


Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет

ВАРИНСЬКИЙ БОРИС ОЛЕКСАНДРОВИЧ 

УДК: 543.544+543.511:547.792:615.2/.4.074

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

15.99.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора фармацевтичних наук

Запоріжжя – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий консультант доктор фармацевтичних наук, професор Каплаушенко Андрій Григорович, Запорізький державний медичний університет, завідувач кафедри фізикоїдної хімії.

**Офіційні опоненти:**

доктор фармацевтичних наук, професор Омеляничук Людмила Олександрівна, Запорізький національний університет, професор кафедри хімії;

доктор фармацевтичних наук, професор Логойла Лілія Святославівна, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, завідувач кафедри фармацевтичної хімії;

доктор хімічних наук, професор Блажесвський Микола Євстахійевич, Національний фармацевтичний університет, професор кафедри неорганічної та фізичної хімії.

Захист відбудеться «28» квітня 2021 р. о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.03 при Запорізькому державному медичному університеті (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотечі Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «25» березня 2021 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



С. О. Васюк

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 трифузол та авесстим. Препарат трифузол 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 в 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 (трифузолу, 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 (трифузолу, 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 діодноматричною 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-обґрунтований 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. Розроблені методики визначення АФІ трифузолу, авесстиму, тіометризолу, домішок у субстанціях, лікарських засобах, залишкових кількостей АФІ трифузолу та авесстиму в біологічних об'єктах є валідними.

Методики визначення АФІ трифузолу, авесстиму, тіометризолу, можливих домішок в субстанціях, лікарських засобах, підходи до визначення АФІ в біологічних рідинах, методики визначення залишкових кількостей АФІ трифузолу 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 трифузолу, 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».

**Практичне значення отриманих результатів.** Напрацьовано значний масив теоретичних та практичних результатів, що полягає в створенні концепції аналітичного забезпечення на всіх етапах створення, вивчення, впровадження у виробництво, ветеринарну та медичну практику оригінальних лікарських засобів трифузолу, авесстиму та тіометризолу.

У 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».

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

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

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.

**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 в 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 в дисертації, розроблені автором особисто.

**Апробація матеріалів 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 захист 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.

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

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 43 праці, у тому числі 1 монографія, 26 статей (з яких 19 у фахових виданнях України, 6 у закордонних виданнях, які індексуються наукометричними базами Web of Science Core Collection і Scopus), 1 патент України на винахід, 3 патенти України на корисну модель, 12 тез доповідей, 1 методичні рекомендації МОЗ України.

**Структура та обсяг 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 впровадження). Робота ілюстрована 85 таблицями та 242 рисунками. Список використаних джерел містить 374 найменування, з яких 307 – латиною.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### **Аналіз існуючих підходів щодо розробки ВЕРХ та ВЕРХ-МС методик (огляд літератури)**

У розділі наведено критичний огляд ВЕРХ-МС методів аналізу активних фармацевтичних інгредієнтів, проаналізовано стан розробки аналітичних методик похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу.

У результаті проведення наукових інформаційних та патентних досліджень, а також аналізу відібраної патентної та науково-медичної інформації за зазначеною проблемою можна зробити такі висновки: основними тенденціями зі створення нових методик аналізу АФІ 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 дані, які присвячені ВЕРХ та ВЕРХ-МС визначенню АФІ тіометризолу, трифузолу, авесстиму, а також напівпродуктів у їх синтезі. Таким чином створення способів визначення перспективних лікарських препаратів із групи похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів є актуальним завданням, має наукову новизну та відзначається практичною значимістю.

### Прилади, методи, методики та реактиви, використані при проведенні досліджень. Дизайн дослідження

В роботі використано 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. Програмний комплекс OpenLAB CDS Software використано для керування приладом та обробки даних.

Як об'єкти дослідження використовували низку похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу, які є напівпродуктами, а також кінцевими продуктами потенційних АФІ (рис. 1).

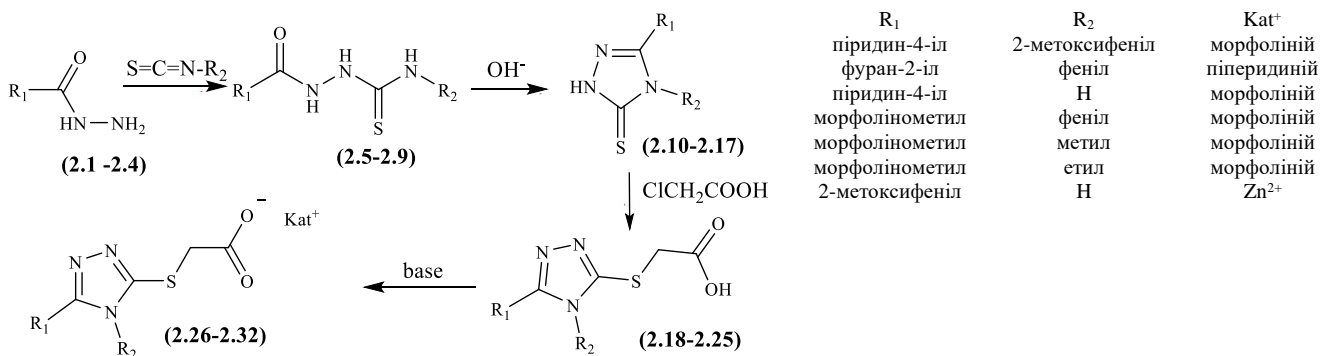


Рис. 1. Об'єкти дослідження

Дизайн дослідження наведений на рис. 2.

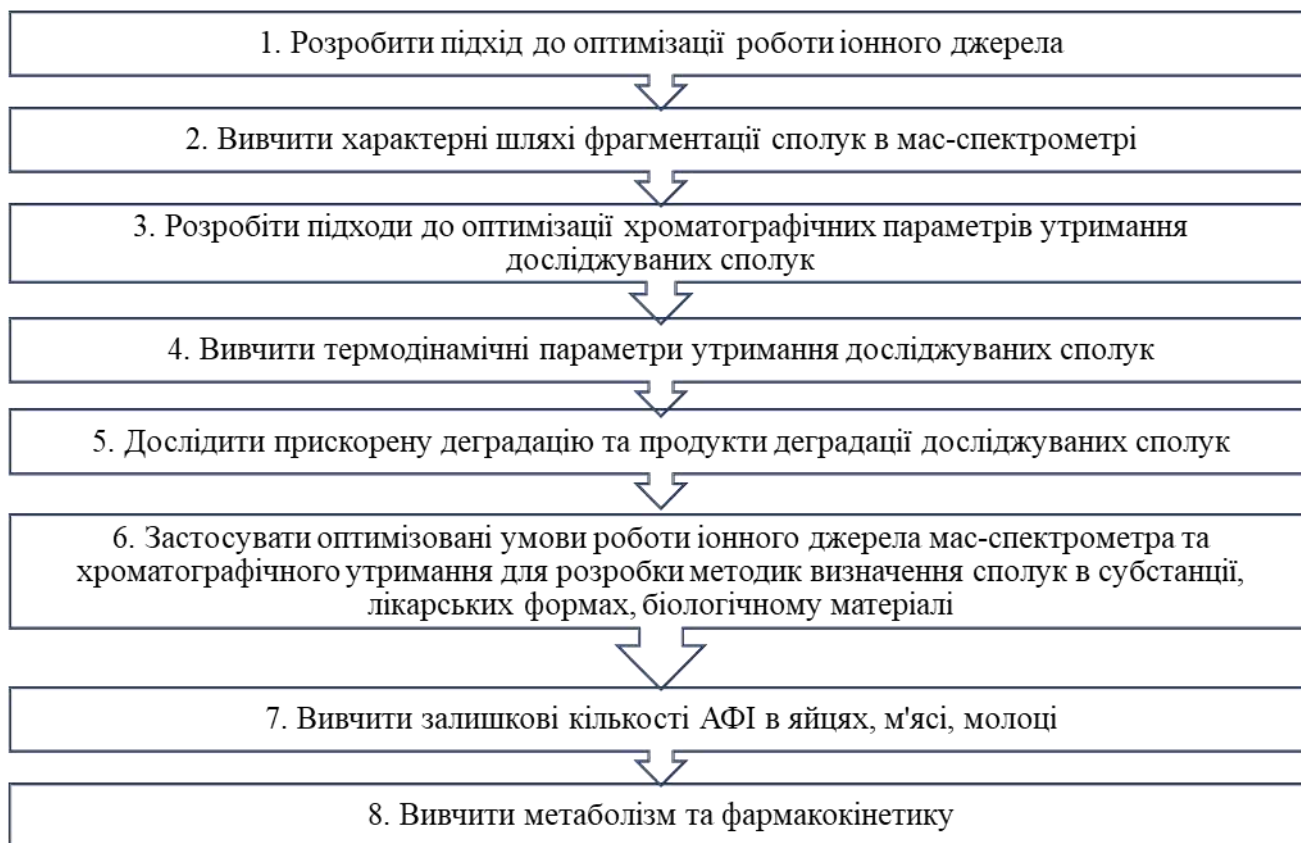


Рис. 2. Дизайн дослідження

### Дослідження умов мас-спектрометричного детектування

Необхідною вимогою розробки 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 і їх солей, а саме: температури газу-осушувача, напруги на фрагментаторі, тиску на небулайзері. Дослідження проводили шляхом прямого введення зразка в камеру іонізації без хроматографічної колонки. Етапи оптимізації умов наведені на рис. 3.

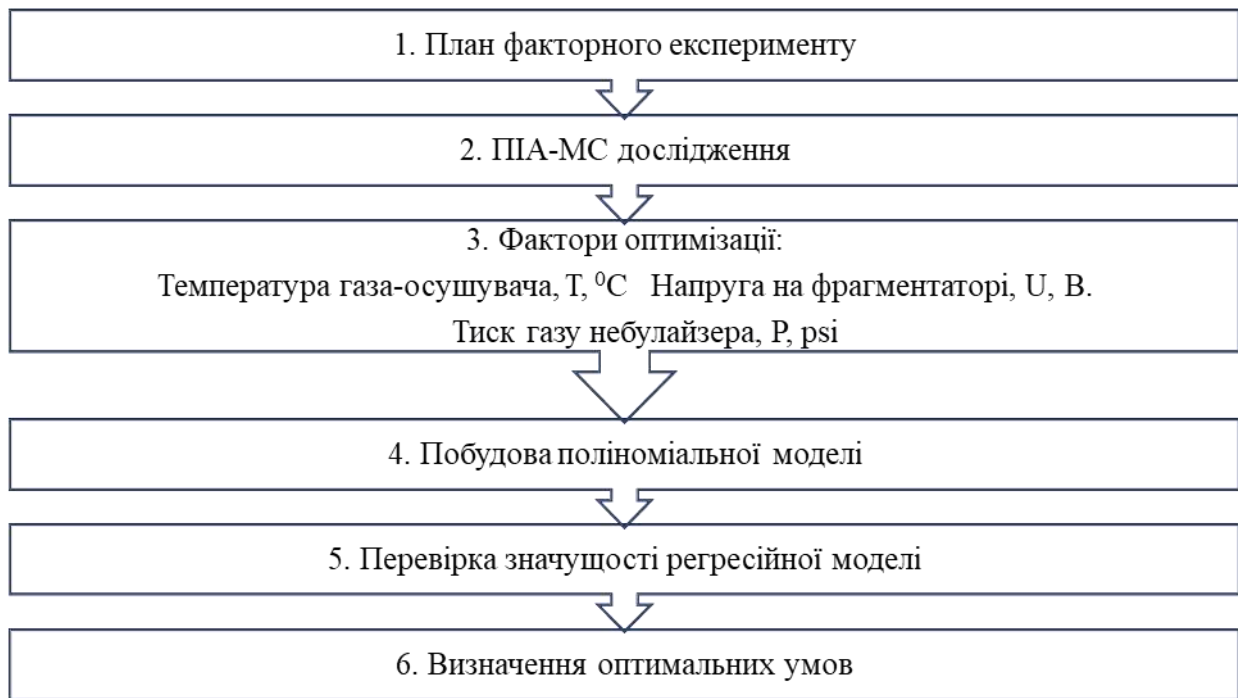


Рис. 3. Схема процедури оптимізації умов мас-спектрометричного детектування

Для досягнення мети роботи досліджувались різні фактори, які впливають на інтенсивність сигналу мас-детектора. Інтервал для кожного фактора був обраний відповідно до рекомендацій програмного комплексу Open Lab CDS, за допомогою якого здійснювалось керування хроматографічним обладнанням. Досліджувані об'єкти, нові похідні 1,2,4-тріазолів та попередники в їх синтезі, мають певну структуру, елементний склад, міцність хімічних зв'язків. Тому оптимізували фактори, які впливають на значення сигналу мас-детектора для кожної сполуки окремо. Фактори вважались найкращими, якщо їм відповідає максимальне значення площі піку сигналу мас-детектора.

Використана схема повного факторного експерименту за 3 факторами (напругою на фрагментаторі (U, В), тиском на небулайзері (p, psi), температурою газу-осушувача (азоту) (T, °C) – варіювалися за трьома рівнями: U – 0, 150, 300 В; p – 10, 30, 60 psi; t – 100, 200, 300°C).

Параметром, що оптимізувався, була площа піків на хроматограмі. Максимальне значення площі піку відповідало оптимальним умовам детектування. За допомогою програмного пакету для статистичного аналізу «Statistica 8» для усіх сполук (2.1-2.32) розраховані рівняння поліноміальної регресії, коефіцієнти регресії та квадрати коефіцієнтів регресії. Якість регресійних моделей, оцінена за допомогою критерію Фішера. Розраховані значення F-критерію Фішера для більшості сполук перевищують табличні 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 із ймовірністю 95% побудовані залежності є адекватними вихідним даним.

За розрахованими рівняннями з використанням надбудови «Solver» («Пошук рішення») програми Excel знайдені оптимальні значення обговорюваних

факторів. Пошук зійшовся за ймовірністю до глобального рішення. В табл. 1-2 надані розраховані оптимальні умови визначення відповідних сполук.

