. Soc.* 2012. Vol. 57 (3). P. 1272–1276.

305. Patel J. K., Patel N. K. Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Ambrisentan and Tadalafil in Pharmaceutical Dosage Form. *Scientia Pharmaceutica.* 2014. Vol. 82. P. 749–763.

306. ICH, 2003. ICH guidelines Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2). URL : <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>.

307. Bhardwaj S. P., Singh S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. Vol. 46 (1). P. 113–120.

308. Nageswara R. R., Ramachandra B., MastanVali R. Satyanarayana S. R. LC-MS/MS studies of ritonavir and its forced degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. Vol. 53 (4). P. 833–842.

309. Forced Degradation Study to Develop and Validate Stability-Indicating RP-LC for Quantification of Ropinirole Hydrochloride in Its Modified Release

Tablets / G. Parmar, S. Sharma, K. Singh, G. Bansal. *Chromatographia*. 2009. Vol. 69. P. 199–206.

310. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. 556 с.

311. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. Доповнення 1. 2004. 520 с.

312. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. 620 с.

313. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1-е вид. Доповнення 3. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. 280 с.

314. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1-е вид. Доповнення 4. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. 540 с.

315. Державна Фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. 1128 с.

316. Державна Фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. 1128 с.

317. Державна фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т. 2. 724 с.

318. Державна фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т. 3. 732 с.

319. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Strasbourg : Council of Europe. 2020.

320. Biopharmaceutics Coordinating Committee in the Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation (Guidance for industry) / Biopharmaceutics Coordinating Committee in the Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) ; USA: Food and Drug Administration, 2018. 41 p.

321. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation / Committee for Medicinal Products for Human Use. London : European Medicines Agency, 2011. 23 p.

322. Валидація біоаналитического методу : метод. рекомендації / Міністерство здравоохоранення України, ГП «Государственный экспертный центр». К., 2013. URL : http://www.dec.gov.ua/site/file_uploads/ua/Bioekvivalentnist/method_validation.pdf.

323. Ізоніазид. URL : <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3290/izoniazid>.

324. Furan-2-carbohydrazide(3326-71-4). URL : https://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7747649_EN.htm.

325. A13619 2-Methoxybenzhydrazide, 98+%. URL : <https://www.alfa.com/en/catalog/A13619/>

326. Synthesis and anti-Candidal activity of N-(4-aryl/cyclohexyl)-2-(pyridine-4-yl carbonyl) hydrazinecarbothioamide / Mashooq Ahmad Bhat et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 24, № 5. P. 1299–1302.

327. Парченко В. В. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості в ряді 5-фурилзаміщених 1,2,4-тріазол-3-тіонів : дис. ... д-ра фарм. наук. Запоріжжя, 2014. 460 с.

328. 3H-1,2,4-Triazole-3-thione,1,2-dihydro-5-(4-pyridinyl)- CAS 1477-24-3. URL : <https://www.guidchem.com/encyclopedia/3h-1-2-4-triazole-3-thione-1-2-dic154065.html>.

329. Панасенко О. І. Синтез, перетворення, фізикохімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-тріазолу : дис. ... д-ра фарм. наук. К., 2005. 396 с.

330. Щербина Р. О. Синтез і фізико-хімічні властивості в ряду солей 2-((4-*R*-3-(морфолінометилен)-4Н-1,2,4-тріазол-5-іл)тіо)ацетатних кислот. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2017. № 1. С. 4–8.

331. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду гідразидів карбонових кислот і 2-ацилгідразинкарботіоамідів методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Фармац. журн.* 2015. № 4. С. 59–64.

332. Варинський Б. О., Базилева Х. А., Легкодух В. Г. Оптимізація умов МС детекції при ВЕРХ-МС визначенні похідних 1,2,4-тріазола. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення* : зб. тез міжнар. наук.-практ. конф. К., 2014. С. 122–123.

333. Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів для ПІА-ЕСІ-МС та ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Вісник фармації*. 2016. № 1. С. 7–10.

334. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-іл-тіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Одеський мед. журн.* 2015. № 4. С. 17–21.

335. Takino M. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibacterial drugs in chicken tissue by LC-ESI-MS, Agilent Technologies, 2003. (application note).

336. Варинський Б. О. Дослідження характеристик утримування ряду гідразидів карбонових кислот і гідразинокаботіоамідів, вихідних речовин при синтезі субстанцій для виготовлення лікарських засобів методом ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС. *Проблеми військової охорони здоров'я* : зб. наук. праць Укр. військово-мед. академії. 2015. № 43. С. 320–330.

337. Варинський Б. О. Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів - напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фармаком*. 2016. № 1. С. 32–40.

338. Вивчення закономірностей утримування потенційних лікарських субстанцій ряду 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ / ДМД-МС / Б. О. Варинський та ін. *Журн. органічної та фармацев. хімії*. 2015. № 4. С. 68–72.

339. Георгієвський Г. В. Аналітичне забезпечення синтезу, стандартизації та організації виробництва похідних 1,2,4-тріазолу та їх лікарських форм : автореф. дис. на здобуття ступеня д-ра фарм. наук. Х., 2013. 42 с.

340. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. В. П. Георгиевского. Х. : НТМТ, 2012. Т. 2. 474 с. Т.3. 520 с.

341. Sigma-Aldrich. Product Specification. Water with 0.1 % formic acid - LC-MS CHROMASOLV®. Product Number: 34673 / Sigma-Aldrich. SigmaAldrich. URL : http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/34/34673/34673-BULK-R_FLUKA_.pdf.

342. Шатц В. Д., Сахартова О. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига : Зинатне, 1988. 390 с.

343. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Practical HPLC Method Development. 2nd ed. WileyInterscience, 1997. 542 p.

344. Рудаков О. Б., Рудакова Л. В. Обобщенные критерии элюирующей способности растворителей в высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2012. № 6. С. 231–239.

345. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Zidan F. Al. Development And Validation of HPLC-DAD Method Of Determination Morpholin-4-ium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate In A Bulk Drug. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2018. № 9. P. 2200–2209.

346. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug. *Запорозж. мед. журн.* 2017. № 3. С. 373–380.

347. Пат. на корисну модель 130584 Україна, МПК G01N 30/02 (2006.01). Спосіб кількісного хроматографічного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № u201807689 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.12.18, Бюл. 23.

348. Пат. на винахід 118707 Україна, МПК (2019.01) G01N 30/00, G01N 33/15 (2006.01), G01N 32/2258 (2018.01), B01D 15/00. Спосіб кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в субстанції морфолін-4-ій 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № u 2017 01062 ; заявл. 06.02.17 ; опубл. 25.02.19, Бюл. № 4.

349. Варинський Б. О., Леонтъев Д. А., Каплаушенко А. Г. Створення фармакопейного стандартного зразка морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю, 23-24 вер. 2020 р. Т., 2020. С. 4.

350. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтъев, Н. Н. Денисенко, Ю. В. Подпружников. *Фармаком.* 2004. № 3. С. 3–17.

351. Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, піперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл] тіо) ацетату, та його домішок : метод. МОЗ України / І. Я. Коцюмбас та ін. К., 2017. 19 с.

352. Varynskiy B. O., Parchenko V. V., Kaplaushenko A. G. Development and validation of HPLC-DAD method of determination piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in 1% solution. *Запорозж. мед. журн.* 2017. № 6. P. 827–832.

353. Пат. на корисну модель 131316 Україна, МПК (2006) G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-

тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. № u201807671 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.01.19, Бюл. № 1.

354. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Metabolism study of morpholinium 2- ((4- (2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl) -4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio) acetate. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2020. Vol. 33, № 2. P. 72–75.

355. Hales T. C. An overview of the Kepler conjecture. URL : <https://arxiv.org/pdf/math/9811071.pdf>.

356. Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду гідразидів деяких органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботіоамідів / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко, М. М. Малецький, Ю. В. Тімошик. *Укр. біофармац. журн.* 2015. № 6 (41). С. 60–71.

357. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. ESI-MS fragmentation pathways of some 1,2,4-triazole-3-thiones, the intermediate compounds in the synthesis of active pharmaceutical ingredients. *J. Org. Pharm. Chem.* 2020. Vol. 18, № 1. P. 22–33.

358. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Parchenko V. Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolylthioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018. Vol. 10. P. 303–312.

359. Пат. на корисну модель 130873 Україна, МПК (2006) C07D 413/12 (2006.01), G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, А. Г. Каплаушенко, В. В. Парченко. № u201807659 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 26.12.18, Бюл. № 24

360. Разработка и валидация методики определения активного ингредиента препарата «авесстим» в яйцах птицы / Б. А. Варинский и др. *Azerbaijan Pharm. Pharmacother. J.* 2017. Т. 17 (2). С. 10–17.

361. Development and validation of a LC-ESI-MS method for detection of piperidin-1-ium {[5-(2-furyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio} acetate residues in poultry eggs / B. Varynskyi et al. *J. Fac. Farm. Ankara.* 2016. Vol. 40 (3). P. 29–40.

362. 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 / Б. О. Варинський та ін. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2015. № 2 (18). С. 25–31.

363. Розробка методики визначення та дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у молоці корів через 12 годин після введення / Б. О. Варинський та ін. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2019. № 2. С. 153–159.

364. Tietze L F., Eicher Th. Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungs laboratorium. 2. Aufl. Stuttgart ; NewYork : Georg Thieme Verlag, 1991. DM 68, 672 s.

365. Varynskyi B. O. ВЕРХ-МС дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1, 2, 4-тріазол-3-іл) тіо) ацетату. *J. Org. Pharm. Chem.* Vol. 18, № 3. P С. 49–54.

366. Пругло Є. С. Синтез та біологічні властивості 3-S-заміщених 5-Alk-(Ar-, Het)-4(H)-R-1,2,4-тріазолу : дис. ... д-ра фарм. наук. Запоріжжя, 2019. 43 с.

367. Shcherbyna R. An investigation of the pharmacokinetics and potential metabolites of potassium 2-((4-amino-5-(morfolinometyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate on rats. *Ankara Univ. Eczacilik Fak. Derg.* 2020. Vol. 44 (2). P. 233–241.

368. A handbook of bioanalysis and drug metabolism / ed. by G. Evans. Boca Raton. London ; N.Y. ; Washington : CRC PRESS, 2004. P. 223–258, 259, 312.

369. Визначення можливих метаболітів деяких S-похідних 1,2,4-тріазолу / В. В. Парченко та ін. *Укр. біофармац. журн.* 2010. № 5 (10). С. 32–37.

370. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М. : Бином, Лаборатория знаний, 2003. 258 с.

371. Benoit F., Holmes J. L. The mass spectra of carboxylic acids-I: fragmentation mechanisms in maleic and fumaric acids and related compounds. *Organic Mass Spectrometry*. 1969. Vol. 2. P. 591–601.


372. Holmes J. L., Benoit F. The mass spectra of carboxylic acids-III: the structures of molecular and fragment ions in benzoic acid and related molecules. *Organic Mass Spectrometry*. 1970. Vol. 4. P. 97–107.

373. Ansher S. S., Jakoby W. B. Amine N-methyltransferases from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261 (9). P. 3996–4001.

374. Formation of quaternary amines by N-methylation of azaheterocycles with homogeneous amine N-methyltransferases / P. A. Crooks et al. *Biochem. Pharmacol.* 1988. Vol. 37 (9). P. 1673–1677.