Таблиця 1

**Оптимальні умови іонізації в електроспрее для гідрозидів, карботіоамідів та відповідних тіонів (Т - температура газу-осушувача, U – напруга на фрагментаторі, P – тиск на небулайзері)**

Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови			Сполука	SIM, m/z	Оптимальні умови		
		T	U	P			T	U	P
<b>2.1</b>	138	100	133	60	<b>2.10</b>	285	300	143	60
<b>2.2</b>	127	197	0	60	<b>2.11</b>	244	300	144	60
<b>2.3</b>	160	100	0	60	<b>2.12</b>	179	187	145	53
<b>2.4</b>	167	100	0	53	<b>2.13</b>	277	300	134	49
<b>2.5</b>	303	138	134	55	<b>2.14</b>	215	150	118	43
<b>2.6</b>	262	100	106	53	<b>2.15</b>	229	100	116	60
<b>2.7</b>	295	100	129	49	<b>2.16</b>	201	237	138	51
<b>2.8</b>	233	100	101	49	<b>2.17</b>	208	300	155	10
<b>2.9</b>	226	105	0	39					

Як видно з табл. 1, умови мас-спектрометричної детекції залежать від структури речовин. Так, для більшості гідрозидів найкращим є нульове значення напруги на фрагментаторі, що пов'язано з лабільністю зв'язків. Досліджувані сполуки, що є гідрозидами та карботіоамідами, є термолабільними, тому для більшості речовин даного ряду рекомендується температура газу-осушувача 100°C.

Вплив температури газу-осушувача від інтенсивності 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, при відповідній температурі повинен спостерігатися максимум інтенсивності. Що і виявляється на практиці.

Можна припустити, що зі збільшенням напруги на фрагментаторі інтенсивність сигналу мас-детектора повинна зменшуватися, тому що іони розпадаються на фрагменти більш активно. Але спостерігається, що інтенсивність сигналу даних сполук спочатку збільшується, проходить через максимум, а потім зменшується. Напруга на капілярі і фрагментаторі, прикладеного на вході і виході капіляра істотно впливає на перехід іонів у детектор. Зазвичай, чим вище напруга, тим краще перехід іонів через область між виходом з капіляра і входом у скіммер. Висока напруга на фрагментаторі може привести до фрагментації, яка забезпечує структурну інформацію. Для сполук, які важко фрагментуються, збільшення напруги, як правило, приводить до поліпшення передачі іонів.

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

*Таблиця 2*

**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
<b>2.18</b>	343	300	142	48	<b>2.26</b>	343	300	142	53
<b>2.19</b>	302	100	138	10	<b>2.27</b>	302	247	149	46
<b>2.20</b>	237	300	144	51	<b>2.28</b>	237	300	144	50
<b>2.21</b>	335	300	139	51	<b>2.29</b>	335	300	141	52
<b>2.22</b>	273	224	135	48	<b>2.30</b>	287	228	138	57
<b>2.23</b>	287	234	137	49	<b>2.31</b>	273	300	144	10
<b>2.24</b>	259	300	140	53	<b>2.32</b>	266	300	145	60
<b>2.25</b>	266	201	0	56					

**Обґрунтування підходів до розробки і валідації методик визначення АФІ в субстанціях та лікарських формах**

Для підбору оптимальних умов хроматографічного визначення напівпродуктів при синтезі солей 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот, потенційних АФІ, необхідно було дослідити залежність утримування на хроматографічному сорбенті від різних факторів, в першу чергу від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі, який є найбільш суттєвим чинником, що впливає на утримування сполук при їх хроматографуванні. Напівпродукти можуть з'являтися як домішки в субстанції та лікарських формах вказаних АФІ. Даний підрозділ присвячений встановленню залежностей характеристик ВЕРХ утримування низки сполук, похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолів. Визначені умови хроматографічного розділення використані для розробки методик визначення домішок та АФІ тіометризолу і трифузолу (рис. 4).



Рис. 4. Схема процедури оптимізації хроматографічних умов визначення

На рис. 5 наведені залежності коефіцієнтів ємності сполук від вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі.

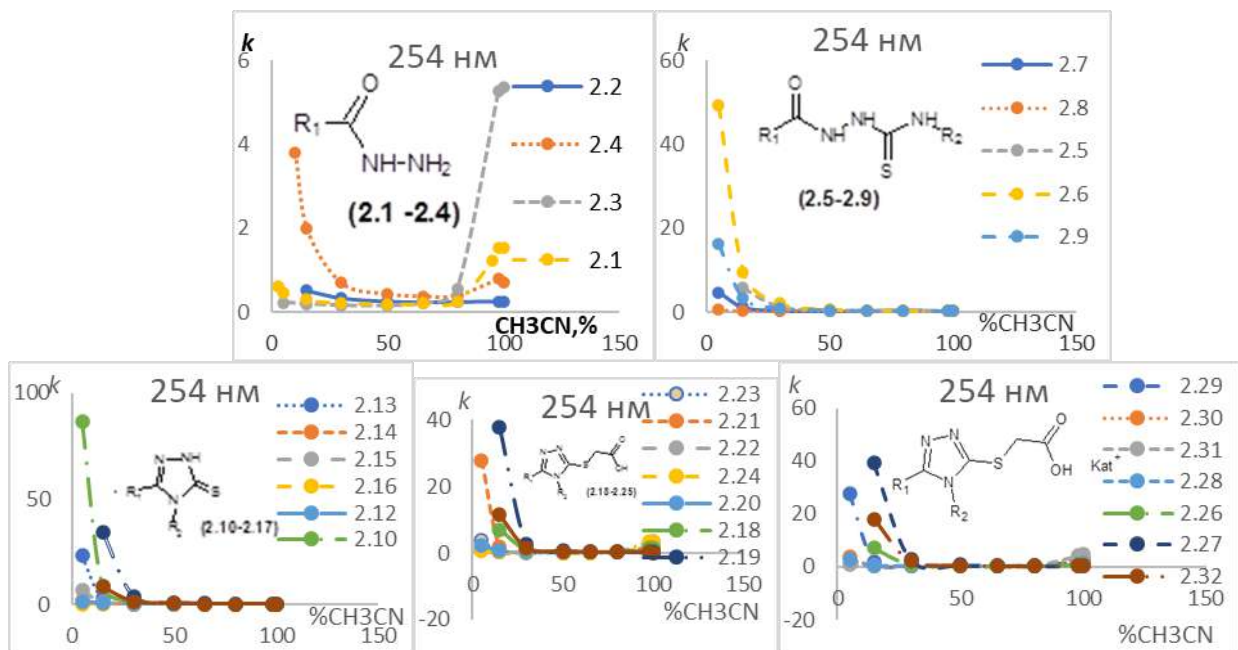


Рис. 5. Залежність коефіцієнта ємності ( $k$ ) (сполуки **2.1-2.32**) від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі при реєстрації сигналу на діодно-матричному детекторі за довжини хвилі 254 нм



Можна зазначити, що для гідразидів, а також для більшості кислот та солей на початку спостерігається зменшення коефіцієнту ємності зі зростанням вмісту ацетонітрилу (обернено-фазовий механізм утримування), а потім (більше 80% ацетонітрилу) зростання коефіцієнту ємності (іонообмінний механізм взаємодії з сіланоольними групами нітрогенвмісних катіонів). В разі ж гідразинокарботіоамідів і для більшості тіонів спостерігається виключно обернено-фазовий механізм утримування.

Отримані залежності допомогли обрати умови хроматографічного дослідження з необхідним часом аналізу сполук, а також підібрати умови їх визначення в сумішах, визначивши максимальну різницю в коефіцієнтах утримування графічним способом.

За допомогою програми ACDLabs розраховані значення LogD, що має перевагу перед LogP, тому що допомагає врахувати іонізацію сполук при різних рН. Найбільш гідрофобні молекули краще утримуються на обернено-фазовому сорбенті. В ряді досліджуваних сполук спостерігається взаємозв'язок між коефіцієнтом ємності та LogD (рис. 6). Коефіцієнти ємності експоненціально залежать від LogD. Залежність  $lgk$  та  $logD$  має лінійний характер.

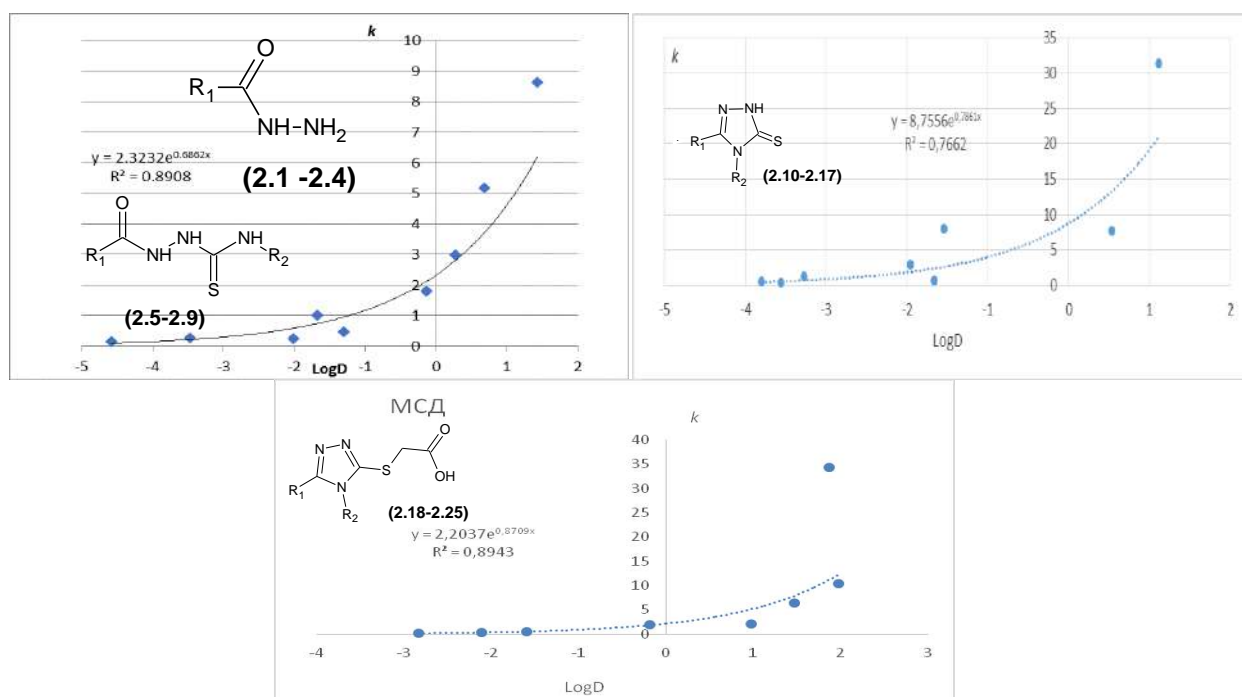


Рис. 6. Залежність коефіцієнта ємності  $k$  для сполук (2.1-2.25) (при 15%  $CH_3CN$ )  $LogD$

За отриманими даними побудовано графік залежності коефіцієнта ємності від концентрації ацетонітрилу в рухомій фазі для потенційних домішок та АФІ. Як приклад наведено АФІ тіометризолу (рис. 7).

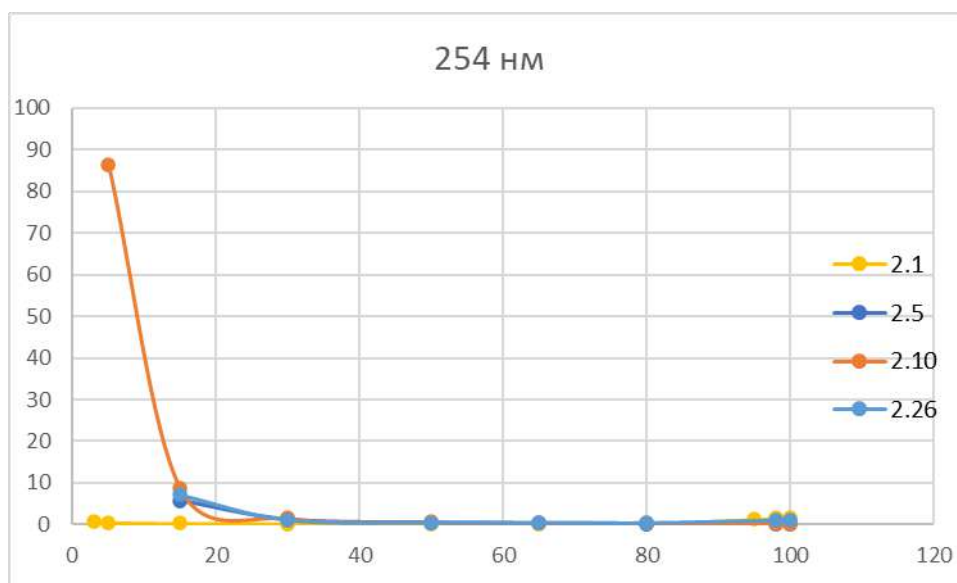


Рис. 7. Залежність коефіцієнта ємності сполук (2.1, 2.5, 2.10, 2.26) від концентрації ацетонітрилу

З графіку видно, що максимальна різниця між лініями знаходиться біля 16-18%. Коефіцієнт розділення ( $R_s$ ) є показником, який характеризує якість розділення. В 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) за допомогою OpenLAB CDS Software (табл. 3).

Таблиця 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

Згідно із вимогами ДФУ коефіцієнт розділення повинен бути більш ніж 1,0. Сума коефіцієнтів розділення є максимальною, стандартне відхилення значень коефіцієнтів було мінімальним при 16% (табл. 3). Тому оптимальний вміст ацетонітрилу становить 16%.

Дослідження УФ-спектрів АФІ на прикладі тіометрізолу та відповідних домішок дозволяє вибрати аналітичні довжини хвилі, які можна використовувати для визначення означених сполук. Максимуми поглинання сполук відповідно мають значення 266 нм (гідрозид (2.1)), 254 нм (карботіоамід (2.5)), 258 нм (тіон (2.10)) (рис. 8).