Додаток А

УКРАЇНА



СВІДОЦТВО
про реєстрацію авторського права на твір

№ 96527

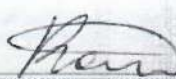
Монографія "Методи ВЕРХ та ВЕРХ-МС в аналізі лікарських речовин в плазмі і сироватці крові"
(вид, назва службового твору)

Автор(и) Варинський Борис Олександрович, Каплаушенко Андрій Григорович
(повне ім'я, псевдонім (за наявності))

Авторські майнові права належать **Варинський Борис Олександрович, вул. Цитрусова, 6, кв. 70, м. Запоріжжя, 69071; Каплаушенко Андрій Григорович, вул. Зернова, 30, кв. 6, м. Запоріжжя, 69121; Запорізький державний медичний університет, пр-т Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035**
(повне ім'я фізичної та/або повне офіційне найменування юридичної особи, адреса)

Дата реєстрації **05.03.2020**

**Заступник Міністра розвитку економіки,
торгівлі та сільського господарства
України Д. О. Романович**





Додаток Б.1

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Генеральний директор ТОВ
"НАУКОВО-ВИРОБНИЧА ФІРМА
"БРОВАФАРМА", заслужений
працівник ветеринарної медицини
України, доктор ветеринарних наук,
професор Березовський А.В.



10 грудня 2018 р.

Акт впровадження

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методика кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнту препарату «Авесстим» в яйцях птиці.
2. **Установа розробник:** Запорізький державний медичний університет, кафедра фізикоїдної хімії і кафедра токсикологічної та неорганічної хімії.
3. **Автори:** Борис О. Варинський, Володимир В.Парченко, Євгеній Г.Книш, Олександр І. Панасенко, Андрій Г. Каплаушенко .
4. **Джерело інформації:** Разработка и валидация методики определения активного ингредиента препарата «Авесстим» в яйцах птицы / [Б. Варинский, В. Парченко, Е. Книш та ін.]. // Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal. – 2017. – №2.
5. **Де та коли впроваджено:** в науково-дослідний процес ТОВ «БРОВАФАРМА», 2018 рік.
6. **Ефективність впровадження:** методика дозволяє визначати залишкові кількості активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Авесстим» в яйцях птиці, що має важливе значення при розробці рекомендацій до застосування препарату.
7. **Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

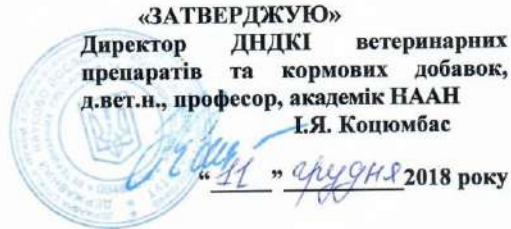
Відповідальний за впровадження:

Директор департаменту якості та впровадження, к.с.-г. Н.



М.В. Розпутній

Додаток Б.2

**КАРТКА ЗВОРотноГО зв'язку**

Щодо впровадження методики кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Трифузол» та його домішок

1. Назва пропозиції для впровадження: Методики кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Трифузол» та його домішок.

2. Установа розробник: Запорізький державний медичний університет, кафедра фізіологічної хімії та кафедра токсикологічної та неорганічної хімії.

3. Автори:

1) І. Я. Коцюмбас, Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, В. В. Парченко.

2) Б. О. Варинський, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш.

4. Джерело інформації:

1) Методичні рекомендації МОЗ України. Коцюмбас І. Я., Варинський Б. О., Панасенко О. І., Книш Є. Г., Парченко В. В. Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, піперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл] тїо}ацетату, та його домішок, Київ – 2017, 19 с.

2) Development and validation of a LC-ESI-MS method for detection of piperidin-1-ium {[5-(2-furyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio}acetate residues in poultry eggs / [B. Varynskyi, V. Parchenko, A. Kaplaushenko та ін.]. // Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. – 2017. – №3. – С. 29–40.

5. Де та коли впроваджено:

В науково-дослідний процес ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, 2018 рік. (протоколи засідання Вченої ради: № 2 від 20. 03. 2018 р. та № 7 від 30. 10. 2018 р.).

6. Ефективність впровадження: Дана розробки є важливою для удосконалення ветеринарно-санітарного контролю за безпечністю продовольчої продукції. Вона дозволяють визначати якість субстанції препарату «Трифузол», а також залишкові кількості активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Трифузол» в яйцях птиці, що має важливе значення при розробці рекомендацій до застосування препарату.

7. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-триазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Заступника директора Інституту
з наукової роботи, д.вет.н.

В. П Музика

Додаток Б.3



02125, Україна, м. Київ, вул. Старосільська, 1-У, тел./факс: (044) 503-08-40 (багатоканальний), E-mail: ufk@i.kiev.ua

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Директор
ТОВ «Українська
фармацевтична компанія»
Дуда С.М.

“ 8 ” 09 2020 р.


Акт впровадження

1. Назва пропозиції для впровадження: Методики кількісного визначення та дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та напівпродуктів в його синтезі.
2. Установа розробник: Запорізький державний медичний університет, кафедра фізикоїдної хімії.
3. Автори:
 - 1) В. Varynskyi, А. Karplausenko, F. Al Zidan (Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко, Ф. Ал Зідан)
 - 2) В. О. Varynskyi, А. Г. Karplausenko (Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко)
 - 3) В. О. Varynskyi (Б.О. Варинський)
 - 4) Varynskyi В., Karplausenko А. (Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко)
 - 5) В. О. Varynskyi, А. Г. Karplausenko (Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко)
 - 6) Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко
4. Джерело інформації:
 - 1) Varynskyi В., Karplausenko А., Zidan F. Al. Development And Validation of HPLC-DAD Method Of Determination Morpholin-4-ium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate In A Bulk Drug. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2018. N 9. P. 2200–2209.
 - 2) Varynskyi В. О., Karplausenko А. Г. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug. *Запоріж. мед. журн.* 2017. № 3. С. 373–380.