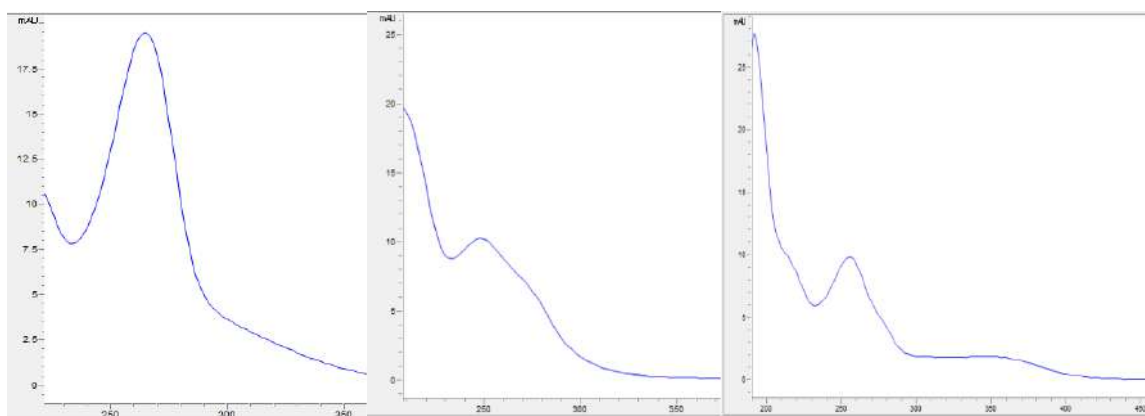


Рис. 8. УФ-спектри піридин-4-карбогідрозиду, 2-ізонікотіноіл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону

Пік АФІ тіометризолу є спектрально однорідним, що підтверджується, як за допомогою мас-спектрометричного (рис. 9), так і діодно-матричного детектора (рис. 10).

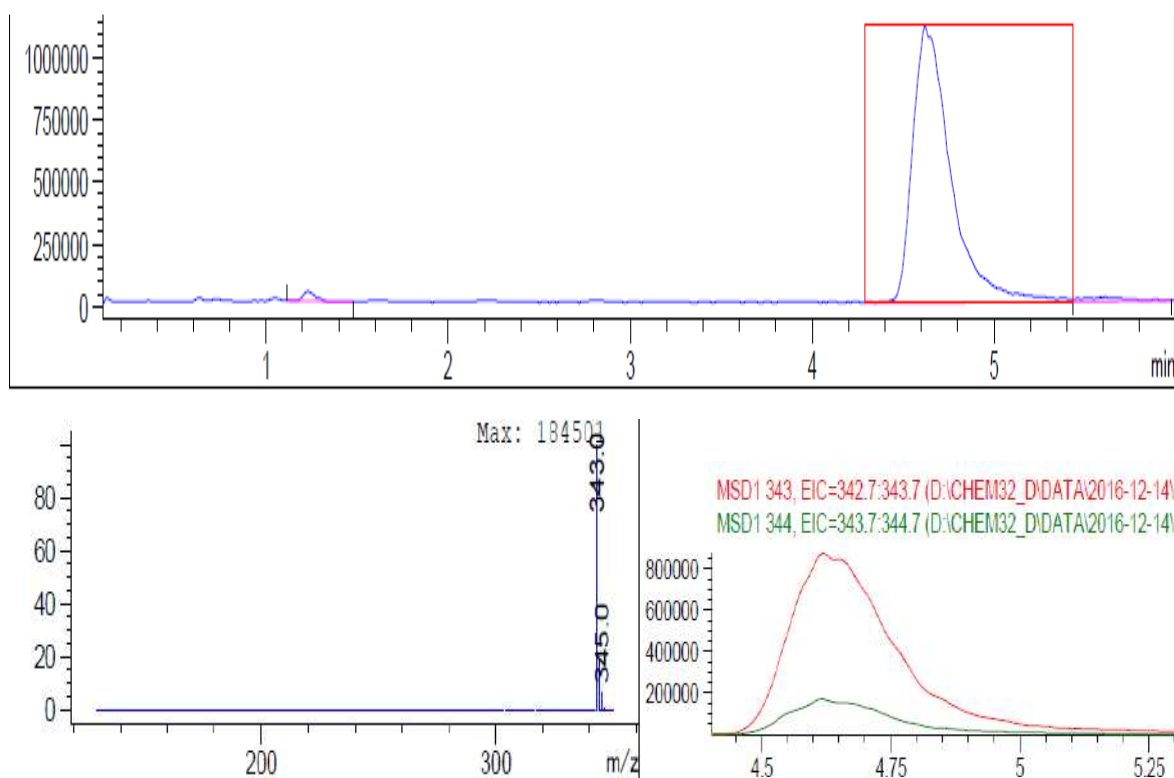


Рис. 9. Хроматограми за мас-спектрометричним детектором та мас-спектр сполуки **2.26** (АФІ тіометризолу)

УФ-спектри, що отримані на різних частинах хроматографічного піку співпадають (рис. 9), що підтверджує чистоту піку. Максимум поглинання світла для АФІ реєструється при 272 нм. Спектри поглинання вимірювали в кюветі діодно-матричного детектора при елююванні речовини 16% ацетонітрилом, що містить 0,1% мурашиної кислоти.

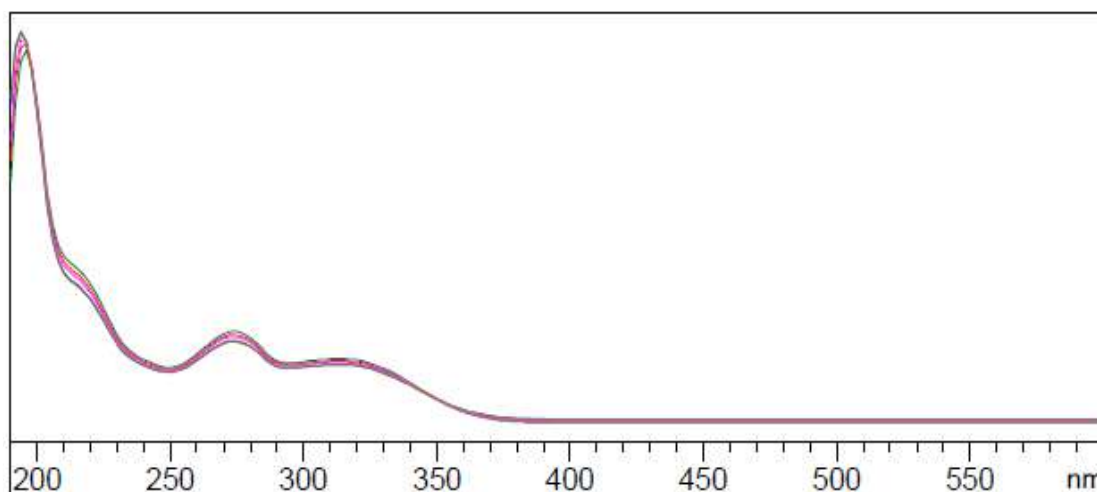


Рис. 10. Спектри сполуки **2.26** (АФІ) на ДМД на різних частках хроматографічного піку

Характеристики хроматографічних піків (ефективність колонки  $N$  за піком, коефіцієнт розділення  $R_s$ ) наведені в табл. 4.

Таблиця 4

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

$N$				$R_s$	
<b>2.1</b> , т.т.	<b>2.5</b> , т.т.	<b>2.10</b> , т.т.	<b>2.26</b> , т.т.	(між <b>2.26</b> та <b>2.5</b> )	(між <b>2.10</b> та <b>2.26</b> )
500	4700	3500	4500	2,96	2,65

*Умови хроматографування:*

- колонка –  $\varnothing 4,6 \times 30$  мм, обернена фаза С18, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C;
- рухома фаза А – H<sub>2</sub>O – 0,1% HCOOH;
- рухома фаза В – CH<sub>3</sub>CN – 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 (сполука **2.1**), 254 нм (сполука **2.5**), 258 нм (сполука **2.10**));

*Специфічність.* Пік АФІ повністю розділяється з піками сполук **2.1**, **2.5**, **2.10**, що можуть бути присутніми як домішки (табл. 4).

*Лінійність.* Метрологічні характеристики лінійної залежності для діапазону застосування методики 80 – 120% від номінального вмісту АФІ наведено в табл. 5. Дані характеристики відповідають вимогам ДФУ до цих показників.

Таблиця 5

**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	$\leq 3,2$	відповідає
$s_a$	1,627	—	—
$RSD_0$	0,7475	$\leq 1,06$	відповідає
$R_c$	0,9991	$\geq 0,99702$	відповідає

Графік лінійної залежності для даного АФІ наведений на рис. 11.

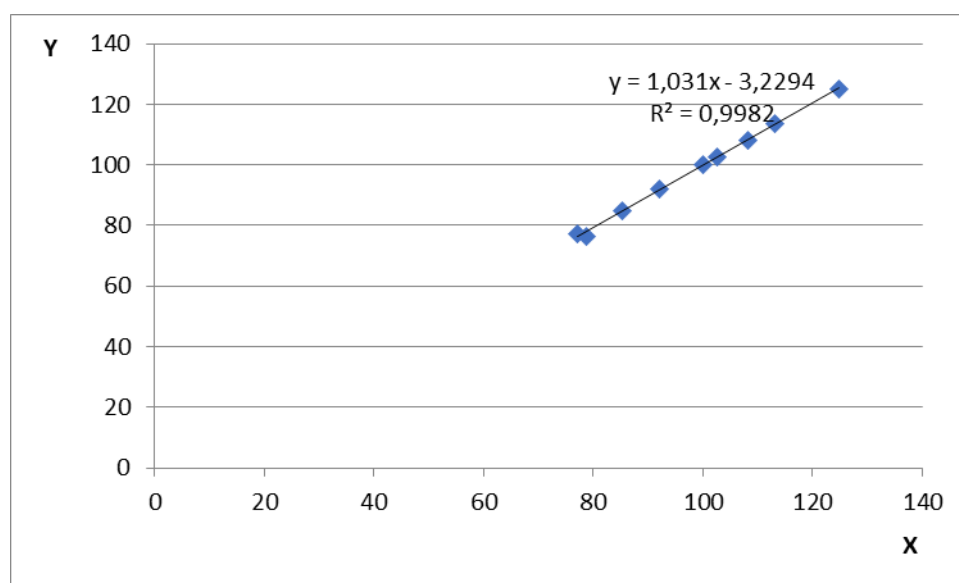


Рис. 11. Лінійна залежність площі піку від концентрації АФІ тіометризолу в нормалізованих координатах

*Прецизійність та правильність.* Визначали прецизійність на рівні збіжності. 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. 6.

Таблиця 6

**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	0,03928	77,19	2004	77,14	99,94
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

Методику застосували для кількісного визначення АФІ тіометрізолу в субстанції. Хроматографували розчин порівняння 5 разів. Результати наведено в табл. 7.

Таблиця 7

**Результати перевірки придатності хроматографічної системи по RSD**

Номер хроматограми	$S_{st}$	Середнє $S_{st}$	RSD%	$RSD\%_{max}$ за 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



Одержане значення RSD не перевищувало вимоги ДФУ до  $RSD\%_{\max}$  при усіх значеннях  $n$ , починаючи з  $n=2$ . Тому достатньо по 2 рази по чергово хроматографувати розчини порівняння (рис. 12) та випробувальний розчин для кожної наважки субстанції (рис. 13).

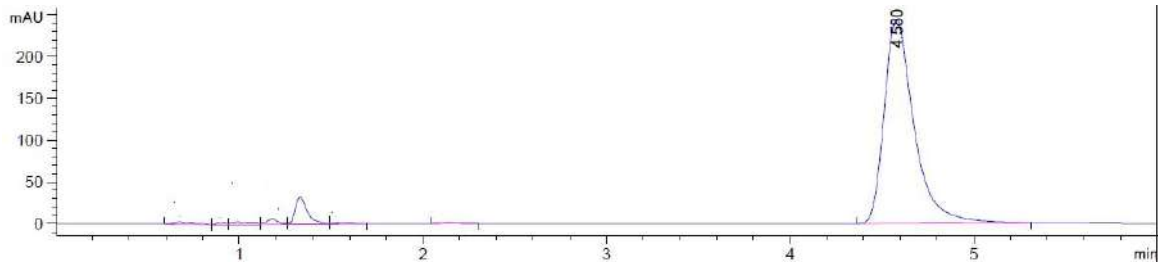


Рис. 12. Хроматограма розчину порівняння АФІ тіометризолу

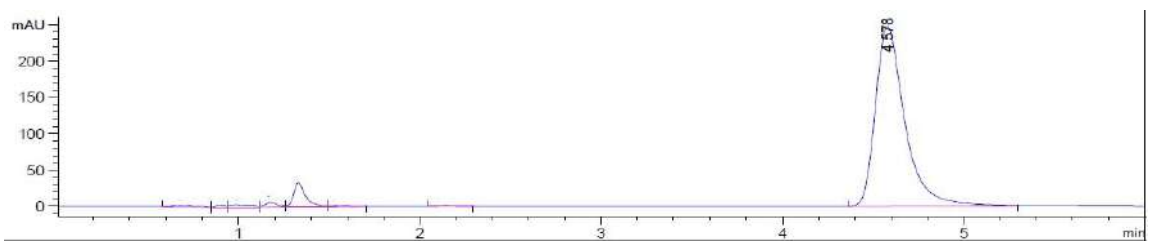


Рис. 13. Хроматограма досліджуваного розчину субстанції тіометризолу

В табл. 8 наведені результати визначення АФІ тіометризолу в субстанції.

Таблиця 8

**Результати кількісного визначення АФІ тіометризолу в субстанції**

Дослід	Наважка, г	Площа піку		Знайдено АФІ в %	Метрологічні характеристики, $n=5, P=0,95$
1	0,05076	2790 2780	2785	100,5	
2	0,04956	2720 2728	2724	100,7	
3	0,0502	2763 2749	2756	100,6	
4	0,0506	2782 2772	2777	100,6	
5	0,05056	2740 2736	2738	99,25	
6	0,05079	2726 2732	2729	98,47	
Стандартний зразок	0,05066	2767		—	

$\bar{X} = 100,0$   
 $S = 0,934$   
 $S_r = 0,934$   
 $\Delta\bar{X} = 0,980$   
 $\varepsilon = 0,980\%$

Отримані закономірності хроматографічного утримування сполук опрацьовані при розробці методик кількісного визначення досліджуваних 1,2,4-тріазол-3-тіонів, разом з гідразидами та карботіоамідами як індивідуально, так і у вигляді домішок до АФІ відповідних солей 1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатних кислот.

В ході виконання експериментальної частини роботи визначені умови хроматографічного розділення домішок та АФІ тіометризолу і трифузолу. Запропоновано методики визначення домішок та АФІ. Розроблена методика визначення АФІ трифузолу 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 у субстанції та лікарській формі вказують на те, що методики можуть бути запропоновані для контролю якості лікарських речовин та препаратів.