Додаток В

Міністерство охорони здоров'я України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

УЗГОДЖЕНО
Начальник Управління
фармацевтичної діяльності та
якості фармацевтичної продукції
МОЗ України


Т. М. Ляковський
«» 20 08. 2017 р.

**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ
ПІПЕРИДИНИЙ {[5-(2-ФУРАН)-4-ФЕНІЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-
ІЛ]ТІО)АЦЕТАТУ ТА ЙОГО ДОМІШОК
ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ВЕРХ-ДМД
(методичні рекомендації)**

(146.16/28.17)

Київ – 2017

Додаток Д

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
Державного підприємства
"Український науковий фармакопейний
центр якості лікарських засобів"
доктор хімічних наук, професор
О. І. Гризодуб



« 27 » 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** використання фармакопейного стандартного зразка Державної Фармакопеї України тіометрізолу для ідентифікації та кількісного визначення субстанцій та готових лікарських засобів.
- 2. Установи, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко; Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", Д. А. Леонтєв.
- 3. Джерело інформації:** Б.О. Варинський, Д.А. Леонтєв, А.Г. Каплаушенко. СТВОРЕННЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ЗРАЗКА МОРФОЛІНІЙ 2-((4-(2-МЕТОКСИФЕНІЛ)-5-(ІПРИДИН-4-ІЛ)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ПРО)АЦЕТАТУ. НАУКОВО-ТЕХНІЧНИЙ ПРОГРЕС І ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ СТВОРЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ: матеріали VIII НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ, м. Тернопіль, 23-24 вересня 2020 р., Тернопіль : ТНМУ, 2020. С. 4 -5.
- 4. Де впроваджено:** відділ валідації та стандартних зразків.
- 5. Форма впровадження:** практична діяльність.
- 6. Термін впровадження:** 2020 р.
- 7. Ефект від впровадження:** вперше сертифіковано фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України (ФСЗ ДФУ) тіометріол. Сертифікований ФСЗ ДФУ тіометрізол є придатним для ідентифікації методом ІЧ-спектроскопії й кількісного визначення методом рідинної хроматографії субстанції тіометріолу та готових лікарських засобів на його основі. Наявність відповідного ФСЗ ДФУ є невід'ємною складовою контролю якості лікарських засобів.
- 8. Зауваження, пропозиції:** рекомендуємо введення розробленого ФСЗ ДФУ до номенклатури ФСЗ ДФУ.

Відповідальний за впровадження:

Доктор фармацевтичних наук, старший науковий співробітник,
заступник директора з наукової роботи,
начальник відділу валідації та стандартних зразків
ДП «Український науковий фармакопейний
центр якості лікарських засобів»

Д. А. Леонтєв

Додаток Е.1

«Затверджую»

Проректор з навчальної роботи
Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
проф. Ю.Й. Гумінський

«27» 01 2021 р.

**Акт впровадження**

- 1. Найменування для впровадження:** Спосіб кількісного визначення морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату. Спосіб кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату).
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії, кафедрою природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії
- 3. Автори:** Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко, В.В. Парченко, Є.Г. Книш, О.І. Панасенко
- 4. Джерело інформації:**
 1. Пат. на корисну модель 130873 Україна, МПК (2006) C07D 413/12 (2006.01), G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, А. Г. Каплаушенко, В. В. Парченко. № u201807659 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 26.12.18, Бюл. № 24.
 2. Пат. на корисну модель 131316 Україна, МПК (2006) G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату) / Б. О. Варинський, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. № u201807671 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.01.19, Бюл. № 1.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою фармацевтичної хімії Протокол № 6 від 27.01.2021 р.
- 6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки ВЕРХ методик визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів
- 7. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.
- 8. Термін впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальна за впровадження
Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії
к. фарм. н., доцент

Ющенко Т.І.

Додаток Е.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
 Вищого державного навчального
 закладу України "Запорізький
 державний медичний університет",
 доктор медичних наук, професор
 Туманський В. О.
 "13" 11 2020 р.

Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-іл-тіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС.
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізколоїдної хімії
- 3. Автори:** Б.О. Варинський
- 4. Джерело інформації:**
 Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-іл-тіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Одеський мед. журн.* 2015. № 4. С. 17–21.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедрою аналітичної хімії
 Протокол № 3 від 13.11. 2020 р.
- 6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки ВЕРХ-МС методик визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів
- 7. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальна за впровадження

Завідувач кафедри
 аналітичної хімії
 д. фарм. н., професор

Васюк С. О.

Додаток Е.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Вищого державного навчального
закладу України "Запорізький
державний медичний університет",
доктор медичних наук, професор
Туманський В. О.
" 09 " 2020 р.

Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Вивчення методом ВЕРХ-МС метаболізму 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-івтіо)ацетату).
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізіологічної хімії
- 3. Автори:** Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко
- 4. Джерело інформації:**
Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Metabolism study of morpholinium 2- ((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio) acetate. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2020. Vol. 33, N 2. P. 72–75.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедрою природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії
Протокол № 2 від 21.09 2020 р.
- 6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань дослідження методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх синтезі
- 7. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри природничих дисциплін

для іноземних студентів

та токсикологічної хімії, д.фарм.н. професор

Панасенко О. І.

Додаток Е.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи
Вищого державного навчального
закладу України "Запорізький
державний медичний університет",
доктор медичних наук, професор
Туманський В. О.
" 28 " 2020 р.

Акт впровадження

1. **Найменування для впровадження:** Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів - напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів.
2. **Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії
3. **Автори:** Б.О. Варинський
4. **Джерело інформації:**
Варинський Б. О. Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів - напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фармаком.* 2016. № 1. С. 32–40.
5. **Ким впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедру фармацевтичної хімії
6. **Термін впровадження:** вересень 2020 р. – грудень 2020 р.
7. **Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки ВЕРХ методик визначення похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів
8. **Форма впровадження:** розроблена методика впроваджена в науково-педагогічний процес кафедри фармацевтичного факультету Запорізького державного медичного університету і використовується при роботі аспірантів
9. **Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Протокол засідання кафедри фармацевтичної хімії
Протокол № 1 від 26.08 2020 р.

Відповідальна за впровадження

Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії
д. фарм. н., професор

Кучеренко Л. І.

Додаток Е.5



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор з науково-педагогічної роботи

ЛНМУ ім. Данила Галицького

член-кор. НАМН України,

проф. Гжегоцький М.Р.

“13” _____ 2017 р.

Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Розробка та валідація ВЕРХ-ДМД методики визначення домішок напівпродуктів морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату в субстанції
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії.
- 3. Автори:** доц. Б.О. Варинський, доктор фарм. наук, доц. А.Г. Каплаушенко
- 4. Джерело інформації:** Varynskyi B. O. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug / B. O. Varynskyi, A. G. Kaplaushenko. // Запорізький медичний журнал. – 2017. – №3. – С. 373–380.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і навчальний процес кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, протокол № 6 від 13. 12. 2017 р.
- 6. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу з аналізу похідних 1,2,4-тріазолів і вивчення їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальна за впровадження

Завідувач кафедри токсикологічної

та аналітичної хімії

канд. фарм. наук, доцент

Галькевич І. Й.

Додаток Е.6

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Перший проректор з науково-педагогічної роботи
 ДНМУ ім. Данила Галицького
 член-кор. НАМН України,
 проф. Гжегоцький М.Р.
 20 17 р.


Акт впровадження

- 1. Найменування для впровадження:** Розробка та валідація ВЕРХ-ДМД методики визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо) ацетату в 1 % розчині.
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикохімії.
- 3. Автори:** доц. Б.О. Варинський, доц. В.В. Парченко, доктор фарм. наук, доц. А.Г. Каплаушенко
- 4. Джерело інформації:** Varynskyi B. O. Development and validation of HPLC-DAD method of determination piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in 1 % solution / B. O. Varynskyi, V. V. Parchenko, A. G. Kaplaushenko. // Запорожский медицинский журнал. – 2017. – №6. – С. 827–832.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і навчальний процес кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, протокол № 6 від 13. 12. 2017 р.
- 6. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу з аналізу похідних 1,2,4-тріазолів і вивчення їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальна за впровадження
 Завідувач кафедри токсикологічної
 та аналітичної хімії
 к. фарм. н., доцент



Галькевич І. Й.

Додаток Е.7

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор
з наукової роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
д.мед.н., професор
Наконечний А.Й.



“27” 08 2020 р.

Акт впровадження

1. **Найменування для впровадження:** Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolythioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients (Шляхи фрагментації за допомогою мас-спектрометрії із іонізацією в електроспреї солей деяких 1,2,4-триазолітїоацетатних кислот, активних фармацевтичних інгредієнтів)
2. **Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії, кафедрою природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії
3. **Автори:** В. Varynskyi, А. Kaplaushenko, V. Parchenko, (Б. Варинський, А. Каплаушенко, В. Парченко)
4. **Джерело інформації:** Varynskyi B., Kaplaushenko A., Parchenko V. Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolythioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2018. N 10. P. 303–312.
5. **Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою загальної, біонеорганічної, фізикоїдної хімії 2020 рік
Протокол № 1 від 27 08 2020 р.
6. **Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань ВЕРХ-МС дослідження похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів
7. **Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальна за впровадження
Завідувач кафедри загальної,
біонеорганічної, фізикоїдної хімії
доцент, доктор фармацевтичних наук

Драпак І. В.

Додаток Е.8

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

перший проректор з науково-педагогічної роботи ДЗ «Луганський державний медичний університет»
доктор біологічних наук, доктор медичних наук, професор


Сергій СМІРНОВ
«25» 01 2021 р.

Акт впровадження

1. **Найменування для впровадження:** Визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії.
2. **Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії.
3. **Автори:** Б.О. Варинський
4. **Джерело інформації:** Варинський Б. О. Визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2020. № 3 (34). С. 371–377.
5. **Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою промислової фармації
Протокол № 7 від 25 січня 2021 р.
6. **Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань дослідження термодинамічних характеристик обернено-фазового хроматографічного утримування активних фармацевтичних інгредієнтів, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів
7. **Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

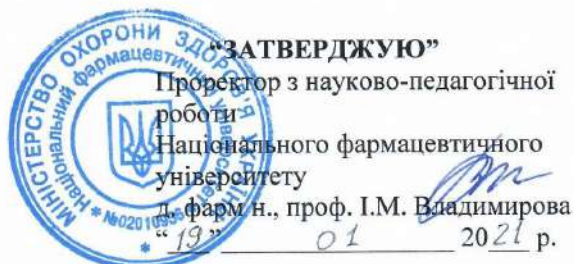
Відповідальний за впровадження

В.о. завідувача кафедри
промислової фармації
ДЗ «Луганський
державний медичний університет»
кандидат технічних наук,
доцент



Андрій БУШУСВ

Додаток Е.9

**Акт впровадження**

1. Найменування для впровадження: Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх синтезі.

2. Ким запропоновано: Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії, кафедрою природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії

3. Автори: Б.О. Варинський, А.Г. Каплаушенко, В.В. Парченко, Є.Г. Книш, О.І. Панасенко

4. Джерело інформації:

1. Вивчення закономірностей утримування потенційних лікарських субстанцій ряду 1,2,4-тріазол-3-ілітіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ/ДМД-МС / Б. О. Варинський, Є. Г. Книш, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, А. Г. Каплаушенко. *J. Org. Pharm. Chem.* 2015. Vol. 13. P. 68–72.

2. Варинський Б. О. Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів - напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фармаком.* 2016. № 1. С. 32–40.