Для дослідження ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в нерухому, із застосуванням різних хроматографічних колонок, було використано методики розділення морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, піридин-4-карбогідрозиду, 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоамиду та 4-(2-метокси-феніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3*H*-1,2,4-тріазол-3-тіону (табл. 9).

Таблиця 9

### Стандартні ентальпії переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну

Сполука	Речовина	$\Delta H^{\circ}$ , кДж/моль
<b>2.10</b>	4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-тіон	-48,30
<b>2.26</b>	морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4 <i>H</i> -1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат	-9,87
<b>2.5</b>	2-ізонікотиноїл- <i>N</i> -(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоамід	-8,40
<b>2.1</b>	піридин-4-карбогідрозид	0,47

Для визначення термодинамічних параметрів переносу аналіту із рухомої фази в стаціонарну необхідно визначити коефіцієнт ємності в залежності від зміни абсолютної температури та побудувати графічну залежність  $\ln k$  від  $1/T$ , а також в подальшому, за допомогою методу найменших квадратів побудувати рівняння лінійної залежності. Лінійна залежність  $\ln k$  від  $1/T$ , відповідно до рівняння Вант-Гоффа, дозволяє розрахувати ентальпії переносу аналітів. Знаходили середнє значення часу утримування для кожної температури, розраховували коефіцієнти ємності  $k$ . Рівняння лінійної залежності  $\ln k$  від  $1/T$  для усіх речовин розраховано за методом найменших квадратів в програмі Microsoft Excel.

Ентальпії переносу для речовин **2.5**, **2.10**, **2.26** (табл. 9) є негативними, тобто процес абсорбції 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 **2.10** має найбільше значення ентальпії, що пояснюється збільшенням гідрофобності і відповідно більшою взаємодією із октадецильним сорбентом. Але для піридин-4-карбогідразиду значення ентальпії переносу є позитивним, що пояснює слабе утримування на оберненофазовому сорбенті.

В даній роботі досліджена залежність утримування аналітів від температури, а також визначені 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, а також для морфоліній 2-(5-(піридиніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату і відповідних домішок.

### **Дослідження мас-спектрометричної фрагментації сполук для ВЕРХ-МС ідентифікації та кількісного визначення**

Проведено вивчення закономірностей фрагментації ряду гідразидів низки органічних кислот та їх відповідних гідразинокарботіоамідів, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, напівпродуктів у синтезі АФІ, ряду 1,2,4-тріазоліл-3-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 (**2.1-2.32**) встановлені характеристичні іони, які утворюються в результаті розпаду іонів у джерелі іонізації. Мас-спектри вимірювали після елюювання через колонку Zorbax SB-C18, 30 мм x 4,6 мм для очищення мас-спектрів речовин.

Мас-спектральна характеристика сполук наведена на прикладі наступних речовин, що є напівпродуктами та кінцевими продуктами в синтезі АФІ.

*2-Ізонікотиноїл-N-(2-метоксифеніл)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-метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дігідро-3H-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 створюються 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. 14-15).

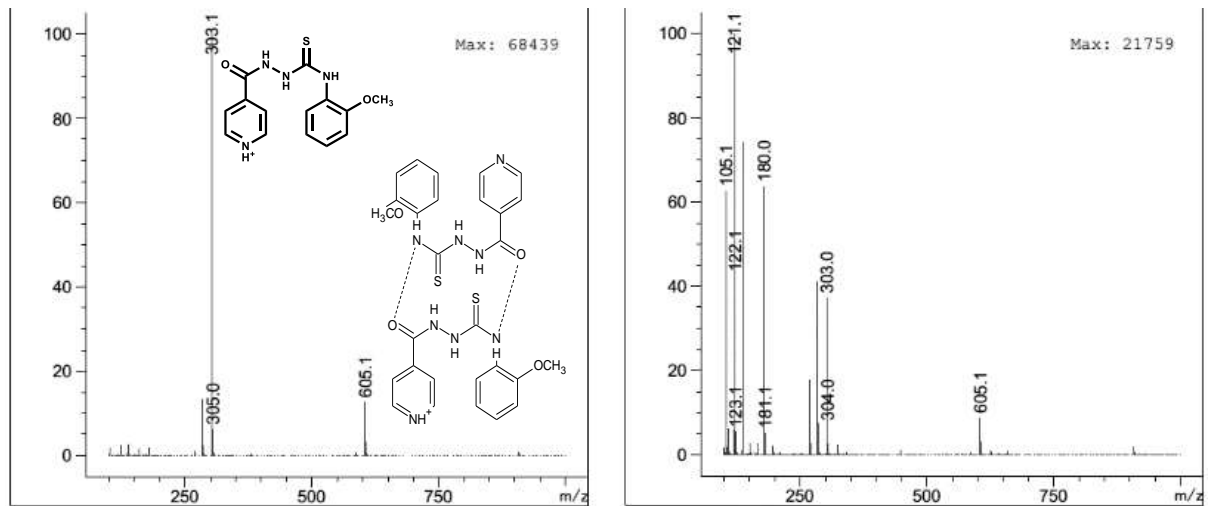


Рис. 14. Мас-спектри 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду при різних умовах фрагментації (100, 200 В)

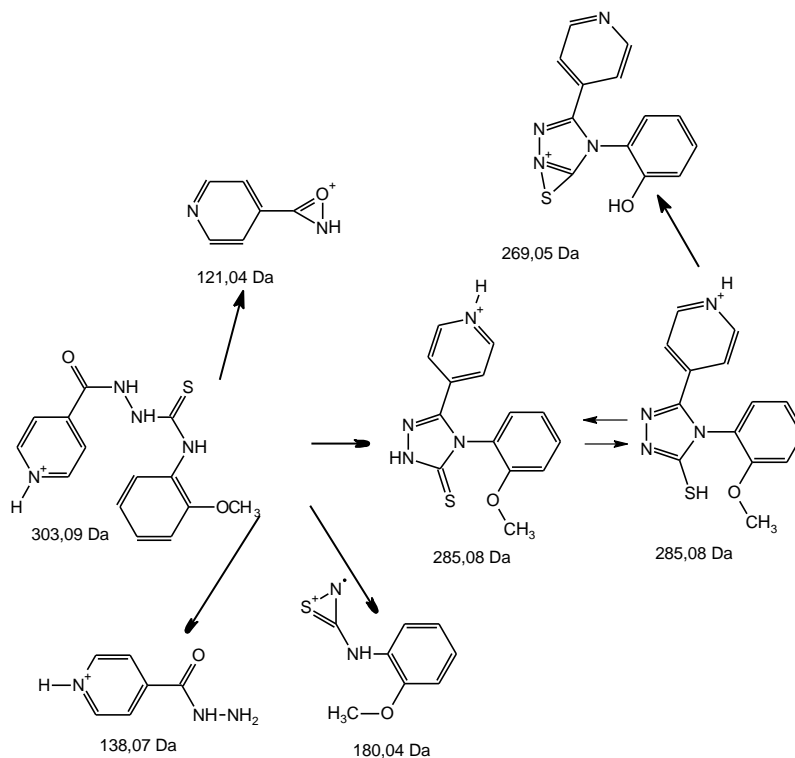


Рис. 15. Схема фрагментації 2-ізонікотиноїл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду

*Морфолін-4-ій 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат* (2.26). Мас-спектри наведені на рис. 16. В кислотному середовищі елюенту сольова форма активного фармацевтичного інгредієнта перетворюється в протоновану кислотну форму із утворенням квазімолекулярного катіона з  $m/z$  343 (рис. 17). Катіон із  $m/z$  313 з'являється із виділенням оксиметильної групи від квазімолекулярного катіона в випадку 100 В та 200 В. Також в цих умовах із квазімолекулярного катіона при відщепленні карбон 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.

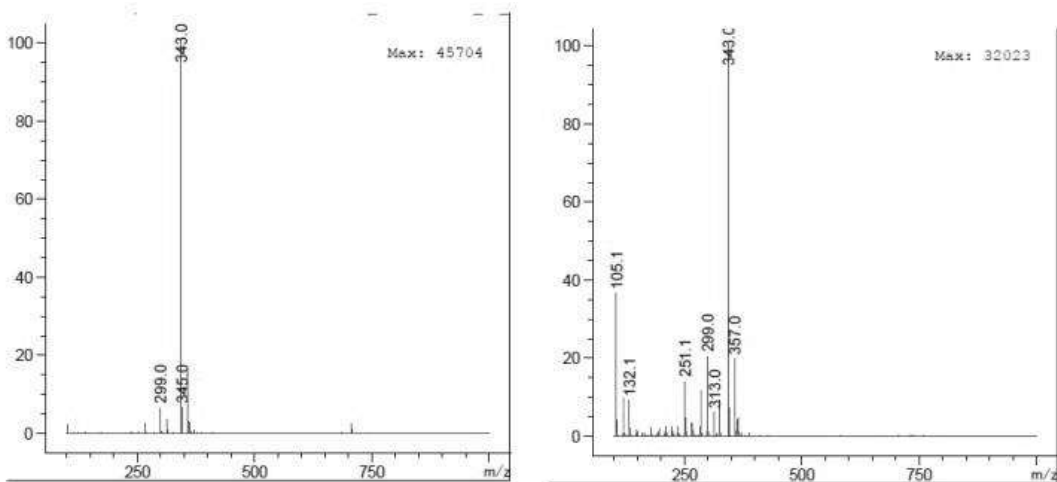


Рис. 16. Мас-спектри морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 100 та 200 В

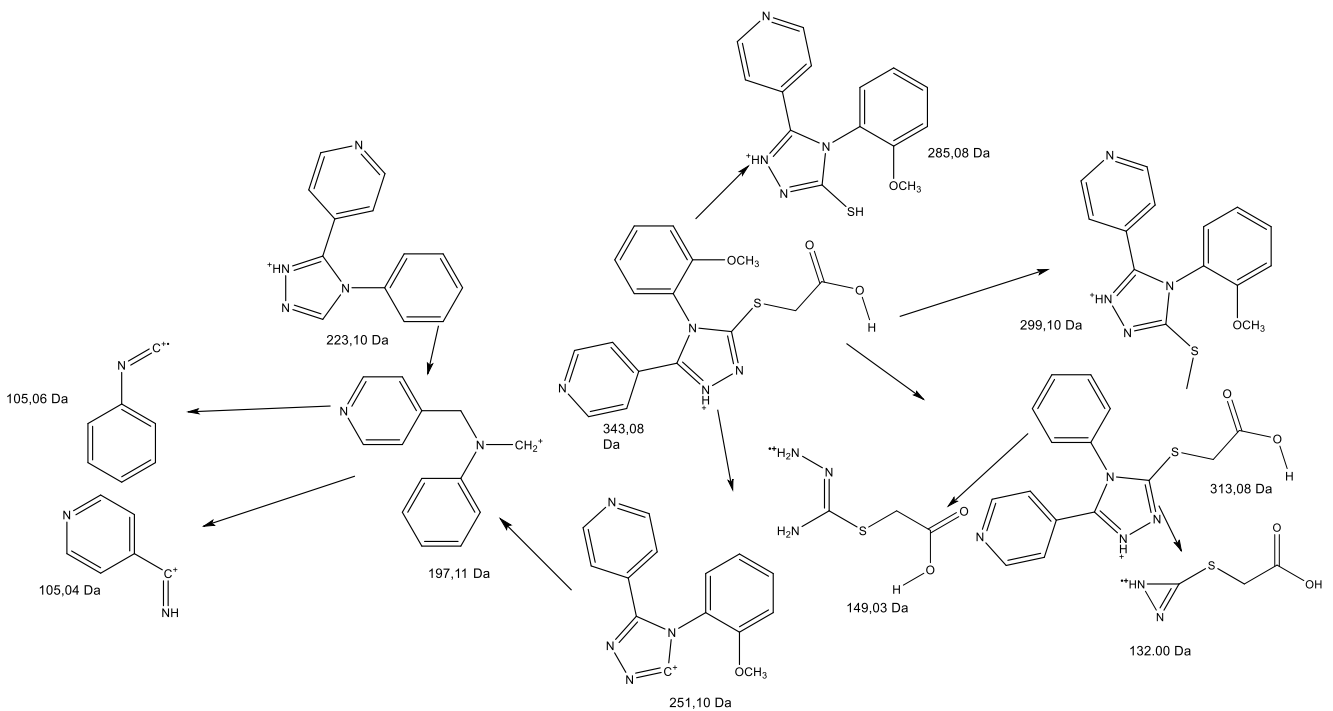


Рис. 17. Схема фрагментації морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату при 200 В

В даній роботі вперше інтерпретовані мас-спектри ЕСІ низки гідразидів та карботіоамідів кислот, 1,2,4-тріазол-3-тіонів, проміжних речовин в синтезі субстанцій потенційних лікарських засобів з 1,2,4-тріазоловим фрагментом. Встановлені загальні та характерні шляхи дисоціації розглянутих сполук, запропоновані та обговорені реакції утворення характеристичних іонів. Досліджена ЕСІ-МС фрагментація солей 1,2,4-тріазол-3-тіооцтових кислот як перспективних АФІ, фармацевтичних препаратів при різній напрузі на фрагментаторі. Отримані мас-спектри солей низки 1,2,4-тріазол-3-тіооцтових кислот. Отримані результати з дослідження фрагментації вказаних речовин

можуть використовуватись для детектування цих речовин, а також для підтвердження структури нових сполук за мас-спектрами на підставі вивчених закономірностей.

### Обґрунтування розробки та валідація методик визначення залишкових кількостей АФІ в біологічних об'єктах

Проведена розробка та валідація ВЕРХ-МС методик, що дозволяють контролювати залишкові кількості досліджуваних препаратів в яйцях, м'ясі, молоці, які можуть бути присутні внаслідок лікування або профілактики тварин препаратами, похідними 3-тіо-1,2,4-тріазолу, а саме трифузолом та авесстимом.

Виходячи з практичної потреби на прикладі трифузолу показано процедуру визначення АФІ в яйцях птиці. Процедура пробопідготовки зразків яєць наведена на рис. 18.