3. Варинський Б. О. Дослідження характеристик утримування ряду гідразидів карбонових кислот і гідразинокарботіоамідів, вихідних речовин при синтезі субстанцій для виготовлення лікарських засобів методом ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС. *Проблеми військової охорони здоров'я : зб. наук. праць Української військово-мед. академії.* 2015. Вип. 43. С. 320–330..

5. Ким і коли впроваджено: в науковий і учбовий процес кафедрою неорганічної та фізичної хімії

Протокол № 8 від 19 січня 2021 р.

6. Ефект від впровадження: удосконалення знань студентів та науковців з питань дослідження методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів та напівпродуктів в їх синтезі

7. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри
 неорганічної та фізичної хімії,
 к.хім.наук, доц.

Голік М. Ю.

Додаток Е.10

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор Вищого
державного навчального закладу
України “Ужгородський
національний університет”, доктор
фізико-математичних наук, професор



Сливка О. Г.

2020 р.**Акт впровадження**

- 1. Найменування для впровадження:** Термодинамічна характеристика обернено-фазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок. Фармац. часопис. 2020. № 3. С. 24–30.
- 2. Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізикоїдної хімії.
- 3. Автори:** Б.О. Варинський
- 4. Джерело інформації:** Варинський Б. О. Термодинамічна характеристика обернено-фазового хроматографічного утримування морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок. Фармац. часопис. 2020. № 3. С. 24–30.
- 5. Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою фармацевтичних дисциплін
Протокол № 4 від 25. червня 2020 р.
- 6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань дослідження термодинамічних характеристик обернено-фазового хроматографічного утримування похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів, потенційних АФІ
- 7. Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри фармацевтичних дисциплін
к.фарм.н, доцент

 Девіняк О. Т.

Продовж. дод. Е.10

- 3) Varynskyi B. O. ВЕРХ-МС дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1, 2, 4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *J. Org. Pharm. Chem.* Vol. 18, № 3. С. 49–54.
- 4) Varynskyi B., Kaplaushenko A. The Force Degradation Study of the Morpholinium 2-((4-(2-Methoxyphenyl)-5-(Pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-Triazol-3-YL)Thio)Acetate. *Indonesian J. Pharmacy.* 2019. Vol 30, N 1. P. 25–34.
- 5) Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Metabolism study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2020. Vol. 33, N 2. P. 72–75.
- 6) Пат. на винахід 118707 Україна, МПК (2019.01) G01N 30/00, G01N 33/15 (2006.01), G01N 32/2258 (2018.01), B01D 15/00. Спосіб кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в субстанції морфолін-4-ій 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № у 2017 01062 ; заявл. 06.02.17 ; опубл. 25.02.19, Бюл. № 4.

5. Де та коли впроваджено: в науково-дослідний процес

Протокол № 5 від 08.09 2020 р.

6. Ефективність впровадження: Дані методики необхідні для стандартизації, контролю та дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату на етапах виробництва, транспортування та зберігання як в субстанції так і в лікарських засобах.
7. Зауваження та пропозиції: продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-тріазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Директор ТОВ «Українська
фармацевтична компанія»



Дуда Сергій Михайлович

Додаток Е.11

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор Івано-
Франківського національного
медичного університету
доктор біологічних наук, професор

Ерестенюк Г.М.
“ 1 2021 р.



Акт впровадження

1. **Найменування для впровадження:** Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок в умовах гідрофільної хроматографії.
2. **Ким запропоновано:** Запорізьким державним медичним університетом, кафедрою фізколоїдної хімії.
3. **Автори:** Б.О. Варинський
4. **Джерело інформації:** Варинський Б. О. Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок в умовах гідрофільної хроматографії. J. Org. Pharm. Chem. 2020. Vol. 18, № 4(72). С. 50–55.
5. **Ким і коли впроваджено:** в науковий і учбовий процес кафедрою фармації
Протокол № 7 від 05.01.2021 р.
6. **Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань дослідження термодинамічних характеристик хроматографічного утримування активних фармацевтичних інгредієнтів, похідних 3-тіо-1,2,4-триазолів
7. **Зауваження та пропозиції:** продовжити роботу по аналізу похідних 1,2,4-триазолів та вивченню їх фізико-хімічних властивостей.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри фармації
д. фарм. н., професор

Грицик А. Р.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Варинський Б. О., Каплаушенко А. Г. Методи ВЕРХ і ВЕРХ-МС в аналізі лікарських речовин в плазмі та сироватці крові : *монографія*. Запоріжжя, 2019. 300 с. (Здобувач провів пошук та опис літературних джерел, підготовку діаграм із пробопідготовки, узагальнення матеріалу, підготовку таблиць).
2. Варинський Б. О. Застосування математичного планування експерименту для оптимізації умов ВЕРХ та ВЕРХ-МС. *Фармац. журн.* 2014. № 5. С. 54–62.
3. Варинський Б. О. Розвиток ВЕРХ-МС як методу оцінювання чистоти і підтвердження молекулярної маси нових біоактивних речовин. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2014. № 2 (15). С. 85–88.
4. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду гідрозидів карбонових кислот і 2-ацилгідрозинкарботіоамідів методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Фармац. журн.* 2015. № 4. С. 59–64.
5. Варинський Б. О. Оптимізація умов детектування ряду 1,2,4-тріазол-3-іл-гіоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Одеський мед. журн.* 2015. № 4. С. 17–21.
6. Варинський Б. О. Дослідження характеристик утримування ряду гідрозидів карбонових кислот і гідрозинокарботіоамідів, вихідних речовин при синтезі субстанцій для виготовлення лікарських засобів методом ВЕРХ-УФ-ЕСІ-МС. *Проблеми військової охорони здоров'я* : зб. наук. праць Української військово-мед. академії. 2015. Вип. 43. С. 320–330.