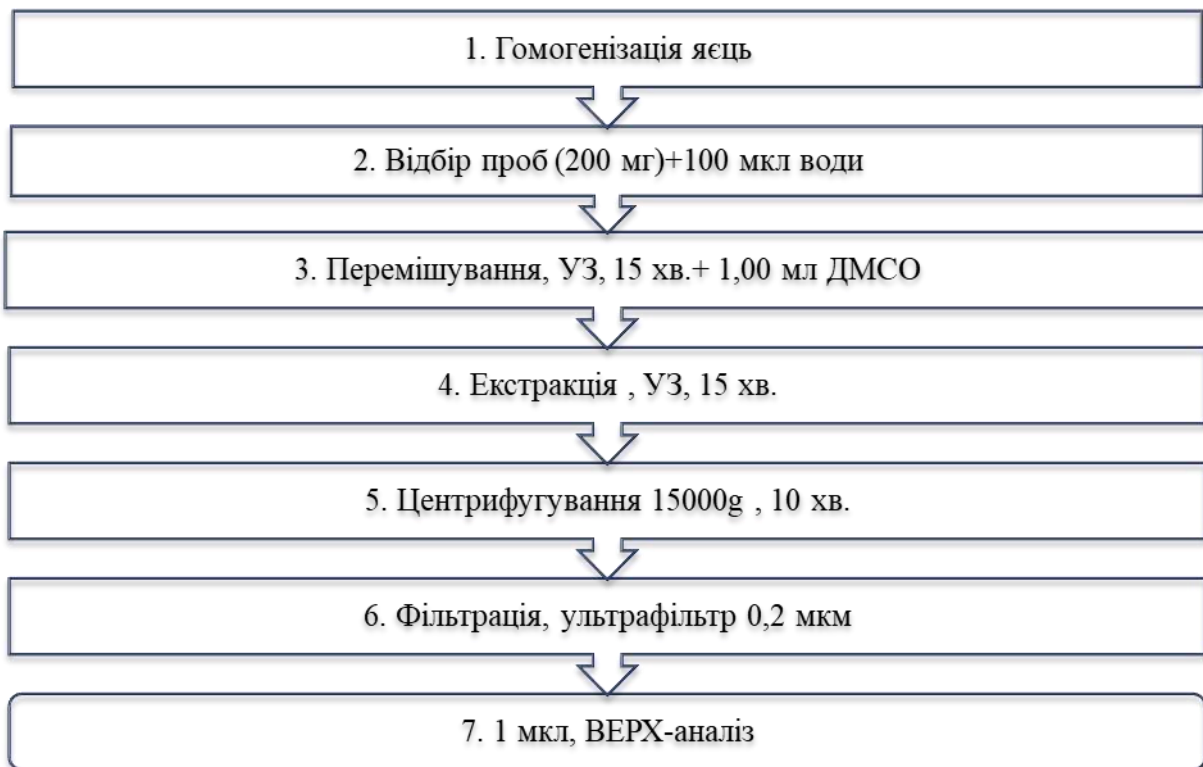


Рис. 18. Процес пробопідготовки зразку

Диметилсульфоксид був використаний як екстракційний та депротейнізуючий агент у пробопідготовці зразка.

*Селективність* було підтверджено шляхом аналізу зразків «бланків матриці» для того, щоб виявити відсутність інтерференції з аналітом.

Пік АФІ трифузолу ідентифікувався за  $m/z=302,1$  на SIM хроматограмі, модельна суміш на нижній межі кількісного визначення мала час утримування 3,4-3,5 хв. Селективність методики підтверджено відсутністю інтерференцій з домішками (рис. 20). Загальний час хроматографічного 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 протона до відповідної кислоти АФІ трифузолу.

*Лінійність.* Калібрувальна крива, побудована як залежність відгуку детектора при 302,1  $m/z$  від вмісту речовин у гомогенаті. Калібрування було проведено з використанням зовнішнього стандарту. Калібрувальна крива є лінійною в межах 0,12-1,07 мкг у зразку зваженого гомогенату чи 0,61-3,6 мкг/г гомогенату.

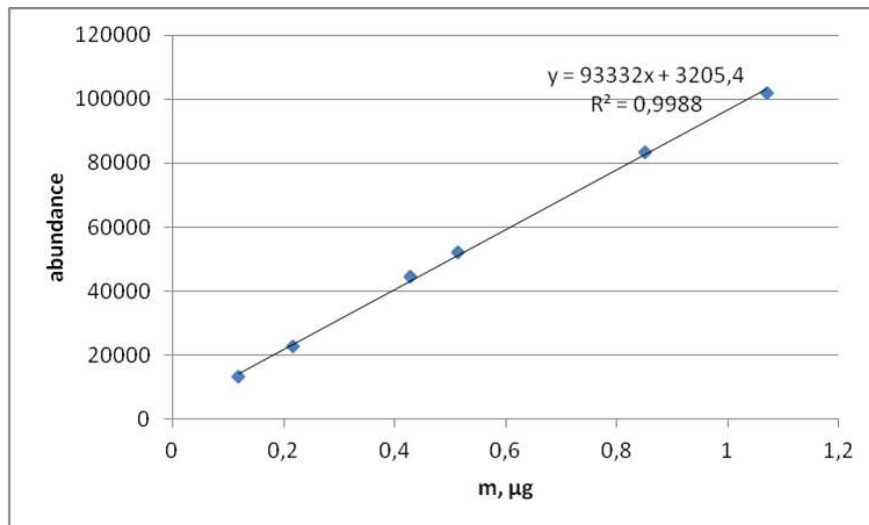


Рис 19. Калібрувальна крива АФІ трифузолу у зразку яєчного гомогенату

*Чутливість.* Нижню межу кількісного визначення 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 аналіту, що було уведено до модельного розчину.

*Прецизійність та правильність.* Ступінь вилучення було виявлено шляхом порівняння екстрагованих стандартних зразків з чотирма рівнями концентрацій для зразків, що приготовані без етапу екстракції.

Вміст АФІ трифузолу в контрольному розчині виявлено із використанням рівняння калібрувальної кривої. Прецизійність та правильність виявлена для контрольного зразка АФІ. Хроматограми контрольних розчинів на рівні нижньої межі кількісного визначення та вищої межі кількісного визначення (як мінімум 75% верхнього діапазону калібрувальної кривої) показані та рис. 20-21.

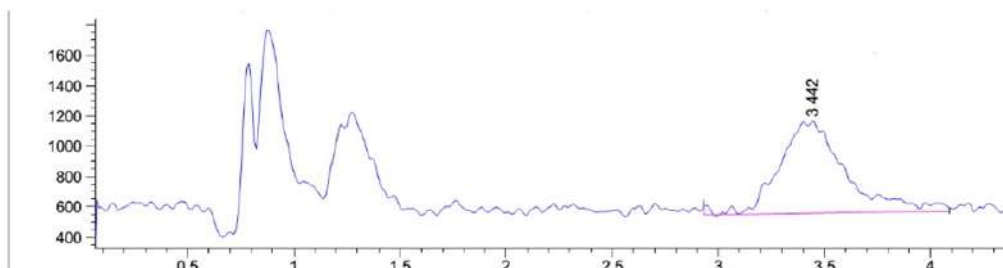


Рис. 20. Хроматограма гомогенізованого екстракту, змішаного з АФІ трифузолу, на нижній межі кількісного визначення

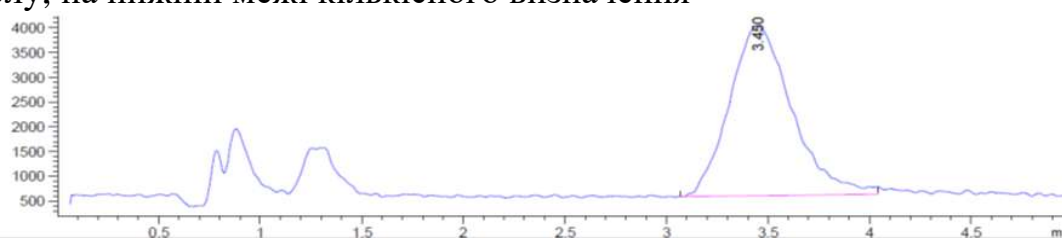


Рис. 21. Хроматограма при верхній межі кількісного визначення в яєчному гомогенаті з АФІ трифузолу

Прецизійність та правильність методики, а також значення ступеню вилучення АФІ наведені у табл. 10.

Таблиця 10

**Прецизійність та правильність виявлення АФІ трифузолу  
(n = 5) на 4 рівнях концентрацій**

Рівні	$\bar{x} \cdot 10^{-1}$ , МКГ уведено	$\bar{x} \cdot 10^{-1} \pm SD \cdot 10^{-2}$ , МКГ знайдено	Прецизійність RSD (%)	Правильність RE (%)	Ступінь ізолювання, (%)
1	1,095	1,146 $\pm$ 5,505	4,804 $\leq$ 20%	4,585 $\leq$ 20%	96,13
2	2,112	1,960 $\pm$ 3,242	1,654 $\leq$ 15%	7,204 $\leq$ 15%	80,57
3	5,312	5,127 $\pm$ 8,020	1,564 $\leq$ 15%	3,493 $\leq$ 15%	82,94
4	8,456	8,430 $\pm$ 4,753	5,638 $\leq$ 15%	0,2887 $\leq$ 15%	97,52

Правильність підтверджена розрахованими значеннями відхилень від номінальних значень контрольного розчину, як відсоток до номінальних значень (відносна похибка).

Обговорювана методика апробована на реальних зразках біологічних об'єктів, що отримані після випоювання птиці препаратом трифузол, і може бути використана для виявлення залишкових кількостей даного АФІ.

Прецизійність та правильність прийнятна та відповідає вимогам. Відносні стандартні відхилення не перевищували 15% для контрольних розчинів. Середня концентрація знаходилась в межах 15% від номінальних значень для контрольних розчинів.

Розроблені ВЕРХ-МС-методику визначення АФІ препаратів авесстим (морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат) та трифузол (піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат) в яйцях птиці: обґрунтовані умови хроматографування і ЕСІ-МС-детектування, підібрана процедура пробопідготовки.

Крім того запропоновані умови пробопідготовки зразків молока для визначення піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (трифузолу), які оптимально підходять до рідинно-хроматографічної системи. Вперше розроблена методика, що дозволяє контролювати залишкову кількість піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (трифузолу) в м'ясі та органах тварин. 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. Визначено залишкові кількості морфоліній 2-(5-(піридин-4-іл)-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (авесстиму), піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (трифузолу) в яйцях птиці, визначено вміст піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (трифузолу) в зразках молока корів через 12 год після ін'єкції 1% розчину. Досліджено залишкові кількості піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (трифузолу) в м'ясі та органах тварин. Методики впроваджено в практику дослідних (ДНДКІ) та контролюючих (на підприємствах) лабораторій. Вони можуть бути використані в токсикохімічних дослідженнях, а також в лабораторіях ветеринарних інспекцій.

### **Дослідження прискореної деградації АФІ похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу**

Аналіз наукових публікацій, а також вимог керівництва міжнародної комісії з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів для людини, свідчить, що дослідження прискореної деградації АФІ у субстанціях і лікарських формах є важливим при розробці методик контролю їх якості. Це необхідно для підтвердження селективності методик аналізу в присутності продуктів деградації і для розробки методик визначення стійкості АФІ. Також дане дослідження дозволяє прогнозувати вплив середовища на лікарську речовину і пропонувати умови її зберігання. Даний розділ присвячений дослідженню стресової деградації АФІ на прикладах АФІ тіометризолу та трифузолу.

*Умови прискореної деградації.* Зразки досліджуваних субстанцій та лікарських форм в умовах зберігання відбиралися щодня, готувалися для введення і вводилися в ВЕРХ систему. Об'єм інжекції для 0,1% розчину склав 5 мкл, для 1% розчину 0,5 мкл. Вміст (%) було взято із звіту програми OpenLab CDS за сигналом діодно-матричного детектора.

*Деградація за лабораторними умовами.* Досліджувана речовина та розчини (0,1%, 1%) зберігались при кімнатній температурі в лабораторних умовах.

*Термічна деградація.* Вплив температури було досліджено протягом декількох днів в термостаті при підвищеній температурі для 0,1%, 1% розчинів та субстанцій.

*Окиснювальна деградація.* Розчин гідроген пероксиду (3%) було використано для дослідження впливу окиснювального агента. Приблизно 0,001 г АФІ було розчинено в 1 мл 3% гідроген пероксиду.

*Ультрафіолетова (УФ) деградація.* Опромінення дослідних зразків було проведено за допомогою люмінесцентної УФ лампи, YF UV-9W 365 нм, яка випромінює в діапазоні довгохвильового ультрафіолету з максимумом випромінювання 365 нм. Освітленість вимірювали за допомогою люксметра, вона дорівнювала 2000 люкс.

*Кислотний гідроліз.* Приблизно 0,001 г АФІ було змішано із 1 мл 0,1 М НСІ.

*Лужний гідроліз.* Приблизно 0,001 г АФІ змішували із 0,1 М розчином NaOH.

Як приклад, наводимо результати дослідження стресової деградації піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетату (трифузол).

2-((5-(Фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетатна кислота утворювалась в потоці розчинника із АФІ (піперидинієва сіль). Таким чином, детектор ідентифікував кислоту. Так, АФІ визначався в формі кислоти.

*Термічна деградація.* Тепловий вплив (66°C) на 0,1% розчин АФІ призводить до його розкладання приблизно на 0,4% протягом 5 днів (рис. 22). Однак істотні продукти деградації не визначені. У той же час під впливом температури (66°C) на 1%-ний розчин відбувається розпад лише близько 0,1% АФІ. Під час дослідження теплового впливу (66°C) на субстанцію (АФІ), вміст АФІ в речовині не змінювався.

*Окислювальна деградація.* Вплив 3% гідроген пероксиду протягом 6 днів призводить до зниження концентрації АФІ приблизно в 2 рази.

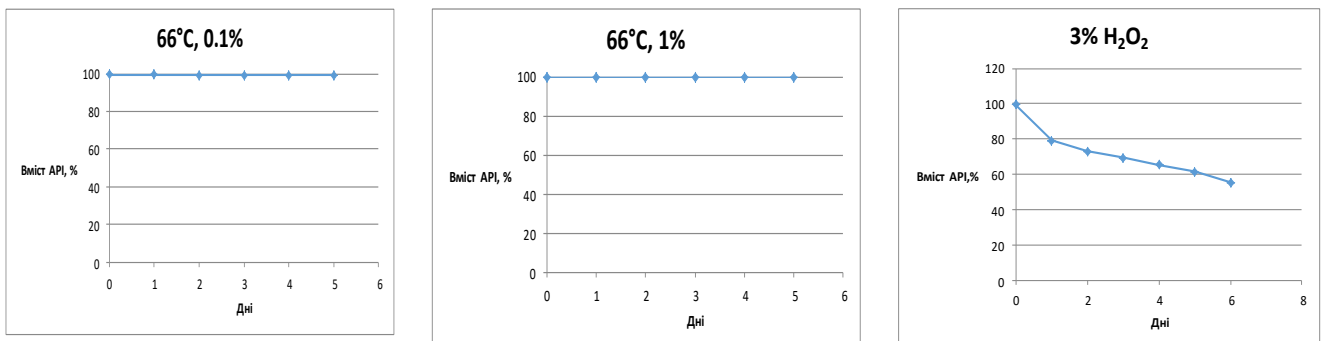


Рис. 22. Криві деградації АФІ в 0,1%, 1% розчині при температурі 66°C та деградації АФІ під дією 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Ультрафіолетова (УФ) деградація.* Ультрафіолетове випромінювання спричиняє розпад 0,1% розчину протягом чотирьох днів більш ніж на 40% (рис. 23). У той же час для 1% розчину концентрація знижувалася приблизно на 20% (рис. 23). Вміст АФІ не змінювався під час опромінення субстанції протягом 4 днів.

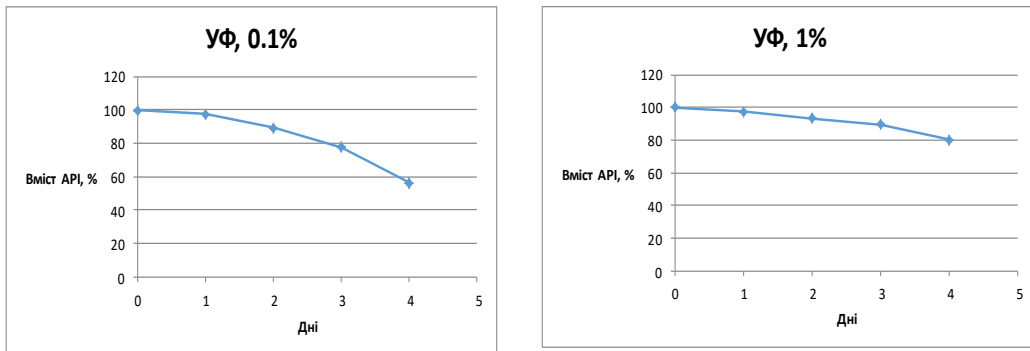


Рис. 23. Криві деградації АФІ в 0,1% розчині та в 1% розчині при дії УФ-випромінення

*Кислотний гідроліз.* Під дією 0,1 М розчину кислоти хлоридної 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.

*Визначення структури продуктів розпаду АФІ, утворених під дією 3% гідроген пероксиду.*

На хроматограмі продуктів розпаду після дії 3%  $H_2O_2$  спостерігаються два піки (рис. 24).

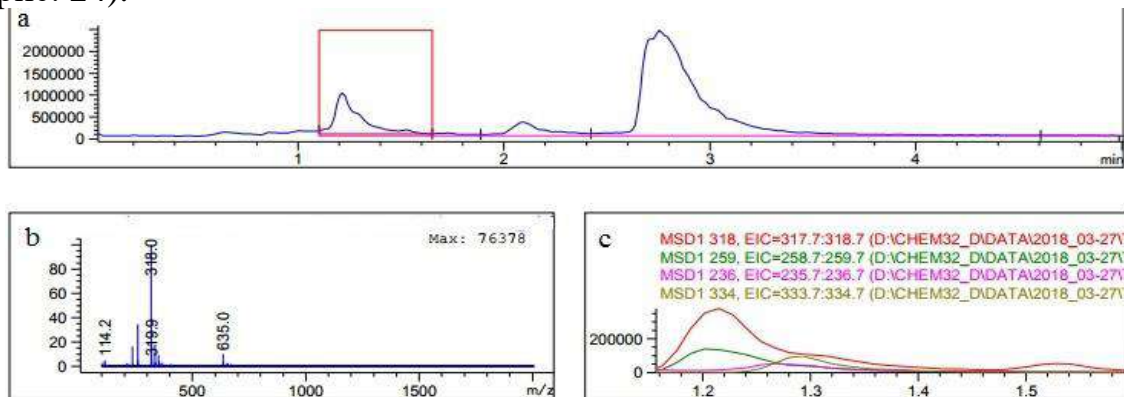


Рис. 24. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених під дією 3%  $H_2O_2$  при 150 В (а). Мас-спектр піку при 1,221 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

Перший пік (за 1,219 хв) не був чистим. Найбільш інтенсивний пік вилученої іонної хроматограми (ЕІС) мав  $m/z=318$ . Він відповідав сульфоксиду (рис. 25).

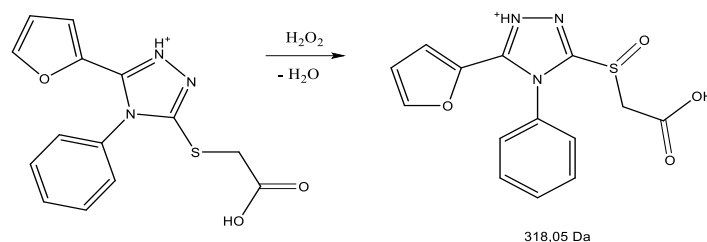


Рис. 25. Утворення 3-[(карбоксиметил)сульфініл]-5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4H-1,2,4-тріазол-1-ій катіону ( $m/z=318$ )

При збільшенні напруги фрагментації до 200 В з'явився іон з  $m/z$  259 в мас-спектрах першого піку (рис. 26).

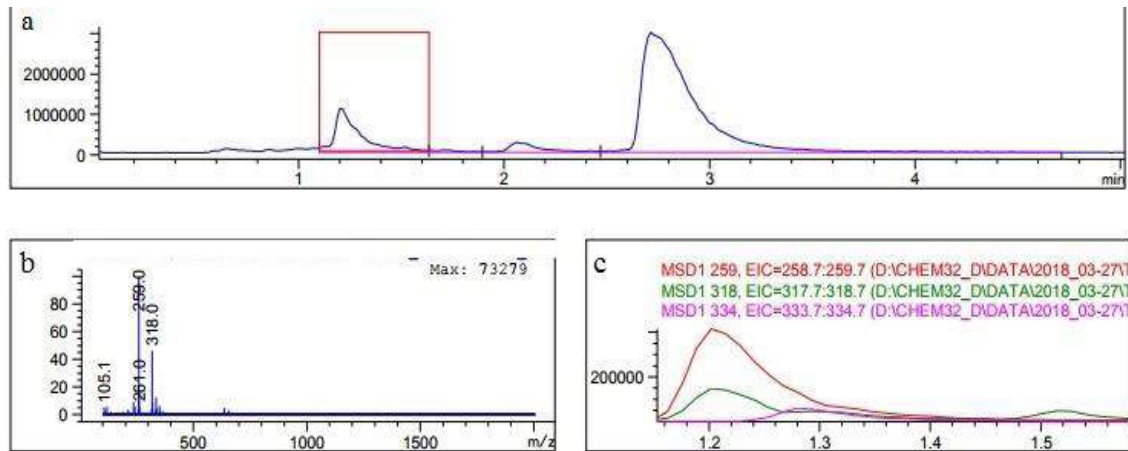


Рис. 26. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених під дією 3%  $H_2O_2$  при 200 В (а). Мас-спектр піку при 1,217 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)

Можлива структура цього іона представлена на рис. 27.

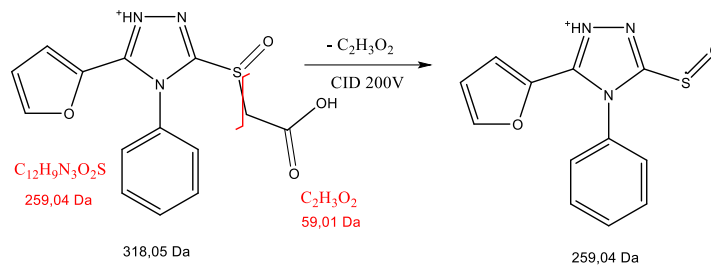


Рис. 27. Схема трансформації катіона з  $m/z$  318 під час фрагментації в CID при 200В

Другий пік продукту деструкції був на 2,140 хв (рис. 28).

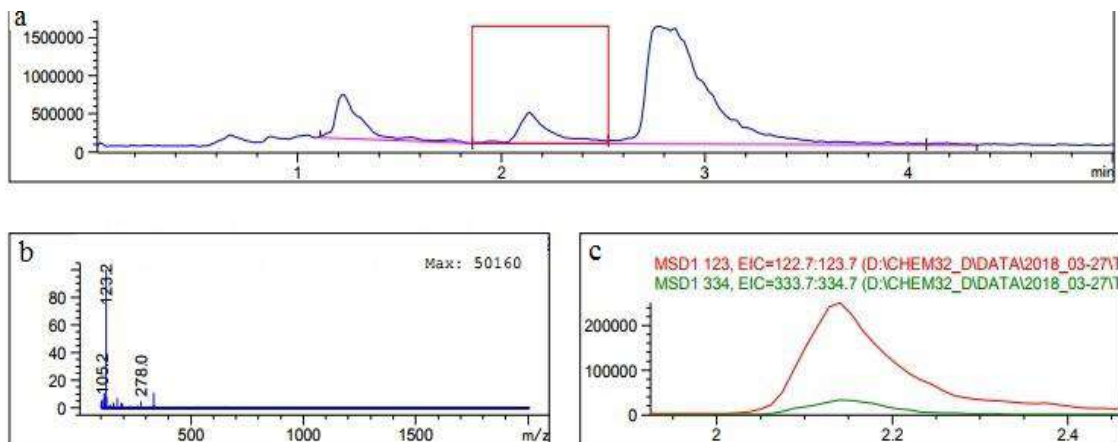


Рис. 28. Хроматограма ТІС продуктів розпаду АФІ, утворених дією 3%  $H_2O_2$  при 100 В (а). Мас-спектр піку при 2,140 хв (б). ЕІС-хроматограма (с)



Квазімолекулярний іон з  $m/z=334$ , що спостерігався в мас-спектрі піку при 2,140 хв (рис. 28), відповідає сульфону, який утворився на другому етапі окислення (рис. 29).

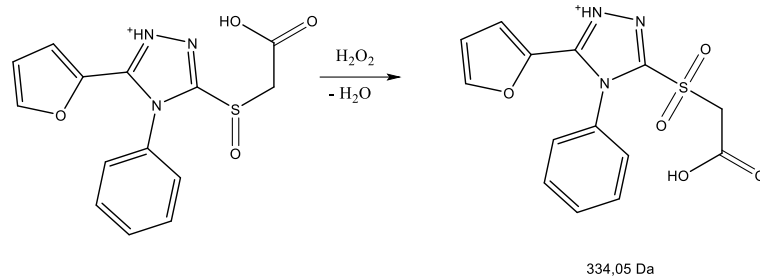


Рис. 29. Схема утворення катіону 3-[(карбоксиметил)сульфоніл]-5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазолію ( $m/z = 334$ )

Узагальнюючи результати дослідження: вивчено вплив різних факторів на морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетат (тіометрізол), а також на піперидиній 2-((5-(фуран-2-іл)-4-феніл-4*H*-1,2,4-тріазол)-3-іл)ацетат (трифузол) в субстанції, 0,1% та 1% розчинах. Досліджено залежність вмісту АФІ від кількості днів впливу факторів. Встановлено, що найбільш руйнівну дію мають  $H_2O_2$  та УФ-випромінювання. Запропонована структура продуктів деградації.

### **Обґрунтування розробки методики та дослідження фармакокінетики і метаболізму морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату (тіометрізолу) в плазмі крові щурів**

Для вивчення фармакокінетики і метаболізму в плазмі крові при внутрішньочеревинному уведенні засобу було запропоновано використовувати гідрофільну хроматографію, оскільки метаболіти зазвичай мають більш гідрофільну природу ніж вихідні речовини, 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  $HCOONH_4$ . У цьому випадку на відміну від зворотньофазової хроматографії в утримуванні аналітів можуть відігравати важливу роль сіланольні групи і, таким чином, полярні аналіти можуть краще утримуватись на колонці за рахунок іон-дипольних, диполь-дипольних або водневих зв'язків.

Пробопідготовку здійснювали згідно із запропонованою схемою (рис. 30).