Продовж. дод. Ж

7. Вивчення закономірностей утримування потенційних лікарських субстанцій ряду 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот та їх солей методом ВЕРХ/ДМД-МС / Б. О. Варинський, Є. Г. Книш, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, А. Г. Каплаушенко. *J. Org. Pharm. Chem.* 2015. Vol. 13, № 4 (52). P. 68–72. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

8. Вивчення закономірностей мас-спектрометричного розпаду гідразидів деяких органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботїоамідів / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко, М. М. Малецький, Ю. В. Тїмошик. *Укр. біофармац. журн.* 2015. № 6 (41). С. 60–71. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

9. 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 фармац. і мед. науки та практики.* 2015. № 2 (18). С. 25–31. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

10. Salionov V. A., Varynskyi B. O., Parchenko V. V. Mas-spectrometric fragmentation of sodium 2-(4-methyl-5-(thiophene-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetate. *Запорозж. мед. журн.* 2015. № 5 (92). С. 93–96. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

11. Варинський Б. О. Вивчення методом ВЕРХ-ДМД-МС закономірностей утримування ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів – напівпродуктів в синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фармаком.* 2016. № 1. С. 32–40.

12. Varynskiy B. O., Kaplaushenko A. G. Optimization of the detection conditions for the Series of 1,2,4-triazole-3-thiones for FIA-ESI-MS and HPLC-ESI-MS. *NEWS OF PHARMACY*. 2016. № 1 (85). С. 7–11. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

13. Varynskiy B. O., Kaplaushenko A. G. The development and validation of HPLC-DMD method for intermediate products impurities determination of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridine-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate in bulk drug. *Запорозж. мед. журн.* 2017. № 3. С. 373–380. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

14. Varynskiy B. O., Parchenko V. V., Kaplaushenko A. G. Development and validation of HPLC-DAD method of determination piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate in 1% solution. *Запорозж. мед. журн.* 2017. Vol. 19, № 6 (105). Р. 827–832. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

15. Розробка методики визначення та дослідження піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату у молоці корів через 12 годин після введення / Б. О. Варинський, Є. О. Карпун, В. В. Парченко, О. І. Панасенко, Б. П. Киричко, І. В. Гиренко. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. 2019. № 2 (30). С. 153–159. (Здобувач спланував дослідження, провів збір даних, провів аналіз та інтерпретацію даних, написання статті).

16. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. ESI-MS fragmentation pathways of some 1,2,4-triazole-3-thiones, the intermediate compounds in the synthesis of active pharmaceutical ingredients. *J. Org. Pharm. Chem.* 2020. Vol. 18, № 1 (69). P. 22–33. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

17. Варинський Б. О. Термодинамічна характеристика обернено-фазового хроматографічного утримання морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок. *Фармац. часопис.* 2020. № 3. С. 24–30.

18. Варинський Б. О. Визначення термодинамічних параметрів морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та його домішок в умовах оберненофазової хроматографії. *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики.* 2020. Т. 13, № 3 (34). С. 371–377.

19. Varynskyi B. O. ВЕРХ-МС дослідження фармакокінетики морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *J. Org. Pharm. Chem.* Vol. 18, № 3 (71). С. 49–54.

20. Варинський Б. О. Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок в умовах гідрофільної хроматографії. *J. Org. Pharm. Chem.* 2020. Vol. 18, № 4 (72). С. 50–55.

21. Development and validation of a LC-ESI-MS method for detection of piperidin-1-ium {[5-(2-furyl)-4-phenyl-4Н-1,2,4-triazol-3-yl]thio} acetate residues in poultry eggs / B. Varynskyi, V. Parchenko, A. Kaplaushenko, O. Panasenko, Ye. Knysh. *J. Fac. Farm. Ankara.* 2016. Vol. 40 (3). P. 29–40. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

22. Разработка и валидация методики определения активного ингредиента препарата «авесстим» в яйцах птицы / Б. А. Варинский, В. В. Парченко, Е. Г. Кныш, А. И. Панасенко, А. Г. Каплаушенко. *Azerbaijan Pharm. Pharmacother. J.* 2017. Т. 17 (2). С. 10–17. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

23. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Parchenko V. Electrospray ionization mass spectrometry fragmentation pathways of salts of some 1,2,4-triazolylthioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018. № 10. P. 303–312. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

24. Varynskyi B., Kaplaushenko A., Zidan F. Al. Development And Validation of HPLC-DAD Method Of Determination Morpholin-4-ium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate In A Bulk Drug. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2018. № 9. P. 2200–2209. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

25. Varynskyi B., Kaplaushenko A. The Force Degradation Study of the Morpholinium 2-((4-(2-Methoxyphenyl)-5-(Pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-Triazol-3-YL)Thio)Acetate. *Indonesian J. Pharmacy.* 2019. Vol 30, N 1. P. 25–34. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

26. Varynskyi B. Piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) acetate forced degradation study. *J. Fac. Pharm. Ankara (Ankara Ecz. Fak. Derg.).* 2019. Vol. 43 (2). P. 117–134.

27. Varynskyi B. O., Kaplaushenko A. G. Metabolism study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio) acetate. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2020. Vol. 33, № 2. P. 72–75. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

28. Пат. на винахід 118707 Україна, МПК (2019.01) G01N 30/00, G01N 33/15 (2006.01), G01N 32/2258 (2018.01), B01D 15/00. Спосіб кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в субстанції морфолін-4-ій 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № у 2017 01062 ; заявл. 06.02.17 ; опубл. 25.02.19, Бюл. № 4. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

29. Пат. на корисну модель 130584 Україна, МПК G01N 30/02 (2006.01). Спосіб кількісного хроматографічного визначення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № у201807689 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.12.18, Бюл. 23. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

30. Пат. на корисну модель 130873 Україна, МПК (2006) C07D 413/12 (2006.01), G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату / Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, А. Г. Каплаушенко, В. В. Парченко. № у201807659 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 26.12.18, Бюл. № 24. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

Продовж. дод. Ж

31. Пат. на корисну модель 131316 Україна, МПК (2006) G01N 30/00. Спосіб кількісного визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату / Б. О. Варинський, В. В. Парченко, А. Г. Каплаушенко, Є. Г. Книш, О. І. Панасенко. № u201807671 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.01.19, Бюл. № 1. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

32. Кучерявий Ю. М., Юрченко І. О., Варинський Б. О. Синтез та мас-спектрометричне дослідження похідних 5R-4R-1-1,2,4-тріазол-3-тіонів. *Інновації в медицині* : тези доповідей 83-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 27-28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 195. (Здобувачем проведено мас-спектрометричне дослідження).