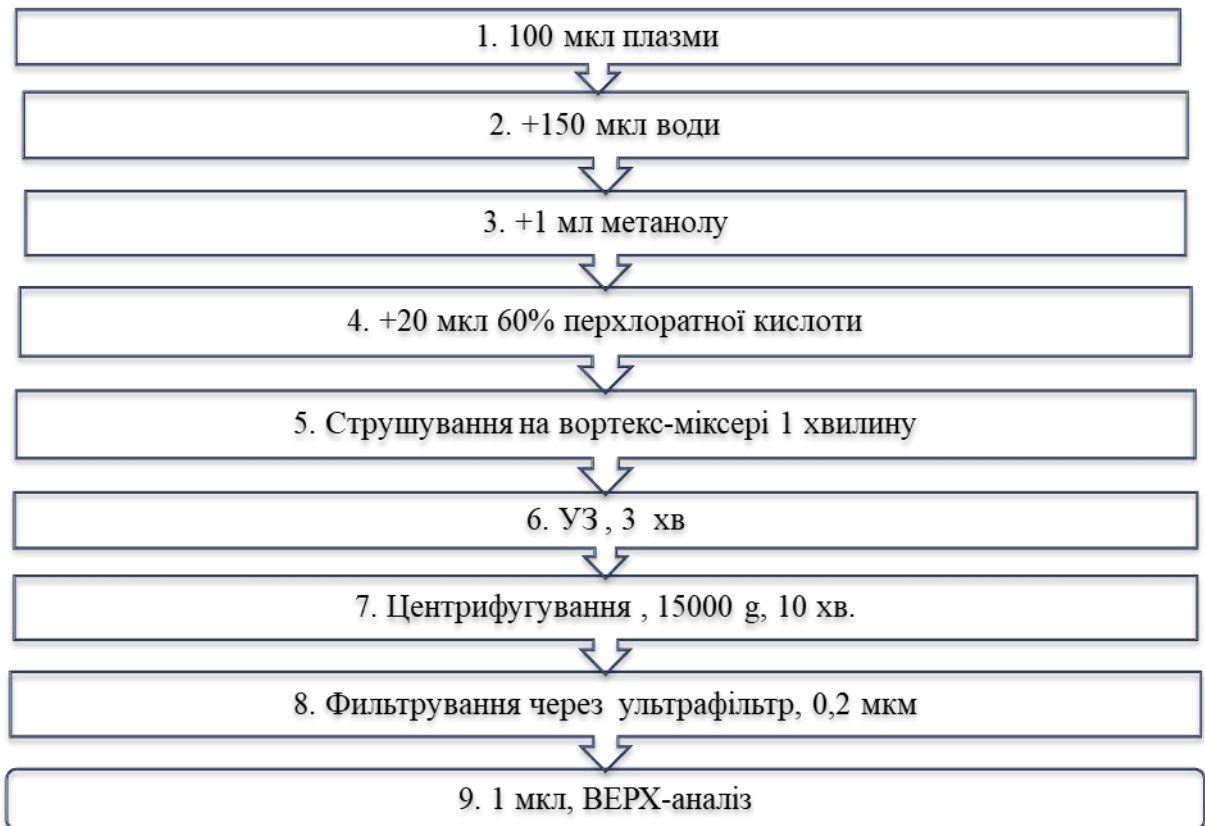


Рис. 30. Процедура підготовки зразків плазми крові при визначенні морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату

*Оптимізація умов пробопідготовки.* Для підготовки зразків плазми крові для аналізу за допомогою рідинної хроматографії із мас-спектрометричним детектуванням найчастіше використовують осадження білків. Як осаджувач тестували чотири різних розчинники: ацетонітрил, метанол, пропан-2-ол та диметилсульфоксид. Як критерій їх ефективності використовували ступінь екстракції. Для розрахунку ступеню 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. 31, при цьому з аналізу даних можна зробити висновок, що найбільший ступінь вилучення показує метанол, який було обрано як розчинник для осадження білків. Для підвищення ступеню осадження білків до метанольної фази також було додано 20 мкл 60% кислоти хлорної.

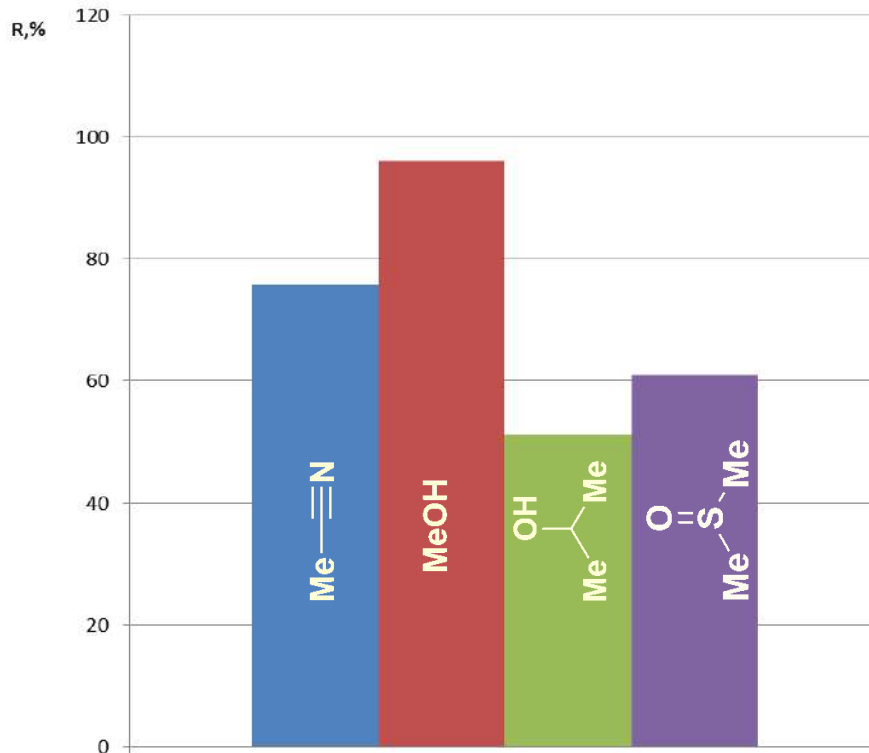


Рис. 31. Діаграма ступеня вилучення АФІ із зразків плазми крові для різних осаджувальних розчинників

*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. Хроматографували кожний зразок плазми крові тричі через 5, 15, 45 хв, 2,5, 7,5 год після уведення. Відповідні хроматограми наведені на рис. 32-36.

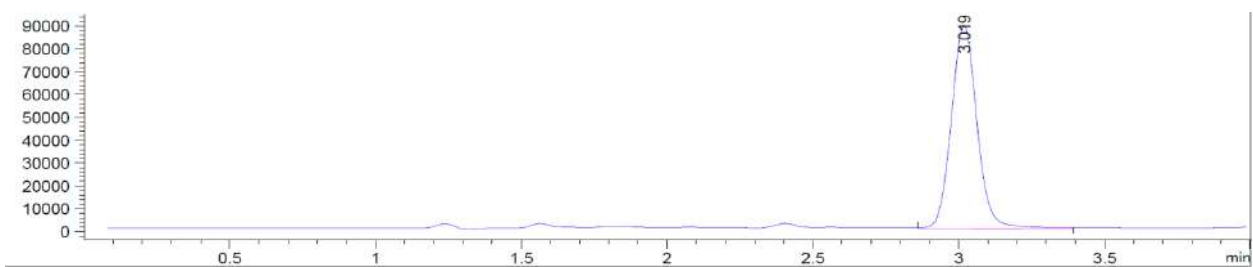


Рис. 32. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 5 хв

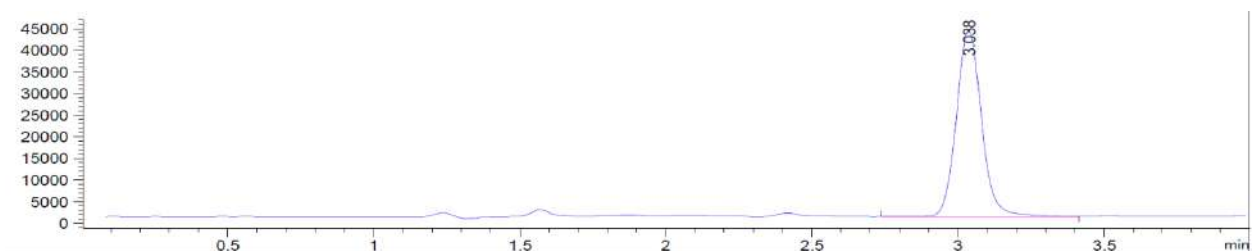


Рис. 33. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 15 хв

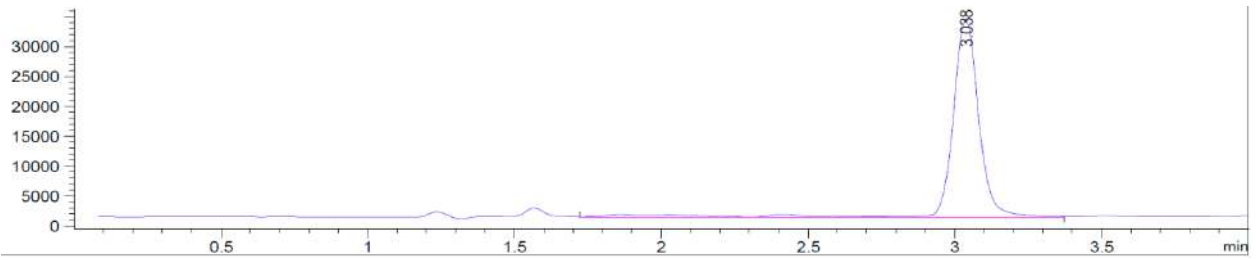


Рис. 34. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 45 хв

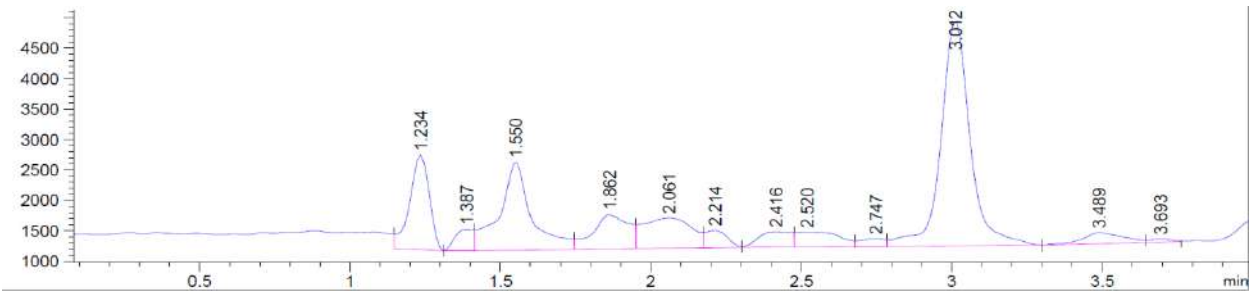


Рис. 35. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 2,5 год

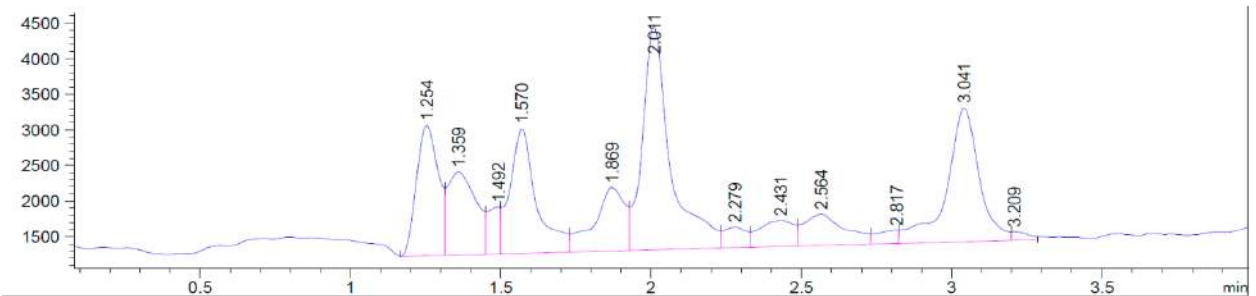


Рис. 36. Хроматограма екстрагованого зразка плазми крові через 7,5 год

Вміст морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату в плазмі крові розраховували за рівнянням калібрувального графіку (рис. 37).

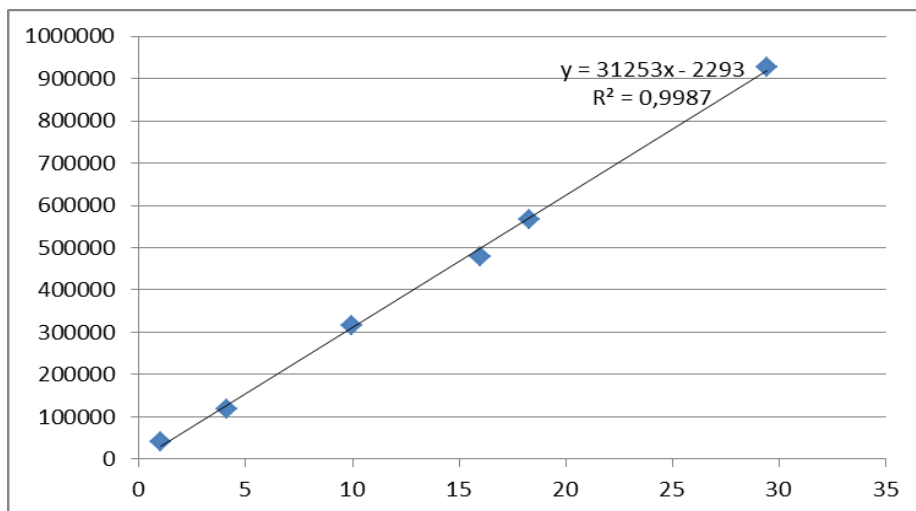


Рис. 37. Калібрувальна крива визначення АФІ тіометризолу в плазмі крові

Хроматограму калібрувального розчину з найменшою концентрацією наведено на рис. 38.

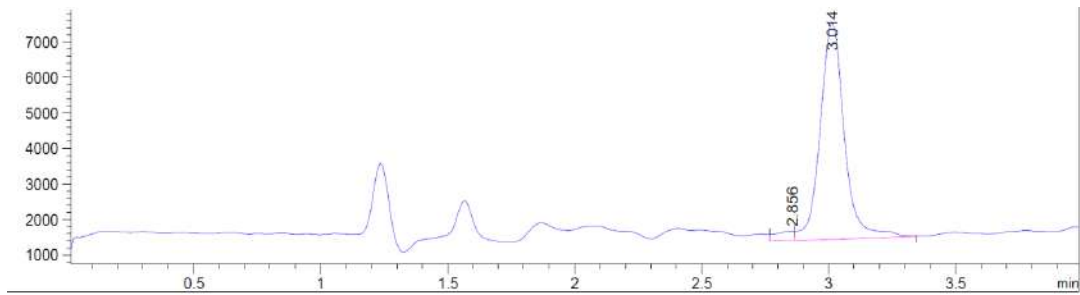


Рис. 38. Хроматограма калібрувального розчину АФІ тіометрізолу з найменшою концентрацією

Фармакокінетична крива залежності концентрації АФІ тіометрізолу в плазмі крові від часу представлена на рис. 39.

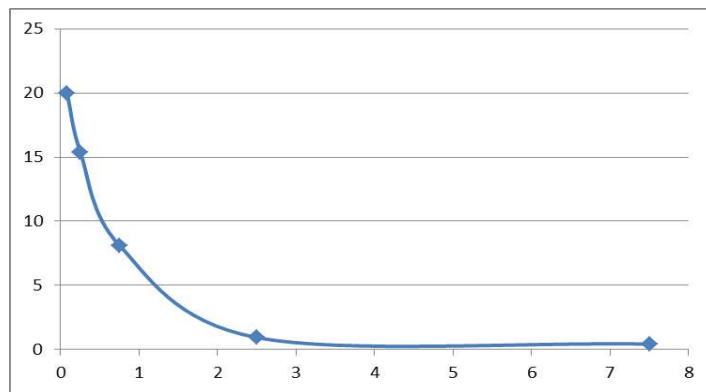


Рис. 39. Фармакокінетична крива залежності концентрації АФІ тіометрізолу в плазмі крові від часу

Метаболізм АФІ тіометрізолу вивчали методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричною детекцією. Пік, що відповідає АФІ, був виявлений за 2,855 хв (рис. 40). Квазімолекулярний іон мав  $m/z$  343.

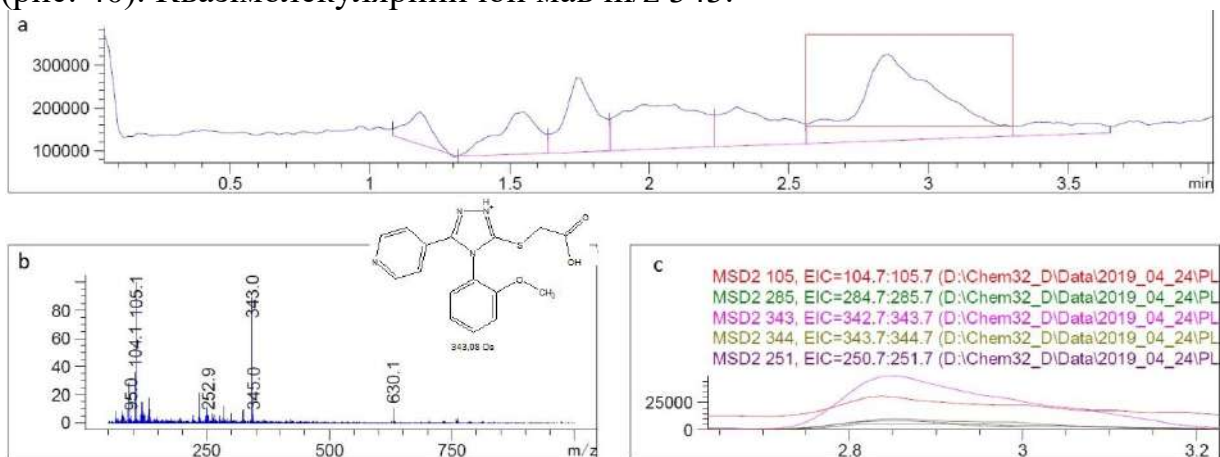


Рис. 40. Хроматограма ТІС продуктів метаболізму АФІ (а). Мас-спектр піку із часом утримування 2,855 хв при напрузі фрагмента 200 В (б). ЕІС-хроматограма (с)

Пік основного метаболіту був виявлений за часом утримування 1,753 хв (рис. 41).

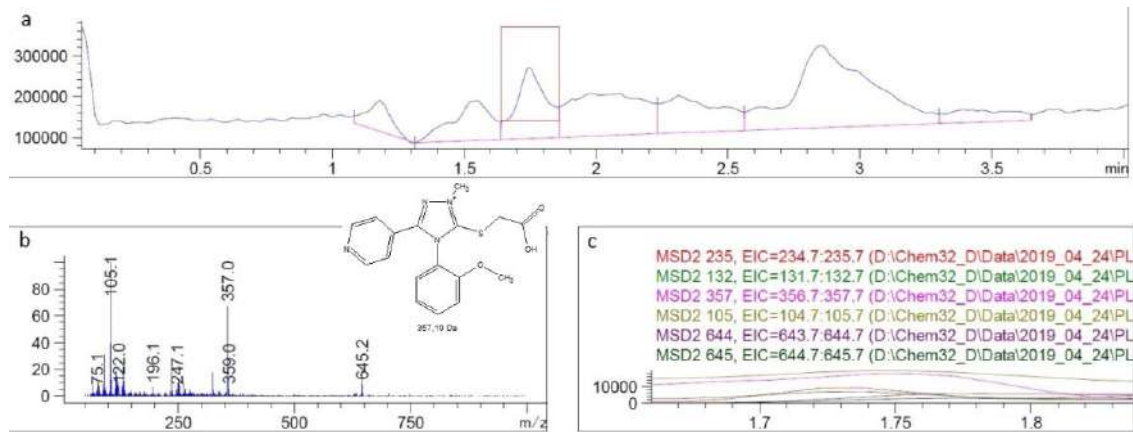


Рис. 41. Хроматограма ТІС продуктів метаболізму АФІ (а). Мас-спектр піку з часом утримування 1,775 хв при напрузі фрагмента 200 В (b). ЕІС-хроматограма (с)

Квазімолекулярний іон основного метаболіту має  $m/z$  357. Моноізотопна маса іона метаболіту дорівнює 357, що на 14 а.о.м. більше за  $(343 + 14 = 357)$  за масу іона АФІ. Це можна пояснити метилюванням 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетату, що супроводжується утворенням 5-((карбоксиметил)тіо)-4-(2-метоксифеніл)-1-метил-3-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-1-ій катіона як основного метаболіту (рис. 42).

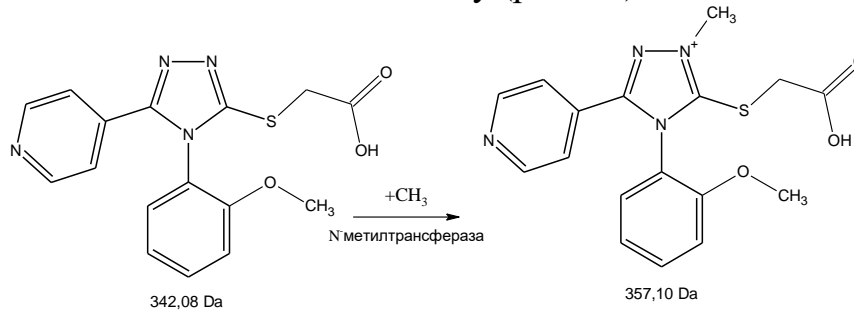


Рис. 42. Схема метилювання 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетатної кислоти АФІ в організмі щурів

## 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 гідразінокарботіоамідів, 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 трифузолу. Запропоновано методики визначення вказаних домішок та АФІ. Розроблена методика визначення АФІ трифузолу 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 трифузолу (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 (трифузолу), 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 ОПУБЛІКОВИНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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. (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-ілтіоацетатних 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. P. 68–72. (Здобувачем



особисто 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 особисто 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 / В. О. 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 особисто проведено розроблення 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 особисто проведено аналіз та узагальнення отриманих даних, 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 особисто 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 особисто проведено розроблення 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. Р. 827–832. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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. С. 153–159. (Здобувач особисто спланував дослідження, провів аналітичне 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. P. 22–33. (Здобувачем особисто проведено експериментальні дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

17. 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.

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. № 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-тріазол-3-іл) тіо)ацетату. *J. Org. Pharm. Chem.* Vol. 18, № 3. С. 49–54.

20. Варинський Б. О. Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-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-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 особисто проведено розроблення 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 особисто проведено розроблення 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-triazolythioacetate acids, the active pharmaceutical ingredients. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018. N 10. P. 303–312. (Здобувачем особисто 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. N 9. P. 2200–2209. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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 особисто 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, N 2. P. 72–75. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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-ілтїо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № u 2017 01062 ; заявл. 06.02.17 ; опубл. 25.02.19, Бюл. № 4. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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-іл)тїо)ацетату / Б. О. Варинський, А. Г. Каплаушенко. № u201807689 ; заявл. 09.07.18 ; опубл. 10.12.18, Бюл. 23. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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-ілтїо)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. (Здобувачем особисто проведено розроблення 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-іл)тїо)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 особисто проведено розроблення та валідацію методик дослідження,

проведено аналіз зразків, аналіз результатів дослідження, підготовано статтю до друку).

32. Ю. М. Кучерявий, І. О. Юрченко, Б. О. Варинський. Синтез та мас-спектрометричне дослідження похідних 5R-4R-1-1,2,4-тріазол-3-тіонів. *Інновації в медицині: тези доповідей 83-й наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю., 27-28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 195.* (Здобувачем особисто 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 : Зб. тез VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів. Х., 2014. С. 126.* (Здобувачем особисто 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 : зб. тез міжнар. наук.-практ. конф. К., 2014. С. 122–123.* (Здобувачем особисто 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. Київська конференція з аналітичної хімії, м. Київ, 7-9 жовт. 2015 р. К., 2015. С. 152.* (Здобувачем особисто проведено пошук та аналіз літературних джерел, планування досліджень, експериментальні дослідження).

36. Б. О. Варинський, Л. Б. Матвієнко, А. А. Гулий. 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: зб. тез доп. Київської Конференції з аналітичної хімії. Київ, 2017. С. 180.* (Здобувачем особисто 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. *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2018 : зб. тез доп. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю. Запоріжжя, 2018. С. 146.* (Здобувачем особисто 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-4H-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)ацетата в стресових умовах. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації - 2019 : зб. тез доп. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю. Запоріжжя, 2019. С. 156.* (Здобувачем особисто 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)-4H-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. Том 1 X. : НФаУ, 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)-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. Тернопіль, 2020. С. 4. (Здобувачем особисто проведено хроматографічні дослідження, приймав участь в підготовці тез).

41. 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 вер. 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 16. (Здобувачем особисто проведено розрахунки енергій зв'язків, написання тез).

42. 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* : матеріали VIII наук.-практ. конф. школи молодих науковців АТ «Фармак» 19 листоп. 2020 р. м. Київ. К., С. 2.

43. Визначення активного фармацевтичного інгредієнту, піперидиній {[5-(2-фуран)-4-феніл-4H-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 особисто проведено розроблення та валідацію методик дослідження, аналіз результатів дослідження, підготовано методичні рекомендації до друку).

## 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, Запоріжжя, 2021.

Дисертаційна робота присвячена науково-теоретичному обґрунтуванню та випробовуванню підходів стосовно розроблення біоаналітичних (фармакокінетики, метаболізму, визначення залишкових кількостей) та аналітичних методик визначення низки похідних 3-тіо-1,2,4-тріазолу (стандартизації потенційних АФІ) за допомогою ВЕРХ-ДМД та ВЕРХ-МС

методів у субстанціях та лікарських засобах, валідації цих методик, а відтак застосуванню їх.

Встановлено оптимальні умови роботи ЕСІ. З'ясовані закономірності хроматографічного утримування. Запропоновані оптимальні умови розділення. Запропоновано схеми ВЕРХ-МС фрагментації сполук.

Розроблені, провалідовані та випробувані методики визначення АФІ, а також технологічних домішок напівпродуктів у субстанціях, в розчині для ін'єкцій, залишкових кількостей АФІ в біологічному матеріалі. Досліджена примусова деградація АФІ. Розроблена методика визначення АФІ та вивчені фармакокінетика та метаболізм в плазмі крові щурів.

Наукова новизна результатів обґрунтована патентами. Практична значимість підтверджена методрекоме́ндаціями МОЗ України, впровадженням методик в роботу 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.

## АННОТАЦИЯ

**Варинский Б. А. Хроматографическое и масс-спектрометрическое определение активных фармацевтических ингредиентов – производных 3-тио-1,2,4-триазола в лекарственных средствах и биологических объектах. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» (226 – Фармация, промышленная фармация). – Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, 2021.

Диссертация посвящена научно-теоретическому обоснованию и испытанию подходов по разработке биоаналитических (фармакокинетики, метаболизма, определения остаточных количеств) и аналитических методик определения ряда производных 3-тио-1,2,4-триазола (стандартизации потенциальных АФИ) с помощью ВЭЖХ-ДМД и ВЭЖХ-МС методов в субстанциях и лекарственных средствах, валидации этих методик, а затем применению их.

Установлены оптимальные условия работы ЭСИ. Выявлены закономерности хроматографического удерживания. Предложены оптимальные условия разделения. Предложены схемы ВЭЖХ-МС фрагментации соединений.

Разработаны, провалидированы и испытаны методики определения АФИ, а также технологических примесей полупродуктов в субстанциях, в растворе для инъекций, остаточных количеств АФИ в биологическом материале. Исследована принудительная деградация АФИ. Разработана методика определения АФИ и изучены фармакокінетика и метаболізм в плазме крови крыс.

Научная новизна обоснована патентами. Практическая значимость подтверждена методрекоме́ндаціями МЗ Украины, внедрением методик в работу

лабораторий фармацевтических и научно-производственных предприятий, внедрением разработанных подходов в научно-педагогический процесс высших учебных заведений Украины.

## 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 manuscripts.**

Thesis for the Degree of Doctor of Pharmacy, speciality 15.00.02 «Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy» (226 – Pharmacy, industrial pharmacy). – Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, 2021.

The dissertation is devoted to scientific and theoretical substantiation, elaboration and test 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) using HPLC-DMD and HPLC-MS methods in substances and drugs, validation of methods, and then apply them. 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 цшеp DAD and single-quadrupole MSD Agilent 6120 with ESI, Open LAB CDS Software were used. Zorbax SB-C18 column; 30 mm × 4.6 mm; 1.8 μm and Agilent Zorbax Rx-SIL column (4.6 × 50 mm, 1.8 μm) were used.

The dependences of the mass detector signal intensity on the ion source operating factors 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 the chromatographic content of 3-thio-1,2,4-triazole derivatives and their intermediates on the content of the organic modifier are given. 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 and avestim.

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.

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 results of the determination in samples of 1% solution of trifuzol for injection are given. 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 in blood plasma. The pharmacokinetic characteristics and metabolism 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 study of forced degradation of piperidinium 2-((5-(furan-2-yl)-4-phenyl-4*H*-1,2,4-triazol)-3-yl) acetate and morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetate.

A pharmacopoeial standard sample of 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4*H*-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 of Ukraine, 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 am

#### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
МСД	– мас-спектрометричний детектор;
ПА-МС	– проточно-інжекційний аналіз;
СІД	– Collision Induced Dissociation (дисоція, що викликана зіткненнями);
ВЕРХ-ЕСІ-МС	– вискоефективна рідинна хроматографія із мас-спектрометричною детекцією в електроспреї;
ВЕРХ-ДМД	– вискоефективна рідинна хроматографія із діодно-матричною детекцією;
т.т.	– теоретичні тарелки;
RSD	– relative standard deviation (відносне стандартне відхилення);
СЗ	– стандартний зразок;
ФСЗ	– фармакопейний стандартний зразок;
ЕІС-хроматограма	– хроматограма по виділеному іону;
ТІС-хроматограма	– хроматограма по повному іонному току.