33. Оптимізація умов рідинної хромато-мас-спектрометрії для перевірки молекулярної маси та чистоти синтезованих біологічно активних сполук / Ю. М. Кучерявий, Б. О. Варинський, І. О. Юрченко, Т. М. Литвиненко, А. М. Рудь. *Хімічні Каразінські читання - 2014* : VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів, 22-24 квіт. 2014 р. Х., 2014. С. 126. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження).

34. Варинський Б. О., Базилєва Х. А., Легкодух В. Г. Оптимізація умов МС детекції при ВЕРХ-МС визначенні похідних 1,2,4-тріазола. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення* : збірник тез міжнар. наук.-практ. конф., 7-8 листоп. 2014 р. К., 2014. С. 122–123. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

35. Варинський Б. А., Баланська Т. Ю. Розробка способу кількісного хроматографічного визначення специфічних домішок в піперидиній{[5-(2-фуран)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл]тіо)ацетату. *Сучасні Тенденції 2015* : тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії, 7-9 жовт. 2015 р. К., 2015. С. 152. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

36. Варинський Б. О., Матвієнко Л. Б., Гулий А. А. Методика визначення залишкової кількості піперидинію 2-[5-(фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо] ацетату в яйцях птиці за допомогою ВЕРХ-ЕСІ-МС. *Сучасні Тенденції 2017* : тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії, 18-21 жовт. 2017 р. К., 2017. С. 180. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

37. Варинський Б. О., Матвієнко Л. Б. Порівняльна характеристика методик визначення похідних 1,2,4-тріазола в яйцях птахів. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : Всеукр. наук.-практ. конф., 18-25 квіт., 30 трав. 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 146. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

38. Усенко Д., Варинський Б. О. Вивчення деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетата в стресових умовах. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації 2019* : збірник тез доповідей наук.-практ. конф. з міжнар. участю молодих вчених та студентів, 13-17 трав. 2019 р. Запоріжжя, 2019. С. 156. (Здобувачем проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

39. Варинський Б. О. Дослідження метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетата. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, 19-20 верес. 2019 р. Х., 2019. Т. 1. С. 319.

40. Варинський Б. О., Леонтьев Д. А., Каплаушенко А. Г. Створення фармакопейного стандартного зразка морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю, 23-24 вер. 2020 р. Т., 2020. С. 4. (Здобувачем проведено хроматографічні дослідження, участь в підготовці тез).

41. Варинський Б. О. Вибір оптимальних умов розділення деяких похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів, активних фармацевтичних інгредієнтів та домішок, для створення методик кількісного визначення. *Наука та сучасне фармацевтичне виробництво* : збірник матеріалів VIII наук.-практ. конф. школи молодих науковців, 19 листоп. 2020 р. К. : АТ «Фармак», 2020. С. 2.

42. Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, піперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл] тіо) ацетату, та його домішок : *метод. рекомендації МОЗ України* / І. Я. Коцюмбас, Б. О. Варинський, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш, В. В. Парченко. К., 2017. 19 с. (Здобувачем проведено розробку та валідацію методик дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано методичні рекомендації до друку).

43. Усенко Д. Л., Варинський Б. О. Визначення енергій зв'язків для інтерпретації мас-спектричного розпаду ряду 1,2,4-тріазол-3-тіонів, вихідних речовин при синтезі активних фармацевтичних інгредієнтів. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю, 23-24 верес. 2020 р. Т., 2020. С. 16. (Здобувачем проведено розрахунки енергій зв'язків, написання тез).

Додаток 3

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 83 Наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, (Івано-Франківськ, 27-28 берез. 2014 р., форма участі – публікація тез).
2. *Хімічні Каразінські читання – 2014* : VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів (Харків, 22-24 квіт. 2014 р., форма участі – публікація тез).
3. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення* : міжнар. наук.-практ. конф. (Київ, 7-8 листоп. 2014 р. форма участі – публікація тез).
4. *Сучасні Тенденції 2015* : Київська конференція з аналітичної хімії (Київ, 7-9 жовт. 2015 р., форма участі – публікація тез).
5. Київська конференція з аналітичної хімії (Київ, 18-21 жовт. 2017 р., форма участі – публікація тез).
6. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : Всеукр. наук.-практ. конф. (Запоріжжя, 18-25 квіт. 2018 р., форма участі – публікація тез).
7. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації 2019* : наук.-практ. конф. з міжнар. участю молодих вчених та студентів (Запоріжжя, 13-17 трав. 2019 р., форма участі – публікація тез).
8. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України (Харків, 19-20 верес. 2019 р., форма участі – публікація тез).
9. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю (Тернопіль, 23-24 вер. 2020 р., форма участі – публікація тез).
10. *Наука та сучасне фармацевтичне виробництво* : VIII наук.-практ. конф. школи молодих науковців (Київ, АТ «Фармак», 19 листоп. 2020 р., форма участі – пленарна доповідь).

Продовж. дод. 3

11. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. міжнар. участю (Тернопіль, 23-24 верес. 2020 р., форма участі – публікація тез).